



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS**



**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICA
A PARTIR DO BAGAÇO DO SORGO SACARINO POR
FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA E SUBMERSA**

REBECA DE ALMEIDA SILVA

CAMPINA GRANDE – PB

2019

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICA
A PARTIR DO BAGAÇO DO SORGO SACARINO POR
FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA E SUBMERSA**

REBECA DE ALMEIDA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito necessário para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Processos.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Líbia de Sousa Conrado de Oliveira.

CAMPINA GRANDE – PB

2019

S586p

Silva, Rebeca de Almeida.

Produção de enzimas celulolíticas e xilanolítica a partir do bagaço do sorgo sacarino por fermentação semissólida e submersa / Rebeca de Almeida Silva. – Campina Grande, 2020.

109 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2019.

"Orientação: Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado de Oliveira".

Referências.

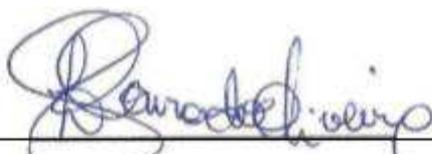
1. Processos Biotecnológicos. 2. Materiais Lignocelulósicos. 3. Celulases. 4. Hemicelulases. 5. *Trichoderma reesei*. I. Oliveira, Líbia de Sousa Conrado de. II. Título.

CDU 676.08(043)

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E XILANOLÍTICA
A PARTIR DO BAGAÇO DO SORGO SACARINO POR
FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA E SUBMERSA**

Tese aprovada em: 28 / 02 / 2019

BANCA EXAMINADORA



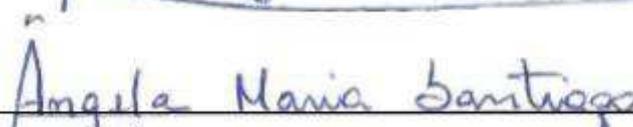
Prof.ª. Dr.ª. Libia de Sousa Conrado Oliveira – UAEQ/CCT/UFCG

Orientadora



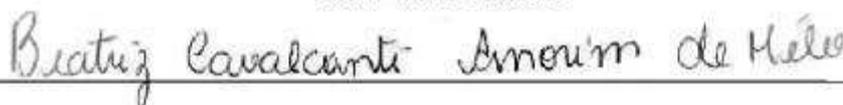
Prof. Dr. Laercio Gomes de Oliveira – UAEQ/CCT/UFCG

Examinador Externo



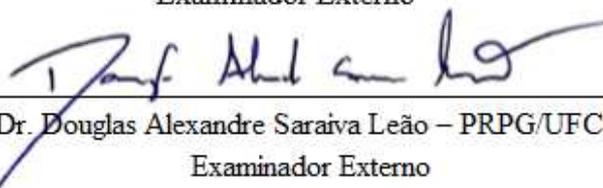
Prof.ª. Dr.ª. Ângela Maria Santiago – DEQ/CCT/UFPB

Examinador Externo



Prof.ª. Dr.ª. Beatriz Cavalcante Amorim de Melo – DES/TECAL/IF SERTÃO - PE

Examinador Externo



Dr. Douglas Alexandre Saraiva Leão – PRPG/UFCG

Examinador Externo



Prof.ª. Dr.ª. Mércia Melo de Almeida Mota – UAEALi/CTRN/UFCG

Examinador Externo

CAMPINA GRANDE - PB

2019

A Deus e a minha família, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por sempre está ao meu lado, me protegendo, iluminando e direcionando os meus caminhos e por permitir grandes vitórias em minha vida.

Aos meus pais, Anselmo e Eliane, pelo amor incondicional, apoio, incentivo e a educação que me deram, que direcionaram a minha vida através de valores e princípios e de seus exemplos como pessoas.

Aos meus irmãos Camila, Jacqueline, Daniel e Nayara e toda a minha família, pelo amor, apoio e torcida pelo meu sucesso pessoal e profissional.

À minha orientadora, Prof^a Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pela grande amizade, confiança, atenção, todo conhecimento transmitido e pela total disponibilidade para me orientar frente a esta tese.

Aos professores Dr. Laércio Gomes de Oliveira, Dr^a. Ângela Maria Santiago, Dr^a. Beatriz Cavalcante Amorim de Mélo, Dr^a. Mércia Melo de Almeida Mota e Dr. Douglas Alexandre Saraiva Leão pela confiança, atenção, amizade e todas as contribuições que foram dadas para enriquecimento desta tese.

A todos os amigos da Grande Família que é o Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da UFCG, a cada um de uma maneira muito especial, quero agradecer pela ajuda, apoio, incentivo e principalmente pela sincera amizade.

À Universidade Federal de Campina Grande pelos conhecimentos adquiridos durante toda a minha formação. Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos por todo o aprendizado, pela assistência e disponibilidade em ajudar.

A todos que me conhecem e fazem parte da minha vida, que acreditam no meu potencial e torcem por cada vitória por mim vivenciada.

Até aqui nos ajudou o Senhor.

I Samuel 7:12

RESUMO

Os materiais lignocelulósicos são uma fonte rica em celulose, hemicelulose e lignina, e representam uma matéria prima promissora e de baixo custo para a produção de enzimas. A demanda por tais catalisadores tem crescido, encorajada principalmente pela indústria de biocombustíveis, em especial para a produção de etanol de 2ª geração. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) e xilanolítica (Xilanase) a partir da fermentação semissólida (FSS) e submersa (FSm) utilizando como substrato o bagaço do sorgo sacarino variedade IPA P15 e fonte indutora o farelo de trigo, e microrganismo metabolizador o *Trichoderma reesei* LCB 48. Foram realizadas caracterizações dos substratos, bagaço do sorgo sacarino (BSS) e farelo de trigo (FT), e foram construídas isotermas de dessorção desses substratos. Para o estudo da produção das enzimas CMCase, FPase e Xilanase por processos fermentativos foi realizado um planejamento experimental 2^2 com 3 pontos centrais, analisando a influência das variáveis umidade inicial e o teor de farelo de trigo na FSS e na FSm a influência do teor de farelo de trigo e relação massa/volume (m/v) da concentração do substrato e para cada condição experimental foi realizado acompanhamento cinético da fermentação por 240 horas. Para a condição ótima do planejamento experimental na FSS foi realizado um aumento de escala para analisar a influência desse aumento nas atividades enzimáticas estudadas. A caracterização do BSS demonstrou ser este um substrato com potencial para ser utilizado na fermentação para produção de celulases e xilanase, por apresentar 40,5 % e 30,5 % de celulose e hemicelulose respectivamente. As isotermas de dessorção dos substratos apresentaram correlação entre a atividade de água e umidade de equilíbrio para os substratos. O modelo de GAB forneceu um bom ajuste para os dados experimentais dos substratos, e os valores da umidade da monocamada para cada substrato. O tratamento estatístico dos planejamentos a um nível de significância de 95 %, mostrou que as variáveis umidade inicial e teor de farelo de trigo influenciaram as atividades enzimáticas da CMCase, FPase e Xilanase na FSS, e as variáveis teor de farelo de trigo e relação massa/volume (m/v) da concentração do substrato influenciaram as atividades enzimáticas na FSm. Os resultados obtidos no estudo da produção dessas enzimas por FSS apontaram o ensaio realizado com 60 % de umidade e 50 % de FT na composição do substrato, o que apresentou as maiores atividades enzimáticas para todas as enzimas estudadas. A atividade de Xilanase teve um pico de $548,7 \text{ U.g}^{-1}$ em 48 horas, de CMCase um pico de atividade de $19,6 \text{ U.g}^{-1}$ em 72 horas, e de FPase um pico de atividade de $2,1 \text{ U.g}^{-1}$ em 96 horas do processo. Já os resultados obtidos na FSm apontaram o ensaio realizado com 5 % da concentração do substrato e 50 % de FT, o que apresentou as maiores atividades enzimáticas para todas as enzimas estudadas. A atividade de Xilanase teve um pico de $76,7 \text{ U.mL}^{-1}$ em 192 horas e de CMCase um pico de atividade de $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$ em 216 horas. Os picos de atividades ocorreram em tempos diferentes que facilita a obtenção das diferentes enzimas em um único processo. As maiores atividades enzimáticas encontradas foi para o aumento de escala realizado com 30 g de substrato e capacidade de 500 mL do biorreator na FSS, onde obteve-se picos de $24,7 \text{ U.g}^{-1}$ ($3,3 \text{ U.mL}^{-1}$) de CMCase, $2,8 \text{ U.g}^{-1}$ ($0,4 \text{ U.mL}^{-1}$) de FPase e $708,9 \text{ U.g}^{-1}$ ($94,5 \text{ U.mL}^{-1}$) de Xilanase.

Palavras-chave: Materiais Lignocelulósicos, Celulases, Hemicelulases, *Trichoderma reesei*

ABSTRACT

Lignocellulosic materials are a rich source of cellulose, hemicellulose and lignin, and represent a promising and low-cost raw material for the production of enzymes. The demand for such catalysts has grown, encouraged mainly by the biofuel industry, especially for the production of 2nd generation ethanol. In this context, the objective of this work was to study the production of cellulolytic enzymes (CMCase and FPase) and xylanolytic (Xylanase) from semisolid (FSS) and submerged (FSm) fermentation using the sweet sorghum bagasse variety IPA P15 as a substrate and inducing source the wheat bran and metabolizing microorganism *Trichoderma reesei* LCB 48. Characterizations of the substrates, bagasse of sweet sorghum (BSS) and wheat bran (FT) were carried out, and desorption isotherms were constructed for these substrates. For the study of the production of CMCase, FPase and Xylanase enzymes by fermentative processes, an experimental planning 2^2 with 3 central points was carried out, analyzing the influence of the variables initial moisture and the wheat bran content in the FSS and FSm the influence of the content of wheat bran and mass/volume ratio (m/v) of the substrate concentration and for each experimental condition, kinetic monitoring of the fermentation was carried out for 240 hours. For the optimal condition of the experimental planning in the FSS, an increase in scale was carried out to analyze the influence of this increase in the studied enzymatic activities. The characterization of BSS demonstrated that this is a substrate with the potential to be used in fermentation for the production of cellulases and xylanase, as it presents 40,5 % and 30,5 % cellulose and hemicellulose, respectively. The substrate desorption isotherms showed a correlation between water activity and equilibrium humidity for the substrates. The GAB model provided a good fit for the experimental data from substrate, and the monolayer moisture values for each substrate. The statistical treatment of the planning at a 95 % significance level, showed that the variables initial moisture and wheat bran content influenced the enzymatic activities of CMCase, FPase and Xylanase in FSS, and the variables wheat bran content and the mass/volume (m/v) ratio of the substrate concentration influenced enzyme activities in FSm. The results obtained in the study of the production of these enzymes by FSS pointed to the assay carried out with 60 % humidity and 50 % FT in the composition of the substrate, which showed the highest enzymatic activities for all the studied enzymes. Xylanase activity peaked at 548,7 U.g⁻¹ in 48 hours, CMCase peaked at 19,6 U.g⁻¹ in 72 hours, and FPase peaked at 2,1 U.g⁻¹ in 96 hours of the process. The results obtained in FSm, on the other hand, showed the assay carried out with 5 % of the substrate concentration and 50 % of FT, which showed the highest enzymatic activities for all the studied enzymes. Xylanase activity peaked at 76,7 U.mL⁻¹ in 192 hours and CMCase peaked at 1,5 U.mL⁻¹ in 216 hours. The activity peaks occurred at different times, which makes it easier to obtain the different enzymes in a single process. The greatest enzymatic activities found were for the scale increase performed with 30 g of substrate and 500 mL capacity of the bioreactor in the FSS, where peaks of 24,7 U.g⁻¹ (3,3 U.mL⁻¹) were obtained of CMCase, 2,8 U.g⁻¹ (0,4 U.mL⁻¹) of FPase and 708,9 U.g⁻¹ (94,5 U.mL⁻¹) of Xylanase.

Keywords: Lignocellulosic Materials, Cellulases, Hemicellulases, *Trichoderma reesei*

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação das frações de materiais lignocelulósicos.....	19
Figura 2.2 - Representação da cadeia linear da celulose.....	20
Figura 2.3 - Estrutura típica da hemicelulose.....	21
Figura 2.4 - Estruturas moleculares precursoras da lignina: (a) Álcool p-sinapílico, (b) Álcool p-coniferílico e (c) Álcool p-cumarílico.....	22
Figura 2.5 - Tipos de Sorgo: (a) Sorgo Granífero; (b) Sorgo Vassoura; (c) Sorgo Forrageiro; (d) Sorgo Biomassa; (e) Sorgo Sacarino.....	23
Figura 2.6 - Modo de ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico.....	26
Figura 2.7 - Representação esquemática da ação das hemicelulases na estrutura da hemicelulose.....	27
Figura 3.1 - Fluxograma da preparação do bagaço do sorgo sacarino IPA P15.....	35
Figura 3.2 - Etapas da preparação: A) Bagaço; B) Moinho de faca; C) Moagem do bagaço.....	36
Figura 3.3 - Repique do <i>Trichoderma reesei</i> em placa de Petri.....	47
Figura 3.4 - Repique do <i>Trichoderma reesei</i> em sabugo de milho.....	48
Figura 4.1 - Isotermas de dessorção dos substratos usados durante a FSS.....	60
Figura 4.2 - Cinética da Fermentação Semissólida para produção da enzima CMCCase...63	
Figura 4.3 - Diagrama de Pareto para a produção de CMCCase em 72 horas.....	65
Figura 4.4 – Gráfico dos valores preditivos versus valores observados para a produção de CMCCase em 72 horas.....	66
Figura 4.5 - Superfície de resposta para a produção de CMCCase em 72 horas.....	68
Figura 4.6 - Cinética da Fermentação Semissólida para produção da enzima FPase.....	69
Figura 4.7 - Diagrama de Pareto para a produção de FPase em 96 horas.....	71
Figura 4.8 – Gráfico dos valores preditivos versus valores observados para a produção de FPase em 72 horas.....	72
Figura 4.9 - Superfície de resposta para a produção de FPase em 96 horas.....	73
Figura 4.10 - Cinética da Fermentação Semissólida para produção da enzima Xilanase.....	75
Figura 4.11 - Diagrama de Pareto para a produção de Xilanase em 48 horas.....	77
Figura 4.12 - Cinética da Fermentação Submersa para produção da enzima CMCCase....	78

Figura 4.13 - Diagrama de Pareto para a produção de CMCCase em 216 horas.....	81
Figura 4.14 – Gráfico dos valores preditivos versus valores observados para a produção de CMCCase em 216 horas.....	81
Figura 4.15 - Superfície de resposta para a produção de CMCCase em 72 horas.....	83
Figura 4.16 - Cinética da Fermentação Submersa para produção da enzima Xilanase....	84
Figura 4.17 - Diagrama de Pareto para a produção de CMCCase em 216 horas.....	86
Figura 4.18 – Gráfico dos valores preditivos versus valores observados para a produção de Xilanase em 192 horas.....	87
Figura 4.19 - Superfície de resposta para a produção de Xilanase em 192 horas.....	88
Figura 4.20 - Cinéticas da Fermentação Semissólida para os aumentos de escala da produção da enzima CMCCase.....	89
Figura 4.21 - Cinéticas da Fermentação Semissólida para os aumentos de escala da produção da enzima FPase.....	91
Figura 4.22 - Cinéticas da Fermentação Semissólida para os aumentos de escala da produção da enzima Xilanase.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.....	22
Tabela 2.2 - Composição lignocelulósica do sorgo sacarino.....	24
Tabela 3.1 - Níveis do planejamento experimental da produção das enzimas na FSS...	49
Tabela 3.2 - Matriz de planejamento experimental fatorial 2^2 com 4 repetições no ponto central da produção de enzimas na FSS.....	50
Tabela 3.3 - Níveis do planejamento experimental da produção das enzimas na FSm..	51
Tabela 3.4 - Matriz de planejamento experimental fatorial 2^2 com 4 repetições no ponto central da produção de enzimas na FSm.....	52
Tabela 4.1 – Caracterização físico-química do bagaço do sorgo sacarino IPA P15.....	57
Tabela 4.2 - Resultados de AR e proteína do bagaço do sorgo sacarino e do farelo de trigo.....	59
Tabela 4.3 - Parâmetros de ajuste das isotermas de dessorção dos substratos para o modelo de GAB.....	61
Tabela 4.4 - Ensaio do planejamento experimental para a produção de CMCCase em 72 h na FSS.....	65
Tabela 4.5 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de CMCCase em 72 horas....	67
Tabela 4.6 - Ensaio do planejamento experimental para a produção de FPase em 72 h na FSS.....	71
Tabela 4.7 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de FPase em 96 horas...	72
Tabela 4.8 - Ensaio do planejamento experimental para a produção de Xilanase em 72 h na FSS.....	76
Tabela 4.9 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de Xilanase em 48 horas....	77
Tabela 4.10 - Ensaio do planejamento experimental para a produção de CMCCase em 216 h na FSm.....	80
Tabela 4.11 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de CMCCase em 216 horas.....	82
Tabela 4.12 - Ensaio do planejamento experimental para a produção de Xilanase em 192 h na FSm.....	86
Tabela 4.13 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de Xilanase em 192 horas.....	87

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

LEB - Laboratório de Engenharia Bioquímica
UFMG - Universidade Federal de Campina Grande
IPA - Instituto de Pesquisas Agropecuárias
BSS - Bagaço do Sorgo Sacarino
FT - Farelo de Trigo
FSS - Fermentação Semissólida
F_{Sm} - Fermentação Submersa
FES - Fermentação em Estado Sólido
FSL - Fermentação Semissólida seguida de submersa
DNS - Ácido 3,5 Dinitrosalicílico
pH - Potencial Hidrogeniônico
AR - Açúcares Redutores
U - Unidade de atividade enzimática
U.g⁻¹ - Unidades de atividade por grama de material úmido
U.mL⁻¹ - Unidades de atividade por mililitro
U.gds⁻¹ - Unidades de atividade por grama de material seco
FPU/g – Unidade de Papel de filtro por grama
% - Porcentagem
°C - Graus Celcius
h - Horas
g - Grama
min - minuto
°C/min - Grau Celsius por minuto
mL - Mililitro
m/v - Massa por volume
m/m - Massa por massa
mol.L⁻¹ - Mol por litro
nm - Nanômetro
rpm - Rotações por minuto
μmol.L⁻¹ - Micromol por litro
UV-Vis - Ultravioleta e/ou visível

A_w - Atividade de Água

X_m - Umidade da monocamada

≥ - Maior ou igual

EC - Enzyme Commission

U (%) - Teor de umidade

Cz (%) - Teor de cinzas totais

E (%) - Teor de extrativos

LI (%) - Teor de lignina insolúvel

H (%) - Teor de holocelulose

A (%) - Teor de α-celulose

MA - Massa da amostra

MR - Massa do recipiente

MF - Massa do funil limpo e seco

MRAU - Massa do conjunto recipiente + amostra úmida

MRAS - Massa do conjunto recipiente + amostra seca

MRAC - Massa do conjunto recipiente + amostra calcinada

MRES - Massa do conjunto recipiente + extrativos secos

MRRS - Massa do conjunto recipiente + resíduo de solvente

MFL - Massa do conjunto funil + lignina seca

MFH - Massa do conjunto funil + holocelulose seca

MFA - Massa do conjunto funil + α-celulose seca

MAH - Massa da amostra de holocelulose.

