

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Caroline Torres de Oliveira

**PRODUÇÃO, CONCENTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
CUTINASE MICROBIANA**

Santa Maria, RS
2018

Caroline Torres de Oliveira

PRODUÇÃO, CONCENTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CUTINASE MICROBIANA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientador: Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS
2018

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

de Oliveira, Caroline Torres
Produção, concentração e caracterização de cutinase
microbiana / Caroline Torres de Oliveira.- 2018.
67 p.; 30 cm

Orientador: Marcio Antonio Mazutti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, RS, 2018

1. Bioprocessos 2. Produção de Enzimas 3.
Microorganismos 4. Fermentação em Estado Sólido 5.
Concentração de Enzimas I. Mazutti, Marcio Antonio II.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Caroline Torres de Oliveira

PRODUÇÃO, CONCENTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CUTINASE

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**.

Aprovado em 16 de fevereiro de 2018:

Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Débora de Oliveira, Dra. (UFSC)

Monica Beatriz Alvarado Soares, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Conforme Maurice Halbwachs, nossas lembranças são coletivas, porque nunca estamos sozinhos. E esses dois anos foram cheios de pessoas especiais que de uma forma ou de outra colaboraram nesta construção.

Agradeço especialmente à minha família, principalmente meus pais e meu irmão! Obrigada por acreditarem em mim e por não terem medido esforços para que eu chegasse ao fim dessa etapa.

Aos meus amigos, sou extremamente grata pela amizade e companheirismo! Obrigada por todos os conselhos, pelos risos e momentos de descontração. Vocês foram e continuarão sendo fundamentais para mim!

Agradeço ao professor Marcio Antonio Mazutti pela orientação, apoio, paciência, compreensão, incentivo e conhecimento transmitido.

Obrigada aos amigos do Setor de Virologia, vocês são muito importantes e especiais para mim.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica Toxicológica, muito obrigada pela ajuda!

Obrigada aos colegas do Departamento de Engenharia Química que de alguma forma participaram dessa conquista.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a todos os professores e demais funcionários pelo apoio.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Ministério da Educação) pelo suporte financeiro.

Agradeço também à Assistência Estudantil da Universidade Federal de Santa Maria, foi fundamental.

*“Não há uma pegada do meu caminho
que não passe pelo caminho do outro.”*

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

PRODUÇÃO, CONCENTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CUTINASE MICROBIANA

AUTOR: Caroline Torres de Oliveira
ORIENTADOR: Marcio Antonio Mazutti

O uso de subprodutos agroindustriais é uma alternativa interessante para a produção de cutinase por fermentação em estado sólido a partir de um processo de baixo custo para aplicação industrial viável desta enzima. Neste sentido, avaliou-se a produção utilizando diferentes substratos e espécies fúngicas do gênero *Fusarium*. Após a escolha do microorganismo e do substrato principal, variáveis do processo foram estudadas visando a maximização da produção de cutinase. Foi apresentada uma estratégia para maximizar a produção de cutinase por fermentação em estado sólido de diferentes microorganismos e substratos. Os melhores resultados foram observados usando *Fusarium verticillioides*, tendo o farelo de arroz como substrato principal. A produção máxima de cutinase foi de 16,22 U / g a 28 ° C, teor de umidade de 50% (p/p), 2,5% (p/p) de água de maceração de milho, 2,5% (p/p) de farelo de soja e 15% em peso de inóculo após 10 dias de fermentação. Em seguida essa enzima foi submetida a um processo de concentração por precipitação utilizando etanol como agente precipitante. A utilização desse agente é considerada economicamente viável e pode ser uma alternativa para a obtenção de um produto final com valor mais acessível. Os ensaios obtiveram melhores resultados com menor concentração de etanol (10%), chegando a um Fator de Concentração de 2,4. A enzima concentrada apresentou melhor atividade a temperatura e pH ótimos de 35 ° C e pH 6,5, respectivamente. A estabilidade da mesma foi maior a temperaturas mais baixas (20 e 30 ° C) e principalmente na temperatura de armazenamento (5 ° C). Quando submetida a temperaturas de 40, 50 e 60 ° C perdeu-se atividade mais rapidamente. Em relação ao pH da reação a cutinase mostrou-se estável em toda a faixa de pH testada (5 a 8) considerando uma temperatura de 30 ° C.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido. Atividade de cutinase. *Fusarium verticillioides*. Precipitação com etanol.

ABSTRACT

PRODUCTION, CONCENTRATION AND CHARACTERIZATION OF MICROBIAL CUTINASE

AUTHOR: Caroline Torres de Oliveira
ADVISOR: Marcio Antonio Mazutti

The use of agroindustrial by-products is an interesting alternative for the production of cutinase by solid-state fermentation from a low cost process for viable industrial application of this enzyme. For this purpose, the production was evaluated using different substrates and fungal species of genera *Fusarium*. After the choice of the microorganism and the main substrate, process variables were studied aiming the maximization of cutinase production. A strategy was presented to maximize cutinase production by solid-state fermentation of different microorganisms and substrates. The best results were observed using *Fusarium verticillioides*, rice bran being the main substrate. The maximum cutinase production was 16.22 U / g at 28 ° C, 50% moisture content by weight, 2.5% by weight corn steep liquor, 2.5% by weight soybean meal and 15% by weight of inoculum after 10 days of fermentation. This enzyme was then subjected to concentration by means of a precipitation process using ethanol as the precipitating agent. The use of this agent is considered economically feasible and may be an alternative to obtain a more affordable end product. The assays that obtained better results were those with lower concentration of ethanol (10 %), reaching a concentration factor of 2.4. The concentrated enzyme presented optimum activity at pH and temperature of 35 ° C and pH 6.5, respectively. Stability was higher at lower temperatures (20 and 30 °C) and especially at storage temperature (5 °C). When subjected to temperatures of 40, 50 and 60 ° C, activity was lost more rapidly. Regarding the cutinase reaction pH was stable over the entire pH range tested (5 to 8) at a temperature of 30 °C.

Keywords: Solid-state fermentation. Cutinase activity. *Fusarium verticillioides*. Ethanol precipitation.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 3

- Figure 1: Cutinase production by fungal strains in different substrates after 12 days of fermentation.....29
- Figure 2: Cutinase activity of the *Fusarium verticillioides* strain at different fermentation times in the presence of rice bran substrate.....30

Capítulo 4

- Figura 1: Superfície de contorno para atividade de cutinase.....47
- Figura 2: (A) Atividade residual (%) da cutinase concentrada após pré-incubação em temperaturas de 20 °C (◆), 30 °C (■), 40 °C (▲), 50 °C (×) e 60 °C (*), pH 6,5. (B) Atividade residual (%) da cutinase concentrada após pré-incubação à temperatura de 5 °C (◆), pH 6,5.....48
- Figura 3: Atividade residual (%) da cutinase concentrada após pré-incubação em pH 5 (◆), pH 6 (■), pH 7 (▲) e pH 8 (×), temperatura de 30 °C.....49

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Table 1: Plackett-Burman matrix (real and coded values) for cutinase production.....	32
Table 2: Effects found in Plackett-Burman planning for cutinase activity.....	33
Table 3: Real and coded combinations and values for DCCR for optimization of cutinase production.....	34
Table 4: Linear (L), quadratic (Q) and of interaction effects among variables of the CCRD to the enzyme production.....	35

Capítulo 4

Tabela 1: Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) e as respostas em termos de atividade específica e fator de purificação.....	44
Tabela 2: Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) e as respostas em termos de atividade enzimática.....	46
Tabela 3: Parâmetros de inativação térmica da cutinase.....	50

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	12
1.1	INTRODUÇÃO	12
1.2	OBJETIVOS	13
1.2.1	Objetivo Geral	13
1.2.2	Objetivos Específicos	13
2	CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	15
2.2	CUTINASE.....	16
2.3	APLICAÇÕES PARA CUTINASE	17
2.4	PRODUÇÃO DE CUTINASES	19
2.5	CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS	21
2.6	CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	23
3	CAPÍTULO 3 – SCREENING OF SUBSTRATES, MICROORGANISMS AND OPERATIONAL VARIABLES FOR MAXIMIZATION OF CUTINASE PRODUCTION BY SOLID-STATE FERMENTATION	24
3.1	ABSTRACT	24
3.2	INTRODUCTION	24
3.3	MATERIALS AND METHODS	26
3.3.1	Substrates and others chemicals	26
3.3.2	Microorganisms and inoculum	26
3.3.3	Solid-state fermentation	27
3.3.4	Enzyme extraction	27
3.3.5	Determination of cutinase activity	28
3.3.6	Statistical analysis of results	28
3.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	28
3.4.1	Screening of microorganism and substrate	28
3.4.2	Screening of operational variables	30
3.5	CONCLUSIONS	35
3.6	REFERENCES	36

4	CAPÍTULO 4 – CONCENTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CUTINASE PRODUZIDA POR <i>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</i>	39
4.1	RESUMO.....	39
4.2	INTRODUÇÃO.....	39
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.3.1	Produção de cutinase por <i>Fusarium verticillioides</i>	41
4.3.2	Precipitação com etanol.....	41
4.3.3	Determinação de temperatura e pH ótimos.....	42
4.3.4	Estabilidade térmica.....	42
4.3.5	Estabilidade de pH.....	43
4.3.6	Métodos analíticos.....	43
4.3.6.1	Atividade enzimática.....	43
4.3.6.2	Determinação de proteína total.....	43
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.4.1	Precipitação com etanol.....	43
4.4.2	Determinação de temperatura e pH ótimos.....	45
4.4.3	Estabilidade térmica e ao pH.....	47
4.5	CONCLUSÕES.....	50
4.6	REFERÊNCIAS.....	51
5	CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO GERAL.....	54
6	CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	56
6.1	CONCLUSÕES GERAIS.....	56
6.2	PERSPECTIVAS.....	56
7	CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO 1.....	66
	ANEXO 2.....	67

1 CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

Processos biotecnológicos podem ser aplicados nas mais diversas áreas do conhecimento, incluindo agroindústria e meio ambiente. Produtos de origem microbiana são utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica, química bem como na produção de bioherbicidas (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000, PANDEY, 2003).

Biomoléculas microbianas são usualmente produzidas por fermentação submersa ou fermentação em estado sólido. A fermentação em estado sólido é uma excelente alternativa para o desperdício de resíduos agroindustriais. Esses resíduos podem ser aplicados como fonte de nutrientes ou suporte físico para fermentações em estado sólido (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000, SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003, DI LUCCIO et al., 2004). Além do reaproveitamento o uso desses subprodutos pode resultar em vantagens como o baixo custo do processo (HOLKER; HOFER; LENZ. 2004; VINIEGRA-GONZALEZ et al., 2003; RODRIGUEZ et al., 2006) tornando esse tipo de fermentação uma opção viável para a produção de metabólitos secundários (FRAGA et al., 2012).

As cutinases (EC 3.1.1.74) estão entre as enzimas microbianas que atraíram a atenção dos pesquisadores. São enzimas multifuncionais capazes de degradar cutina, um componente estrutural das plantas (CHEN et al., 2013). Características como estabilidade, atividade em solventes orgânicos, capacidade para catalisar reações de hidrólise e reações sintéticas estão entre os atrativos dessa enzima (KUMARI et al., 2016).

Considerando o contexto das pesquisas realizadas pelo grupo Biotec Factory no que se refere ao desenvolvimento de bioherbicidas a produção de cutinase é de grande interesse. A importância dessa enzima está relacionada a sua capacidade em degradar o polímero da superfície das plantas e facilitar o acesso de bioherbicidas (KOLATTUKUDY; POULOSE, 1996).

Diversos microrganismos são capazes de produzir cutinase (DUTTA et al., 2009), principalmente fungos patógenos (NYYSOLA et al., 2013). Alguns estudos relatam a produção dessa biomolécula por *Fusarium oxysporum* (PIO; MACEDO, 2007; PIO; MACEDO, 2008) em fermentações submersas. Mas a produção desse mesmo metabólito também pode ser investigada para outros microrganismos selvagens como o *Fusarium verticillioides*, *Fusarium*

acuminatum e *Fusarium equiseti*. Outros tipos de fermentação também podem influenciar na quantidade da enzima obtida, daí o interesse na aplicação da fermentação em estado sólido. No intuito de possibilitar aplicações industriais para a enzima é importante atingir o máximo de produção possível (CHEN et al., 2013). Diante disso alguns fatores como a espécie de microrganismo utilizado, tipos e concentrações de fontes de carbono e nitrogênio, temperatura e teor de umidade da cultura e concentração de oxigênio no meio devem ser avaliados, pois eles têm grande influência na secreção de cutinase (DUTTA et al., 2009; CHEN et al., 2013).

Além de aumentar a produção da enzima via fermentação é importante que essa apresente um certo nível de purificação (PRZYBYCIEN et al., 2004) de acordo com sua aplicação futura. No entanto processos para separação e purificação podem resultar em custo elevado. Nesse sentido o processo de precipitação pode ser uma alternativa interessante para a etapa de isolamento e concentração de enzimas (BOERIS et al. 2009, SOARES et al., 2012; GOLUNSKI et al., 2017). Além da simplicidade e facilidade de ampliação dos equipamentos a técnica de precipitação permite a utilização de diferentes precipitantes, isso possibilita a aplicação de agentes de baixo custo e de fácil obtenção.

Outra etapa importante para que se possa considerar a aplicação industrial de uma enzima é a sua caracterização. Variações de temperatura e pH podem influenciar na sua atividade, daí a importância em conhecer sua temperatura e pH ótimos de atuação. Além disso também é interessante avaliar a estabilidade da enzima.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a produção e concentração parcial de cutinase a partir de diferentes subprodutos agroindustriais e diferentes microrganismos do gênero *Fusarium* utilizando fermentação em estado sólido.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a produção de cutinase pelos microrganismos *Fusarium acuminatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium equiseti* e *Fusarium oxysporum*

- b) Avaliar a produção de cutinase a partir de diferentes substratos como arroz, farelo de arroz e resíduo de malte.
- c) Otimizar a produção de cutinase no que se refere características do meio, temperatura e umidade para produção.
- d) Concentrar a cutinase produzida por precipitação com etanol.
- e) Caracterizar a cutinase quanto a temperatura e pH ótimos
- f) Caracterizar a cutinase quanto a estabilidade a temperatura e ao pH.