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS	9
LISTAS DE TABELAS	11
LISTAS DE SÍMBOLOS E SIGLAS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	19
2.2 SORGO SACARINO.....	23
2.3 ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS.....	25
2.3.1 Microrganismos produtores de celulasas e hemicelulasas.....	28
2.4 TIPOS DE PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	29
2.5 ESTADO DA ARTE.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 MATÉRIA PRIMA.....	35
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	36
3.2.1 Teor de Umidade.....	36
3.2.2 Teor de Cinzas.....	37
3.2.3 Teor de Extrativos.....	38
3.2.4 Teor de Lignina.....	39
3.2.5 Teor de Holocelulose (α -Celulose + Hemicelulose).....	40
3.2.6 Teor de α -celulose.....	41
3.2.7 Açúcares Redutores.....	42
3.2.8 pH.....	43
3.2.9 Proteína.....	43
3.3 ISOTERMAS DE DESSORÇÃO DE UMIDADE.....	45
3.4 PRODUÇÃO DAS CELULASES E HEMICELULASE.....	46
3.4.1 Microrganismo.....	46
3.4.2 Inoculação do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48.....	48
3.4.3 Fermentação Semissólida.....	49
3.4.4 Fermentação Submersa.....	51

3.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS	52
3.5.1 Extração das Enzimas.....	52
3.5.2 Endo- β -1,4-Glucanase (CMCase)	53
3.5.3 Celulase Total (FPase)	54
3.5.4 Endo- β -1,4-xilanase (Xilanase).....	55
3.6 AUMENTO DE ESCALA.....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	57
4.2 ISOTERMAS DE DESSORÇÃO DE UMIDADE.....	60
4.3 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA (FSS)....	62
4.3.1 CMCase.....	63
4.3.1.1 Perfil Cinético da produção de CMCase.....	63
4.3.1.2 Análise Estatística da produção de CMCase.....	65
4.3.2 FPase.....	68
4.3.2.1 Perfil Cinético da produção de FPase.....	68
4.3.2.2 Análise Estatística da produção de FPase.....	70
4.3.3 Xilanase.....	74
4.3.3.1 Perfil Cinético da produção de Xilanase.....	74
4.3.3.2 Análise Estatística da produção de Xilanase.....	76
4.4 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSm).....	78
4.4.1 CMCase.....	78
4.4.1.1 Perfil Cinético da produção de CMCase.....	78
4.4.1.2 Análise Estatística da produção de CMCase.....	80
4.4.2 Xilanase.....	83
4.4.2.1 Perfil Cinético da produção de Xilanase.....	83
4.4.2.2 Análise Estatística da produção de Xilanase.....	85
4.5 AUMENTO DE ESCALA PARA A FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA.....	89
4.5.1 CMCase.....	89
4.5.2 FPase.....	91
4.5.3 Xilanase.....	92
5 CONCLUSÕES.....	94
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

Os processos biotecnológicos industriais vêm crescendo gradativamente, haja vista o grande número de metabólitos de interesse industrial que pode ser gerado, a partir desses processos, sendo um dos principais exemplos, em ascensão, a obtenção de enzimas, as quais são produzidas, principalmente, por microrganismos (CARVALHO, 2013).

A produção industrial de enzimas microbianas é, geralmente, limitada pelo custo do substrato utilizado para o cultivo dos microrganismos. Para tornar essa produção mais competitiva, tem sido explorada a utilização de substratos de baixo custo e facilmente disponíveis, como exemplo, o emprego de materiais lignocelulósicos (SUKUMARAN *et al.*, 2009).

Dentre esses materiais lignocelulósicos estão incluídos vários resíduos gerados na agricultura e na agroindústria, como as palhas, cascas, hastes, bagaços e farelos, além de madeiras, algodão e resíduos da indústria de polpa e papel. De modo geral, estes resíduos apresentam elevado potencial de energia, visto que contem até 70 % de carboidratos, como celulose e hemicelulose em sua composição (CARVALHO, 2013).

As enzimas celulolíticas agem na celulose desses materiais liberando glicose. Já as enzimas hemicelulolíticas formam um complexo enzimático que degradam a hemicelulose, liberando glicose, arabinose, xilose, galactose e manose. Os açúcares fermentescíveis obtidos a partir da hidrólise desses materiais podem ser utilizados na produção de etanol de segunda geração.

A produção de bioenergia, em uma perspectiva de sustentabilidade, passa, obrigatoriamente pela diversificação de matérias primas, direcionadas para a produção de biocombustíveis de 2ª geração, nos quais se inclui o bioetanol produzido a partir desses materiais lignocelulósicos (BARCELOS *et al.*, 2016).

Dentre as alternativas economicamente mais promissoras no Brasil, destacam-se o bagaço e a palha de cana-de-açúcar, além do sorgo sacarino, que apresenta colmos ricos em açúcares fermentescíveis, semelhantes à cana-de-açúcar (FREITA, 2016).

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma planta com elevada capacidade de produção de biomassa. Quando comparado a outras culturas que possuem potencial energético, se destaca por atender às necessidades de mercado, como: baixo custo de implantação, ciclo curto, ampla adaptabilidade podendo ser cultivado em diferentes

condições edafoclimáticas. É uma cultura totalmente mecanizável, com baixa umidade e alto poder calorífico em caldeiras (CASTRO, 2014).

A produção em larga escala de enzimas microbianas envolve os processos de Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FSm). Entre os microrganismos produtores de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas destacam-se os fungos filamentosos, pelo fato de secretarem grandes quantidades de diferentes enzimas, sendo os mais estudados os do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* (RABELO, 2010).

Embora a produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais esteja bastante consolidada, a quantidade de celulose e hemicelulose presentes no sorgo sacarino, o torna uma fonte com potencial para a produção de enzimas de interesse industrial, como exemplo, as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, que por sua vez podem ser utilizadas na hidrólise de açúcares fermentescíveis presentes no bagaço do sorgo, para posterior emprego na produção de etanol de segunda geração, agregando ainda mais valor a essa biomassa.

Tendo em vista a importância dessas enzimas para o desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol de segunda geração, ambas constituem os produtos biotecnológicos de interesse do presente trabalho.

Nesse contexto, o bagaço do sorgo sacarino IPA P15 (nova cultivar híbrida do Instituto Agrônomo de Pernambuco) se enquadra como fonte lignocelulósica de baixo custo para obtenção de enzimas celulolíticas e xilanolítica, através dos processos de fermentação semissólida e fermentação submersa, utilizando o fungo filamentoso *Trichoderma Reesi* LCB 48 como o agente metabolizador de celulose e hemicelulose.

1.1 OBJETIVO GERAL

Produzir enzimas celulolíticas e xilanolítica, utilizando o microrganismo *Trichoderma Reesi* LCB 48 pelos processos de fermentação semissólida e submersa utilizando como substrato o bagaço do sorgo sacarino e o farelo de trigo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o bagaço do sorgo sacarino (BSS) IPA P15 quanto aos teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose, α -celulose, hemicelulose, açúcares redutores e proteínas totais e o farelo de trigo (FT) quanto aos teores de açúcares redutores e proteínas totais;
- Obter as isotermas de dessorção de umidade para o bagaço do sorgo sacarino IPA P15 e a mistura BSS/FT na temperatura de 28 °C, afim de determinar a umidade e atividade de água limite para o crescimento do microrganismo *Trichoderma Reesi* LCB 48;
- Avaliar a influência da umidade inicial e a relação da composição do substrato (BSS/FT) sobre a produção das enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) e xilanolítica (Endo- β -1,4-xilanase) na fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino IPA, utilizando o microrganismo *Trichoderma Reesi* LCB 48;
- Realizar um aumento de escala experimental do processo de fermentação semissólida para a condição que fornece as maiores atividades enzimáticas;
- Avaliar a influência relação da composição do substrato (BSS/FT) e relação massa/volume (m/v) da concentração do substrato sobre a produção das enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) e xilanolítica (Endo- β -1,4-xilanase) na fermentação submersa do bagaço do sorgo sacarino IPA, utilizando o microrganismo *Trichoderma Reesi* LCB 48.
- Determinar as atividades enzimáticas da CMCase, FPase e Xilanase nos processos de FSS e FS_m.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

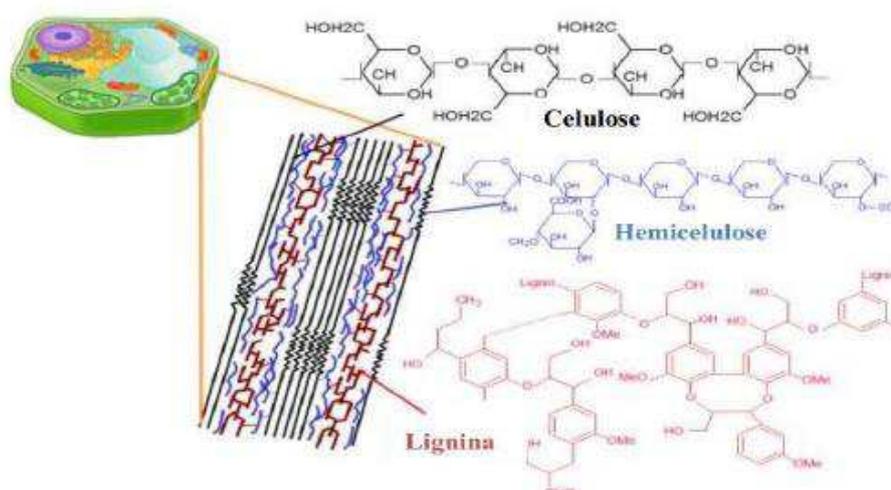
Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes da biosfera, representando cerca de 50% de toda a biomassa terrestre. Estes materiais são oriundos da parede celular encontrada nas células vegetais (BON *et al.*, 2008).

A escolha de materiais agroindustriais lignocelulósicos como substrato deve-se ao fato de serem baratos e possuírem as seguintes características: serem recursos renováveis, muitas vezes um subproduto ou produto secundário, produzidos em grande quantidade e representarem um problema localizado sob forma de rejeitos ou descarte industrial (SINGHANIA *et al.*, 2010; JUHÁSZ *et al.*, 2005).

Resíduos agrícolas, como palhas, cascas, caules, hastes, bagaços e farelos, originados de cereais (arroz, trigo, milho, sorgo), legumes (tomate, feijão, soja), frutas (banana, manga, coco), além de madeiras decíduas e coníferas, café, cacau, algodão, amendoim, juta, azeitona e resíduos da indústria de polpa e papel, são materiais lignocelulósicos. (VANDAMME, 2009; SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

As biomassas lignocelulósicas são constituídas por três principais frações poliméricas: a celulose, a hemicelulose e a lignina, representadas na Figura 2.1 (JEFFRIES, 1990).

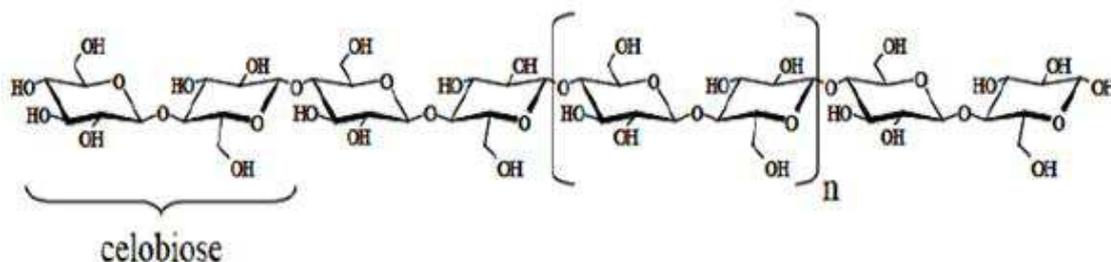
Figura 2.1 – Representação das frações de materiais lignocelulósicos.



Fonte: (ZAMPIERI, 2011).

A celulose, principal componente da parede celular da fibra vegetal, consiste em unidades de glicose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4). As ligações glicosídicas são formadas pela eliminação de uma molécula de água, envolvendo os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4 de duas glicoses adjacentes. O dissacarídeo formado recebe o nome de celobiose (Figura 2.2), e é considerado a unidade estrutural básica da celulose (LORENCINE, 2013).

Figura 2.2 - Representação da cadeia linear da celulose.



Fonte: (TIMAR-BALÁZSY e EASTOP, 1998).

As cadeias de celulose podem estabelecer interações de hidrogênio, tanto intramoleculares quanto intermoleculares, que fazem com que as cadeias de celulose sejam agregadas na forma de microfibrilas, na qual regiões altamente ordenadas (cristalinas) se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas). As microfibrilas interagem entre si para formar as fibrilas, e estas, por fim, dão origem às fibras celulósicas. Como consequência, a supraestrutura celulósica possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (BON *et al.*, 2008; KLOCK *et al.*, 2005).

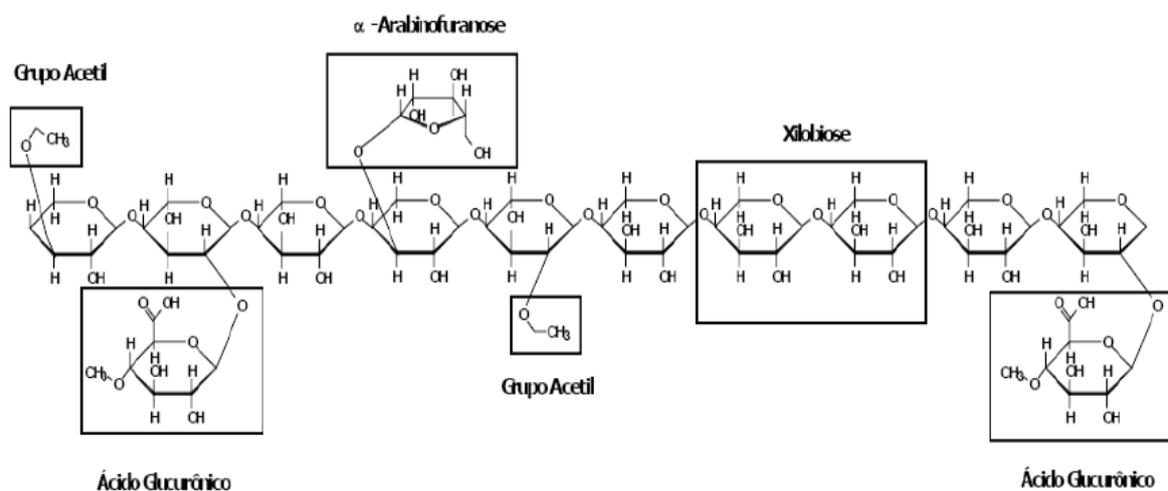
As hemiceluloses (polioses) são misturas de heteropolímeros encontrados na parede celular de plantas, que estão intimamente associadas à celulose e à lignina. Enquanto a celulose é constituída apenas por resíduos de D-glicose, a composição das polioses é bastante heterogênea e variada, podendo ser encontrados os seguintes açúcares: xilose, manose, glicose, arabinose, galactose, ácido galactourônico, ácido glicourônico e ácido metilglicourônico. Estes polissacarídeos consistem, principalmente, de cadeias poliméricas ramificadas, além de serem amorfos e possuírem massa molar relativamente baixa (LIMA e RODRIGUES, 2007; KLOCK *et al.*, 2005).

A hemicelulose confere elasticidade e flexibilidade ao agregado e é constituída de moléculas planas que tem a finalidade de auxiliar na formação das ligações cruzadas entre a lignina e a celulose (DE CARLI, 2011; AHMAD *et al.*, 2007).

A diversidade e complexidade da estrutura da hemicelulose requerem uma diversidade equivalente de enzimas para a sua degradação. Uma variedade dessas enzimas age exclusivamente sobre as cadeias laterais. Com a liberação das cadeias laterais, a cadeia principal de xilana, principal componente da fração hemicelulósica e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, é exposta a clivagem por outras enzimas (COLLINS *et al.*, 2005).

A Figura 2.3 ilustra a estrutura de uma hemicelulose, na qual a cadeia linear representa a xilana.

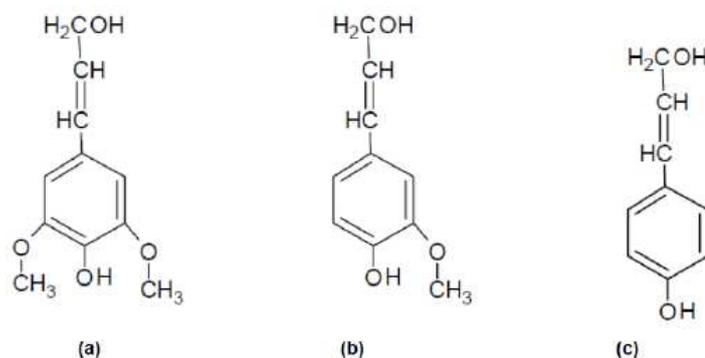
Figura 2.3 – Estrutura típica da Hemicelulose.



Fonte: (MUSSATO, 2002).

A lignina está presente na parede celular das plantas dando-lhes suporte estrutural. Participa do transporte de água e lhe confere uma barreira contra o ataque microbiano, protegendo os polissacarídeos prontamente assimiláveis. Sua cadeia é extremamente complexa, formada por unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de ligações covalentes (LI *et al.*, 2009). Pode ser definida como um material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três monômeros precursores (Figura 2.4): os alcoóis p-cumarílico, coniferílico e sinapílico que geram unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (DENCE e LIN, 1992).

Figura 2.4 - Estruturas moleculares precursoras da lignina: (a) Álcool p-sinapílico, (b) Álcool p-coniferílico e (c) Álcool p-cumarílico.



Fonte: (BARBOSA *et al.*, 2008).

A lignina é responsável pela recalcitrância dos materiais lignocelulósicos à degradação enzimática, limitando a acessibilidade da enzima, tornando-se um dos principais problemas para o processo de conversão da biomassa lignocelulósica, uma vez que, devido ao reduzido tamanho dos capilares da biomassa, limita os sítios de ataques enzimáticos e impede a entrada de enzimas de maior massa molecular, restringindo o ataque à superfície externa (CARDOSO *et al.*, 2012; RAJARATHNAM *et al.*, 1992).

A composição básica do material lignocelulósico depende do vegetal de origem, da espécie da planta, da região de cultivo, idade e período do ano em que se realiza a colheita do material, dentre outros fatores que a influenciam (HASSUANI, 2005).

A Tabela 2.1 mostra algumas fontes de materiais lignocelulósicos e sua composição básica aproximada.

Tabela 2.1 – Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.

MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	COMPONENTES (%)			
	CELULOSE	HEMICELULOSE	LIGNINA	CINZAS
Bagaço de Cana	33-36	28-30	18-20	2-5
Palha de Cana	32-36	19-21	16-18	-
Palha de Arroz	32-37	19-24	9-13	12-18
Palha de Trigo	30-33	22-28	14-18	3-7
Palha de Sorgo	34-36	45-48	25-26	-
Sabugo de Milho	34-36	16-24	15-19	-
Papel	43	13	6	-
Madeira	50	20	10	5

Fonte: (LEE, 1997).

2.2 SORGO SACARINO

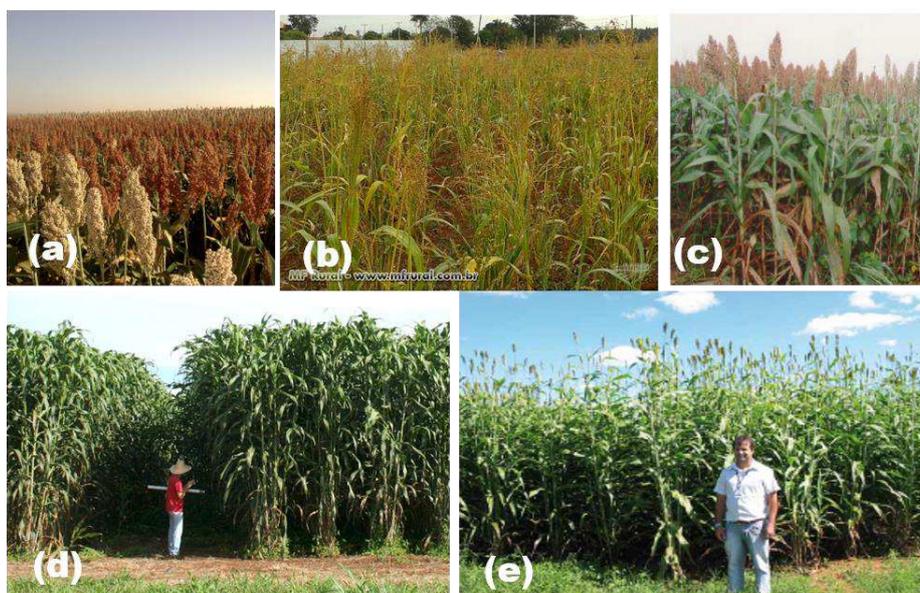
O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) pertencente à família da Poaceae, é uma planta originária do continente africano mais precisamente da África Oriental. Foi introduzido no Brasil no século XX provavelmente pela região nordeste (RIBAS, 2014). Os Estados Unidos lideram a produção mundial de sorgo, seguido por México, Nigéria, Índia, Argentina, Sudão, Etiópia, China e Brasil (CONAB, 2014).

A planta de sorgo se adapta a uma gama de ambientes, principalmente sob condições de deficiência hídrica, desfavoráveis à maioria dos outros cereais. É uma planta que apresenta tolerância relacionada ao nível bioquímico, onde é capaz de reduzir o metabolismo, murchar e recuperar-se quando o estresse é interrompido (MAGALHÃES *et al.*, 2014).

Os cultivares utilizados são resultados da intervenção humana, que melhorou a cultura para atender as necessidades agrícolas, nutricionais e econômicas, o que a tornou de grande importância global, sendo um dos cereais mais cultivados no mundo, adaptados ao cultivo de regiões áridas e semiáridas (DUARTE, 2010).

Há basicamente cinco tipos de sorgo, como mostra a Figura 2.5. Esta classificação está ligada à sua natureza e a forma de sua utilização, todos com características e importância econômica diversas (FERREIRA, 2015).

Figura 2.5 - Tipos de Sorgo: (a) Sorgo Granífero; (b) Sorgo Vassoura; (c) Sorgo Forrageiro; (d) Sorgo Biomassa; (e) Sorgo Sacarino.



Fonte: (EMBRAPA, 2015; EMBRAPA, 2011).

O sorgo granífero apresenta porte baixo, sua colheita pode ser manual ou mecanizada, e seu produto principal é o grão, produzido na extremidade superior do vegetal (EMBRAPA, 2015). O sorgo vassoura é explorado pela agricultura familiar e suas plantas devem possuir panículas com ráquis longas para a confecção de vassouras. O sorgo forrageiro é caracterizado pela formação rápida de pastagem e por apresentar boas qualidades bromatológicas. O sorgo biomassa apresenta porte alto (até 6 metros) e apresenta características lignocelulósicas adequadas para fins energéticos. E o sorgo sacarino é uma cultivar que apresenta porte alto (maior que 3 metros), e colmo suculento com alta concentração de açúcares fermentescíveis (RODRIGUES, 2010).

O caldo extraído do colmo fresco é composto de sacarose, glicose e frutose e podendo ser prontamente fermentados em álcool (SAIDUR *et al.*, 2011). Após a extração do caldo, o bagaço é gerado e este pode ser utilizado na geração de energia térmica ou elétrica ou na produção de etanol, de celulose (etanol de 2ª geração). Além disso, seria possível utilizar o bagaço na forragem para animais em confinamentos, contribuindo para um balanço energético e econômico favoráveis (BATISTA, 2016). O sorgo sacarino, constituído basicamente de colmo, representa cerca de 80 % de massa verde dessa cultura (PANANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2010).

O sorgo sacarino se assemelha à cana-de-açúcar, uma vez que armazena açúcares simples em colmos, apresentando assim grande potencial na produção de bioetanol. Destaca-se em relação à cana-de-açúcar, sobretudo, na rapidez do ciclo de produção, na mecanização da cultura e na antecipação da colheita em até quatro meses (RODRIGUES, 2008). A Tabela 2.2 apresenta a composição lignocelulósica média do sorgo sacarino baseada em estudos realizados.

Tabela 2.2 - Composição lignocelulósica do sorgo sacarino.

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
39,59	32,05	20,36	Neto, J. M. S. (2018)
37,68	17,02	13,84	Bi <i>et al.</i> (2017)
25,07	37,03	12,82	Lins, S. A. S. (2017)
32,07	20,14	22,82	Freita <i>et al.</i> (2016)
33,24	21,44	19,94	Yue <i>et al.</i> (2017)
40,40	20,00	19,80	Barcelos <i>et al.</i> (2016)
44,83	31,33	23,84	Prathyusha <i>et al.</i> (2016)

2.3 ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS

As enzimas lignocelulósicas podem ser sintetizadas durante o crescimento de alguns fungos a partir do uso de materiais lignocelulósicos. Estas enzimas, são responsáveis por hidrolisar os principais compostos da parede celular vegetal. As enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas atuam sobre a celulose e hemicelulose, respectivamente, transformando estes polímeros, em açúcares de menores massas moleculares. Há também as enzimas lignolíticas, que atuam na degradação da lignina presente nestes materiais.

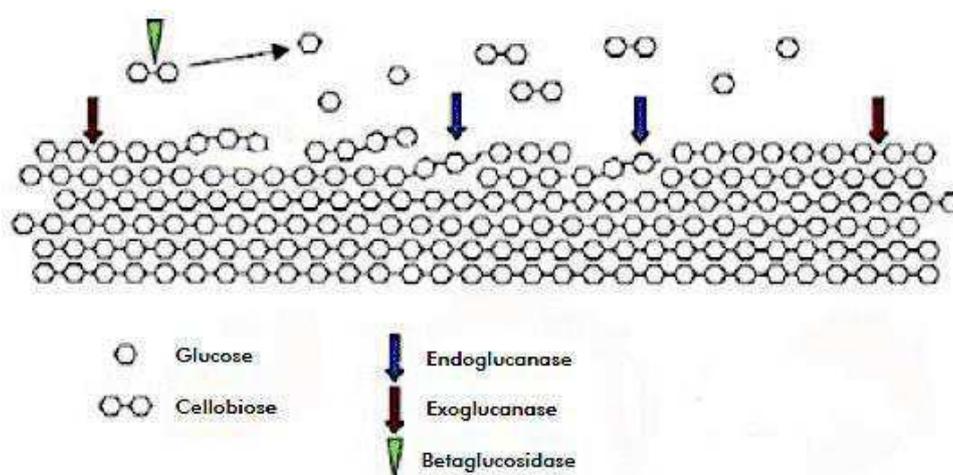
As celulasas são biocatalizadores específicos que atuam conjuntamente para a liberação de açúcares, dos quais a glicose, é o mais importante (CASTRO e PEREIRA JR, 2010). As celulasas são classificadas, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, em três grandes grupos: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. São classificadas pela EC (Enzyme Commission) com a codificação 3.2.1.x, onde o valor de x varia com a enzima celulósica avaliada (LYND *et al*, 2002).

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam randomicamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando como produto oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (CASTRO E PEREIRA JR, 2010). A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas. As exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO e TAN, 2002).

As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: tipo I - que hidrolisa terminais redutores; tipo II - que hidrolisa terminais não redutores. As celobiohidrolases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso, é de grande importância na atuação de outras enzimas do complexo celulolítico, as β -glucosidases (BON *et al.*, 2008). As β -glucosidases (EC 3.2.1.21) são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose, a glicose, reduzindo, assim, a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA *et al.*, 2002). A atividade das enzimas do complexo celulolítico é geralmente sinérgica, ou seja, a atividade combinada das enzimas é maior do que a soma da atividade individual de cada componente (DAROIT, 2007).

A Figura 2.6 ilustra a ação sinérgica entre esses três grupos de enzimas na hidrólise da fibra celulósica.

Figura 2.6 - Modo de ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: (Adaptado de: QUIROZ-CASTANEDA E FOLCH-MALLOL, 2011).

As celulasas encontram aplicação em diversos setores produtivos, tais como as indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica, têxtil e celulose (ZUÑIGA *et al.*, 2011). Tem merecido destaque nos últimos anos na produção de biocombustíveis, sendo utilizadas para hidrolisar a biomassa lignocelulósica, convertendo a celulose em glicose (AKCAPINAR *et al.*, 2012).

As celulasas têm importante papel na nutrição animal. Ao serem incorporadas à ração, essas enzimas, juntamente com as celulasas produzidas pelos microorganismos presentes no rúmen do animal, aumentam a digestibilidade das fibras da parede celular vegetal, melhorando a conversão do alimento consumido (pastagem) em carne e leite (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

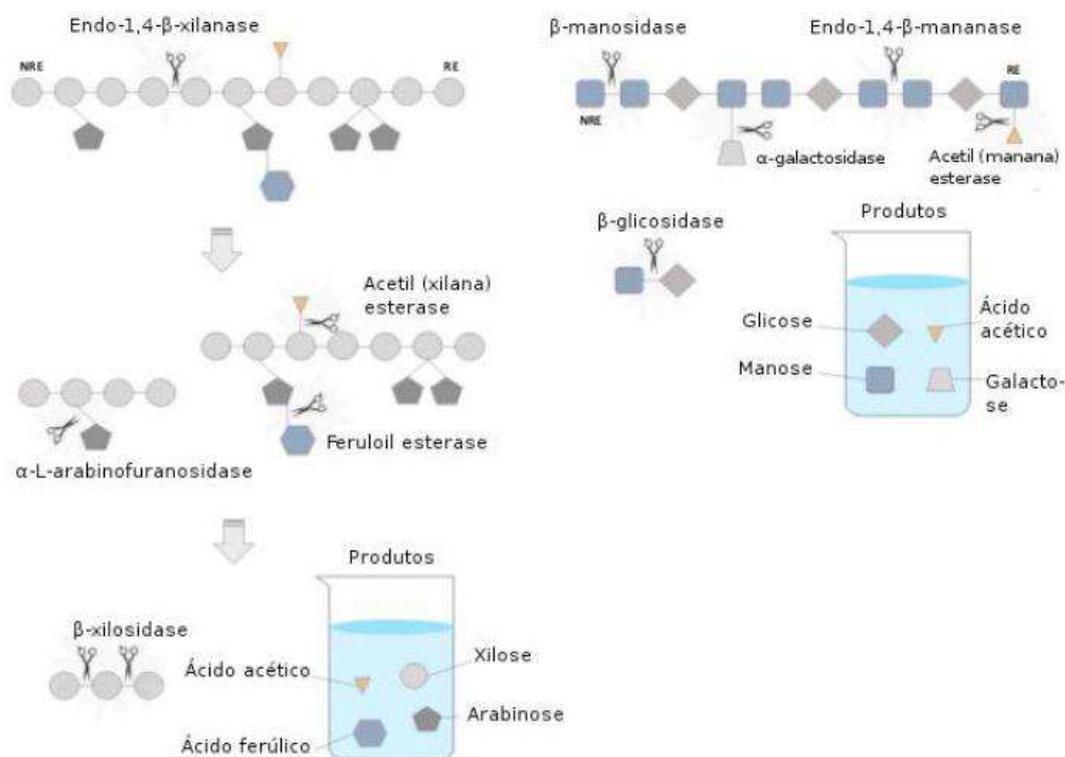
As hemicelulasas também são enzimas importantes que hidrolisam a complexa rede da hemicelulose. Em função dessa complexa estrutura, a degradação completa da hemicelulose exige a ação conjunta de diversas enzimas hidrolíticas, que atuam cooperativamente para converter a xilana, em seus açúcares constituintes (BAJPAI, 2014).

Tendo em vista que aproximadamente 70 % da hemicelulose é xilana, as principais enzimas participantes na degradação desse composto são as xilanases e as β -xilosidases. A endo- β -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Trata-se de uma endo-enzima que hidrolisa aleatoriamente ligações glicosídicas do tipo β -1,4 dentro da cadeia de hemicelulose (na cadeia principal de xilana) liberando xilooligossacarídeos. A degradação completa desta

cadeia principal ocorre por uma ação sinérgica entre endo e exoxilanases, a β -xilosidases ou xilohidrolases (EC 3.2.1.37), que hidrolisam os xilooligômeros de baixa massa molecular resultantes, como a xilobiose (duas moléculas de xilose) para produzir xilose (QUIROZ-CASTANEDA e FOLCH-MALLOL, 2011; HALTRICH *et al.*, 1996).

A Figura 2.7 nos mostra os componentes estruturais básicos encontrados na hemicelulose e as hemicelulases responsáveis por sua degradação.

Figura 2.7 - Representação esquemática da ação das hemicelulases na estrutura da hemicelulose.



Fonte: (Adaptado de: GUPTA e VERMA, 2015).

As xilanases são enzimas induzíveis, quando produzidas em substratos que contenham xilana, xilose, xilobiose ou resíduos de β -Dxilopiranosil adicionados ao meio de cultura. Há relatos de ocorrência de repressão catabólica da biossíntese da xilanase por fontes de carbono facilmente metabolizadas, a exemplo da glicose (KUMAR *et al.*, 2008; KULKARNI *et al.*, 1999).

Resíduos de xilose, produtos da hidrólise da xilana, pelas enzimas xilanases, podem ser fermentados por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitidis* e *Candida shehatei* para a produção de etanol e xilitol. O xilitol é um poliálcool com poder

adoçante comparável com a sacarose, utilizado como adoçante não cancerígeno recomendável para diabéticos e indivíduos obesos (POLIZELI *et al.*, 2005).

As xilanases, também, são utilizadas na formulação de detergentes e na produção de polissacarídeos com atividades farmacológicas para o uso como agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes (COLLINS *et al.*, 2005).

Durante décadas apenas a hidrólise da celulose foi o foco da atenção dos pesquisadores para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Estudos apontam que a produção de etanol de 2ª geração a preços competitivos depende da hidrólise eficiente tanto da celulose como da hemicelulose, além da fermentação eficiente de pentoses e hexoses liberadas e do aproveitamento da lignina (MORALES *et al.*, 2015; RAGAUSKAS *et al.*, 2014; SINGHVI *et al.*, 2014; CHOVAU *et al.*, 2013; LIMAYEM E RICKE, 2012).

2.3.1 Microrganismos produtores de celulasas e hemicelulasas

Uma vasta gama de microrganismos tem sido estudada extensivamente de forma a tornar o processo de produção dessas enzimas viável e selecionar aqueles que apresentam alta produtividade (DAMASO *et al.*, 2012).

A maioria das preparações comerciais enzimáticas é produto da fermentação fúngica, predominantemente das espécies *Trichoderma* e *Aspergillus*, e bacteriana, principalmente *Bacillus*. As espécies do gênero *Trichoderma* produzem grandes quantidades de celulasas e outras enzimas hidrolíticas (BÉGUIN, 1990). Quando cultivado estaticamente, o aspecto observado é verde brilhante, devido a grupos de conídias presentes nas extremidades das hifas aéreas (PELCZAR *et al.*, 1980).

O fungo *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viridae*) apresenta um potencial elevado para produção específica de celulasas, principalmente quanto as frações de endoglucanases, sendo submetidos constantemente a técnicas de mutação, com o intuito de aumentar a produção enzimática. Com relação as hemicelulasas, o *Trichoderma reesei* produz um completo sistema xilanolítico que proporcionam eficiência no processo de hidrólise da hemicelulose (SINGHANIA *et al.*, 2010; POUTANEN *et al.*, 1987).

2.4 TIPOS DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

Estudos vêm utilizando resíduos agroindustriais como matéria prima para a produção de celulasas e xilanases por fungos como o *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, entre outros, pelos processos de Fermentação Submersa (FSm) e Fermentação em Estado Sólido (FES) ou semissólido (FSS), principalmente. Estes trabalhos vem avaliando a influência de vários parâmetros da fermentação como o tipo de substrato lignocelulósico, influência do pH, temperatura de incubação e suplementação do meio de cultura com uma fonte de nitrogênio (SINGHANIA *et al.*, 2009; NIEVES *et al.*, 2009; KABEL *et al.*, 2005).

Os processos industriais de produção de enzimas são desenvolvidos, em sua maior parte, em cultivos submersos aerados, em biorreatores com agitação mecânica, que permite maior controle dos parâmetros operacionais. O cultivo em estado sólido é também utilizado, principalmente nos países orientais, por apresentar vantagens para a produção de algumas enzimas, especialmente as produzidas por fungos filamentosos (BON *et al.*, 2008).

A fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação semissólida (FSS), pode ser definida como um processo referente à cultura de microrganismos sobre a superfície de uma matriz sólida porosa, com reduzida quantidade de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada a matriz sólida do substrato ou como uma fina camada absorvida pela superfície das partículas (BEHERAA e RAY, 2016; CASTRO e PEREIRA JR, 2010). O substrato deve conter umidade suficiente para permitir o crescimento do microrganismo e metabolismo (PANDEY, 2003).

Os substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho, mandioca) são geralmente fermentados entre 25 a 60 % de umidade inicial. No entanto, os substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço, farelos e outros) permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados entre 60 e 80 % (SOCCOL, 1992).

Os estudos sobre a fermentação semissólida têm-se intensificado por algumas de suas vantagens: simplicidade do meio de cultura, tecnologia de baixo custo, maior produtividade dos extratos enzimáticos, a alta concentração de produtos e também menor requerimento de espaço e energia (SINGHANIA *et al.*, 2011; MITCHELL *et al.*, 2000). Além de simular o hábitat natural de microrganismos fúngicos selvagens, apresenta menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de

temperatura e pH (SINGHANIA *et al.*, 2010; HOLKER *et al.*, 2004). Todas estas vantagens aumentam a economia deste tipo de fermentação para a produção das enzimas.

As maiores desvantagens são as dificuldades no monitoramento e controle dos parâmetros da fermentação (conteúdo de biomassa, pH, temperatura, umidade) (HAMIDI-ESFAHANI *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, o mecanismo utilizado para produzir diferentes enzimas com uma ampla faixa de aplicações biotecnológicas através de FES tem aumentado (YOON *et al.*, 2014). As principais aplicações em bioprocessos são a biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, detoxificação biológica de resíduos agroindustriais, biorrefinaria, biopolpação e produção de metabolitos secundários como alcaloides, enzimas, antibióticos e ácidos orgânicos (CASTRO e SATO, 2015; SINGHANIA *et al.*, 2009).

A fermentação submersa designa-se como um processo pelo qual utiliza-se um meio fermentativo líquido onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis (FEITOSA, 2009). Aproximadamente 90 % dos preparados enzimáticos industriais são realizados por processos de fermentação submersa e, na maioria das vezes, com microrganismos geneticamente modificados (CASTRO *et al.*, 2010; SINGHANIA *et al.*, 2010).

Aém de um melhor controle do processo, a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa são facilitadas na FSm, sendo realizadas por filtração simples ou centrifugação para a remoção das células. O sobrenadante da cultura é utilizado para os estudos enzimáticos e o crescimento microbiano é quantificado após secagem da biomassa, por gravimetria, podendo ainda ser realizado por densidade ótica no caso de cultivos com bactérias (LIMA *et al.*, 2003).