2 CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Os processos biotecnológicos têm sido aplicados nas mais diversas áreas do conhecimento, incluindo agroindústria e meio ambiente. A melhoria na produção associada a processos mais limpos, com menor geração de resíduos tem sido valorizada em diversos setores produtivos (ANDRADE; MARINHO; KIPERSTOK, 2001), o que resulta em uma ampla aplicabilidade industrial de processos biotecnológicos (BULL; WARD; GOODFELLOW, 2000).

Algumas vantagens como o consumo reduzido de energia, menor emissão de gases de efeito estufa e diminuição da geração de resíduos tem motivado a utilização de células vivas e/ou suas enzimas para o desenvolvimento de processos e produtos químicos, materiais e combustíveis (TANG; ZHAO, 2009). Diante disso a biotecnologia tem sido considerada uma tecnologia-chave, capaz de fornecer novas oportunidades para a produção sustentável no setor industrial (GAVRILESCU; CHISTI, 2005). Uma fonte interessante para obtenção de produtos biotecnológicos são os microrganismos uma vez que a diversidade genética e metabólica desses favorece tal obtenção (FALEIRO; ANDRADE; REIS JÚNIOR, 2011). Conhecimentos sobre a diversidade microbiana contribuem para a compreensão das atribuições dessas comunidades nos ambientes terrestres e suas interações com outros componentes (CANHOS; MANFIO, 2001). A descoberta de microrganismos passíveis de aplicação em processos biotecnológicos pode implicar em inúmeros benefícios econômicos e estratégicos que incluem inovação na obtenção de produtos químicos, enzimas, antibióticos, polímeros para aplicação industrial e tecnológica, processos de biolixiviação e recuperação de minérios e de biorremediação de poluentes (CANHOS; MANFIO, 2001).

A biocatálise é um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para obtenção de produtos de alto valor agregado (CARVALHO et al., 2005). As técnicas tradicionais de descoberta de novas enzimas para aplicação em processos de biocatálise em escala industrial envolvem a seleção de microrganismos, plantas ou células animais (DEMIRJIAN; SHAH; MORIS-VAS, 1999). Notoriamente os microrganismos são de especial interesse para nesse caso. Isso se deve a grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas bem como o número virtualmente ilimitado de microrganismos que podem ser testados (CARVALHO et al., 2005).

Inúmeras enzimas que se adequam à utilização em processos industriais já foram descobertas, e muitas pesquisas ainda são desenvolvidas nesse sentido. Para a aplicação dessas é necessário projetar e otimizar o desempenho da enzima no que se refere à sua atividade, seletividade, termoestabilidade para que o processo enzimático se torne comercialmente viável (LUETZ; GIVER; LALONDE, 2008).

A inovação biotecnológica na área de enzimas e o desenvolvimento de processos fermentativos trazem perspectivas interessantes para reutilização de resíduos agrícolas (BRAND et al., 2000). A economia brasileira é baseada na agricultura (UENOJO; PASTORE, 2007), setor que produz uma quantidade significativa de resíduos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003), portanto esses podem ser aplicados como insumos em procedimentos de interesse industrial.

Os microrganismos são capazes de crescer diretamente em função de uma única fonte de energia, um substrato específico (PEDROZO et al., 2002). Diante disso resíduos agrícolas surgem com uma potencial aplicação para fonte de carbono em bioprocessos. A partir disso é possível a obtenção de produtos de maior valor agregado, como enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos além de produtos químicos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; MEDEIROS et al., 2000).

2.2 CUTINASE

A cutinase é uma enzima que apresenta capacidade de hidrolisar ligações éster de cutina que é um polímero insolúvel em água e principal componente estrutural da cutícula das plantas (BRECCIA; KROOK; OHLIN, 2003). A cutícula é encontrada nas partes aéreas das plantas e tem a atribuição de protegê-las do meio exterior (TAFOLLA-ARELLANO et al., 2013), sendo considerada a primeira barreira contra agentes patogênicos (DIMAROGONA et al., 2015).

A cutina é uma rede polimérica lipídica insolúvel composta basicamente por ácidos graxos com C16 ou C18, sua estrutura e composição exatas podem variar entre plantas, órgãos e estágios de crescimento (HEREDIA, 2003). No caso de plantas de crescimento lento ocorre uma mistura de ácidos graxos de C16 e C18 como principal constituinte dessa rede polimérica. Já nas de crescimento rápido o predomínio é de ácidos graxos de C16, especialmente dihidroxipalmitato (WALTON; KOLATTUKUDY, 1972).

A cutinase é um dos membros da família das serinas hidrolases, e apresenta uma tríade catalítica composta por serina, histidina e um grupo carboxil (EGMOND; VLIEG, 2000). Pertence também a uma subfamília com aproximadamente 20 membros com base nas sequências de aminoácidos similares (EGMOND; VLIEG, 2000). Segundo Longhi e Cambillau (1999) a cutinase pertence ao grupo das hidrolases de éster carboxílico com capacidade de degradar cutina, hidrolisar triacilgliceróis insolúveis em água bem como inúmeros ésteres simples solúveis em água.

Os diferentes aspectos de sua atividade catalítica sugerem que as cutinases são intermediárias entre esterases e lipases verdadeiras (CARVALHO et al., 1999; PIO; MACEDO, 2009). Mas segundo Carvalho et al. (1999) apesar das cutinases apresentarem atividade lipolítica, elas diferem das lipases clássicas por não exibirem ativação interfacial, ou seja, não necessitam da interface água/óleo para a sua atividade. Segundo Carvalho et al. (1999) e Borreguero et al. (2001) isso ocorre devido à inexistência de uma tampa hidrófoba no sítio catalítico da cutinase, característica presente no caso das lipases. Por outro lado, Melo, Baptista e Cabral. (2003) relatam a existência de uma “mini-tampa” no sítio catalítico de algumas cutinases. Isso indicaria maior semelhança entre cutinases e lipases e não entre cutinases e esterases, além disso esse poderia ser o motivo para a adaptação da cutinase a diferentes solventes (MELO; BAPTISTA; CABRAL, 2003).

2.3 APLICAÇÕES PARA CUTINASE

A cutinase é uma enzima extremamente versátil com potencial para aplicação industrial diversificada (CHEN et al., 2013). Algumas características como estabilidade e atividade na presença de detergentes, proteases e oxidantes bem como sua capacidade de catalisar reações de hidrólise, esterificações e transesterificações, tornam essa enzima industrialmente importante (DUTTA; SEN; VEERANKI et al., 2009). Ela pode ser amplamente utilizada na indústria de alimentos, farmacêutica, de detergentes, têxtil, meio ambiente, agricultura entre outras (CARVALHO et al., 1999; DUTTA; SEN; VEERANKI et al., 2009).

Na indústria de alimentos a cutinase pode ser utilizada no tratamento de secagem de frutas e vegetais (NYSSÖLÄ, 2015). O uso dessa enzima pode atuar no aumento da permeabilidade da água, técnica útil para produção de frutas desidratadas (POULOSE; BOSTON, 1991; DUTTA; SEN; VEERANKI et al., 2009; NYSSÖLÄ, 2015). Essa mesma

técnica pode ser utilizada no fornecimento de edulcorantes, conservantes e estabilizadores em frutas e vegetais (POULOSE; BOSTON, 1991). Além disso a cutinase também pode substituir a lipase utilizada na indústria alimentar para produção de sabores caseiros em produtos de padaria, manteiga, molhos e lanches (NYSSÖLÄ, 2015). A produção de aromas naturais através da síntese de compostos aromáticos utilizando enzimas hidrolíticas no processo de catálise também pode ser aplicada na indústria de alimentos bem como na farmacêutica (PIO et al., 2008).

Essa biomolécula também pode ser utilizada como enzima lipolítica em formulações de detergentes (NYSSÖLÄ, 2015). Sua estabilidade na faixa de temperatura de 20 a 50 °C e na presença de outras enzimas é ideal para aplicação em composições de limpeza (DUTTA; SEN; VEERANKI et al., 2009). Além disso a inclusão de cutinase na formulação desses produtos não ocasiona limitação de uso (KOLATTUKUDY; POULOSE, 1996).

Na indústria têxtil a cutinase pode participar de uma das fases de fabricação de tecido de algodão. Durante o processo produtivo ocorre a etapa de remoção da cutícula da fibra de algodão que tradicionalmente é feito por hidrólise alcalina em alta temperatura (CHEN et al., 2013). Esse processo, além do alto consumo de água e energia, pode provocar danos na fibra do algodão. Daí surge a aplicação da cutinase juntamente com outras enzimas que podem ocasionar melhoras significativas nessa etapa (YAN et al., 2009; CHEN et al., 2013). A mesma biomolécula também pode ser utilizada em outros setores da indústria têxtil como na modificação de fibras sintéticas e tratamento de tecidos de lã (CHEN et al., 2013).

No que se refere às questões ambientais a cutinase já foi sugerida para remediação de solo contaminado por produtos químicos como ftalatos (NYSSÖLÄ, 2015). Esse produto é utilizado principalmente em plásticos e é considerado perigoso (NYSSÖLÄ, 2015). Além disso essa enzima pode ser utilizada na produção de biodiesel na etapa de transesterificação de óleos vegetais e gorduras animais (DUTTA; SEN; VEERANKI et al., 2009). Normalmente liases são aplicadas como catalisadores dessa reação, porém a cutinase mostra-se vantajosa por não precisar de ativação interfacial na hidrólise de triacilglicerol solúvel e emulsionado (MARTINEZ et al., 1992).

Outra utilidade interessante das cutinases é no setor agrícola. As mesmas já foram indicadas para uso em pesticidas e fungicidas (DUTTA; SEN; VEERANKI et al., 2009). Sua aplicação em plantas antes ou juntamente com um agente químico agrícola pode degradar os

polímeros da superfície dessas plantas aumentando o efeito farmacológico do produto aplicado (KOLATTUKUDY; POULOSE, 1996). Conseqüentemente pode permitir a utilização de uma quantidade reduzida de pesticidas e fungicidas (KOLATTUKUDY; POULOSE, 1996).

2.4 PRODUÇÃO DE CUTINASES

Plantas, células animais e microrganismos são os métodos tradicionais para obtenção de enzimas (DEMIRJIAN; SHAH; MORÍS-VARAS, 1999). Na literatura, a produção de cutinase é relatada tanto através de plantas (MAITI; KOLATTUKUDY; SHAYKH, 1979) como de microrganismos (PIO et al., 2008; DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009; DEGANI, 2015). Os principais problemas com as fontes de plantas são em relação ao cultivo, manutenção e isolamento da enzima em larga escala que é mais complicado (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009). Enquanto isso, existe uma quantidade numerosa de microrganismos na natureza que podem ser testados para produção de enzimas (CARVALHO et al., 2005). Os microrganismos capazes de produzir cutinase incluem fungos, bactérias e actinomicetos (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009).

Diversos estudos relatam a produção de cutinase por espécies bacterianas como *Streptomyces scabies* (LIN; KOLATTUKUDY, 1980), *Pseudomonas aeruginosa* (FETT et al., 1992), *Thermoactinomyces vulgaris* (FETT et al., 2000). Muitos fungos patógenos também têm sido investigados por serem bons produtores de cutinase (NYYSOLA et al., 2013). A produção dessa enzima tem sido relatada a partir de *Fusarium solani pisi* (PURDY; KOLATTUKUDY, 1975), *Fusarium oxysporum* (PIO; MACEDO, 2007; SPERANZA; CARVALHO; MACEDO, 2011; FRAGA; CARVALHO; MACEDO, 2012), *Colletotrichum gloeosporioides* (CHEN et al., 2007), *Colletotrichum kahawae* (CHEN et al., 2007) entre outras.

Cutinases microbianas podem ser produzidas através de cultura submersa (PIO; MACEDO, 2007, PIO; MACEDO, 2008), bem como por fermentação em estado sólido (SPERANZA; CARVALHO; MACEDO, 2011; FRAGA; CARVALHO; MACEDO, 2012). A fermentação submersa é baseada no cultivo de microrganismos em meio líquido enriquecido com nutrientes (MARTINS et al., 2011). Já a fermentação em estado sólido fundamenta-se no crescimento microbiano acompanhado da formação de produtos em partículas sólidas (MARTINS et al., 2011). Essas partículas sólidas são acrescidas de uma pequena quantidade água, suficiente para o crescimento e metabolismo do microrganismo (PANDEY, 2003).

Conforme Martins et al. (2011) os produtos obtidos via fermentação em estado sólido apresentam características melhores além de maior rendimento e produtividade se comparado aos produtos obtidos em cultivos líquidos. Outro fato relevante é a possibilidade de utilização de resíduos provenientes da agricultura e de agroindústrias como substrato, isso reduz os custos do processo produtivo tornando esse ainda mais vantajoso em relação a fermentação submersa (MARTINS et al., 2011; DE CASTRO; SATO, 2015). Outras vantagens como a redução de agitação, menores custos de esterilização e o baixo volume de água utilizado nas fermentações também são relatadas (PANDEY, 2003; NIGAM, 2009; CHEN; LIU; DAI, 2014). No entanto existem dificuldades na ampliação de cultivos sólidos principalmente devido a homogeneidade da cultura e a problemas na transferência de calor (DI LUCCIO et al., 2004).

Na aplicação de processos fermentativos em estado sólido devem ser levadas em consideração algumas particularidades como a seleção de um microrganismo adequado (DE CASTRO; SATO, 2015). Em função do baixo teor de umidade do meio bactérias podem apresentar dificuldades de crescimento nesse tipo de processo. Enquanto isso fungos e leveduras apresentam capacidade de crescimento em ambientes com essa característica, sendo os mais utilizados (MARTINS et al., 2011; DE CASTRO; SATO, 2015; MANSOUR et al., 2016). Além do microrganismo, outros aspectos importantes também devem ser considerados. Condições como o substrato utilizado, umidade inicial do meio, temperatura de incubação e inóculo são cruciais no desenvolvimento e otimização do processo de fermentação (DE CASTRO; SATO, 2015).