Diversos metabólitos de grande importância podem ser produzidos por meio da fermentação submersa. Entre eles estão as enzimas, ácidos orgânicos, carotenoides, biotina, proteínas e aminoácidos (PAPAGIANNI, 2004).

Generalizar vantagens relacionadas aos processos submersos, ou em estado sólido, é complexo, visto que cada microrganismo pode melhor se adequar a um ou outro processo, bem como produzir complexos enzimáticos diferentes com atividades enzimáticas diferentes.

2.5 ESTADO DA ARTE

A biomassa lignocelulósica vem sendo bastante utilizada na obtenção de derivados biotecnológicos, com destaque para a produção de diversos tipos de enzimas, de etanol de segunda geração, oligossacarídeos e xilitol.

Santos *et al.* (2015) ao trabalharam com bagaço de sabugo de milho e palha de milho incrementados com 50 % (m/m) de FT e com 60 % de umidade inicial, utilizando o fungo FSDE16 na FES. Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 1000 mL com 100 g de meio. A temperatura de incubação e o tempo total de fermentação foram de 30 °C e 7 dias, respectivamente. Para a análise da atividade CMC_{Case}, foi utilizada solução de CMC a 4 %. A atividade CMC_{Case} (endoglucanase) obtida com o sabugo de milho e farelo de trigo (50 %) variou de 0,12 a 7,96 U/g, sendo que a máxima atividade foi obtida com tempo de fermentação de 168 horas, enquanto para a palha de milho e farelo de trigo (50 %) a variação foi de 0,11 a 6,44 U/g, com a máxima atividade obtida também a 168h.

Dias (2017) estudou a produção de celulases e hemicelulases a partir do sorgo biomassa e farelo de trigo como fonte de carbono e algumas fontes de nitrogênio, como peptona, ureia, extrato de levedura, na FES, utilizando duas linhagens fúngicas de *Aspergillus*. Para a análise das atividades da CMC_{Case} e xilanase, foram utilizadas soluções de 1 % de CMC e xilana. A máxima produção de xilanase foi de 300,07 U/g em 72 h de fermentação, a máxima produção de CMC_{Case} foi de 41,47 U/g em 120 h e a máxima produção de FPase foi de 2,11 FPU/g em 144 h, utilizando o fungo *Aspergillus niger SCBMI*, apenas o bagaço do sorgo biomassa como fonte de carbono e a peptona como fonte de nitrogênio.

Lins (2017) chama a atenção para o potencial do sorgo sacarino cultivar IPA P222 na produção de celulases e hemicelulases, trabalhando com o fungo o *T. reesei* e o farelo de trigo como fonte indutora no processo de fermentação semissólida. Para a análise das atividades da CMC_{Case} e xilanase, foram utilizadas soluções de 2 % e 1 %, de CMC e xilana, respectivamente. As máximas atividades das enzimas CMC_{Case}, FPase e xilanase foram de 7,55 U/g em 72 h, 1,00 U/g em 216 h e 577,41 U/g em 216 h, respectivamente, na umidade de 60 % e teor de farelo de trigo de 50 %.

Zamora (2017) estudou a produção de celulases e hemicelulases a partir de caules e folhas de *Alstroemeria sp.* por meio do crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO6 através de FES em 14 dias. O fungo foi capaz de produzir as enzimas Xilanase, □-

xilosidase, endoglucanase (CMCase), exoglucanase e β -glicosidase, cujas máximas atividades para a Xilanase de 74,5 U/g em 120 h e CMCase de 20,5 U/g 216 h.

Marques *et al.* (2018), estudaram 14 cepas de fungos endofíticos ainda não exploradas para produção de celulasas e xilanases por FES, utilizando uma mistura (5 g: 1:1 (m/m)) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato, com umidade inicial de 70 % e 5 discos miceliais como inóculo, por 7 dias, a 28 °C. Um dos fungos que se destacou em atividade endoglucanásica foi o *Trichoderma viridae* PAJ 01 atingindo máxima atividade de CMCase de 64,56 U/g. Para a produção de FPase e Xilanase, obteve máximas atividades de 0,26 e 351,74 U/g, respectivamente.

Souza *et al.* (2018) estudaram as condições operacionais de temperatura (25, 33 ou 38 °C), umidade (50, 65 ou 80 %) e tempo de fermentação (24, 72 e 120 h) na produção da enzima Xilanase, durante a FES do bagaço de cana-de-açúcar utilizando microrganismo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 e obteve máxima atividade de Xilanase de 19,95 UI/g, nas condições de 65 % de umidade, temperatura de 25 °C e tempo de fermentação de 72 h.

Salomão *et al.* (2019) estudaram as condições operacionais de temperatura (28, 33 ou 38 °C) e umidade (50, 60 ou 70 %) para a produção de celulasas pelos fungos *Penicillium sp.*, *Rhizomucor sp.* e *Trichoderma koningii* INCQS 40331 (CFAM 422), utilizando o bagaço da cana-de-açúcar *in natura*, pré-tratado por uma solução ácido-alcalina e por peróxido de hidrogênio como substratos no processo de fermentação em estado sólido. Os ensaios foram realizados em erlenmeyer de 250 mL com 5 g de meio e para a análise da atividade CMCase, foi utilizada solução de CMC a 2 %. Os resultados mostraram que o fungo mais adequado para a produção de CMCase foi o *Trichoderma koningii* (8,2 UI/g), seguido por *Penicillium sp* (1,7 UI /g). Além disso, os melhores resultados foram obtidos usando NSB para todos os fungos.

Taherzadeh-Ghahfarokhi *et al.* (2019), estudaram os possíveis efeitos de aditivos carbonosos (Tween 80, betaína, carboximetilcelulose (CMC) e lactose) na produção de celulasas e xilanases. As enzimas foram produzidas por *Trichoderma reesei* em FES de palha de trigo, farelo de trigo, palha de arroz e casca de arroz. Para a melhor indução, a atividade da Xilanase foi cerca de 469 U/gds com betaína como único indutor. Aumentou para 218 % com a mistura de Tween 80, A betaína e CMC, confirmando que a combinação de aditivos é mais indutora. Utilizando o farelo de trigo na ausência de aditivos obtiveram máximas atividades de 1949,0, 7,6 e 6,6 U/g.d.s para as enzimas Xilanase, CMCase e FPase, repectivamente.

Albano (2012) trabalhou com 6 linhagens de fungos filamentosos, incluindo *A. fumigatus* e *T. reesei* para, utilizando como substrato apenas bagaço de cana-de-açúcar ou suplementado com farelo de trigo na produção de celulases e xilanases por FES (umidade de 80 %) e FSm (relação de composição do substrato no meio de 3 %). Para a análise das atividades da CMCase e xilanase, foram utilizadas soluções de 0,5 % de CMC e xilana. Para a FSm utilizando o fungo *T. reesei* as atividades máximas de CMCase e Xilanase foram de 10,7 U/g e 666 U/g, respectivamente, sendo mais expressivas quando comparadas as atividades por FES que foram de 7,2 U/g e 103,6 U/g quando utilizado apenas o bagaço de cana-de-açúcar.

Florencio *et al.* (2016) estudaram o efeito dos processos de fermentação submersa (FSm) e sequencial (FSL) (semissólida seguida de submersa), sobre a produção de enzimas por *A. niger* e *T. reesei*, utilizando como substrato bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e glicose (10 g/L). Os dois fungos obtiveram atividades de xilanase e CMCase na FSL maiores que as produzidas por FSm. Utilizando o *Trichoderma reesei* Rut C30, as máximas atividades para a FSm e FSL de CMCase foram 1,6 e 2,5 U/mL, e para a xilanase de 7,9 e 18,3 U/mL, respectivamente. Usando o fungo filamentos *Aspergillus niger* A12, as máximas atividades de CMCase foram de 0,6 e 0,9 U/mL e xilanase foram de 7,8 e 26,4 U/mL. Já para a FPase as máximas atividades foram as mesmas para a FSL e FSm, com valores de 0,02 e 0,01 U/mL utilizando o *Trichoderma reesei* Rut C30 e o *Aspergillus niger* A12, respectivamente.

Salomão (2017) estudou as melhores condições operacionais de temperatura (28, 33 ou 38 °C) e concentração de bagaço de cana (0,5, 1,6 ou 2,7 %) para produção de celulases a partir dos fungos *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. e *Trichoderma koningii* INCQS 40331 (CFAM 422) utilizando bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com solução ácido-base via FSm. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de solução salina e o substrato nas concentrações de trabalho. O melhor resultado para a atividade da CMCase foi obtido com o fungo *Trichoderma koningii* a 28 °C e concentração de substrato *in natura* de 2,7 % de 3,130 U/mL em 72 h. Já para o bagaço pré-tratado o melhor resultado foi á 28 °C e 0,5 % de substrato com uma atividade de 1,524 U/mL.

Silva *et al.* (2018) estudaram diferentes fontes de carbono (resíduos) com ou sem alguns pré-tratamentos (biológico ou químico), a fim de aumentar a produção de enzimas celulases e xilanases, produzidas usando *Trichoderma reesei* QM9414 no processo de FSm. O inóculo foi obtido pela transferência asséptica de círculos de 10 mm de diâmetro

da cultura do fungo para frascos de 250 mL contendo 80 mL de meio de cultura com concentração de substrato de 3 %. As atividades atingiram um máximo de 0,85 FPU/mL para a FPase e 3,14 U/mL (104,69 U/g) para a CMCase em 240 h com a casca da laranja suplementada com sacarose e 93,08 U/mL para a Xilanase utilizando o bagaço de cana-de-açúcar sob pré-tratamento alcalino.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

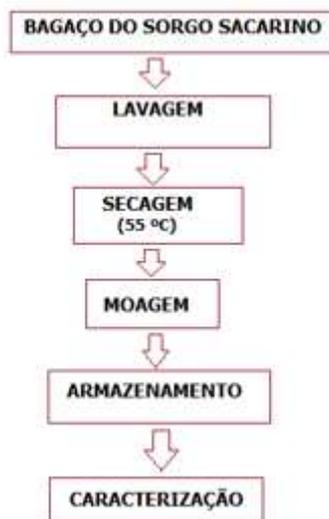
Os experimentos desta pesquisa foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química, da Universidade Federal de Campina Grande.

3.1 MATÉRIA-PRIMA

A matéria prima utilizada como substrato foi o bagaço do colmo do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) da variedade IPA P15, cedidos pelo Instituto de Pesquisas Agropecuárias de Pernambuco (IPA), e o farelo de trigo (*in natura*), adquirido no comércio de Campina Grande, o qual foi usado como fonte indutora de nitrogênio orgânico nos processos fermentativos da produção das celulases e hemicelulases.

A Figura 3.1 mostra as etapas realizadas com o substrato até ser utilizado nos processos fermentativos.

Figura 3.1 – Etapas da preparação do bagaço do sorgo sacarino IPA P15.



Inicialmente o bagaço do sorgo sacarino foi lavado com água destilada para reduzir o excesso de açúcares redutores e outros materiais solúveis presentes no interior do bagaço. Em seguida o BSS, foi seco em estufa com circulação de ar, a temperatura de 55 ± 2 °C, até atingir massa constante, e então triturado para a redução de suas partículas em um moinho de facas tipo cróton, da marca Tecnal (Figura 3.2). O material foi homogeneizado e armazenado em embalagens de PVC hermeticamente fechadas à temperatura ambiente para

posteriormente ser caracterizado e utilizado como substrato na fermentação.

Figura 3.2 – Etapas da preparação: A) Bagaço; B) Moinho de faca; C) Moagem do bagaço.



3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização físico-química do bagaço do sorgo sacarino IPA P15 foi realizada quanto aos teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina, holocelulose e α -celulose seguindo a metodologia descrita por Morais *et al* (2010). Foram realizadas também análises de açúcares redutores e proteínas para o bagaço do sorgo sacarino e o farelo de trigo, sendo todas as análises feitas em triplicata.

3.2.1. Teor de Umidade

Para a realização desta análise utilizou-se cadinhos de porcelana, que foram lavados e secos na estufa a 105 °C durante 60 min. Estes foram mantidos em dessecador por 30 minutos, em seguida, foram pesados em uma balança analítica, obtendo-se assim a massa de cada recipiente seco. Dentro de cada cadinho foram colocados 8 g do material, e o conjunto cadinho-material foi levado à estufa a 105 °C até atingir massa constante. O conjunto foi retirado e posto em um dessecador para resfriar, por 30 minutos. Em seguida, foi pesado e sua massa rapidamente anotada para obtenção do teor de umidade, U(%), conforme Equação 3.1:

$$U(\%) = \left[\frac{MRAU - MRAS}{MA} \right] 100 \quad (3.1)$$

Onde:

MRAU = Massa do conjunto recipiente + amostra úmida;

MRAS = Massa do conjunto recipiente + amostra seca;

MA = Massa da amostra.

3.2.2. Teor de Cinzas

Para essa análise, cadinhos de porcelana vazios foram colocados na estufa a 105 °C durante 60 min. Depois foram mantidos em dessecador até atingir a temperatura ambiente e em seguida foram pesados vazios e com 2 g da amostra seca resultante da análise feita para a verificação do teor de umidade.

Logo após a pesagem os cadinhos foram levados à mufla, e para o aquecimento da amostra utilizou-se uma rampa de aproximadamente 9,6 °C/min, para que a temperatura de trabalho de 600 °C fosse atingida após 1 hora. Essa temperatura foi mantida por 3 horas, e, ao final desse tempo, foi regulada para 200 °C onde permaneceu por mais 2 horas.

O conjunto cadinho-material calcinado foi colocado em um dessecador para resfriar por 30 minutos, em seguida foi pesado em balança analítica. Para a obtenção do teor de cinzas totais, Cz (%), utilizou-se a Equação 3.2:

$$Cz(\%) = \left[\frac{MRAC - MR}{MA} \right] 100 \quad (3.2)$$

Onde:

MRAC = Massa do conjunto recipiente + amostra calcinada;

MR = Massa do recipiente;

MA = Massa da amostra.

Como os dados de cinzas se referem à massa da amostra seca, logo, foi necessário corrigir os valores do material original. O teor de cinzas corrigido foi calculado pela Equação 3.3:

$$Cz(\%)_{Corrigido} = \frac{Cz(\%)(100 - U(\%))}{100} \quad (3.3)$$

3.2.3. Teor de Extrativos

Iniciou-se esta análise pesando um papel de filtro previamente seco em estufa a 105 °C e resfriado à temperatura ambiente em dessecador. Em seguida, foram pesadas 5,0 g do material resultante da análise feita para a verificação do teor de umidade.

Feito isso, o conjunto papel-material foi dobrado, formando-se um cartucho e depositado dentro de um Soxhlet. Montou-se o sistema de extração, unindo-se o aparelho de Soxhlet a um condensador de bolas e um balão volumétrico de fundo redondo de 250 mL no qual foram adicionados 100 mL de álcool etílico e 100 mL de ciclohexano como solventes extratores. O conjunto foi colocado em uma manta aquecedora, permanecendo assim por um período de 6 horas de extração.

Após esse tempo, o balão foi removido, e o seu conteúdo (solvente e extrativos) armazenado para posterior utilização. O cartucho de papel foi posto em uma estufa a 105 °C por 14 horas. Em seguida foi colocado em dessecador por 30 minutos para seu resfriamento e pesado em balança analítica. Para a obtenção do teor de extrativos, E (%), utilizou-se a Equação 3.4:

$$E(\%) = \left[\frac{MRES - MRRS}{MA} \right] 100 \quad (3.4)$$

Onde:

MRES = Massa do conjunto recipiente + extrativos secos;

MRRS = Massa do conjunto recipiente + resíduo de solvente;

MA = Massa da amostra.

Como os dados de extrativos se referem à massa da amostra seca, foi necessário corrigir os valores do material original. O teor de extrativos corrigido foi calculado pela Equação 3.5:

$$E(\%)_{Corrigido} = \frac{E(\%)(100 - U(\%))}{100} \quad (3.5)$$

3.2.4. Teor de Lignina

Na determinação de lignina utilizou-se cerca de 1,0 g da amostra na sua forma sem umidade e sem extrativos. O material foi colocado em um almofariz, onde foram adicionados 17,0 mL de ácido sulfúrico a 72 % (m/m), resfriado em geladeira a 15 °C, antes do uso. Após a adição do ácido, o material foi macerado por 15 minutos cuidadosamente com um pistilo. Após este procedimento, o material foi deixado em digestão por 24 horas.

Passado esse tempo, foram adicionadas 306 mL de água destilada ao almofariz para diluir o ácido sulfúrico a 4 % (m/m). O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de fundo redondo de 500 mL. Em seguida o balão foi conectado ao mesmo sistema utilizado para a determinação de extrativos, sendo mantido sob aquecimento e refluxo por 4 horas, contadas a partir do início da fervura do conteúdo presente no balão.

Em paralelo, colocou-se um funil de vidro por uma hora na estufa a 105 °C, sendo em seguida resfriado em dessecador e pesado. O funil foi colocado sobre um kitassato de 1.000 mL. Conectou-se o kitassato com o funil através de uma mangueira a outro kitassato e esse com outra mangueira a bomba, para que assim formasse um sistema de vácuo para facilitar a filtração.

O material contido no balão foi aos poucos sendo transferido para o funil, com uma agitação constante, para evitar a perda de precipitado no interior do funil. O precipitado recolhido no funil foi lavado com água destilada até que o filtrado atingisse pH próximo ao da água utilizada. Em seguida, o funil foi levado a estufa a 105 °C onde permaneceu por 2 horas. Após resfriado em dessecador foi pesado em balança analítica.

Para a obtenção do teor de lignina insolúvel, LI (%), utilizou-se a Equação 3.6:

$$LI(\%) = \left[\frac{(MFL - MF)}{MA} 100 \right] - Cz(\%) \quad (3.6)$$

Onde:

MFL = Massa do conjunto funil + lignina seca;

MF = Massa do funil limpo e seco;

MA = Massa da amostra.

Como os dados de lignina se referem à massa da amostra seca e sem extrativos, foi necessário corrigir os valores do material original. O teor de lignina corrigido foi calculado pela Equação 3.7:

$$LI(\%)_{Corrigido} = \frac{LI(\%)[100 - (E(\%) + U(\%))]}{100} \quad (3.7)$$

3.2.5. Teor de Holocelulose

Em um erlenmeyer de 500 mL, foram pesados 3,0 g do material, sem umidade e extrativos. Em seguida adicionados 2,5 g de clorito de sódio, com pureza aproximada de 80 %, 120 mL de água destilada e 1 mL de ácido acético glacial, com pureza $\geq 99,85$ %. Foi colocada uma barra magnética para garantir uma agitação constante durante a reação. Em uma capela de exaustão, preparou-se um banho-maria, mantendo-se a temperatura constante a 70 °C.

O erlenmeyer de 500 mL foi tampado com um erlenmeyer de 25 mL e mergulhado no banho. Após 1 hora de reação foi realizada uma nova adição de 1 mL de ácido acético. Decorrida mais 1 hora adicionou mais 1 mL do ácido ao meio reacional, prosseguindo-se com o aquecimento em banho por mais 3 horas. No decorrer do aquecimento, foi percebida a elevação de cloro, observada pela formação de um gás amarelo-esverdeado dentro do Erlenmeyer.

Em paralelo foi preparado o mesmo sistema de filtração utilizado para determinação da lignina. Encerrado o período de reação, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para o funil com uma agitação constante evitando assim a perda de precipitado (holocelulose) no interior do erlenmeyer. A filtração foi iniciada e o precipitado recolhido no funil foi lavado com água destilada até que o filtrado atingisse pH próximo ao da água utilizada.

O conjunto funil/holocelulose foi transferido para uma estufa a 105 °C, onde permaneceu por 18 horas, a fim de que o material fosse completamente seco. Em seguida o conjunto funil/holocelulose foi resfriado em dessecador por 30 minutos e pesados em balança analítica. Para a obtenção do teor de holocelulose, H (%), utilizou-se a Equação 3.8:

$$H(\%) = \left[\frac{MFH - MF}{MA} \right] 100 \quad (3.8)$$

Onde:

MFH = Massa do conjunto funil + holocelulose seca;

MF = Massa do funil limpo e seco;

MA = Massa da amostra.

Como os dados de holocelulose se referem à massa da amostra seca e sem extrativos, foi necessário corrigir os valores do material original. O teor de holocelulose corrigido foi calculado pela Equação 3.9:

$$H(\%)_{\text{Corrigido}} = \frac{H(\%)[100-(E(\%)+U(\%)]}{100} \quad (3.9)$$

3.2.6. Teor de α -celulose

Inicialmente pesou-se 1,0 g da holocelulose seca em um almofariz à temperatura ambiente. Foram adicionados 15 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 17,5 % (m/v) e aguardou-se dois minutos de contato entre a solução e o material. Após esse contato, o material foi macerado por oito minutos. Em seguida foram acrescentados 40 mL de água destilada ao almofariz.

Foi preparado o mesmo sistema de filtração utilizado para determinação da lignina. O conteúdo do almofariz foi transferido para o funil com agitação constante e o precipitado (α -celulose) recolhido no funil foi lavado várias vezes com água destilada até que o filtrado atingisse pH próximo ao da água utilizada.

Após a filtração, o funil foi levado a estufa a 105 °C, onde permaneceu por 18 horas. O conjunto funil/ α -celulose foi colocado em um dessecador por 30 minutos para resfriar e em seguida foi pesado. Para obtenção do teor de α -celulose, A (%), utilizou-se a Equação 3.10:

$$A(\%) = \left[\frac{MFA-MF}{MAH} \right] 100 \quad (3.10)$$

Onde:

MFA = Massa do conjunto funil + α -celulose seca;

MF = Massa do funil limpo e seco;

MAH = Massa da amostra de holocelulose.

Para obter o teor corrigido de α -celulose ($A(\%)_{\text{corrigido}}$), com base no teor corrigido de holocelulose ($H(\%)_{\text{corrigido}}$), foi utilizada a Equação 3.11 para a realização deste cálculo:

$$A(\%)_{\text{corrigido}} = \frac{(H(\%)_{\text{corrigido}} A(\%))}{100} \quad (3.11)$$

E por meio do cálculo da diferença entre os valores de holocelulose e α -celulose corrigidos, foi calculado o valor do percentual corrigido de hemicelulose ($HeC(\%)_{corrigido}$), dado pela Equação 3.12:

$$H(\%)_{corrigido} - A(\%)_{corrigido} = HeC(\%)_{corrigido} \quad (3.12)$$

3.2.7 Açúcares Redutores

A concentração de açúcares redutores (AR) foi determinada seguindo a metodologia descrita por Miller (1959), com algumas adaptações. Baseia-se na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a 3-amino-5-nitrosalicílico, simultaneamente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico.

Inicialmente foi pesado 1 grama da amostra (M_A) *in natura* em balança analítica. Essa massa foi diluída com água destilada (V_A), nas proporções de 1:25, 1:50 e 1:100, para ser determinada a diluição extratora de todos os açúcares redutores presentes na amostra. Deixou-se em agitação por 30 minutos e em seguida foi realizada filtração da amostra. As diluições foram feitas de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração e assim a concentração de açúcares redutores da amostra fossem calculadas com base no fator de conversão (F_C) da curva de calibração realizada previamente.

Do filtrado transferiu-se 1 mL para tubos de ensaios e em seguida adicionou-se 1 mL da solução de DNS. Em seguida os tubos foram levados para banho com água fervente por exatos 5 min. Após este intervalo, os tubos foram retirados e colocados em banho de água fria, até completo resfriamento. Em cada tubo foram adicionados 8 mL de água destilada e depois foram homogeneizados. A leitura da absorbância da amostra foi então realizada em um espectrofotômetro UV-Vis em um comprimento de onda de 540 nm, previamente zerado com uma amostra em branco submetida ao mesmo procedimento, no qual 1mL do filtrado da amostra, foi substituído por 1 mL de água destilada que foi o fluido utilizado na extração dos açúcares presentes na amostra a ser analisada.

Os resultados de açúcares redutores foram expressos em gramas de açúcares redutores por grama de amostra analisada, seguindo a Equação 3.13.

$$AR \left(\frac{g_{AR}}{g_A} \right) = \frac{Abs F_c V_A}{M_A 1000} \quad (3.13)$$

Onde:

Abs = Absorbância;

F_C = Fator de conversão da absorbância em mg de AR por mL de solução;

V_A = Volume de água destilada utilizado na diluição da amostra (mL);

M_A = Massa da amostra (g).

3.2.8 pH

A determinação do pH foi realizada seguindo a metodologia descrita em IAL (2008). Pesou-se 2 g da amostra e adicionou-se 20 mL de água destilada. Após a homogeneização da suspensão, a mesma foi deixada por 30 minutos em repouso e em seguida mediu-se o pH utilizando o pH-indicador *strips (non-bleeding)* de marca MColorpHast.

3.2.9 Proteína

A proteína bruta foi quantificada através da determinação de nitrogênio, feita pelo processo de digestão Kjeldahl com posterior destilação e titulação conforme Malavolta *et al.* (1989). Esse método foi realizado em 4 etapas: Pré-digestão ou digestão a frio, digestão a quente, destilação e titulação.

Na primeira etapa de digestão a frio, pesou-se aproximadamente 0,1 g da amostra em papel manteiga e transferiu-se para os tubos digestores. Em cada tubo digestor foram adicionados 0,5 g da mistura catalítica digestora (composta por 90,1 % de sulfato de sódio, 9 % de sulfato de cobre II e 0,9 % de dióxido de selênio) e 5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A digestão a frio ocorreu durante 12 horas enquanto as amostras permaneceram em repouso.

A segunda etapa da digestão a quente consistiu em colocar os tubos digestores no bloco digestor o qual foi submetido a aquecimentos com um aumento gradual da temperatura de 50 °C até 400 °C em intervalos regulares de 30 minutos (para cada temperatura selecionada esperou-se estabilizar para poder iniciar a contagem dos 30 min).

Atingidos os 400 °C, o final da digestão foi sinalizado pelo aparecimento da coloração azul-esverdeada da amostra.

Terminada a digestão, as amostras foram encaminhadas para a etapa de destilação onde foi adicionado 3 gotas do indicador fenolftaleína a 1 % no tubo contendo a amostra digerida. A destilação foi realizada no destilador Kjeldahl com a liberação da solução de hidróxido de sódio a 40 % no tubo com a amostra digestora até que ocorresse a neutralização da amostra que é evidenciada pela mudança da cor, para uma coloração marrom. A amostra destilada foi recolhida em um erlenmeyer de 250 mL acoplado abaixo do condensador, contendo ácido bórico a 4 % como agente capturador de nitrogênio e também 3 gotas do indicador misto. A destilação terminou ao completar cerca de 50 mL dentro do erlenmeyer e a presença de uma coloração esverdeada na amostra destilada.

Após a destilação a amostra foi encaminhada para a titulação na presença de ácido clorídrico 0,1 N, previamente padronizado. O destilado foi titulado até aparecimento da coloração avermelhada, obtendo assim o volume gasto na titulação. Em paralelo, foi realizado uma prova em branco, contendo apenas os reagentes. O volume gasto para a titulação do branco foi subtraído dos resultados dos volumes das amostras.

O teor de proteína bruta foi obtido a partir da Equação 3.14, onde o fator de conversão utilizado para o farelo de trigo foi de 5,83 e para o sorgo sacarino 6,25 (IAL, 2008).

$$P\% = \frac{(V_L F_{CHCl} N_{HCl} F_{Nitrogênio} fc) 100}{M_A} \quad (3.14)$$

Onde:

V_L = Volume gasto na titulação ($V_{HCl} - V_{Branco}$) (L);

F_{CHCl} = Fator de correção do Ácido clorídrico a 0,1 mol/L (valor utilizado = 1,02);

N_{HCl} = Normalidade do Ácido clorídrico (valor utilizado = 0,1 N);

$F_{Nitrogênio}$ = Fator de correspondência do nitrogênio (valor utilizado = 14);

fc = Fator de conversão para percentual de proteína (valor para proteína genérica = 6,25).

3.3 ISOTERMAS DE DESSORÇÃO DE UMIDADE

As curvas de dessecção (isotermas) foram obtidas no presente trabalho no intuito de conhecer o comportamento do substrato que foi utilizado durante os processos de fermentação, através da determinação da umidade e atividade de água limite para o crescimento do microrganismo utilizado nesses processos. Foram obtidas no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, a partir dos dados de atividade de água e umidade de equilíbrio, utilizando o medidor de atividade de água Aqualab 3TE (Decagon), estufa de secagem (Marconi) e balança analítica (Shimadzu).

O método utilizado para determinação das isotermas foi de acordo com a metodologia usada por Capriste e Rotstein (1982). Inicialmente, amostras dos substratos usados nos ensaios da fermentação (BSS com 0 e 50 % de FT) foram umidificadas com água destilada. Em seguida, cada amostra em embalagem hermeticamente fechada foi mantida sob refrigeração “*overnight*” até uniformização da umidade do substrato (em média 15 horas).

Após esse tempo, em balança analítica foi pesado 1,5 g de cada amostra e levada ao equipamento Aqualab para a determinação da atividade de água (A_w) na temperatura de 28 °C, temperatura utilizada para produção das enzimas. A amostra foi levada a estufa de secagem a temperatura de 40 °C por 5 minutos. Após esse período a amostra foi resfriada em dessecador para posterior leitura da atividade de água (A_w) no medidor de atividade de água em seguida pesagem em balança analítica. A amostra foi submetida repetidamente a esse processo (estufa-dessecador-Aqualab-balança) até atingir o equilíbrio.

Ao final desse processo a amostra foi submetida a estufa a 105 °C, para obtenção da sua massa seca, e conseqüentemente, da umidade de equilíbrio. A umidade de equilíbrio, em base seca, foi determinada pela relação entre a massa de água e a massa seca das amostras, conforme a Equação 3.15:

$$X_{eq} = \left[\frac{M_{eq} - M_s}{M_s} \right] 100 \quad (3.15)$$

Onde:

X_{eq} = Umidade de equilíbrio (% base seca);

M_{eq} = Massa da amostra no equilíbrio (g);

M_s = Massa da amostra seca (g).

Para o ajuste matemático das curvas de desorção de umidade, foi utilizado o modelo de GAB (Equação 3.16), utilizando-se o processador STATISTICA versão 7.0 (STATSOFT, 1995).

$$X_{eq} = \frac{X_m C K A_w}{(1 - K A_w)(1 - K A_w + C K A_w)} \quad (3.16)$$

Onde:

X_{eq} = Umidade de equilíbrio;

A_w = Atividade de água;

X_m = Umidade na monocamada molecular;

C e K = Parâmetros que dependem da temperatura e da natureza do produto.

3.4 PRODUÇÃO DAS CELULASES E HEMICELULASES

Neste trabalho foi estudada a produção de enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) e xilanolítica (Xilanase), utilizando o fungo *Trichoderma reesei* LCB 48 em fermentação semissólida e submersa do bagaço do sorgo sacarino IPA P15.

3.4.1 Microrganismo

O fungo foi mantido em blocos de ágar de 4-6 mm³ no interior de tubos tipo eppendorf, preenchidos com água destilada estéril e estocados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) a temperatura de 8 °C (CASTELLANI, 1939) até sua utilização.

A repicagem do fungo foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na incubação dos esporos contidos no tubo eppendorf em placas de Petri contendo meio BDA (Batata - Dextrose - Ágar). Cerca de 39 g de BDA foram dissolvidos em água destilada com agitação e fervura durante 1 min para dissolver completamente o meio. Em seguida foi autoclavado por 15 min a 120 °C. Após resfriamento, o meio estéril foi

distribuído nas placas de Petri e após a solução de BDA solidificar o microrganismo foi inoculado.

Após a inoculação as placas de Petri contendo o microrganismo foram incubadas a 28 °C por um período de 10 dias. Tempo necessário para que as placas estivessem totalmente cobertas por esporos (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Repique do *Trichoderma reesei* em placa de Petri.



A partir do repique em placas de Petri, foi realizada a segunda etapa, desta vez em sabugo de milho, o qual proporciona maior crescimento e conseqüentemente maior esporulação do fungo. Em cada placa de Petri com o microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48, adicionou-se 8 mL de espessante (Tween 80 0,3 % v/v) e, com o auxílio de um bastão de vidro, foi feito o desprendimento dos esporos contidos no meio de cultivo deixando a suspensão homogênea. Em erlenmeyers de 125 mL foram pesados 4,6 g de sabugos previamente cozidos, triturados e secos (55 °C), e adicionou-se 6 mL de solução umidificante, contendo peptona e outros elementos. Os erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão envolvidos com gaze, homogeneizados e esterilizados em autoclave por 15 min a 120 °C. Com o auxílio de um pipetador, transferiu-se 1 mL de suspensão de esporos em cada erlenmeyer contendo sabugo de milho previamente autoclavado e homogeneizado. Em seguida, os erlenmeyers de 125 mL foram fechados com tampão de gaze e algodão e incubados a 28 °C por um período de 10 dias, até que todo o sabugo estivesse coberto de esporos (Figura 3.4).

Figura 3.4 - Repique do *Trichoderma reesei* em sabugo de milho.



Após o período de cultivo do microrganismo, os erlenmeyers foram mantidos sob refrigeração a 9 °C (geladeira) por período máximo de até 3 meses e utilizados como inóculos nos ensaios de fermentação.

3.4.2 Inoculação do *Trichoderma reesei* LCB 48

Para o preparo do inóculo a ser utilizado nas fermentações, adicionou-se 40 mL de uma solução de Tween 80 a 0,3 % (v/v) em erlenmeyers contendo os esporos do *T. reesei* em sabugo de milho. Após agitação, a suspensão de esporos foi filtrada em um béquer com auxílio de gaze e algodão (autoclavados a 120 °C por 15 minutos).

A concentração do microrganismo presente na suspensão foi determinada através da contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada e um microscópio óptico. Para a contagem de esporos, diluiu-se a suspensão, e a mesma foi homogeneizada com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida colocou-se esta solução, entre a câmara de Neubauer e a lamínula, com o auxílio de uma micropipeta para posterior contagem dos esporos no microscópio óptico.

A concentração de esporos na suspensão foi encontrada a partir da Equação 3.17:

$$C_{Esporos} = 25 \bar{E} F_D 10^4 \quad (3.17)$$

Onde:

$C_{esporos}$ = Concentração de esporos na suspensão;

\bar{E} = Média de esporos contados na Câmara de Neubauer;

F_D = Fator de diluição para contagem na Câmara de Neubauer.

O volume da suspensão de esporos adicionado aos ensaios de fermentação semissólida foi ajustado de modo a se ter um inóculo de 10^7 esporos.g⁻¹ de meio, e para a fermentação submersa uma concentração de inóculo de 10^7 esporos.mL⁻¹ de meio, conforme a Equação 3.18.

$$V_{Suspensão} = \frac{C_{Inóculo} M}{C_{Esporos}} \quad (3.18)$$

Onde:

$V_{Suspensão}$ = Volume da suspensão que será inoculado nos ensaios de fermentação;

$C_{Inóculo}$ = Concentração de inóculo desejada para a fermentação (10^7);

M = Massa (g) de substrato utilizada na fermentação semissólida (substituída pelo volume do meio, V (mL), nos ensaios da fermentação submersa).

3.4.3 Fermentação Semissólida

Para o estudo da produção das enzimas por fermentação semissólida, foi realizado um planejamento fatorial do tipo 2^2 com 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios.

Com o planejamento experimental, foram analisadas a influência das seguintes variáveis independentes no processo: Umidade inicial (U_i , em b.u. %) e teor de farelo de trigo (FT, em %). As variáveis dependentes avaliadas foram as atividades celulolíticas da FPase (celulase total) e da CMCase (Endo- β -1,4-Glucanase) e xilanolítica da xilanase (endo- β -1,4-xilanase).

Os valores adotados para as variáveis independentes foram baseados em estudos feitos por Lins (2017) e Rodríguez-Zúñiga *et al* (2011) na produção de celulases e hemicelulases com diferentes resíduos agroindustriais.

Nas Tabelas 3.1 e 3.2 encontram-se, respectivamente, os níveis e a matriz do planejamento, que foram utilizados nesta pesquisa.

Tabela 3.1 - Níveis do planejamento experimental da produção das enzimas na FFS.

Variável	Nível		
	-1	0	+1
U_i (b.u. %)	60	70	80
FT (%)	0	25	50

Tabela 3.2 - Matriz de planejamento experimental fatorial 2² com 3 repetições no ponto central da produção de enzimas na FSS.

Ensaio	U _i (b.u. %)	FT (%)
1	60	0
2	80	0
3	60	50
4	80	50
5	70	25
6	70	25
7	70	25

Os ensaios de fermentações semissólida foram realizados em erlenmeyers de 250 mL contendo o substrato previamente umidificado, de acordo com as condições do planejamento experimental.

A umidade inicial do meio foi ajustada para 60, 70 e 80 % (base úmida) pela adição de um volume definido de água destilada, que foi determinado por meio de um balanço de massa, seguindo a Equação 3.19, a qual leva em consideração que a densidade da água é igual a 1,00 g.cm⁻³ (à 28 °C):

$$V = \frac{M_u (U_2 - U_1)}{(1 - U_2)} \quad (3.19)$$

Onde:

V = Volume de água a ser adicionada ao meio (mL);

M_u = Massa do meio a ser umidificado;

U₁ = Umidade natural do meio;

U₂ = Umidade do meio desejada.

Após umidificação, o substrato foi deixado *overnight* (em média 15 horas), em embalagem hermeticamente fechada sob refrigeração (8 °C), de acordo com cada ensaio do planejamento.

Decorridas as 15 h, foram pesadas 15 g do substrato umidificado em erlenmeyers de 250 mL, vedados com tampão de algodão envolvido com gaze e papel alumínio, e em seguida foram autoclavados por 15 minutos à 120 °C. Após resfriamento cada meio de cultivo foi inoculado com o *Trichoderma reesei* LCB 48 na concentração de 1,0 x 10⁷ esporos.g⁻¹.

Os erlenmeyers foram incubados em câmara climática com temperatura controlada de 28 °C, durante um período de 240 horas. Foram retirados, periodicamente, em intervalos de 24 h durante os 10 dias, um erlenmeyer, todos na mesma condição inicial do processo, para a análise de umidade (base úmida), pH e a extração das enzimas, para serem determinados os açúcares redutores (AR) e as atividades enzimáticas de cada extrato enzimático durante a cinética fermentativa. Para a realização das análises periódicas cada frasco coletado foi submetido a uma homogeneização do meio fermentado de forma a obter amostras reprodutivas e minimizar os erros de amostragem.