Para seleção do substrato é importante observar que esse atuará como suporte físico e também como fonte de nutrientes. O mesmo deve apresentar uma capacidade mínima de absorção de água, para garantir o crescimento microbiano e a realização de suas atividades biológicas durante as primeiras horas de fermentação. Em alguns casos é necessário a incorporação de uma solução nutritiva, pois nem todos os substratos são naturalmente adequados para o desenvolvimento de microrganismos. Nesse sentido a utilização de resíduos agroindustriais pode ser uma alternativa, uma vez que esses já possuem as características necessárias para o crescimento microbiano (DE CASTRO; SATO, 2015).

Diversos resíduos e subprodutos agroindustriais já foram avaliados quanto a produção enzimática. Speranza, Carvalho e Macedo (2011) e Fraga, Carvalho e Macedo (2012) estudaram a produção de cutinase por *Fusarium oxysporum* utilizando como substrato farelo de trigo,

casca de soja e farelo de arroz. Os resultados demonstraram que essa enzima pode ser produzida a partir de diferentes meios.

Na literatura o farelo de arroz é descrito como um excelente substrato para produção de enzimas por fermentação em estado sólido sem necessidade de suplementação adicional (CHUTMANOP et al., 2008). Diversos resíduos como casca de melancia (CHAUDHARI; SINGHAL, 2015), casca de frutas cítricas (RODRIGUEZ-FERNANDEZ et al., 2011), palha de trigo (KALOGERIS et al., 2003), resíduos de banana (REDDY et al., 2003) entre outros também já foram utilizados como substratos para produção de alguns tipos de enzima.

2.5 CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS

Após a etapa de produção da enzima o próximo passo é a concentração/purificação, seguida da caracterização (DUTTA; SEN; VEERANK, 2009). Esses são pontos cruciais para exploração do potencial para aplicação comercial dessas biomoléculas. Algumas finalidades nem sempre exigem uma preparação enzimática com alto grau de purificação. No entanto, é necessário um certo grau de pureza, de acordo com a aplicação final, como ocorre em indústrias de produtos químicos finos, produtos farmacêuticos e cosméticos (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004).

A purificação de cutinases a partir de fontes microbianas envolve a separação da enzima do caldo de fermentação (DUTTA; SEN; VEERANK, 2009). As metodologias geralmente utilizadas são concentração do sobrenadante da cultura que contém a enzima por precipitação, ultrafiltração, cromatografia entre outras técnicas (GANGADHARAPP et al., 2017).

A precipitação é caracterizada pela separação de proteínas de uma mistura aquosa por alterações diferenciais nas suas solubilidades individuais através da adição de um agente precipitante (FOSTER; DUNNILL; LILLY, 1973). Esse é um processo amplamente empregado no isolamento de componentes biológicos (CHEN et al., 2007; CHANDRASEKARAN; KIM; SHIN, 2011; GOLUNSKI et al., 2011; PRIJI et al., 2015; GOLUNSKI et al., 2017) e geralmente é utilizada nas etapas iniciais do processamento para redução de volume para as etapas subsequentes (GOLUNSKI et al., 2011). Existe uma variedade de precipitantes que podem ser utilizados, é o caso do etanol, acetona, sulfato de amônio, entre outros (FARAG; HASSAN,

2004). A escolha do precipitante adequado pode variar de acordo com a disponibilidade do mesmo bem como em função do custo e dos efeitos desse sobre a enzima em questão.

A ultrafiltração é um processo de separação por membrana que também pode ser aplicado na purificação de proteínas (GOLUNSKI et al., 2011). Esse método pode ser considerado uma alternativa econômica além de proporcionar alta produtividade e pureza ao mesmo tempo (GOLUNSKI et al., 2011). Porém problemas relacionados à absorção de proteína durante a filtração acabam provocando incrustações (GOLUNSKI et al., 2011) o que sugere a necessidade de estudos mais aprofundados para melhoria dessa técnica (SAXENA et al., 2009).

Técnicas cromatográficas também são bastante utilizadas na purificação de enzimas. Alguns estudos relatam sua utilização em etapas mais avançadas, após algum processo preliminar de concentração da enzima (CHEN et al., 2007; CHANDRASEKARAN; KIM; SHIN, 2011). Essa tem como princípio a migração de componentes de uma mistura devido a diferentes interações entre uma fase móvel e uma estacionária (SAPSFORD et al., 2011). Os processos cromatográficos podem ocorrer por fluxo de gravidade, cromatografia líquida de baixa pressão ou cromatografia líquida de alta performance (SAPSFORD et al., 2011). Dentro de cada uma dessas categorias ainda existem variações da técnica.

Além disso existem outros métodos como o sistema micelar reverso, sistemas aquosos de duas fases entre outros (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Porém a metodologia de sistema micelar reverso não é muito explorada por pesquisadores, devido a protocolos ineficientes de extração (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Já os sistemas aquosos de duas fases apresentam algumas desvantagens como transferência de massa difusiva lenta e tempo de estabilização longo para a separação de fases (MENG et al., 2018).

A utilização de duas ou mais metodologias em sequência é comum no processo de purificação. Chen et al. (2007) utilizaram o processo de precipitação com sulfato de amônio e com ácido acético seguido de um método cromatográfico para purificar uma cutinase microbiana. Chandrasekaran, Kim e Shin (2011) purificaram uma esterase por uma sequência de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de permuta iônica e cromatografia de filtração em gel. Golunski et al. (2011) utilizaram precipitação com etanol e ultrafiltração. No entanto, em outros casos, pesquisadores optaram por utilizar um sistema aquoso de duas fases (ALMEIDA et al., 1998; BARBOSA et al., 2011; SOUZA et al., 2015) ou apenas um processo

de precipitação com o intuito de concentrar ou purificar parcialmente a enzima estudada (GOLUNSKI et al., 2017; PRIJI et al., 2015).

É frequente a utilização da precipitação nas etapas iniciais de purificação enzimática. Essa técnica apresenta algumas vantagens relacionadas aos equipamentos, que são geralmente simples e de fácil ampliação (CORTEZ; PESSOA, 1999; GOLUNSKI et al., 2011). Além do mais a possibilidade de escolha de um solvente apropriado e de baixo custo também facilita sua aplicação. Nesse sentido o etanol é um precipitante acessível e amplamente produzido no Brasil e no mundo (GOLUNSKI et al., 2011), além de permitir aplicação em diferentes proteínas (CORTEZ; PESSOA, 1999; CUI et al., 2007). Sendo assim o processo de precipitação é uma alternativa interessante para a etapa de isolamento e concentração de enzimas a baixo custo (BOERIS et al. 2009, SOARES et al., 2012; GOLUNSKI et al., 2017).

2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Diante do exposto percebe-se que a produção de cutinase pelo microrganismo *Fusarium oxysporum* já foi relatada, porém a mesma ocorria via fermentação submersa. Outros microrganismos também já apresentaram capacidade para produção dessa mesma enzima, alguns utilizando fermentação em estado sólido. Dando seguimento a etapa de produção de biomoléculas, inúmeras técnicas de concentração e purificação são relatadas, algumas capazes de chegar a níveis de purificação e outras não.

Sendo assim surge a possibilidade de avaliar a produção de cutinase por *Fusarium oxysporum* e outros microrganismos do gênero *Fusarium* via fermentação em estado sólido. Na etapa seguinte a concentração da enzima produzida através de um processo de precipitação com etanol parece adequada no contexto de pesquisas realizadas pelo grupo Biotec Factory.

3 CAPÍTULO 3 – SCREENING OF SUBSTRATES, MICROORGANISMS AND OPERATIONAL VARIABLES FOR MAXIMIZATION OF CUTINASE PRODUCTION BY SOLID-STATE FERMENTATION

3.1 ABSTRACT

The use of agroindustrial by-products is an economical alternative for the production of sufficient titers cutinase by solid-state fermentation from a low cost process for feasible industrial application of this enzyme. For this purpose, it was evaluated the production using different substrates and fungal species of genera *Fusarium*. After the choice of microorganism and main substrate, several process variables were studied aiming the maximization of cutinase production. In the present study was presented a strategy to maximize the cutinase production by solid-state fermentation from different microorganisms and substrates. The best results were observed using *Fusarium verticillioides*, having rice bran as the main substrate. This microorganism prominent had not yet been reported in the literature. Maximum production of cutinase obtained by the strain was 16.22 U/g of substrate at 28°C, moisture content of 50 wt%, 2.5 wt% of corn steep liquor, 2.5 wt% of soybean bran and 15 wt% of inoculum after 10 days of fermentation.

Key-words: Cutinase; solid-state fermentation; *Fusarium verticillioides*; agroindustrial residues.

3.2 INTRODUCTION

Solid-state fermentation (SSF) have been widely used for obtaining products of microbial origin, which includes food, pharmaceuticals and chemicals, bioherbicides, biosurfactants among others (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000, PANDEY, 2003). Several studies on the application of SSF are focused on the aggregation of value to agroindustrial waste, which can be used as a source of nutrients or physical support in this process (PANDEY *et al.*, 2000, SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003, DI LUCCIO *et al.*, 2004). The use of these by-products can result in advantages such as the low cost of the process in regard to lower expenses with equipment and operating procedures (HOLKER; HOFER; LENZ. 2004; VINIEGRA-GONZALEZ *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2006). If the SSF parameters are controlled

correctly and the purity of the product is defined, SSF may be a feasible option for the industrial production of secondary metabolites (FRAGA; CARVALHO; MACEDO et al., 2012).

Microbial enzymes are biomolecules widely produced by SSF. Among them, cutinases have attracted attention of researchers because of the fact that they do not require any cofactors, are fairly stable, catalyzes both hydrolysis and synthetic reactions and are even active in organic solvents (KUMARI et al., 2016). Cutinases are multifunctional enzymes that catalyze the degradation of insoluble biopolyester cutin, a structural component of plants, the hydrolysis reactions, esterifications and transesterifications, having potential to be widely used in the food, chemical, detergent, environmental, and textile industries (CHEN et al., 2013).

Many microorganisms produce cutinases (EC 3.1.1.74) (DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009), mainly fungal plant pathogens (NYYSOLA et al., 2013). For this reason, the production of cutinases from wild strains has been studied in the past years. However, production of cutinases from their wild-type strains suffers from the disadvantages of low productivity and long fermentation periods. The amount of cutinase produced by wild fungal species reported in literature meet the needs of researchers, but it is not produced sufficient quantities to meet the needs of industrial applications (CHEN et al., 2013).

Several essential factors influence the secretion of cutinases by SSF, including the fungal specie, types and concentrations of carbon and nitrogen sources, the culture temperature and moisture content, the gradient concentration of oxygen and temperature in the solid material (CHEN et al., 2013; DUTTA; SEN; VEERANKI, 2009). The adequate choice and control of factors (microorganism, substrate and operational parameters) are fundamentals to increase the production of metabolites by the microorganisms, to reduce fermentation time, improve the robustness of the fermentation, and increase both the scale and product titers (FRAGA et al., 2012). The increase of product titers is crucial in achieving an economically feasible process, since high product titers will reduce the cost of downstream processing (FORMENTI et al., 2014).

Taking into account the wide area of application of cutinase and aiming to produce sufficient titers from a low cost process for feasible industrial application of this enzyme, the present study aims to produce cutinase from agroindustrial byproducts by solid state fermentation. It was evaluated the production using different substrates and fungal species of

genera *Fusarium*. The enzyme production was optimized and the condition experimentally validated.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Substrates and others chemicals

All chemical products used were purchased from Sigma-Aldrich. The substrates used in this study were all agroindustrial products obtained in local agroindustries, namely: rice bran, rice, soybean bran, corn steep liquor and brewer's spent grain. Rice, rice bran, soybean bran and corn steep liquor were used as received. Brewer's spent grain was dried at 60 °C under continuous air flow (Fanem, Brazil) during 72 h to prevent microbial contamination during storage and then milled (Marconi, Brazil) to yield particles < 2.0 mm. All substrates were maintained at -12 °C until the moment of fermentations.

3.3.2 Microorganisms and inoculum

The strains of *Fusarium acuminatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium oxysporum* were used in this study. They were obtained in the Laboratory of Phytopathology of Federal University of Santa Maria (UFSM). Both strains were cultured in glass tube containing potato-dextrose-agar (PDA) at 28°C for 7 days and maintained at 4°C.

Initially, 3 disks (10 mm diameter) of PDA with fungal mycelium were used for the inoculum. Subsequent inoculums were prepared by the addition of 3 mL of potato-dextrose medium in the glass tube containing the fungus and scraped. The suspension was transferred to a falcon tube and the final volume was filled to 10 mL with potato-dextrose medium. The microorganisms were grown at 28 ° C for 36 hours. Subsequently, the hawk tube solution (10 mL) was transferred to an Erlenmeyer flask containing 90 mL of potato dextrose medium (final volume 100 mL) for culturing at 28 ° C for 5 days under 120 rpm orbital shaking (INNOVA 44R, New Brunswick).

3.3.3 Solid-state fermentation

All fermentations were carried out in conical flasks (500 mL) containing 35 g of dry substrate. The moisture content and supplementation of substrates were adjusted conform experimental plan. Afterwards, the solid material was autoclaved at 121°C for 30 minutes. After cooling until room temperature (~25°C), the inoculum was added and fermentations carried out in a chamber with moisture and temperature control (POL-EKO, model KK 350) for a specified time. At the end of fermentation, fermented solid material was used to extraction of enzyme produced.

First screening consisted in the selection of microorganism and substrate adequate for cutinase production. This was made by evaluating one-variable-at-one time. Each microorganism was fermented in different substrates without supplementation and using solid inoculum. In these fermentations, temperature was 28°C, moisture content 65 wt% and inoculum density 10 wt%. Fermentations were carried out by 12 days. Such conditions are similar to conditions by Liu and Tzeng (1999) for SSF.