3.4.4 Fermentação Submersa

Para o estudo da produção das enzimas por fermentação submersa, foi realizado um planejamento fatorial do tipo 2^2 com 3 repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios.

Com o planejamento experimental, foram analisadas a influência das seguintes variáveis independentes no processo: teor de farelo de trigo (FT, em %) e relação massa/volume (m/v) da concentração do substrato (com 0 e 50 % de FT). As variáveis dependentes avaliadas foram as atividades celulolítica da CMCCase (Endo- β -1,4-Glucanase) e xilanolítica da xilanase (endo- β -1,4-xilanase).

Os valores adotados para as variáveis independentes foram baseados em estudos feitos por Lins (2017) e Salomão (2017) na produção de celulases e hemicelulases com diferentes resíduos agroindustriais.

Nas Tabelas 3.3 e 3.4 encontram-se, respectivamente, os níveis e a matriz do planejamento, que foram utilizados nesta pesquisa.

Tabela 3.3 - Níveis do planejamento experimental da produção das enzimas na FSm.

Variável	Nível		
	-1	0	+1
FT (%)	0	25	50
m/v (%)	1	3	5

Tabela 3.4 - Matriz de planejamento experimental fatorial 2^2 com 3 repetições no ponto central da produção de enzimas na FSM.

Ensaio	FT (%)	m/v (%)
1	0	1
2	0	5
3	50	1
4	50	5
5	25	3
6	25	3
7	25	3

Os ensaios de fermentação submersa foram realizados baseado na metodologia descrita por Albano (2012). Em erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 50 mL de meio de cultivo com a seguinte composição (m/v): m/v % (1, 3 e 5 %) da relação BSS/FT (0, 25 e 50 %), 0,4 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,01 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 % K_2HPO_4 , 0,1 % KH_2PO_4 e 0,1 % de solução de micronutrientes (0,1% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,02 % ZnSO_4). Em seguida o pH foi ajustado a 5,0 e o sistema esterilizado a 120 °C por 15 min.

O meio de cultivo foi inoculado com uma concentração de 10^7 esporos/mL de meio líquido de fermentação. Os erlenmeyers foram colocados em câmara incubadora do tipo shaker da marca MARCONI com temperatura controlada de 28 °C, sob agitação de 150 rpm, durante um período de 240 horas. Foram retirados, periodicamente, em intervalos de 24 h durante 10 dias, um erlenmeyer, todos na mesma condição inicial do processo. Foi filtrado com papel de filtro Whatman nº1. O meio de cultivo livre de biomassa foi utilizado como extrato enzimático bruto para serem determinadas as atividades enzimáticas durante a cinética fermentativa.

3.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

3.5.1 Extração das Enzimas

A extração, do complexo enzimático produzido na fermentação semissólida, foi feita com tampão citrato de sódio (0,05 mol. L^{-1} /pH = 4,8) (BAILEY *et al.*, 1992), na proporção de 7,5 mL de tampão por grama de substrato fermentado. Esse material foi homogeneizado e levado para uma incubadora do tipo shaker da marca MARCONI, sob rotação de 150 rpm, em temperatura de 4 °C por 30 minutos. Logo após a extração, foi

realizada a filtração, com gaze, algodão e papel filtro (autoclavados a 120 °C por 15 minutos), para remoção dos esporos.

O complexo enzimático foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas expressas em carboximetilcelulase, celulases totais e xilanase como também para a determinação dos açúcares redutores presente em cada meio fermentado.

3.5.2 Endo-β-1,4-Glucanase (CMCase)

A atividade celulolítica da carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada seguindo o procedimento descrito em Ghose (1987), que se baseia na capacidade do extrato enzimático em liberar açúcares redutores na presença de carboximetilcelulose (CMC) devido à hidrólise da fonte de celulose em glicose.

Para a análise, foi colocado em todos os tubos de ensaio 0,5 mL de uma solução de CMC a 2 % (m/v), preparada em tampão citrato de sódio (0,05 mol.L⁻¹ / pH = 4,8), em seguida nos tubos de reação da enzima foi acrescentado 0,5 mL do extrato enzimático. Todos os tubos foram levados a um banho termostático, a 50 °C por 30 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida adicionando-se nos tubos de ensaio 1,0 mL de DNS, 0,5 mL do extrato enzimático nos tubos do branco da enzima (sem reação) e 0,5 mL de tampão citrato no tubo do branco do equipamento (espectrofotômetro UV-Vis).

Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100 °C por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. Foram acrescentados 8 mL de água destilada em cada tudo e os mesmos foram homogeneizados para posterior leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-Vis a 540 nm, semelhantemente à metodologia de Miller (1959).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol.L⁻¹ de açúcar redutor, por minuto, a 50 °C. A atividade enzimática da CMCase foi expressa em U/g de substrato úmido, a qual foi calculada seguindo a Equação 3.20:

$$CMCase = \frac{AR_{Liberado} 10^6}{(180)(30)} = \frac{(AR_{ComReação} - AR_{SemReação}) 10^6}{(180)(30)} \quad (3.20)$$

Onde:

$AR_{ComReação}$ = Concentração da amostra com reação (g de AR liberado.g de meio fermentado⁻¹);

$AR_{SemReação}$ = Concentração da amostra sem reação (g de AR liberado.g de meio fermentado⁻¹);

10^6 = Fator de conversão de mols de glicose para μmol de glicose;

180 = Massa molar da glicose (g/mol);

30 = Tempo de reação em minutos.

3.5.3 Celulase Total (FPase)

A atividade celulolítica da FPase (Celulase Total), também foi determinada seguindo o procedimento descrito em Ghose (1987).

Para a análise, foi colocado em todos os tubos de ensaio 0,5 mL de tampão citrato de sódio (0,05 mol.L⁻¹ / pH = 4,8) e 0,5 mL do extrato enzimático. Em seguida nos tubos de reação da enzima foi colocada uma fita de papel de filtro Whatman n° 1 medindo 1x6 cm utilizada como substrato, e nos tubos do branco da enzima (sem reação) não cotinha o papel. Para o branco do equipamento (espectrofotômetro UV-Vis) colocou-se 1 mL de tampão citrato de sódio. Todos os tubos foram levados a um banho termostático, a 50 °C por 60 minutos, dando início à reação das enzimas com a celulose do papel.

A reação foi interrompida adicionando-se em todos os tubos de ensaio 1 mL de DNS. Em seguida, os açúcares redutores foram quantificados conforme à metodologia de Miller (1959).

A unidade de atividade de FPase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por minuto. O resultado foi calculado com o auxílio da Equação 3.21:

$$FPase = \frac{AR_{Liberado} 10^6}{(180)(60)} = \frac{(AR_{ComReação} - AR_{SemReação}) 10^6}{(180)(60)} \quad (3.21)$$

Onde:

$AR_{ComReação}$ = Concentração da amostra com reação (g de AR liberado.g de meio fermentado⁻¹);

$AR_{SemReação}$ = Concentração da amostra sem reação (g de AR liberado.g de meio fermentado⁻¹);

10^6 = Fator de conversão de mols de glicose para μmol de glicose;

180 = Massa molar da glicose (g/mol);

60 = Tempo de reação em minutos.

3.5.4 Endo- β -1,4-Xilanase (Xilanase)

A atividade hemicelulolítica da xilanase foi determinada segundo a metodologia descrita por Bailey *et al* (1992).

O procedimento consiste na adição de 0,9 mL de xilana a 1 % (Birchwood – Sigma), preparada em tampão citrato de sódio (0,05 mol.L⁻¹ / pH = 4,8) em todos os tubos de ensaio e aquecida a 50 °C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 0,1 mL de extrato enzimático nos tubos de reação da enzima. Todos os tubos foram levados a um banho termostático, a 50 °C por 5 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se em todos os tubos de ensaio 1,5 mL de DNS, depois 0,1 mL do extrato enzimático nos tubos do branco da enzima (sem reação) e 0,1 mL de tampão citrato no tubo do branco do equipamento (espectrofotômetro UV-Vis). Os açúcares redutores foram quantificados conforme à metodologia de Miller (1959).

A unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de xilose por minuto. O resultado foi calculado com o auxílio da Equação 3.22:

$$Xilanase = \frac{AR_{Liberado}10^6}{(150)(5)} = \frac{(AR_{ComReação} - AR_{SemReação})10^6}{(150)(5)} \quad (3.22)$$

Onde:

$AR_{ComReação}$ = Concentração da amostra com reação (g de AR liberado.g de meio fermentado⁻¹);

$AR_{SemReação}$ = Concentração da amostra sem reação (g de AR liberado.g de meio fermentado⁻¹);

150 = Massa molar da xilose (g/mol);

30 = Tempo de reação em minutos;

10^6 = Fator de conversão de mols de glicose para μmol de glicose.

3.6 AUMENTO DE ESCALA

Visando analisar a influência do aumento de escala do processo de FSS, nas atividades enzimáticas da CMCase, FPase e Xilanase, esse estudo foi realizado para a melhor condição de umidade inicial e teor de farelo, do planejamento experimental da Tabela 3.2, na produção dessas enzimas.

Para os aumentos de escala utilizou-se 30 gramas de substrato em erlenmeyers de 500 mL e 60 gramas de substrato em erlenmeyers de 1000 mL.

O processo fermentativo semissólido foi realizado da mesma forma que o descrito no item 3.4.4, tendo apenas a quantidade de massa de substrato e a capacidade do biorreator utilizado, aumentadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização físico-química do bagaço do sorgo sacarino (BSS) IPA P15, visou conhecer sua composição com relação aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, sendo esses os componentes de maior interesse presentes em materiais lignocelulósicos.

Na Tabela 4.1 estão apresentados os resultados obtidos para o BSS IPA P15, material utilizado como substrato nos processos de FSS e FSm, quanto aos teores de umidade, cinzas, extrativos, lignina, celulose e hemicelulose, bem como seus respectivos desvios padrão.

Tabela 4.1 – Caracterização físico-química do bagaço do sorgo sacarino IPA P15.

Parâmetros (%)	Teor
	Bagaço de sorgo sacarino
Umidade (b.u.)	7,64 ± 0,18
Cinzas	2,45 ± 0,14
Extrativos	2,41 ± 0,64
Lignina	19,27 ± 0,41
Celulose	40,54 ± 0,44
Hemicelulose	30,45 ± 0,46

O teor de umidade encontrado para o BSS foi bem próximo ao encontrado por Oliveira *et al.* (2009), para o bagaço de sorgo sacarino lavado, de 7,4 %. Já Silva (2017), caracterizou sete cultivares de sorgo sacarino, e encontrou valores entre 6,16 % a 9,39 % de umidade, ficando o teor de umidade para o BSS dentro deste intervalo. Estes valores de umidade são adequados para o armazenamento do BSS, pois permite diminuição da proliferação de microrganismos e manutenção da estabilidade química, físico-química e bioquímica originais dos bagaços em estudo. Sendo necessária a sua reumidificação para os ensaios de FSS, como meio de recuperar a umidade inicial de equilíbrio que forneça uma atividade de água adequada para o crescimento e desenvolvimento do microrganismo.

O teor de cinzas para o BSS foi um pouco inferior aos encontrados por Batista (2016), que trabalhou com as cultivares de sorgo sacarino BRS 511 e BD 5404 e obteve os valores de 3,13 % e 3,67 % de cinzas para cada cultivar. Freita *et al.* (2016) trabalhando com o bagaço do sorgo sacarino e o bagaço da cana-de-açúcar encontraram os valores de 2,90 % e 4,34 % de cinzas, respectivamente. O teor de cinzas depende da espécie, idade, forma de colheita do material, e indica a quantidade de sais minerais presentes no material. Apesar do baixo teor de cinzas, o BSS apresenta micronutrientes suficientes para o desenvolvimento microbiano.

O teor de extrativos foi inferior ao encontrado por Neto (2018), valor de 4,76 %, trabalhando com o sorgo sacarino IPA EP17. Lins (2017) obteve 13,99 % de extrativos trabalhando com o bagaço do sorgo sacarino IPA P222, valor bem superior ao encontrado neste trabalho. Este valor encontrado pode ser atribuído a diversos componentes estruturais da parede celular do material, como alguns sais, açúcares e polissacarídeos (solúveis em água), ácidos ou ésteres graxos, álcoois de cadeia longa, ceras, resinas e compostos fenólicos e glicosídeos (solúveis em solventes orgânicos) (MORAIS *et al.*, 2010).

O teor de lignina foi bem próximo aos reportados por Barcelos *et al.* (2016) e Yue *et al.* (2017) que obtiveram os valores de 19,80 % e 19,94 % de lignina, respectivamente, ao caracterizar o bagaço do sorgo sacarino. Já Bi *et al.* (2017) e Batista (2016), obtiveram valores menores, sendo eles, de 13,84 % e 10,80 %, respectivamente.

O teor de celulose foi semelhante ao obtido por Guimarães (2014) e Barcelos (2016) de 40,08 % e 40,42 %, respectivamente. Bi *et al.* (2017) ao caracterizar bagaço de sorgo reportaram valores de 37,68 % de celulose. Pacheco *et al.* (2014) trabalhando com quatro genótipos de sorgo sacarino para a produção de etanol celulósico, encontraram valores para celulose entre 32,81 % a 36,50 %.

O teor de hemicelulose foi semelhante ao encontrado por Batista (2016), de 30,46 % de hemicelulose para a cultivar BD 5404 do bagaço de sorgo sacarino. Neto (2018) encontrou teor de 32,05 %, para o bagaço do sorgo sacarino IPA EP17. Prathyusha *et al.* (2016) ao caracterizar o sorgo sacarino para ensaios de sacarificação obtiveram 44,83 % de hemicelulose, sendo esse o maior valor reportado.

Silva (2017) ao caracterizar 7 cultivares de Bagaço de Sorgo Sacarino, do Instituto de Pesquisa de Agropecuária, visando a produção de etanol, observou variação de 23,16 a 41,07 % de celulose, 20,96 a 39,78 % de hemicelulose e 12,69 a 20,85 % de lignina.

A partir dos dados reportados podemos observar que as diferentes variedades de sorgo sacarino, ocasionaram variações nos parâmetros obtidos pelos diversos autores. Outros fatores que influenciam nos valores desses parâmetros são o solo em que foi plantada, época da colheita e seu estágio de maturação.

A partir da caracterização físico-química, observamos que o bagaço do sorgo sacarino IPA P15 apresenta alto potencial para ser utilizado como substrato nos processos de FSS e FSm, para produção de celulasas e xilanase, visto o alto percentual de celulose e hemicelulose presentes, as quais são utilizadas como fonte de carbono indutor na produção dessas enzimas.

O bagaço do sorgo sacarino após processo de lavagem e o farelo de trigo, usados como substrato e fonte indutora nos processos fermentativos para produção das enzimas, foram caracterizados quanto aos teores de açúcares redutores (AR) e proteínas. Os valores estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Resultados de AR e proteína do bagaço do sorgo sacarino e do farelo de trigo.

Componentes (%)	Teor	
	Bagaço de sorgo sacarino	Farelo de Trigo
AR	5,5 ± 0,01	2,43 ± 0,01
Proteína	2,43 ± 0,53	16,77 ± 1,53

Os teores de proteínas encontrados para o BSS e o FT, foram próximos aos encontrados por Lins (2017) trabalhando com o bagaço de sorgo sacarino e o farelo de trigo, de 2,62 % e 17,87 %, respectivamente. Rodríguez-Zúñiga *et al.* (2011), trabalhando com o bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, encontraram os valores de 1,52 % e 17,61 %, respectivamente. O alto teor de proteína do farelo de trigo, o torna uma fonte de nitrogênio orgânico importante para o microorganismo, o que influencia diretamente na indução das enzimas produzidas nos processos fermentativos.

A concentração de açúcares redutores obtida para o bagaço do sorgo sacarino foi de 5,5 %, mostrando que mesmo tendo sido lavado para remoção do excesso de açúcares no meio, permaneceu com uma quantidade de AR remanescente. Já o farelo de trigo apresentou valor próximo ao encontrado por Lins (2017), de 1,5 % de AR.

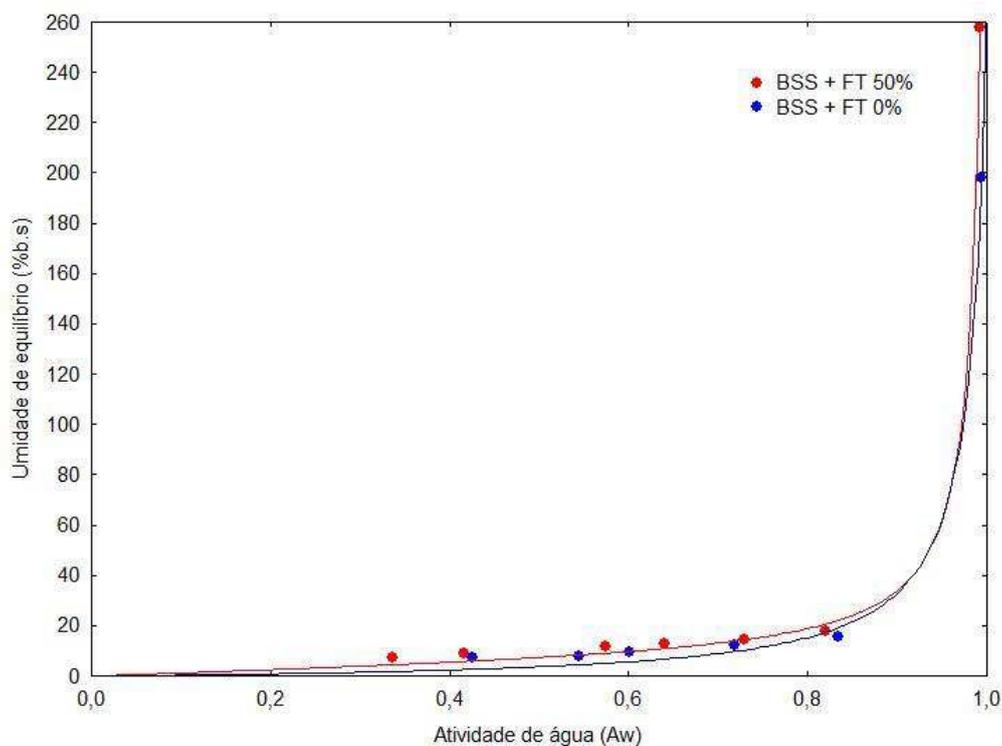
4.2 ISOTERMAS DE DESSORÇÃO DE UMIDADE

Foram realizadas isotermas de dessecção dos substratos usados nos ensaios de fermentação, compostos por BSS *in natura* com 0 % de FT, e o BSS incrementado com 50 % de FT.

As isotermas de dessecção de umidade foram construídas, com o intuito de correlacionar a atividade de água do substrato e a umidade de equilíbrio, possibilitando a determinação da umidade inicial na qual o microrganismo deve ser inoculado, proporcionando quantidade de água suficiente para adaptação, crescimento e metabolismo do *Trichoderma reesei* para a produção de celulases e hemicelulases na fermentação semissólida.

Na Figura 4.1 são apresentadas as isotermas de dessecção de umidade dos substratos usados durante a fermentação, representando os valores da umidade de equilíbrio (b.s) em função das diferentes atividades de água, ajustadas pelo o modelo de GAB.

Figura 4.1 - Isotermas de dessecção dos substratos usados durante a FSS.