Second screening consisted in the use of a Plackett-Burmann design with 12 experiments (PB12) plus seven central points to identify the significant variables in the process. The variables studied are moisture content, temperature, corn steep liquor, soybean bran, inoculum density and micronutrient solution (K_2HPO_4 , $MgSO_4$, KCl , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e $NaCl$). Table 1 present the range of investigated variables. These fermentations were carried out using the fungus *Fusarium verticillioides* and rice bran as main substrate by 12 days.

In the third step, cutinase production by *Fusarium verticillioides* was maximized by means of a central composite rotational design (CCRD) for two independent variables (temperature and moisture content). Corn steep liquor, soybean bran and inoculum were fixed in 2.5, 2.5 and 15 wt%, respectively. Additional fermentations were carried out aiming the validation of result.

3.3.4 Enzyme extraction

The fermented solid material was used for enzyme extraction. The extractions were carried out in a water bath shaker (INNOVA 3100, New Brunswick) at 30°C, 120 rpm for 40 minutes. The mass solid to liquid ratio used was 1:10. Similar conditions to those used by Fraga,

Carvalho and Macedo (2012). Afterwards, material was filtered using filter paper and supernatant used for determination of enzyme activity.

3.3.5 Determination of cutinase activity

For determination of enzyme activity was employed the spectrophotometric method for determination of p-nitrophenyl (p-NP) released from enzymatic hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate (p-NPB). The measurements were carried out in a spectrophotometer (Shimadzu) at 405 nm (PIO; MACEDO, 2008; FETT et al., 2000). The reaction were carried out by mixing 3.43 mL of a solution containing 0.2 % of Tween 80, 0.43 M of tetrahydrofuran and 1.12 mM of p-NPB dissolved in 50 mM phosphate buffer at pH 6,75 with 0.07 mL of enzyme solution obtained in the extraction for 15 minutes at room temperature (~25°C). One unit of cutinase was defined as the amount of enzyme necessary to release 1 μ mol of p-NP per minute under reaction conditions.

3.3.6 Statistical analysis of results

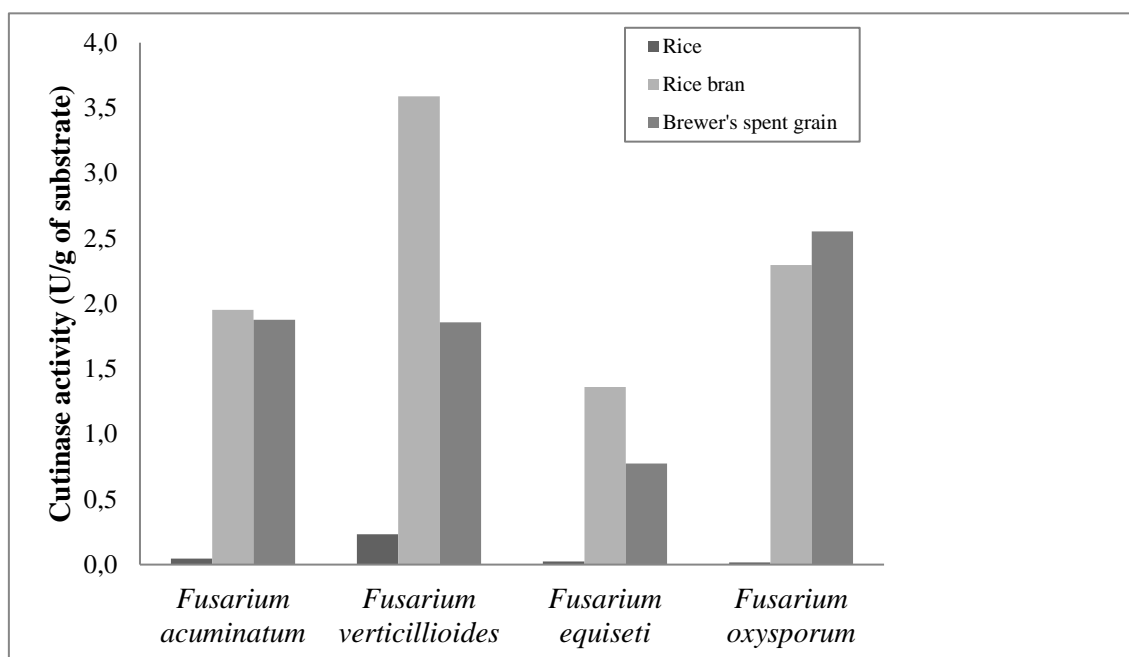
All the results were analyzed using the software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), considering a significance level of 90% for PB12 and 95% for the CCRD and one-variable-at-one time design.

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

3.4.1 Screening of microorganism and substrate

Figure 1 presents the production of cutinase by the strains of *Fusarium acuminatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium oxysporum* using different substrates. It is observed that the rice bran substrate resulted in greater cutinase production for all the fungal strains tested, highlighting the strain of *Fusarium verticillioides*. Cutinase production using rice bran was also evaluated by Speranza, Carvalho and Macedo et al. (2011) and Fraga, Carvalho and Macedo (2012) along with other agricultural by-products such as soybean hulls and wheat bran.

Figure 1: Cutinase production by fungal strains in different substrates after 12 days of fermentation.

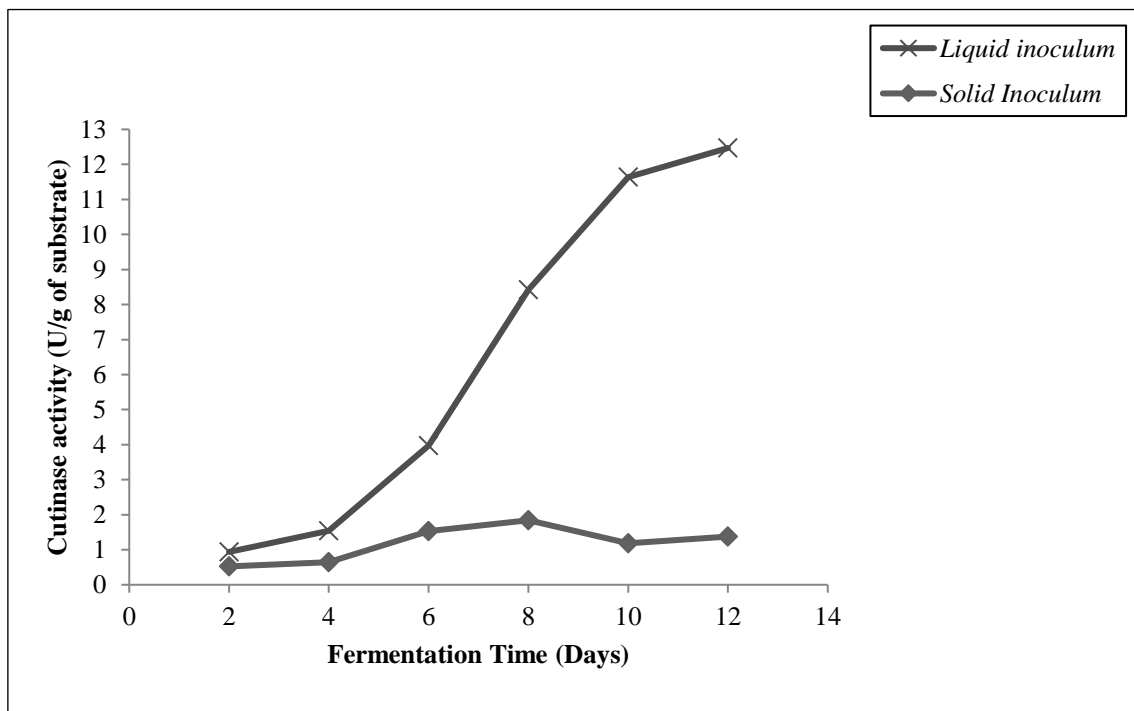


During the polishing process of the rice occurs the removal of the bran that in turn results in the reduction of the nutritional content of the polished rice (CHAMPAGNE, 2004). The obtained bran contains considerable amounts of minerals such as phosphorus, calcium and potassium, and is considered an excellent substrate for the production of enzymes by SSF without the need for additional supplementation (CHUTMANOP et al., 2008). As for malt residue, it may present low amounts of nutrients (CORDEIRO; EL-AOUAR; GUSMÃO, 2012) and a much lower percentage of carbohydrates when compared to rice bran (CORDEIRO; EL-AOUAR; GUSMÃO, 2012).

Regarding the microorganisms, the genus *Fusarium* has already presented cutinolytic activity in studies conducted by Gonçalves et al. (1996), Pio and Macedo (2008), Fraga, Carvalho and Macedo (2012) and Degani (2015). The genus *Fusarium* are plant pathogens and it is believed that cutinase catalyzed degradation of the cuticular layer enables the fungi to penetrate the surfaces of plants (NYYSOLA et al., 2013). Among *Fusarium* species, *Fusarium verticillioides* presented the highest enzyme production and, for this reason, was selected for the next steps. Figure 2 shows the cutinase production as a function of the fermentation time for the assays in which solid inoculum was used and for the liquid inoculum assays. The

increase in cutinase production is apparent when the liquid inoculum was used. Thus, the subsequent fermentations were carried out with the inoculum with the best result. Considering figure 2, for fermentations with liquid inoculum a large increase in cutinase production is observed between 4 and 10 days of fermentation. Fraga Carvalho and Macedo (2012) used *Fusarium oxysporum* for the production of cutinase and obtained maximum enzyme production after 72 hours of fermentation, whereas Degani (2015) reported submerged fermentations with 10 days using a *Fusarium oxysporum* strain. In the present study, the *Fusarium verticillioides* isolate seems to require a relatively large fermentation time. Thus ten days were set for subsequent fermentations.

Figure 2: Cutinase activity of the *Fusarium verticillioides* strain at different fermentation times in the presence of the rice bran substrate for solid inoculum and liquid inoculum.



3.4.2 Screening of operational variables

Table 1 presents the results in terms of enzyme activity obtained in the PB12. It can be observed that a great variation occurred in cutinolytic activity, and the best results (13.45 U/g of substrate and 10.15 U/g of substrate) occurred in the absence of micronutrient solution at

25°C and with a low percentage of moisture (runs 8 and 12, respectively). Other factors such as concentration of corn steep liquor, soybean bran and inoculum appear to have no great influence on the best-performing assays. In order to define the significant variables in the responses obtained, the effects of each of them on the enzymatic activity were calculated and presented in Table 2.

Table 1: Plackett-Burman matrix (real and coded values) for cutinase production.

Essay	Variables						Activity
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	
1	80.0 (+)	25.0 (-)	5.0 (+)	0.0 (-)	10.0 (-)	0.0 (-)	0.29
2	80.0 (+)	35.0 (+)	0.0 (-)	5.0 (+)	10.0 (-)	0.0 (-)	0.25
3	40.0 (-)	35.0 (+)	5.0 (+)	0.0 (-)	20.0 (+)	0.0 (-)	2.58
4	80.0 (+)	25.0 (-)	5.0 (+)	5.0 (+)	10.0 (-)	10.0 (+)	1.32
5	80.0 (+)	35.0 (+)	0.0 (-)	5.0 (+)	20.0 (+)	0.0 (-)	0.64
6	80.0 (+)	35.0 (+)	5.0 (+)	0.0 (-)	20.0 (+)	10.0 (+)	0.72
7	40.0 (-)	35.0 (+)	5.0 (+)	5.0 (+)	10.0 (-)	10.0 (+)	0.68
8	40.0 (-)	25.0 (-)	5.0 (+)	5.0 (+)	20.0 (+)	0.0 (-)	13.45
9	40.0 (-)	25.0 (-)	0.0 (-)	5.0 (+)	20.0 (+)	10.0 (+)	1.20
10	80.0 (+)	25.0 (-)	0.0 (-)	0.0 (-)	20.0 (+)	10.0 (+)	0.94
11	40.0 (-)	35.0 (+)	0.0 (-)	0.0 (-)	10.0 (-)	10.0 (+)	0.77
12	40.0 (-)	25.0 (-)	0.0 (-)	0.0 (-)	10.0 (-)	0.0 (-)	10.15
13	60.0 (0)	30.0 (0)	2.5 (0)	2.5 (0)	15.0 (0)	5.0 (0)	3.93
14	60.0 (0)	30.0 (0)	2.5 (0)	2.5 (0)	15.0 (0)	5.0 (0)	4.52
15	60.0 (0)	30.0 (0)	2.5 (0)	2.5 (0)	15.0 (0)	5.0 (0)	3.61
16	60.0 (0)	30.0 (0)	2.5 (0)	2.5 (0)	15.0 (0)	5.0 (0)	3.70
17	60.0 (0)	30.0 (0)	2.5 (0)	2.5 (0)	15.0 (0)	5.0 (0)	3.79

Where: X1 Moisture (%); X2 Temperature (° C); X3 Corn steep liquor (%); X4 Soybean bran (%); X5 Inoculum (%); X6 Micronutrient solution (%); Activity is the Cutinase activity (U/g of substrate).

Table 2: Effects found in Plackett-Burman planning for cutinase activity.

Variables	Effects	Standard Error	<i>P</i> -value
Mean	3.09072	0.670388	0.000965
Moisture	-4.11254	1.595842	0.027556
Temperature	-3.61878	1.595842	0.046759
Corn steep liquor	0.84850	1.595842	0.606548
Soybean bran	0.34953	1.595842	0.831034
Inoculum	1.01222	1.595842	0.540133
Micronutrient solution	-3.62397	1.595842	0.046501

The effects analysis shows that moisture, temperature, and concentration of micronutrients solution have a significant effect on cutinase activity ($p < 0.1$). Among the several factors that are important for the growth and activity of microorganisms in SSF moisture is one of the most critical (LIU; TZENG, 1999, PANDEY et al., 1994, SMAIL; SALHI; KNAPP, 1995) and the temperature regulation is linked to the moisture content of the solid phase (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003). However, there are other factors that may also influence the production of cutinase, such as micronutrient solutions that may result in a positive effect, conform previously reported by Pio and Macedo (2008).

In the present study the significant variables (moisture content, temperature and micronutrient solution) presented negative effects on enzyme production. Based on this result, a new experimental design was conceived for better evaluation of the influence of temperature and moisture content in a narrow range. The micronutrient solution was not used in the next tests and other variables were fixed at values of central point of the PB12.

Table 3 shows the enzyme production in the runs of the CCRD. The highest production of cutinase (13.24 U/g of substrate) was verified at the central points (moisture content of 50 wt% and temperature of 25°C). The effect of temperature and humidity on cutinase production was evaluated by the Tukey test ($p < 0.05$). In this table, different letters within different levels

of each variable indicate significant difference between such levels. Statistically, the central points of the experiment differed from the others.

Table 3: Real and coded combinations and values for CCRD for optimization of cutinase production.

Assay	Variables		
	X1	X2	X3 + SD
1	40.0 (-)	20.0 (-)	3.86 ± 0.6c,d
2	40.0 (-)	30.0 (+)	11.12 ± 0.2b
3	60.0 (+)	20.0 (-)	4.24 ± 0.3c,d
4	60.0 (+)	30.0 (+)	2.66 ± 0.3d
5	64.0 (+1,41)	25.0 (0)	10.00 ± 0.2b
6	36.0 (-1,41)	25.0 (0)	4.98 ± 0.5c
7	50.0 (0)	32.0 (+1,41)	10.75 ± 0.4b
8	50.0 (0)	18.0 (-1,41)	10.25 ± 0.2b
9	50.0 (0)	25.0 (0)	13.24 ± 0.2 ^a
10	50.0 (0)	25.0 (0)	12.82 ± 0.2 ^a
11	50.0 (0)	25.0 (0)	13.10 ± 0.1 ^a

Where: X1 Moisture (%); X2 Temperature (° C); X3 Cutinase activity (U/g of substrate)

Data of Table 3 were used to calculate the linear, quadratic and interaction effects among variables, which are presented in Table 4. Only quadratic effect for moisture content was significant in the evaluated range. Its negative sign indicates the presence of maximum point.

Table 4: Linear (L), quadratic (Q) and of interaction effects among variables of the CCRD to the enzyme production.

Variables	Effects	Standard Error	P-value
Mean	13.06721	1.514068	0.000345
Temperature (L)	3.19885	1.857133	0.145598
Temperature (Q)	-7.36915	2.216043	0.020885
Moisture (L)	-1.85139	1.857133	0.364579
Moisture (Q)	-4.34570	2.216043	0.107149
Temperature (L) by Moisture (L)	-4.42049	2.622473	0.152681

The choice of the adequate moisture content occurred as a function of the characteristics of the environment, observed experimentally. High levels of moisture impaired microbial growth such that it only grew on the surface of the substrate. This fact indicates that moisture impaired the distribution of oxygen in the medium. In relation to the temperature selected, it is close to the values commonly used in fermentation processes (PIO, MACEDO, 2008, CHAUDHARI and SINGHAL, 2015).

The results were validated from four tests at a temperature condition of 28°C and 50% of moisture content resulting in an enzyme activity of 16.2 U/g of substrate. The results of the experiments were similar to that reported by Pio and Macedo (2007) (17.52 U / mL) and Pio and Macedo (2008) (16.44 U/mL) in submerged fermentations with *Fusarium oxysporum*.

3.5 CONCLUSIONS

In the present study, a strategy was presented to maximize cutinase production by solid state fermentation of different microorganisms and substrates. From the microorganisms used *Fusarium verticillioides* was prominent in cutinase production, which had not yet been reported in the literature. The best results observed using such microorganism occurred in the presence

of rice bran as the main substrate. The maximum cutinase production was 16.22 U / g of substrate at 28 ° C, moisture content 50% by weight, 2.5% by weight corn steep liquor, 2.5% by weight soybean meal and 15% % by weight of inoculum.

3.6 REFERENCES

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 881-896, 2003.

CHAMPAGNE, E. T. et al. The rice grain and its gross composition. **Rice chemistry and technology**, v. 3, p. 77-107, 2004.

CHAUDHARI, S. A.; SINGHAL, R. S. Cutin from watermelon peels: A novel inducer for cutinase production and its physicochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 398-404, 2015.

CHEN, S. et al. Cutinase: characteristics, preparation, and application. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1754-1767, 2013.

CHUTMANOP, J. et al. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 7, p. 1012-1018, 2008.

CORDEIRO, L. G.; EL-AOUAR, Â. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização do bagaço de malte oriundo de cervejarias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n.3, p. 20-22, 2012.

DEGANI, O. Production and Purification of Cutinase from *Fusarium oxysporum* Using Modified Growth Media and a Specific Cutinase Substrate. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 245, 2015.

DI LUCCIO, M. et al. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. In: **Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held**, Breckenridge, 2004, p. 173-180.

DUTTA, K.; SEN, S.; VEERANKI, V. D. Production, characterization and applications of microbial cutinases. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 127-134, 2009.

FRAGA, L. P.; CARVALHO, P. O.; MACEDO, G. A. Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* on Brazilian agricultural by-products and its enantioselective properties. **Food and bioprocess technology**, v. 5, n. 1, p. 138-146, 2012.

FETT, W. F. et al. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. **Letters in applied microbiology**, v. 31, n.1, p. 25-29, 2000.

FORMENTI, L. R., et al. Challenges in industrial fermentation technology research. **Biotechnology journal**, v. 9, n. 6, p. 727-738, 2014.

GONÇALVES, A. P. V. et al. Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 1, n. 2, p. 53-60, 1996.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

KUMARI, V. et al. Optimization of medium parameters by response surface methodology (RSM) for enhanced production of cutinase from *Aspergillus*. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2016.

LIU, B. L.; TZENG, Y. M. Water content and water activity for the production of cyclodepsipeptide in solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, 21, 657–661, 1999.

NYSSÖLÄ, A., et al. Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 4, p. 272-278, 2013.

PANDEY, A. et al. Influence of water activity on growth and activity of *A. niger* for glucoamylase production in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 485–486, 1994.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, 69-80, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using central composite design. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 59-67, 2008.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 613-619, 2007.

RODRIGUEZ, J. A. et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2264-2269, 2006.

SMAIL, T.; SALHI, O.; KNAPP, J. S. Solid state fermentation of carob pods by *Aspergillus niger* for protein production-effect of particle size. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 171-173, 1995.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 205-218, 2003.

SPERANZA, P.; CARVALHO, P. O.; MACEDO, G. A. Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3, p. 181-186, 2011.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. et al. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 157-167, 2003.

4 CAPÍTULO 4 – CONCENTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE CUTINASE PRODUZIDA POR *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

4.1 RESUMO

Processos de concentração e purificação de enzimas podem implicar em alto custo. A precipitação utilizando um agente precipitante economicamente viável pode ser uma alternativa para a obtenção de um produto final com valor mais acessível. Nesse sentido utilizou-se precipitação com etanol no processo de concentração da cutinase produzida por *Fusarium verticillioides*. O ensaio com menor concentração de etanol conduziu a melhores resultados, chegando a um Fator de Purificação de 2,4. A enzima concentrada apresentou temperatura e pH ótimos de 35 °C e 6,5, respectivamente. A estabilidade da mesma foi maior à temperatura de armazenamento (5 °C) com tempo de redução decimal de 7675,3 e às temperaturas de 20 e 30 °C com tempos de redução decimal de 333,7 e 207,4 h. Quando submetida a temperaturas de 40, 50 e 60 °C perdeu-se atividade mais rapidamente e conseqüentemente os tempos de redução decimal foram mais baixos (163,3, 13,4 e 4,0 h). Em relação ao pH da reação a cutinase mostrou-se estável em toda a faixa de pH testada (5 a 8).

Palavras-chave: Cutinase; Concentração; Caracterização; Precipitação; Etanol; *Fusarium verticillioides*.

4.2 INTRODUÇÃO

As cutinases são enzimas responsáveis pela hidrólise da cutina, um biopolímero que protege plantas contra microrganismos patogênicos (BORREGUERO *et al.*, 2001). Essa biomolécula apresenta uma série de aplicações importantes em indústrias, que variam desde o emprego em detergentes, alimentos até produtos químicos (TREICHEL *et al.*, 2010). No setor agrícola a cutinase foi sugerida para uso em pesticidas e fungicidas (DUTTA; SEM; VEERANKI, 2009). Sua aplicação em plantas antes ou juntamente com um agente químico agrícola podem degradar os polímeros da superfície dessas plantas aumentando o efeito farmacológico do produto aplicado (KOLATTUKUDY; POULOSE, 1996).

No entanto a uso dessa enzima exige um certo nível de purificação de acordo com a aplicação pretendida (PRZYBYCIEN *et al.*, 2004) bem como a caracterização da enzima produzida. No setor agrícola, para uso como adjuvante não é exigido um nível de purificação específico. A enzima apenas deve estar em uma concentração suficiente para degradar pelo menos uma porção do polímero da superfície da planta, esta quantidade variará de enzima para enzima e de planta para planta, além de ser afetada por outras condições como temperatura, umidade, solo, entre outras (KOLATTUKUDY; POULOSE, 1996).

O processo de separação e purificação de enzimas de origem microbiana é uma etapa complexa que envolve aspectos econômicos e técnicos e ao mesmo tempo crucial para produção de biomoléculas para aplicação industrial (GOLUNSKI *et al.*, 2011; GOLUNSKI *et al.*, 2017). Os custos relacionados a essa etapa podem chegar a 90 % dos gastos totais do processo produtivo (GOLUNSKI *et al.*, 2011).

Os processos de precipitação parecem ser uma alternativa interessante para a etapa de isolamento e concentração de enzimas e possibilita a obtenção de macromoléculas concentradas e, em alguns casos purificada, a baixo custo (BOERIS *et al.* 2009, SOARES *et al.*, 2012; GOLUNSKI *et al.*, 2017). A precipitação é normalmente mais efetiva no processo de concentração, mas pode chegar ao nível de purificação (GOLUNSKI *et al.*, 2017). Essa técnica é geralmente utilizada nas etapas iniciais do processamento para redução de volume para as etapas subsequentes (GOLUNSKI *et al.*, 2011).

O uso da precipitação para concentração e purificação apresenta algumas vantagens relacionadas aos equipamentos, que são geralmente simples e de fácil ampliação (CORTEZ; PESSOA, 1999; GOLUNSKI *et al.*, 2011). Além disso existe uma numerosa quantidade de precipitantes, o que possibilita infinitas variações no processo de acordo com cada sistema (GOLUNSKI *et al.*, 2017). Várias técnicas de precipitação utilizam o sulfato de amônio como agente precipitante (GOLUNSKI *et al.*, 2017) outras utilizam etanol, precipitante de baixo custo e amplamente produzido no Brasil e no mundo (GOLUNSKI *et al.*, 2011). Além disso o etanol é um solvente que permite aplicação em diferentes proteínas (CORTEZ; PESSOA, 1999; CUI *et al.*, 2007).

Diversos autores já aplicaram processos de precipitação na etapa de purificação de enzimas como lipase, esterase e inulinase (CHANDRASEKARAN; KIM; SHIN, 2011; GOLUNSKI *et al.*, 2011; PRIJI *et al.*, 2015; GOLUNSKI *et al.*, 2017). Alguns autores

estudaram inclusive a purificação de cutinases, porém utilizando outras metodologias de purificação Chen et al. (2007) purificou uma cutinase produzida por *Colletotrichum kahawae* e *Colletotrichum gloeosporioides* utilizando precipitação com sulfato de amônio, outros aplicaram técnicas cromatográficas e purificaram cutinase produzida por *Saccharomyces cerevisiae* (CALADO; CABRAL; FONSECA, 2002; CALADO et al., 2004)

O presente trabalho abordou a concentração de cutinase produzida por *Fusarium verticillioides*. Não há na literatura relatos da concentração ou purificação de cutinase produzida por essa cepa. Utilizou-se um processo de concentração por precipitação com etanol seguida da caracterização parcial em termos de temperatura e pH ótimos, bem como a estabilidade frente a temperatura e pH. O processo de precipitação permite a obtenção da enzima concentrada, o que possibilita sua aplicação em bioprodutos no âmbito das pesquisas desenvolvidas pelo grupo de Biotec Factory.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Produção de cutinase por *Fusarium verticillioides*

A cutinase foi produzida por fermentação em estado sólido pelo microrganismo *Fusarium verticillioides*. Utilizou-se como substrato o farelo de arroz (60 g) enriquecido com 2,5 % de água de maceração de milho e 2,5% de farelo de soja. A umidade inicial do meio foi ajustada para 50 % e o mesmo foi esterilizado em autoclave (121° C, 1,1 atm, 20 minutos). A concentração de inóculo utilizada foi de 15% em relação à massa de substrato utilizada. As fermentações foram realizadas a 28 °C por 10 dias e em seguida fez-se a extração da enzima em um agitador de banho de água (INNOVA 3100, New Brunswick) a 30 ° C, 120 rpm por 40 minutos. A relação sólida líquida utilizada foi 1:10. Posteriormente, o material foi filtrado usando papel de filtro e sobrenadante usado no processo de concentração por precipitação.

4.3.2 Precipitação com etanol

Alíquotas do extrato enzimático foram submetidas à precipitação com etanol. Fez-se a determinação das condições ótimas de concentração de etanol e tempo de contato através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). Durante o processo o sistema foi

mantido sob agitação constante e temperatura de 5 °C. Em seguida cada alíquota foi centrifugada (5000 rpm, 15 minutos, 5 °C) e o precipitado diluído em tampão fosfato (50 mM). Determinou-se atividade enzimática e proteína total para todas as frações. Estipulou-se um fator de purificação (FP) através da razão entre as atividades específicas da enzima (U/mg) no precipitado ressuspenso e na enzima bruta (U/mg) (GOLUNSKI *et al.*, 2017). O FP foi a variável dependente estudada. Utilizou-se o *software* Statistica 8.0 e obteve-se os coeficientes de regressão ($p < 0,05$) que foram aplicados na obtenção de um modelo matemático capaz de explicar os efeitos da concentração de etanol e tempo de contato. O ajuste do modelo foi avaliado através da análise de variância (ANOVA).