Perceber que a atividade de água diminui com o decaimento da umidade de equilíbrio. A taxa de dessecção é mais alta no início do processo, mostrando uma maior

facilidade de redução da umidade. A isoterma do BSS incrementado com 50 % de FT apresentou o mesmo comportamento comparada com a do BSS *in natura*, mostrando que a diferença na composição química influencia no formato da isoterma não influenciou no formato da isoterma.

Cada microrganismo tem um nível de A_w mínimo para que possa efetuar suas atividades metabólicas, segundo Biachi *et al.*, 2014 os fungos apresentam uma A_w mínima de 0,7 para o seu crescimento. Por meio dos dados obtidos verificou-se que abaixo de 13 %, a atividade de água foi inferior a 0,7, valor crítico para o desenvolvimento de fungos, e ideal para o armazenamento do substrato. Já nas faixas de umidade acima de 15 %, as atividades de água foram encontradas acima de 0,7, o que pode ser suficiente para o crescimento de microrganismos, sob o ponto de vista desse parâmetro, ressalvando que em uma fermentação outros parâmetros são também importantes e imprescindíveis, como por exemplo, a quantidade de carbono, nitrogênio e oligonutrientes, contidos no meio de cultivo.

Na Tabela 4.3 tem-se os resultados para os parâmetros de ajuste das isotermas de dessecção dos substratos para o modelo de GAB, obtidos por meio de regressão não-linear.

Tabela 4.3 - Parâmetros de ajuste das isotermas de dessecção dos substratos para o modelo de GAB.

Substrato	X_m	C	K	R^2
BSS + 0 % FT	2,3443	1,3687	0,9843	0,9989
BSS + 50 % FT	45,8342	0,2573	0,9959	0,9997

O modelo de GAB forneceu um bom ajuste para os dados experimentais, fato demonstrado a partir dos valores do coeficiente de correlação (R^2), que variaram de 0,9989 – 0,9997. Já era esperado que o modelo de GAB tivesse bom desempenho com o conjunto de dados experimentais obtidos, visto que o modelo é amplamente utilizado em análises com atividade de água próxima a 0,9.

Os dados exibidos na Tabela 4.3 demonstram um aumento bastante expressivo na umidade da monocamada (X_m) de 2,34 para 45,83 % (b.s.) quando adicionado o farelo de trigo ao bagaço do sorgo sacarino. Assim o BSS com 50 % de FT, pode se apresentar como um substrato mais adequado para o crescimento e metabolismo do *Trichoderma reesei* para as umidades iniciais de equilíbrio estudadas neste trabalho, o que comprovaremos com o estudo do processo de fermentação utilizando este substrato.

Santos *et al.* (2013) utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger* para produção de enzimas celulolíticas a partir do farelo do cacau pelo processo de fermentação semissólida, avaliaram o efeito do tempo de fermentação (24, 72, e 120 horas) e atividade de água (0,963; 0,976 e 0,983) sob a produção das enzimas. Como resultado eles obtiveram as melhores atividades de CMCase (14,42 U/mL), FPAse (7,82 U/mL) e Xilanase (11,86 U/mL) com 72 horas e com atividade de água de 0,976.

Santos *et al.* (2012), utilizaram a palma forrageira como substrato para a produção de enzimas celulolíticas, por meio de fermentação semissólida, utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger* como agente fermentativo. As variáveis estudadas no processo fermentativo foram, a atividade de água (0,827, 0,892, 0,949, 0,988, 0,993) e o tempo de fermentação (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h). Os maiores valores de produção da CMCase foi de 7,47 U/mL e 0,949 de atividade de água e para a FPase de 9,42 U/mL e atividade de água de 0,986, ambas em 72h de fermentação.

Para a produção das enzimas obtidas, no presente trabalho, foram estudados os valores de umidade inicial dos substratos de 60, 70 e 80 % em base úmida (150, 233 e 400 % base seca), o que corresponde a 0,856, 0,889, 0,999 (para o BSS + 50% de FT) de atividade de água calculadas pelo modelo de GAB, faixa suficiente da correlação atividade de água e umidade de equilíbrio adequada para o crescimento do fungo *Trichoderma reesei*.

4.3 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA (FSS)

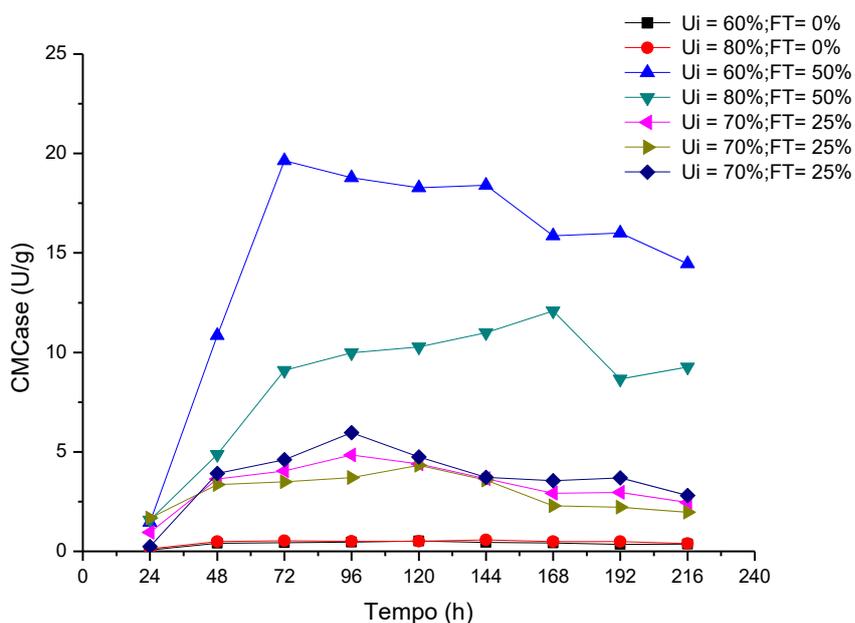
Para o processo de FSS foram analisadas a influência da umidade inicial (60, 70 e 80 %) e o teor de farelo de trigo (0, 25 e 50 %) compondo o substrato, durante as cinéticas de fermentação para cada experimento, com duração de 240 horas cada. Nas Figuras 4.2, 4.6 e 4.10 são apresentados os perfis cinéticos para a produção das enzimas CMCCase, FPase e Xilanase, referente ao planejamento experimental da Tabela 3.2.

4.3.1 CMCCase

4.3.1.1 Perfil Cinético da produção de CMCCase

Na Figura 4.2, estão apresentadas as cinéticas fermentativas de produção da enzima CMCCase, para os ensaios do planejamento experimental.

Figura 4.2 - Cinética da Fermentação Semissólida para produção da enzima CMCCase.



Observa-se a partir da Figura 4.2, para os ensaios 1 e 2, com 60 e 80 % de umidade inicial e compostos apenas por BSS, que ambos apresentaram o mesmo perfil com relação a produção de CMCCase, com atividade máxima de 0,52 e 0,57 U/g (0,07 e 0,076 U/mL), em 120 h e 144 h, respectivamente. Observa-se que os valores máximos de atividade foram bem próximos assim como o tempo de fermentação.

O ensaio 3, com umidade inicial de 60 % e FT de 50 %, apresentou as maiores atividades para a CMCCase, durante toda a cinética fermentativa, atingindo uma atividade máxima de 19,64 U/g (2,62 U/mL), em 72 h de fermentação, com produtividade de 0,273 U/g.h, melhor tempo comparado aos demais. Já o ensaio 4, utilizando o mesmo substrato com 50 % de FT, porém com umidade inicial de 80 %, observou-se que o pico de atividade foi de 12,09 U/g (1,61 U/mL) em 168 h.

Comparando os ensaios 1 e 3, com a mesma umidade inicial de 60 %, e a composição do substrato variando (0 % e 50 %), podemos observar a forte influência do

uso do FT compondo o substrato, um aumento aproximadamente de 38 vezes na atividade enzimática da CMCase. Evidenciando o farelo de trigo como uma importante fonte indutora da produção de CMCase.

Os ensaios 5, 6 e 7, com umidade inicial de 70 % e 25 % (m/m) de FT, apresentaram aproximadamente o mesmo perfil cinético e máxima atividade de 4,60 U/g (0,61 U/mL) em 96 horas de fermentação, comprovando há reprodutibilidade e repetibilidade do processo fermentativo.

Salomão (2019) trabalhando com FSS a temperatura de 28 °C, utilizando o bagaço da cana-de-açúcar *in natura* com umidade de 50%, e o fungo *Trichoderma koningii*, obteve atividade de 8,2 U/g de CMCase em 72 horas de fermentação.

Zamora (2017) estudando a produção de celulases e hemicelulases a partir de caules e folhas de *Alstroemeria sp.* por meio do crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO6 através de FES, obteve máxima atividade de CMCase de 20,5 U/g 216 h, valor bem próximo ao obtido neste trabalho para o ensaio 3, com 60 % de umidade e 50 % de FT.

Marques *et al.* (2018) estudaram a produção de celulases e xilanases por FES, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (50 %) como substrato, com umidade inicial de 70% e utilizando o fungo *Trichoderma viridae* PAJ 01, atingiu máxima atividade de CMCase de 64,56 U/g (produtividade 0,384 U/g.h). Embora o valor tenha sido superior, as produtividades foram próximas. Para a produção de FPase e Xilanase, obteve máximas atividades de 0,26 e 351,74 U/g, respectivamente em 168 h, inferiores as encontradas neste trabalho.

Lins e Conrado (2015), trabalhando com *T. reesei* na FSS do bagaço do caju lavado para produção de CMCase com umidade inicial de 65 %, obtiveram máxima atividade enzimática de 0,40 U/g em 196 horas de fermentação. Já Mélo *et al.* (2014), trabalhando com *T. reesei* na FSS do resíduo agroindustrial da acerola a 45 % de umidade, obtiveram atividade máxima de 1,25 U/g de CMCase em 216 horas de fermentação. Ambos sem suplementar o substrato com farelo de trigo, obtiveram atividades próximas as encontradas neste trabalho quando se utilizou apenas o BSS compondo o substrato.

4.3.1.2 Análise Estatística da produção de CMCase

Para a análise estatística do planejamento experimental na produção de CMCase, as atividades enzimáticas selecionadas para compor a matriz do planejamento como variável resposta, foram as obtidas no tempo de 72 horas, por ser esse o tempo de obtenção de maior atividade (ensaio 3), no entanto, ressalta-se que não necessariamente para os demais ensaios, nesse tempo, a atividade enzimática foi a de valor máximo.

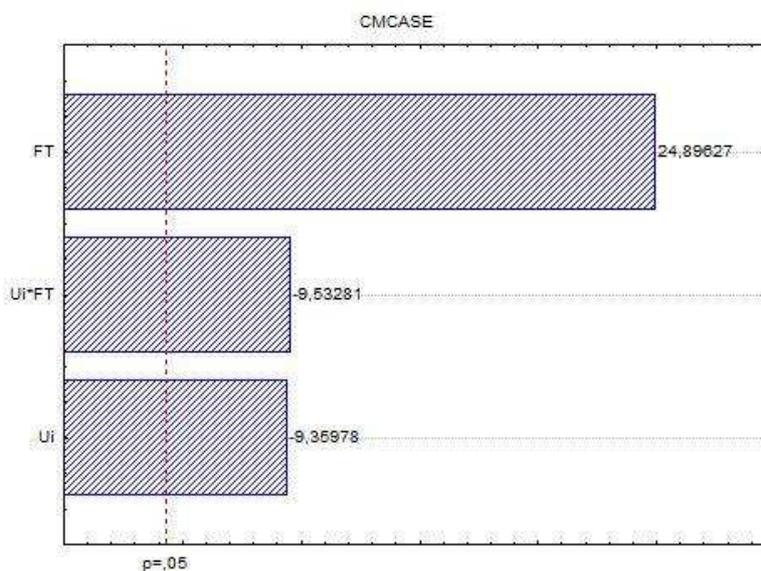
A Tabela 4.4 mostra os dados do planejamento experimental e como variável resposta as atividades de CMCase no tempo de 72 horas.

Tabela 4.4 - Ensaios do planejamento experimental para a produção de CMCase em 72 h na FSS.

Ensaios	Ui % (b.u)	FT %	CMCase		
			U/g	U/g.d.s	U/mL
1	60 (-1)	0 (-1)	0,44	1,35	0,06
2	80 (+1)	0 (-1)	0,53	4,31	0,07
3	60 (-1)	50 (+1)	19,64	60,69	2,62
4	80 (+1)	50 (+1)	9,10	73,64	1,21
5	70 (0)	25 (0)	4,05	18,10	0,54
6	70 (0)	25 (0)	3,49	15,60	0,47
7	70 (0)	25 (0)	4,60	20,59	0,61

Na Figura 4.3 é apresentado o Diagrama de Pareto mostrando a influência da umidade inicial (Ui) e do teor de farelo de trigo (FT) na produção da enzima CMCase por FSS e o efeito da interação entre essas duas variáveis (Ui*FT).

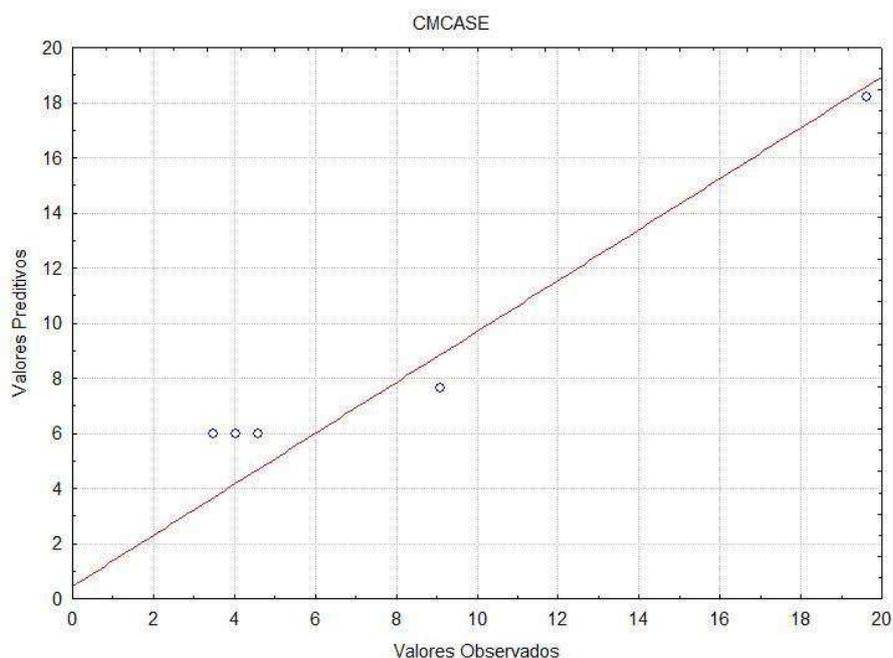
Figura 4.3 - Diagrama de Pareto para a produção de CMCase em 72 horas.



Observa-se que as duas variáveis e a interação entre elas foram parâmetros significativos. O teor de farelo de trigo (% FT) foi a variável que mais influenciou no processo. Quando passamos do nível -1 (menor % de FT) para o nível +1 (maior % de FT), ocorreu o aumentando da atividade enzimática da CMCCase. Observa-se também que a umidade inicial e a interação entre as duas variáveis influenciaram o processo, mas de maneira a diminuir a atividade enzimática da CMCCase. Quando passamos do nível -1 (menor % de umidade) para o nível +1 (maior % de Ui), ocorreu uma diminuição da atividade enzimática da CMCCase.

Na Figura 4.4 é apresentado o gráfico com os valores preditos pelo modelo estatístico e os valores observados para cada ensaio do planejamento experimental.

Figura 4.4 – Gráfico dos valores preditivos versus valores observados para a produção de CMCCase em 72 horas.



A partir dos dados observados constata-se uma boa concordância entre os valores observados e os esperados, confirmando o modelo como linear, visto que os pontos se aproximam da reta identidade.

Na Tabela 4.5 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade enzimática da CMCCase do planejamento experimental.

Tabela 4.5 - Análise de Variância (ANOVA) para a produção de CMCCase em 72 horas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	248,2960242	3	82,7657	1,32
Resíduo	20,21263576	3	6,7275	
Total	268,5087	6		
% R²	92,5			
		F_{tabelado} = 9,28	F_{calculado} = 12,28	

GL – Grau de Liberdade; SQ - Soma dos Quadrados; MQ. – Média Quadrática dos Desvios; Teste F = (Fcalculado / Ftabelado).

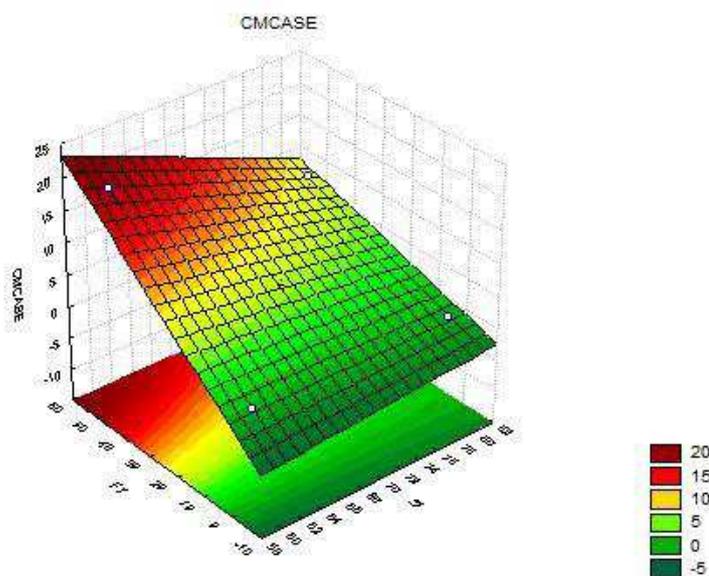
Os dados foram analisados em nível estatístico de 95 % de confiança apresentando um coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) de 92,5 %. Segundo Barros Neto *et al.* (1995) para valores de F maior que 1,0 o modelo estatístico é considerado significativo. Neste caso para a produção de CMCCase o modelo é significativo ao nível de 95 % de confiança, uma vez que o valor de F foi de 1,32.

O modelo estatístico codificado com as variáveis significativas para a atividade enzimática da CMCCase é apresentado na Equação 4.1.

$$CMCase \left(\frac{U}{g} \right) = 5,978 - 2,609 U_i + 6,942 FT - 2,658 U_i * FT \quad (4.1)$$

A Figura 4.5 apresenta a superfície de resposta para a variável atividade enzimática da CMCCase em função da umidade inicial (% U_i) e do teor de farelo de trigo adicionado ao BSS, usado como substrato na fermentação semissólida. Observa-se que nos intervalos estudados a maior atividade enzimática da CMCCase ocorre para o nível -1 da umidade inicial e o nível +1 do teor de farelo de trigo.

Figura 4.5 - Superfície de resposta para a produção de CMCase em 72 horas.