4.3.3 Determinação de temperatura e pH ótimos

Para determinação das condições de temperatura e pH ótimos para atividade enzimática utilizou-se um DCCR. Estabeleceu-se dois níveis lineares e dois pontos axiais para cada variável, além de três repetições para o ponto central. A atividade cutinólítica (U/mL) foi a variável dependente estudada. Utilizou-se o *software* Statistica 8.0 e obteve-se os coeficientes de regressão ($p < 0,05$) que foram aplicados na obtenção de um modelo matemático capaz de explicar os efeitos da temperatura e pH na atividade enzimática. O ajuste do modelo foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). Então, em caso de significância do modelo foi gerada superfície de contorno.

4.3.4 Estabilidade térmica

Alíquotas da enzima diluídas em tampão fosfato 50 mM, pH 6,5, foram pré-incubadas em temperaturas que variaram de 5 °C a 60 °C por diferentes períodos de tempo. Após o tratamento térmico foi determinada a atividade enzimática nas condições ótimas de temperatura e pH. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos em termos de atividade relativa.

4.3.5 Estabilidade de pH

Alíquotas de enzima foram diluídas em diferentes valores de pH (5-8) e incubados a 30 °C por diferentes períodos de tempo. Em seguida foi determinada a atividade enzimática nas condições otimizadas. Os ensaios foram realizados em duplicata e expressos em termos de atividade relativa.

4.3.6 Métodos analíticos

4.3.6.1 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada pelo método espectrofotométrico a 405 nm após a hidrólise de p-nitrofenilbutirato (p-NPB). Seguiu-se a metodologia aplicada por Pio e Macedo (2008). A mistura reacional continha 1,12 mM de p-NPB dissolvido em tampão fosfato 50 mM com pH 6,75, contendo 0,2 % Tween 80 e tetrahydrofurano 0,43 M. Adicionou-se uma alíquota de 0,07 mL do sobrenadante obtido na extração a 3,43 mL da mistura reacional. A reação foi monitorada e após 15 minutos comparada com o branco. O branco foi preparado com a mesma mistura reacional, porém adicionou-se 0,07 mL tampão fosfato a 3,43 mL da mistura reacional. Definiu-se que a unidade de atividade cutinólítica é a quantidade de cutinase necessária para liberar um micromol de p-nitrofenil em 1 minuto nas condições estabelecidas.

4.3.6.2 Determinação de proteína total

Determinou-se proteína total pelo método descrito por Bradford (1976), utilizou-se como padrão albumina de soro bovino.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Precipitação com etanol

A Tabela 1 exhibe a matriz do DCCR com as respectivas respostas em termos de atividade específica e fator de purificação. Observou-se que a atividade específica aumentou em quase todos os ensaios se comparada à atividade média do extrato bruto. Os dados indicam que o

melhor fator de purificação foi na condição 5, com menor concentração de etanol (10%) e um tempo de contato de 35 minutos.

Tabela 1: Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) e as respostas em termos de atividade específica e fator de purificação.

Ensaio	Concentração de Etanol (%)	Tempo de Contato (minutos)	Proteína Total (mg/mL)	Atividade Total (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de Purificação
Enzima Bruta	-	-	3,0	3,8	1,3	-
1	-1 (22,0)	-1 (17,3)	11,3	23,5	2,1	1,6
2	1 (78,0)	-1 (17,3)	14,8	22,0	1,5	1,2
3	-1 (22,0)	1 (52,7)	16,2	24,4	1,5	1,2
4	1 (78,0)	1 (52,7)	17,2	24,0	1,4	1,1
5	-1,41 (10,0)	0 (35,0)	8,8	27,0	3,1	2,4
6	1,41 (90,0)	0 (35,0)	14,5	16,4	1,1	1,0
7	0 (50,0)	-1,41 (10,0)	10,5	16,1	1,5	1,2
8	0 (50,0)	1,41 (60,0)	16,2	20,0	1,2	1,0
9	0 (50,0)	0 (35,0)	9,4	19,6	2,1	1,6
10	0 (50,0)	0 (35,0)	10,0	20,0	2,0	1,6
11	0 (50,0)	0 (35,0)	9,7	20,1	2,1	1,6

Fatores de purificação (1,6) relevantes também foram obtidos nas condições centrais bem como no ensaio 1. As menores concentrações de enzima foram obtidas principalmente nos ensaios com maior concentração de etanol em diferentes tempos de contato. Em estudo realizado por Kumari *et al.* (2017) precipitou-se cutinase produzida por *Aspergillus* sp. RL2Ct utilizando acetona, o que resultou em um fator de purificação de 1,7. Já utilizando precipitação com sulfato de amônio Jallouli *et al.* (2012) chegaram a um fator de purificação de 1,5 para lipase produzida por *Fusarium solani* enquanto Chen *et al.* (2007) chegou a um fator de purificação de 1 para cutinase produzida por *Colletotrichum kahawae* Z1 e *Colletotrichum gloeosporioides* Ch27. No mesmo estudo Chen *et al.* (2007) precipitaram cutinase produzida por *Colletotrichum gloeosporioides* Ch27 utilizando ácido acético e chegaram a um FP de 2,9, semelhante ao obtido no presente estudo.

O modelo empírico do fator de purificação em função da concentração de etanol e tempo de contato foi gerado a partir dos dados da Tabela 1 e validado por análise de variância (ANOVA). Obteve-se um coeficiente de correlação de 0,80 e um valor de F calculado superior ao valor de F tabelado, tornando o modelo válido com 95 % de confiança.

A Equação (1) mostra que a concentração de etanol (C) é a variável que mais afeta o fator de purificação (FP) da cutinase.

$$FP = 1,61 - 0,34 C$$

Equação 1

4.4.2 Determinação de temperatura e pH ótimos

A Tabela 2 exhibe a matriz do DCCR com as respectivas respostas em termos de atividade enzimática para a enzima concentrada. Os resultados demonstram que a maior atividade de cutinase (32,0 U/mL) ocorreu no ponto central, cujas condições eram temperatura de 35 °C e pH de 6,5.

Tabela 2: Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) e as respostas em termos de atividade enzimática.

Ensaio	Temperatura	pH	U/mL
1	-1 (24,4 °C)	-1 (5,4)	14,9
2	1 (45,6 °C)	-1 (5,4)	24,2
3	-1 (24,4 °C)	1 (7,6)	24,8
4	1 (45,6 °C)	1 (7,6)	11,5
5	-1,41 (20,0 °C)	0 (6,5)	19,6
6	1,41 (50,0 °C)	0 (6,5)	22,0
7	0 (35 °C)	-1,41 (5,0)	13,7
8	0 (35 °C)	1,41 (8,0)	28,6
9	0 (35 °C)	0 (6,5)	30,2
10	0 (35 °C)	0 (6,5)	30,9
11	0 (35 °C)	0 (6,5)	32,0

Yang *et al.* (2017) caracterizaram a cutinase produzida por *Myceliophthora thermophila* quanto à temperatura e pH, obtendo atividade máxima a 30 °C e pH 8,5. Já uma cutinase produzida por *Fusarium oxysporum* apresentou condições ótimas de atividade à temperatura de 28 °C e pH 6 (SPERANZA; MACEDO, 2013). O isolado de *Fusarium solani pisi* produziu cutinase com temperatura ótima de 30 °C e pH 8 (CHEN *et al.*, 2008).

Com base nos dados experimentais elaborou-se um modelo empírico da atividade enzimática em função da temperatura e pH da reação. O mesmo foi validado por análise de variância (ANOVA). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,83 e o valor de F calculado foi superior ao valor de F tabelado, validando o modelo com 95 % de confiança.

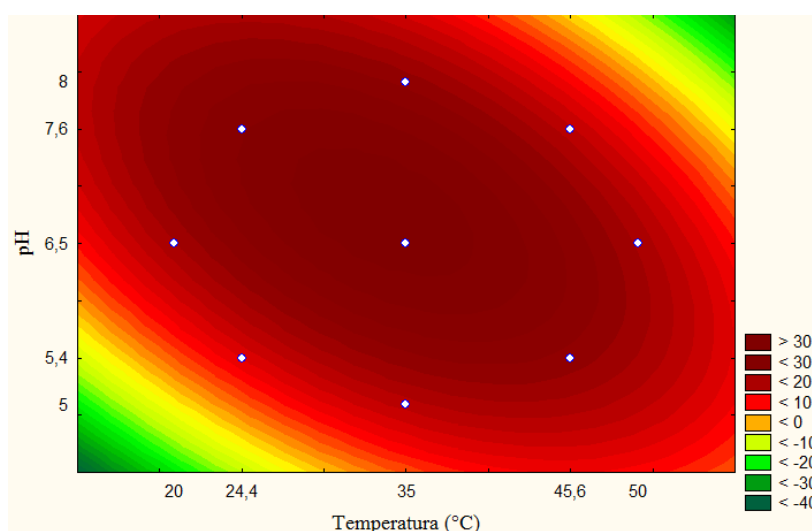
A Equação (2) mostra que a temperatura quadrática (T^2), pH quadrático (pH^2) e a interação entre temperatura e pH são os fatores que mais influenciam na atividade enzimática.

$$\text{Atividade} = 31,06 - 5,68 T^2 - 5,48 \text{ pH}^2 - 5,62 T \text{ pH}$$

Equação 2

Este modelo foi usado para gerar a superfície de contorno (Figura 1). Pode-se observar nessa superfície a faixa de temperatura (27-37 °C) e pH (6,0-7,5) que resultam em atividade ótima da enzima. Em se tratando de aplicações agrícolas a faixa de temperatura obtida é bastante interessante já que a aplicação de herbicidas em diferentes culturas ocorre nessa faixa (LIMA; MACHADO-NETO, 2001; PROCÓPIO et al., 2001; PEDRINHO JÚNIOR et al., 2002)

Figura 1: Superfície de contorno para atividade de cutinase.

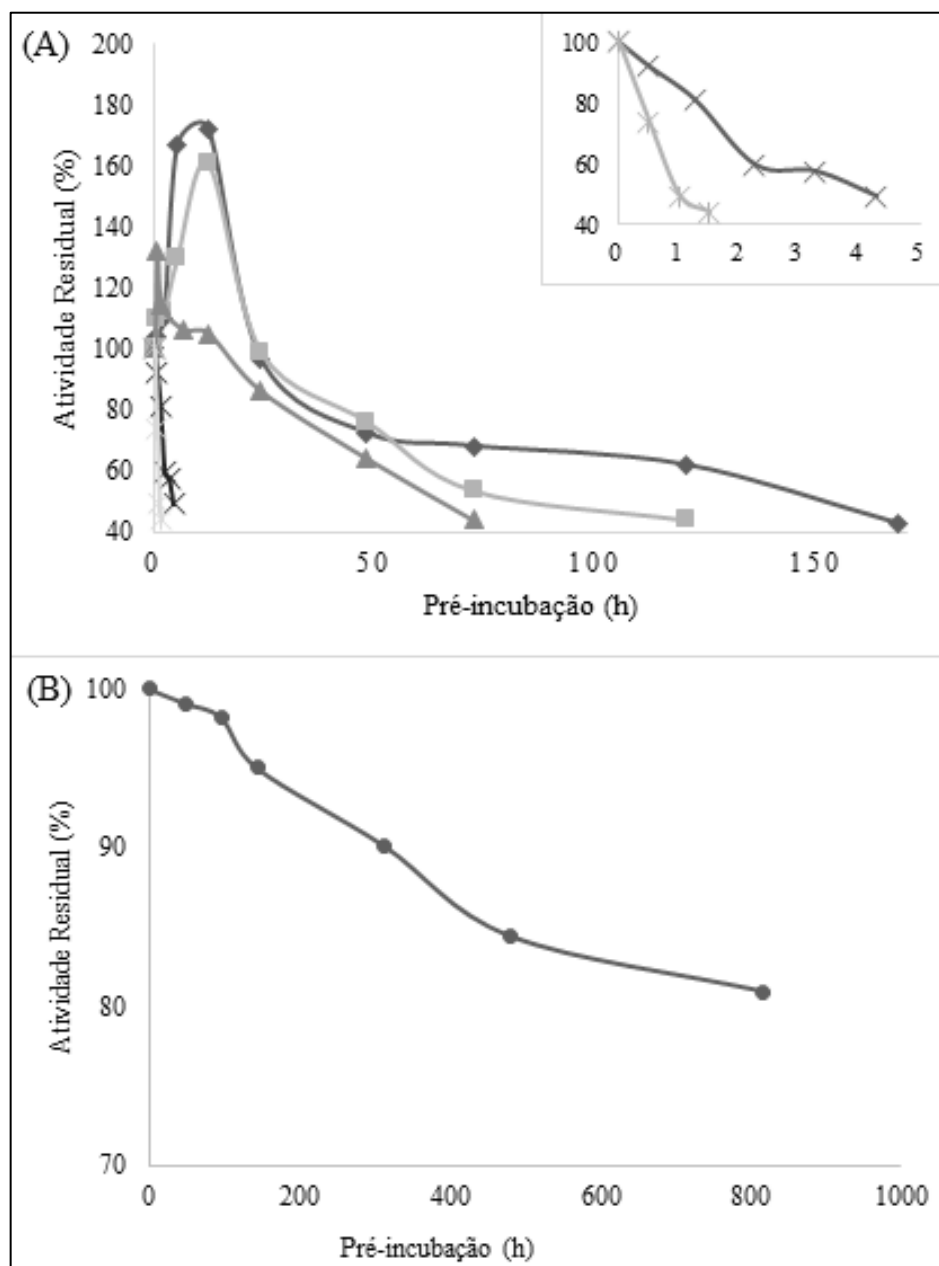


4.4.3 Estabilidade térmica e ao pH

A cutinase concentrada foi pré-incubada em várias temperaturas (5°C, 20, 30, 40, 50 e 60 °C), posteriormente sua atividade foi avaliada em diferentes intervalos de tempo. As temperaturas de 50 e 60 °C resultaram em uma diminuição aproximada de 50 % da atividade em 4,0 e 1,5 h respectivamente. Já em pré-incubações a 40 °C foram necessárias mais de 72 h para redução de mais de 50 % da atividade enzimática. Os tempos de redução decimal obtidos para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C foram, respectivamente 163,3, 13,4, 4,0 h⁻¹. Em estudo realizado por Chen *et al.* (2008) a cutinase produzida por *Fusarium solani pisi* perdeu mais de 50 % da sua atividade em menos de 10 minutos de pré-incubação à 60 °C, a mesma redução de atividade foi observada a 40 °C porém em um tempo de 90 h. Já a cutinase produzida por *Aspergillus sp.* RL2Ct apresentou mais da metade da atividade somente até 3 h de pré-incubação

à temperatura de 40 °C, à 35 °C a atividade manteve-se acima de 50 % até aproximadamente 5 h (KUMARI *et al.*, 2017).

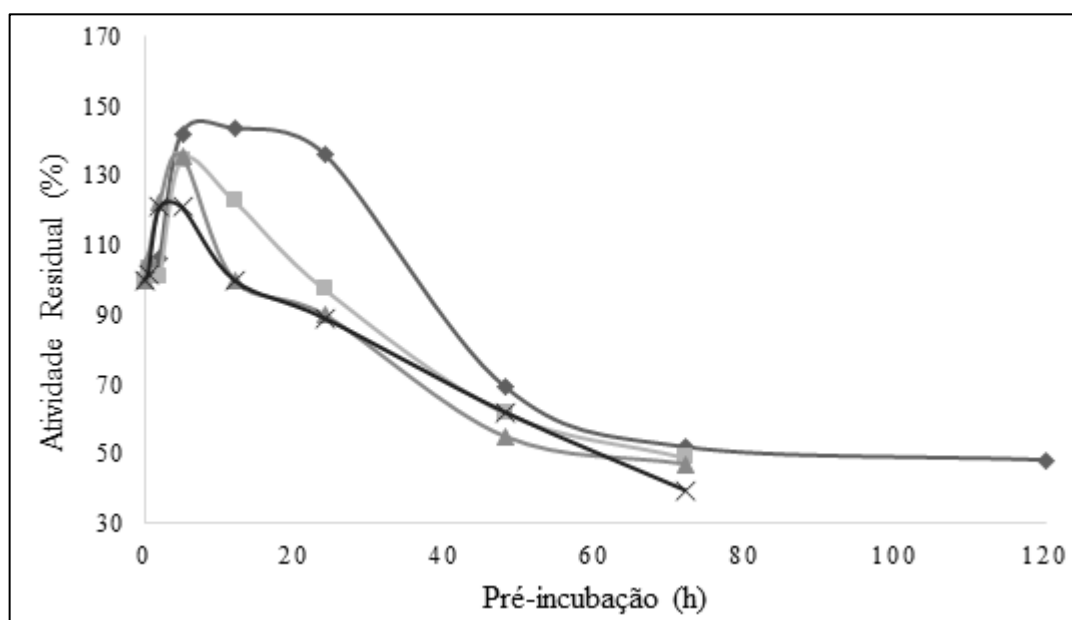
Figura 2: (A) Atividade residual (%) da cutinase concentrada após pré-incubação em temperaturas de 20 °C (◆), 30 °C (■), 40 °C (▲), 50 °C (×) e 60 °C (*), pH 6,5. (B) Atividade residual (%) da cutinase concentrada após pré-incubação à temperatura de 5 °C (◆), pH 6,5.



Em pré-incubações à temperaturas mais baixas, de 20 e 30 °C, a enzima estudada demonstrou ser bastante estável apresentando um tempo de redução decimal de 333,7, 207,4 h⁻¹. As alíquotas submetidas a temperatura de 30 °C chegaram à aproximadamente metade da atividade inicial após 120 h, já aquelas submetidas a pré-incubação a 20 °C chegaram a 50 % da atividade após 150 h. A cutinase produzida por *Myceliophthora thermophila* também demonstrou ser bastante estável nas temperaturas de 25 e 30 °C e manteve mais de 80 % de sua atividade no pequeno intervalo de tempo testado (YANG *et al.*, 2017). A alíquota armazenada à 5 °C apresentou uma estabilidade satisfatória, atingindo um tempo de redução decimal de 7675,3 h⁻¹.

Também foram avaliados diferentes tempos de pré-incubação em pH 5, 6, 7 e 8, fixando-se a temperatura em 30 °C. A enzima mostrou-se aparentemente estável em todos os valores de pH testados e manteve sua atividade em aproximadamente 50 % até 72h.

Figura 3: Atividade residual (%) da cutinase concentrada após pré-incubação em pH 5 (◆), pH 6 (■), pH 7 (▲) e pH 8 (×), temperatura de 30 °C.



Em 24 h avaliadas a cutinase produzida por *Myceliophthora thermophila* manteve aproximadamente 90 % de sua atividade em pH de 5 a 9 (YANG *et al.*, 2017). Já a cutinase produzida por *Fusarium oxysporum* apresentou aproximadamente 50 % da atividade em pH 5 e 7

após 24 h de pré-incubação (SPERANZA; MACEDO, 2013). Em 24 h a enzima produzida por *Fusarium verticillioides* ainda apresentava cerca de 100 % de sua atividade.

Tabela 3: Parâmetros de inativação térmica da cutinase.

Temperatura (°C)	pH	- k (h ⁻¹)	D-Valor (h)	R ²
5	6,5	0,0003	7675,3	0,9560
20	6,5	0,0069	333,7	0,7770
30	6,5	0,0111	207,4	0,8678
40	6,5	0,0141	163,3	0,9848
50	6,5	0,1714	13,4	0,9602
60	6,5	0,5737	4,0	0,9629
30	5,0	0,0110	209,3	0,8163
30	6,0	0,0157	146,7	0,9840
30	7,0	0,0154	149,5	0,9434
30	8,0	0,0158	145,7	0,9928

4.5 CONCLUSÕES

No presente estudo foi realizada a precipitação da cutinase utilizando etanol como solvente. Foram avaliadas condições de precipitação e observou-se melhores resultados na utilização de baixa concentração de etanol, o tempo de contato com o solvente foi estatisticamente significativo. A enzima concentrada foi caracterizada quanto à temperatura e pH ótimos (35 °C e pH 6,5). Também avaliou-se a estabilidade térmica e de pH da enzima

concentrada o que indicou maior estabilidade à temperaturas mais baixas e em toda a faixa de pH estudada.

4.6 REFERÊNCIAS

BOERIS, V. et al. Purification of chymotrypsin from bovine pancreas using precipitation with a strong anionic polyelectrolyte. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 588-592, 2009.

BORREGUERO, I. et al. Enantioselective properties of *Fusarium solani pisi* cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4, p. 613-622, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CALADO, C. R. et al. Integration of the production and the purification processes of cutinase secreted by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. **Journal of biotechnology**, v. 109, n. 1, p. 147-158, 2004.

CALADO, C. R. C.; CABRAL, J.; FONSECA, L. P. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation conditions on expanded bed adsorption of heterologous cutinase. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 77, n. 11, p. 1231-1237, 2002.

CHANDRASEKARAN, G.; KIM, G. J.; SHIN, H. J. Purification and characterisation of an alkaliphilic esterase from a culinary medicinal mushroom, *Sparassis crispa*. **Food chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1376-1381, 2011.

CHEN, S. et al. Identification and characterization of bacterial cutinase. **Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 38, p. 25854-25862, 2008.

CHEN, Z. et al. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1306-1313, 2007.

CORTEZ, E. V.; PESSOA, A. Xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 277-283, 1999.

CUI, L. et al. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food chemistry**, v. 105, n. 2, p. 612-618, 2007.

DUTTA, K.; SEN, S.; VEERANKI, V. D. Production, characterization and applications of microbial cutinases. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 127-134, 2009.

GOLUNSKI, S. et al. Purification of inulinases by changing the ionic strength of the medium and precipitation with alcohols. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 57-63, 2017.

GOLUNSKI, S. et al. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. **Separation and purification technology**, v. 78, n. 3, p. 261-265, 2011.

JALLOULI, R. et al. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline (Phospho) lipase from a newly isolated *Fusarium solani* strain. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 8, p. 2330-2343, 2012.

KOLATTUKUDY, P.; POULOSE, A. J. **Cutinase cleaning composition**. U.S. Patent No. 5,512,203. 1996.

KUMARI, V. et al. Graft copolymerization of acrylamide on chitosan-co-chitin and its application for immobilization of *Aspergillus* sp. RL2Ct cutinase. **Bioorganic chemistry**, v. 70, p. 34-43, 2017.

LIMA, P. R. F.; MACHADO-NETO, J. G. Otimização da aplicação de fluazifop-p-butil em pós-emergência na cultura de soja (*Glycine max*). **Planta Daninha**, p. 85-95, 2001.

PEDRINHO JÚNIOR, A. F. F. et al. Momento da chuva após a aplicação e a eficácia dos herbicidas sulfosate e glyphosate aplicados em diferentes formulações. **Planta Daninha**, p. 115-123, 2002.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using central composite design. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 59-67, 2008.

PRIJI, P. et al. Production, optimization, and partial purification of lipase from *Pseudomonas* sp. strain BUP6, a novel rumen bacterium characterized from Malabari goat. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 71-78, 2015.

PROCÓPIO, S. D. O. et al. Tolerância de cultivares de feijão ao s-metolachlor em diferentes condições de aplicação. **Planta Daninha**, v. 19, n. 2, p. 263-271, 2001.

PRZYBYCIEN, T. M.; PUJAR, N. S.; STEELE, L. M. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 469-478, 2004.

SOARES, P. A. et al. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and purification technology**, v. 98, p. 389-395, 2012.

SPERANZA, P.; MACEDO, G. A. Biochemical characterization of highly organic solvent-tolerant cutinase from *Fusarium oxysporum*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 372-376, 2013.

TREICHEL, H. et al. A review on microbial lipases production. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

YANG, S. et al. Characterization of a cutinase from *Myceliophthora thermophila* and its application in polyester hydrolysis and deinking process. **Process Biochemistry**. 2017.

5 CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO GERAL

O screening inicial para seleção do substrato e microrganismo que resultasse em maior produção de cutinase demonstrou que o substrato mais adequado foi o farelo de arroz, destacando-se a produção de cutinase por *Fusarium verticillioides*, o que condiz com a descrição do farelo de arroz como um excelente substrato para produção de enzimas por fermentação em estado sólido (CHUTMANOP et al., 2008).

Selecionados o melhor microrganismo e substrato realizou-se um screening das variáveis operacionais para produção da cutinase. As variáveis umidade, temperatura, concentração de água de maceração de milho, farelo de soja, inóculo e solução de micronutrientes foram avaliadas através de um planejamento Plackett–Burman. Foram calculados e avaliados os efeitos dessas na atividade enzimática. A umidade, a temperatura e a concentração da solução de micronutrientes resultaram em efeito significativo na atividade da cutinase. A solução de micronutrientes apresentou efeito negativo e, portanto, não foi utilizada nos ensaios posteriores. Temperatura e umidade, também com efeitos negativos, foram melhor avaliadas em um novo planejamento. As melhores condições obtidas foram teor de umidade de 50% em peso e temperatura de 25 ° C.

Observou-se experimentalmente que altos teores de umidade do meio resultavam no crescimento limitado do microrganismo, implicando em uma baixa produção de cutinase. Esse fato pode ser explicado pela falta de circulação de oxigênio no meio de fermentação, uma vez que isso acarreta em redução da porosidade do meio.

Otimizada a produção da cutinase optou-se pela utilização de um processo de precipitação para concentração da enzima. Utilizou-se etanol como solvente, uma vez que esse provavelmente representa o equilíbrio ideal entre o efeito sobre a solubilidade e o caráter hidrofílico adequado para reduzir a desnaturação da enzima durante o processo (GOLUNSKI et al., 2011). Além disso é um precipitante acessível e amplamente produzido no Brasil e no mundo (GOLUNSKI et al., 2011). Nessa etapa atingiu-se um fator de purificação máximo de 2,4, resultado característico de processos iniciais de purificação como a precipitação (CHEN et al., 2007; JALLOULI et al., 2012; KUMARI et al., 2017). Nesse sentido, focando na utilização da cutinase no setor agrícola, mais especificamente como adjuvantes em pesticidas e fungicidas, para os quais não é exigido um procedimento de concentração e/ou purificação tão refinado, os resultados obtidos parecem adequados. Conforme Kolattukudy e Poulouse (1996) a enzima

selecionada para aplicação como adjuvante deve estar em uma concentração suficiente para degradar pelo menos uma porção do polímero correspondente, e esta quantidade variará de enzima para enzima e de planta para planta, além de ser afetada por outras condições como temperatura, umidade, solo, entre outras.

O procedimento seguinte foi a caracterização da enzima concentrada. A temperatura ótima de atuação dessa foi 35 °C, permitindo uma variação em torno desse ponto. Esse resultado vem de encontro com a uma possível aplicação da cutinase em pesticidas e fungicidas já que a temperatura local em determinadas épocas é parecida com a temperatura ótima de atuação da enzima. O pH ótimo encontrado foi de 6,5, semelhante ao de uma cutinase anteriormente caracterizada (SPERANZA; MACEDO, 2013). No que se refere à estabilidade a mesma mostrou-se estável na faixa de pH testada (5-8) e à temperaturas mais baixas (5, 20, 30 °C).

6 CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSÕES GERAIS

Dentre os microrganismos e substratos avaliados os melhores resultados foram observados usando *Fusarium verticillioides*, tendo o farelo de arroz como substrato principal. Na otimização da produção da cutinase a umidade do meio teve grande influência sendo que os melhores resultados (16,22 U/g) foram obtidos para um teor de umidade de 50 % e temperatura de 28 °C, ou seja, a produção de cutinase aumentou aproximadamente 4,5 vezes após a otimização.

A precipitação da enzima foi mais eficiente para baixas concentrações de etanol e o tempo de contato com o solvente foi estatisticamente significativo. A enzima concentrada foi caracterizada quanto à temperatura e pH ótimos de atuação (35 °C e pH 6,5). No que se refere à estabilidade a cutinase mostrou-se estável à temperaturas mais baixas e em toda a faixa de pH estudada.

6.2 PERSPECTIVAS

Testar o potencial para uso da cutinase em biopesticidas.

Aumentar a escala de produção da enzima.

Investigar a produção de cutinase em reatores com diferentes conformações.

Testar outras metodologias para purificação, como sistemas de ultrafiltração.

7 CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. C.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. A.; AIRES-BARROS, M. R. Cutinase purification on poly (ethylene glycol)–hydroxypropyl starch aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 711, n. 1, p. 151-159, 1998.

ANDRADE, J. C. S.; MARINHO, M. M. O.; KIPERSTOK, A. Uma política nacional de meio ambiente focada na produção limpa: elementos para discussão. **Bahia Anal Dados**, v. 10, n. 4, p. 326-32, 2001.

BARBOSA, J. M. P.; SOUZA, R. L.; FRICKS, A. T.; ZANIN, G. M.; SOARES, C. M. F.; LIMA, Á. S. Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 32, p. 3853-3858, 2011.

BOERIS, V.; ROMANINI, D.; FARRUGGIA, B.; PICÓ, G. Purification of chymotrypsin from bovine pancreas using precipitation with a strong anionic polyelectrolyte. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 588-592, 2009.

BORREGUERO, I.; CARVALHO, C. M. L.; CABRAL, J. M. S.; SINISTERRA, J. V.; ALCANTARA, A. R. Enantioselective properties of *Fusarium solani pisi* cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4, p. 613-622, 2001.

BRAND, D. et al. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1, p. 127-133, 2000.

BRECCIA, J. D.; KROOK, M.; OHLIN, M.; HATTI-KAUL, R. The search for a peptide ligand targeting the lipolytic enzyme cutinase. **Enzyme and microbial technology**, v. 33, n. 2, p. 244-249, 2003.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. Recursos microbiológicos para Biotecnologia. 2001. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20_Vanderlei%20Fina_.pdf> Acesso em: 05/01/2018

CARVALHO, C. M.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. **Biotechnology and bioengineering**, v. 66, n. 1, p. 17-34, 1999.

CARVALHO, P. D. O.; CALAFATTI, S. A.; MARASSI, M.; SILVA, D. M. D.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R.; MACEDO, G. A. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**. v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CHANDRASEKARAN, G.; KIM, G. J.; SHIN, H. J. Purification and characterisation of an alkaliphilic esterase from a culinary medicinal mushroom, *Sparassis crispa*. *Food chemistry*, v. 124, n. 4, p. 1376-1381, 2011.

CHAUDHARI, S. A.; SINGHAL, R. S. Cutin from watermelon peels: A novel inducer for cutinase production and its physicochemical characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 398-404, 2015.

CHEN, H. Z.; LIU, Z. H.; DAI, S. H. A novel solid state fermentation coupled with gas stripping enhancing the sweet sorghum stalk conversion performance for bioethanol. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 53, 2014.

CHEN, S. et al. Cutinase: characteristics, preparation, and application. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1754-1767, 2013.

CHEN, Z. et al. Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 6, p. 1306-1313, 2007.

CHUTMANOP, J. et al. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 7, p. 1012-1018, 2008.

CORTEZ, E. V.; PESSOA, A. Xylanase and β -xylosidase separation by fractional precipitation. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 277-283, 1999.

CUI, L. et al. Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. **Food chemistry**, v. 105, n. 2, p. 612-618, 2007.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 6, p. 1085-1093, 2015.

DEGANI, O. Production and Purification of Cutinase from *Fusarium oxysporum* Using Modified Growth Media and a Specific Cutinase Substrate. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 6, n. 04, p. 245, 2015.

DEMIRJIAN, D. C.; SHAH, P. C.; MORÍS-VARAS, F. Screening for novel enzymes. In **Biocatalysis-From discovery To Application** (pp. 1-29). Berlin Heidelberg, 1999, p. 1-29.

DI LUCCIO, M. et al. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. In: **Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held**, Breckenridge, 2003, p. 173-180.

DIMAROGONA, M. et al. Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 11, p. 2308-2317, 2015.

DUTTA, K.; SEN, S.; VEERANKI, V. D. Production, characterization and applications of microbial cutinases. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 127-134, 2009.

EGMOND, M. R.; DE VLIEG, J. *Fusarium solani pisi* cutinase. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1015-1021, 2000.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JÚNIOR, F. B. **Biotecnologia**: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. 721 p.

FARAG, A. M.; HASSAN, M. A. purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial technology**, v. 34, n. 2, p. 85-93, 2004.

FETT, W. F. et al. Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin-degrading enzymes. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2123-2130, 1992.

FETT, W. F. et al. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. **Letters in applied microbiology**, v. 31, n. 1, p. 25-29, 2000.

FOSTER, P. R.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. The precipitation of enzymes from cell extracts of *Saccharomyces cerevisiae* by polyethyleneglycol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure**, v. 317, n. 2, p. 505-516, 1973.

FRAGA, L. P.; CARVALHO, P. O.; MACEDO, G. A. Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* on Brazilian agricultural by-products and its enantioselective properties. **Food and bioprocess technology**, v. 5, n. 1, p. 138-146, 2012.

GANGADHARAPP, B. S. et al. Reverse micelles as a bioseparation tool for enzymes. **Journal of Proteins & Proteomics**, v. 8, n. 2, 2017.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology: a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 7, p. 471-499, 2005.

GOLUNSKI, S. et al. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. **Separation and purification technology**, v. 78, n. 3, p. 261-265, 2011.

GOLUNSKI, S. et al. Purification of inulinases by changing the ionic strength of the medium and precipitation with alcohols. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 57-63, 2017.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

HEREDIA, A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1620, n. 1, p. 1-7, 2003.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004.

JALLOULI, R. et al. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline (Phospho) lipase from a newly isolated *Fusarium solani* strain. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 8, p. 2330-2343, 2012.

KALOGERIS, E. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1099-1104, 2003.

KOLATTUKUDY, P.; POULOSE, A. J. **Cutinase cleaning composition**. U.S. Patent No. 5,512,203. 1996.

KOLATTUKUDY, P.; POULOSE, A. J. **Enzymes as agricultural chemical adjuvants**. U.S. Patent No. 5,545,547. 1996.

KUMARI, V. et al. Optimization of medium parameters by response surface methodology (RSM) for enhanced production of cutinase from *Aspergillus*. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2016.

KUMARI, V. et al. Graft copolymerization of acrylamide on chitosan-co-chitin and its application for immobilization of *Aspergillus* sp. RL2Ct cutinase. **Bioorganic chemistry**, v. 70, p. 34-43, 2017.

LIN, T. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel amino acids and glucuronic acid amide at the N terminus. **The FEBS Journal**, v. 106, n. 2, p. 341-351, 1980.

LONGHI, S.; CABBILLAU, C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2, p. 185-196, 1999.

LUETZ, S.; GIVER, L.; LALONDE, J. Engineered enzymes for chemical production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 101, n. 4, p. 647-653, 2008.

MAITI, I. B.; KOLATTUKUDY, P. E.; SHAYKH, M. Purification and characterization of a novel cutinase from *Nasturtium* (*Tropaeolum majus*) pollen. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 196, n. 2, p. 412-423, 1979.

MANSOUR, A. A. et al. Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, n. 1, p. 31-46, 2016.

MARTINEZ, C. et al. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 615-618, 1992.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. **A review, Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 365-373, 2011.

MEDEIROS, A. B. P et al. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 1, p. 33-39, 2000.

MELO, E. P.; BAPTISTA, R. P.; CABRAL, J. M. Improving cutinase stability in aqueous solution and in reverse micelles by media engineering. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5, p. 299-306, 2003.

MENG, S. X. et al. Enhanced enzymatic reaction by aqueous two-phase systems using parallel-laminar flow in a double Y-branched microfluidic device. **Chemical Engineering Journal**, v. 335, p. 392-400, 2018.

NIGAM, P. Production of bioactive secondary metabolites. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**, p. 129-145, 2009.

NYSSÖLÄ, A., et al. Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Enzyme and microbial technology**, v. 52, n. 4, p. 272-278, 2013.

NYSSÖLÄ, A. Which properties of cutinases are important for applications?. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 12, p. 4931-4942, 2015.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PEDROZO, M. F. M. et al. Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo. CRA–Centro de Recursos Ambientais, Governo da Bahia, Secretaria do Planejamento. **Ciência e Tecnologia, Salvador**, 2002.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 5, p. 613-619, 2007.

PIO, T. F. et al. Cutinases fúngicas: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, p. 2118-2123, 2008.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using central composite design. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 59-67, 2008.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Cutinases: Properties and Industrial Applications. **Advances in applied microbiology**, v. 66, p. 77-95, 2009.

POULOSE, A. J.; BOSTON, M. **Enzymes as agricultural chemical adjuvants**. U.S. Patent No. 5,037,662. 1991.

PURDY, R. E.; KOLATTUKUDY, P. E. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani f. pisi*. **Biochemistry**, v. 14, n. 13, p. 2824-2831, 1975.

PRIJI, P. et al. Production, optimization, and partial purification of lipase from *Pseudomonas* sp. strain BUP6, a novel rumen bacterium characterized from Malabari goat. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 62, n. 1, p. 71-78, 2015.

PRZYBYCIEN, T. M.; PUJAR, N. S.; STEELE, L. M. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 469-478, 2004.

REDDY, G. V. et al. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 1457-1462, 2003.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E. et al. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource technology**, v. 102, n. 22, p. 10657-10662, 2011.

RODRIGUEZ, J. A. et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 2264-2269, 2006.

SAPSFORD, K. E. et al. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. **Anal. Chem**, v. 83, n. 12, p. 4453-4488, 2011.

SAXENA, A. et al. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1, p. 1-22, 2009.

SOARES, P. A. et al. Purification of bromelain from pineapple wastes by ethanol precipitation. **Separation and purification technology**, v. 98, p. 389-395, 2012.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 205-218, 2003.

SOUZA, R. L. et al. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. **Separation and Purification Technology**, v. 155, p. 118-126, 2015.

SPERANZA, P.; CARVALHO, P. O.; MACEDO, G. A. Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, n. 3, p. 181-186, 2011.

SPERANZA, P.; MACEDO, G. A. Biochemical characterization of highly organic solvent-tolerant cutinase from *Fusarium oxysporum*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 372-376, 2013.

TAFOLLA-ARELLANO, J. C. et al. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. **Revista fitotecnia mexicana**, v. 36, n. 1, p. 3-12, 2013.

TANG, W. L.; ZHAO, H. Industrial biotechnology: tools and applications. **Biotechnol J**, v. 4, n. 12, p. 1725-1739, 2009.

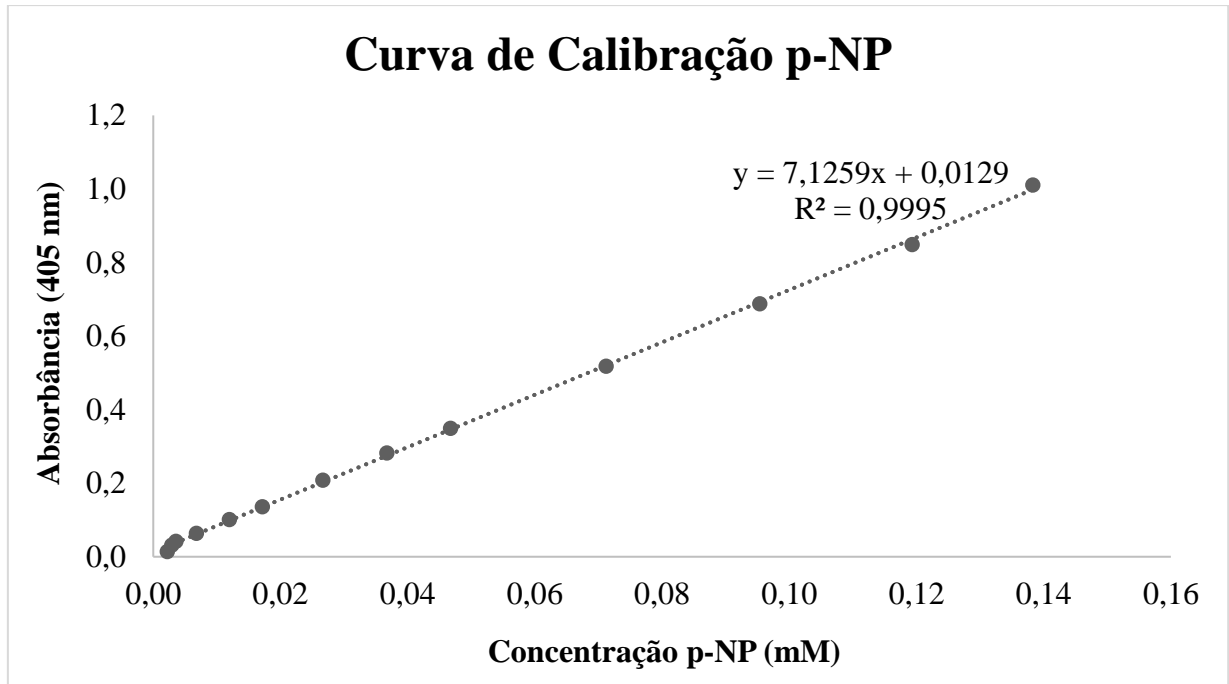
UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388, 2007.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. et al. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 157-167, 2003

WALTON, T. J.; KOLATTUKUDY, P. E. Determination of the structures of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. **Biochemistry**, v. 11, n. 10, p. 1885-1897, 1972.

YAN, H. et al. Effect of cutinase on the degradation of cotton seed coat in bio-scouring. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 3, p. 354-360, 2009.

ANEXO 1



ANEXO 2