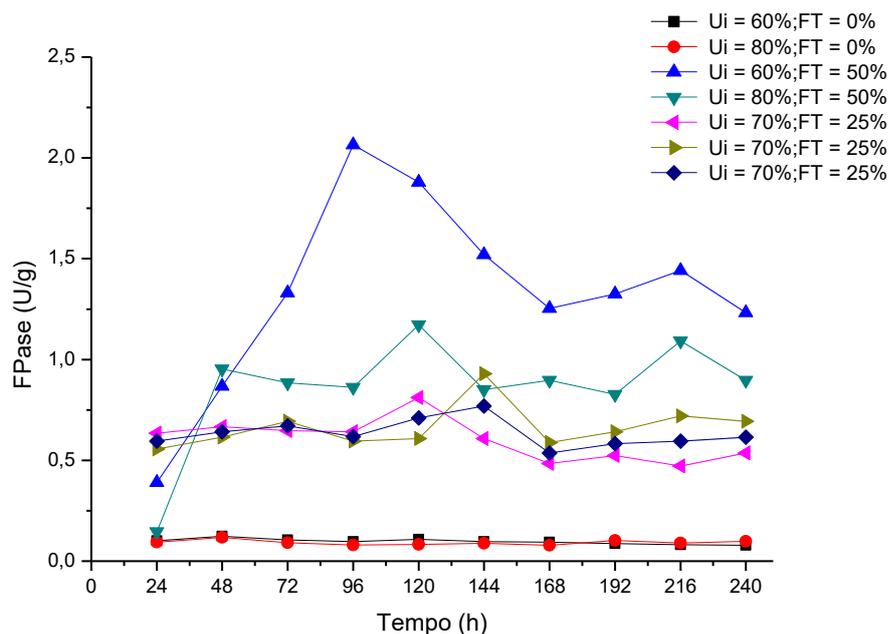
Embora a umidade inicial tenha sido um parâmetro estatisticamente significativo no processo fermentativo de produção da CMCase, por meio da superfície de resposta, podemos observar que sua contribuição foi pouco expressiva quando comparada a influência do teor de farelo de trigo, no entanto, se faz pertinente observar que a interação entre essas duas variáveis umidade inicial e teor de FT, influenciaram significativamente e com o mesmo efeito se comparado a umidade isoladamente, como demonstrado no Digrama de Pareto.

Assim a diminuição do teor de água e consequentemente da atividade de água, fez com que o *Trichoderma reesei* buscasse a fonte de carbono necessária para expressar a CMCase em valores de maior atividade, porque estava assegurado a ele, no meio de cultivo, uma maior quantidade de nitrogênio proveniente do FT. Assim operando nos níveis -1 (60 %) e +1 (50 % FT) para estas variáveis, respectivamente, obtém-se atividades enzimáticas acima de 19,64 U/g.

4.3.2 FPase

4.3.2.1 Perfil Cinético da produção de FPase

Na Figura 4.6, estão apresentadas as cinéticas fermentativas da produção da enzima FPase, para os ensaios do planejamento experimental.

Figura 4.6 - Cinética da Fermentação Semissólida para produção da enzima FPase.

Observa-se pela Figura 4.6 para os ensaios 1 e 2 com 60 e 80% de umidade inicial, comportamento da cinética de atividade similar à CMCCase, com valores de atividades máximas de 0,12 e 0,11 U/g (0,0016 e 0,0015 U/mL), ambos a 48 h. Assim verifica-se que o valor da umidade inicial pouco influenciou na produção da enzima FPase uma vez que a atividade é considerada baixa quando o substrato é composto apenas por BSS.

No ensaio 4, onde foi utilizado como substrato o BSS com 50 % de FT, com umidade inicial de 80 %, obteve-se o pico de atividade enzimática de 1,17 U/g (0,156 U/mL) em 120 h.

O ensaio 3, com umidade inicial de 60 %, obteve-se as maiores atividades para a FPase, a partir de 72 h de fermentação, atingindo uma atividade máxima de 2,06 U/g (0,275 U/mL) em 96 h de fermentação, com produtividade de 0,021 U/g.h.

Comparando os ensaios 1 e 3, com umidade inicial de 60 %, e composição do substrato variando, de 0 % para 50 % de FT, podemos observar a forte influência do uso do FT na atividade enzimática da FPase, um aumento de 0,12 U/g para 2,06 U/g.

Os ensaios 5, 6 e 7, com umidade inicial de 70 % e 25 % (m/m) de FT, apresentaram aproximadamente o mesmo perfil cinético e máxima atividade de 0,6411 U/g (0,085 U/mL) em 144 horas de fermentação, demonstrando novamente que o processo fermentativo desenvolvido nessa pesquisa foi reprodutível.

Dias (2017) estudou a produção de celulasas e hemicelulasas utilizando duas linhagens fúngicas de *Aspergillus*, na fermentação em estado sólido e obteve máxima

produção de FPase de 2,11 FPU/g em 144 h, utilizando o fungo *Aspergillus niger SCBM1*, com o bagaço do sorgo biomassa como fonte de carbono e a peptona como fonte de nitrogênio. Valor de atividade bem próximo ao encontrado neste trabalho, mas com produtividade inferior (produtividade de 0,015 U/g.h).

Florencio *et al.* (2016) estudaram o efeito dos processos de fermentação submersa (FSm) e sequencial (FSL) (semissólida seguida de submersa), sobre a produção de enzimas a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e as máximas atividades para a enzima FPase foram as mesmas para a FSL e FSm, com valores de 0,02 e 0,01 U/mL utilizando o *Trichoderma reesei* Rut C30 e o *Aspergillus niger* A12, respectivamente. Valores bem próximos ao encontrado neste trabalho, apesar do processo fermentativo empregado ter sido diferente.

Almeida (2012) trabalhando com a mistura de farelo de trigo (75 %) e bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, com umidade de 70 %, obteve atividade de 1,4 U/g em 7 dias de cultivo (produtividade de 0,008 U/g.h), atingindo um pico de 3,71 U/g em 14 dias de fermentação (produtividade de 0,011 U/g.h) para FPase. Valores de atividades bem próximos ao encontrado neste trabalho, mas com produtividades inferiores.

4.3.2.2 Análise Estatística da produção de FPase

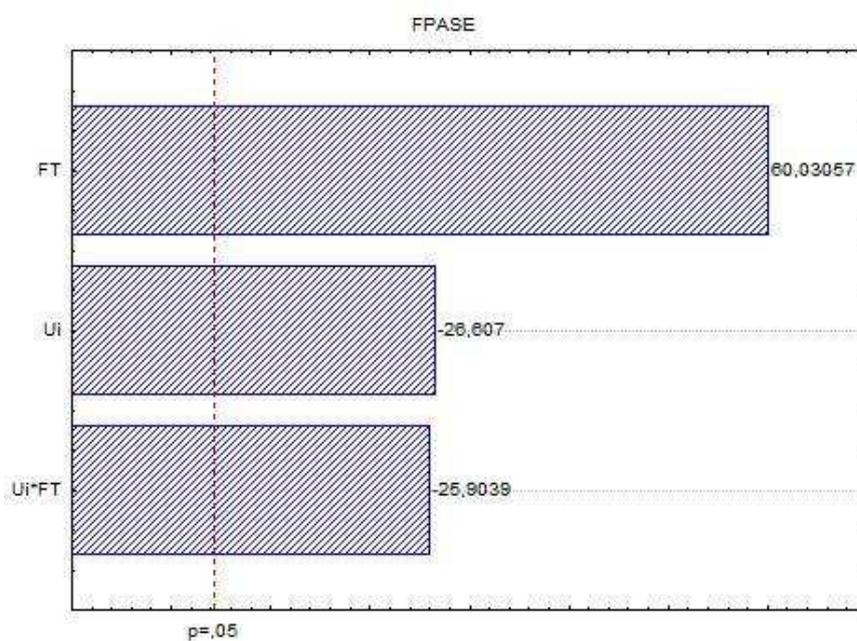
Para a análise estatística do planejamento experimental na produção de FPase, as atividades enzimáticas selecionadas para compor a matriz do planejamento como variável resposta, foram as obtidas no tempo de 96 horas, tempo de obtenção de maior atividade (ensaio 3), no entanto, ressalta-se que não necessariamente a atividade enzimática foi a de valor máximo, nesse tempo, para os demais ensaios.

A Tabela 4.6 mostra os dados do planejamento experimental e como variável resposta as atividades da FPase no tempo de 96 horas de fermentação.

Tabela 4.6 - Ensaios do planejamento experimental para a produção de FPase em 96 h na FSS.

Ensaios	Ui % (b.u)	FT %	FPase		
			U/g	U/g.d.s	U/mL
1	60 (-1)	0 (-1)	0,10	0,30	0,01
2	80 (+1)	0 (-1)	0,08	0,65	0,01
3	60 (-1)	50 (+1)	2,06	6,38	0,28
4	80 (+1)	50 (+1)	0,86	6,97	0,11
5	70 (0)	25 (0)	0,64	2,87	0,09
6	70 (0)	25 (0)	0,60	2,66	0,08
7	70 (0)	25 (0)	0,62	2,76	0,08

Na Figura 4.7 é apresentado o Diagrama de Pareto mostrando a influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima FPase e o efeito da interação entre essas duas variáveis, para o tempo de máxima atividade que foi de 96 horas, como pode ser observado na Figura 4.6.

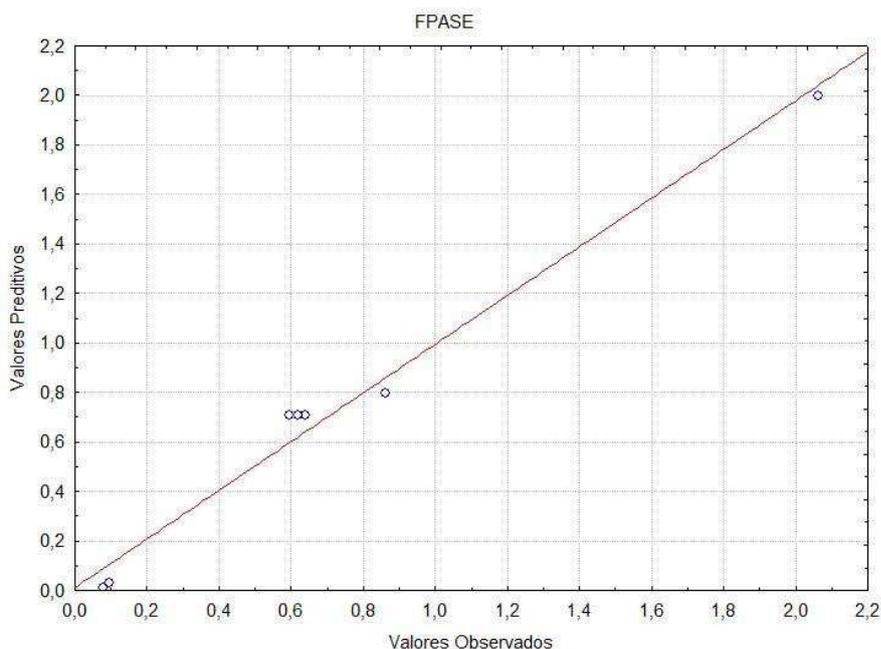
Figura 4.7 - Diagrama de Pareto para a produção de FPase em 96 horas.

Fica evidente que as variáveis, umidade inicial (Ui) e teor de farelo de trigo (FT), e sua interação (Ui*FT) mostram-se ser significativas a nível de 95 % de confiança. Observa-se que as duas variáveis e a interação entre elas foram parâmetros significativos. O teor de farelo de trigo (% FT) foi a variável que mais influenciou no processo. Quando passamos do nível -1 para o nível +1 do % de FT, ocorre o aumentando da atividade enzimática da FPase. A umidade inicial e a interação entre as duas variáveis também influenciaram o processo, mas de maneira a diminuir a atividade enzimática da CMCCase.

Quando passa do nível -1 para o nível +1 do % de U_i , ocorre uma diminuição da atividade enzimática da FPase.

Na Figura 4.8 é apresentado o gráfico com os valores preditos pelo modelo estatístico e os valores observados para cada ensaio do planejamento experimental.

Figura 4.8 – Gráfico dos valores preditivos versus valores observados para a produção de FPase em 72 horas.



A partir dos dados observados constata-se uma concordância entre os valores observados e os esperados, onde os resíduos do modelo seguem distribuição normal, visto que os pontos se aproximam da reta identidade, confirmando o modelo como linear.

Na Tabela 4.7 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade enzimática da FPase do planejamento experimental.

Tabela 4.7 - Análise de Variância (ANOVA) para a produção de FPase em 96 horas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	2,61293282	3	0,8710	6,45
Resíduo	0,043627837	3	0,0145	
Total	2,656561	6		
% R²	98,36			

$F_{\text{tabelado}} = 9,28$ $F_{\text{calculado}} = 59,89$

GL – Grau de Liberdade; SQ - Soma dos Quadrados; MQ. – Média Quadrática dos Desvios; Teste F = ($F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$).

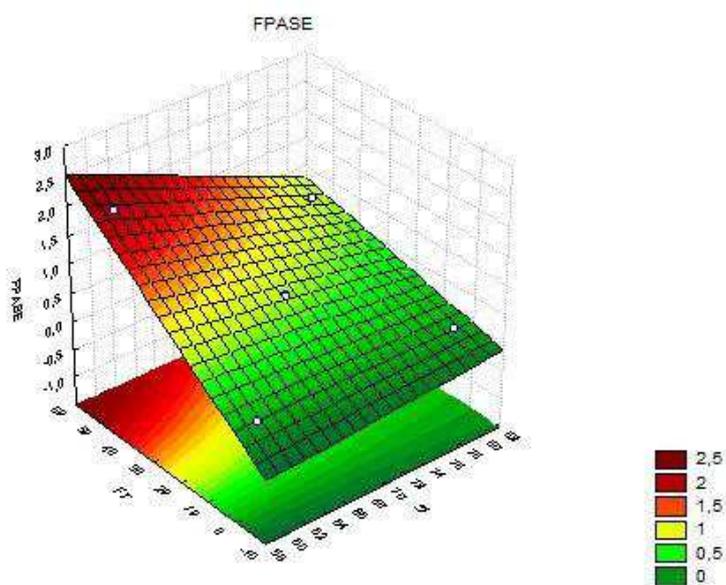
Os dados foram analisados em nível estatístico de 95 % de confiança apresentando um coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) de 98,36 %.

Segundo Barros Neto *et al.* (1995) para valores de F maior que 1,0 o modelo estatístico é considerado significativo, indicando que há relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que um modelo não seja apenas estatisticamente significativo, mas também útil para fins preditivos, o valor do teste F deve ser no mínimo maior que 4,0. Neste caso para a produção de FPase o modelo é significativo e preditivo ao nível de 95 % de confiança, uma vez que o valor de F foi de 6,45. O modelo estatístico codificado com as variáveis significativas para a atividade enzimática da FPase é apresentado na Equação 4.2.

$$FPase (U/g) = 0,708 - 0,305 U_i + 0,687 FT - 0,297 U_i * FT \quad (4.2)$$

A Figura 4.9 apresenta a superfície de resposta para a variável atividade enzimática da FPase em função da umidade inicial (% U_i) e do teor de farelo de trigo (% FT) adicionado ao BSS, usado como substrato na fermentação semissólida. Observa-se que nos intervalos estudados a maior atividade enzimática da FPase ocorre para o nível -1 da umidade inicial e o nível +1 do teor de farelo de trigo.

Figura 4.9 - Superfície de resposta para a produção de FPase em 96 horas.



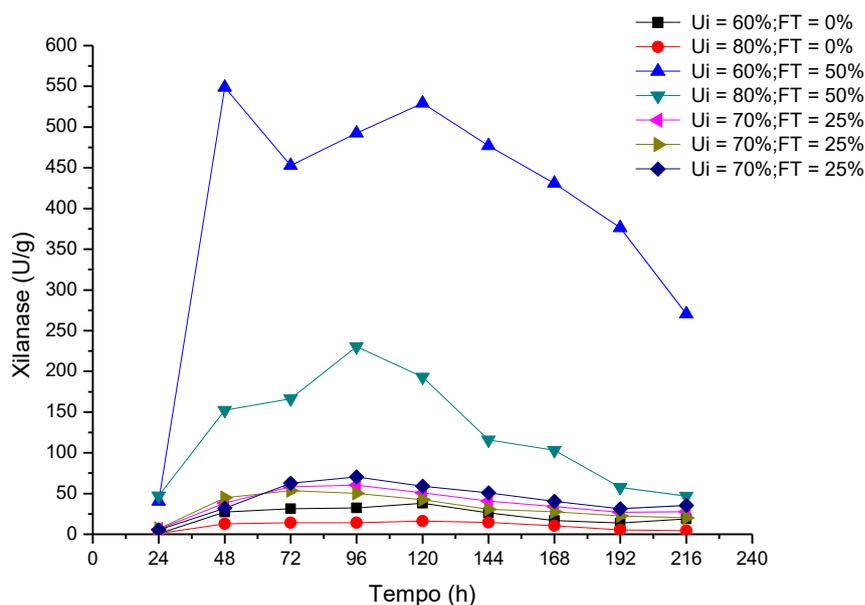
Analisando a superfície de resposta observa-se que o aumento da atividade enzimática da FPase é decorrente, positivamente, do aumento do teor de farelo de trigo no bagaço do sorgo sacarino.

4.3.3 Xilanase

4.3.3.1 Perfil Cinético da produção da Xilanase

Na Figura 4.10, estão apresentadas as cinéticas fermentativas de produção da enzima Xilanase, para os ensaios do planejamento experimental.

Figura 4.10 - Cinética da Fermentação Semissólida para produção da enzima Xilanase.



Observa-se na Figura 4.10 para os ensaios 1 e 2, com 60 e 80 % de umidade inicial e compostos apenas por BSS, que ambos apresentaram aproximadamente o mesmo perfil com relação a produção de Xilanase, com atividades máximas de 38,22 e 16,14 U/g (5,10 e 2,15 U/mL), ambos em 120 h. A partir desses valores observa-se que a umidade inicial teve influência na atividade da Xilanase para os ensaios apenas com BSS, uma vez que a atividade para o ensaio 1 foi mais que 2 vezes superior à obtida no ensaio 2, para o mesmo tempo de atividade máxima.

Analisando o ensaio 4, onde foi utilizado como substrato o BSS com 50 % de FT, com umidade inicial de 80 %, observa-se que o perfil cinético apresentou um pico de atividade máxima de 230,45 U/g (30,73 U/mL) em 96 h de fermentação.

O ensaio 3, com umidade inicial de 60 % e 50 % de FT, apresentou as maiores atividades para a Xilanase, durante o período do processo fermentativo, atingindo uma atividade máxima de 548,71 U/g (77,16 U/mL) em 48 h de fermentação, sendo muito

superior a atividade obtida no ensaio 4, logo a umidade inicial teve forte influência sobre a atividade da Xilanase, com uma produtividade de 11,43 U/g.h.

Comparando os ensaios 1 e 3, com a mesma umidade inicial de 60 %, e a composição do substrato variando, de 0 % para 50 % de FT, podemos observar a forte influência do uso do FT na atividade enzimática da Xilanase, um aumento de aproximadamente 15 vezes.

Os ensaios 5, 6 e 7, com umidade inicial de 70 % e 25 % (m/m) de FT, apresentaram o mesmo perfil cinético e máxima atividade de 44,81 U/g (5,97 U/mL) em 96 horas de fermentação. A comparação do comportamento cinético nesses três ensaios permite concluir que também para a enzima Xilanase o processo fermentativo foi reprodutível e que a repetibilidade desse processo pode ser obtida.

Taherzadeh-Ghahfarokhi *et al.* (2019), estudando a produção de celulasas e xilanases, utilizando o *Trichoderma reesei* em FES, apenas com o farelo de trigo compondo o substrato obtiveram máximas atividades de 1949,0 U/g.d.s (16,2 U/(g.d.s.)h) de Xilanase em 120 h de incubação. Valor bem próximo ao encontrado neste trabalho para o ensaio com 60 % de umidade e 50 % de FT 1695,6 U/g.d.s em 48 h (32,3 U/(g.d.s.)h) mas com produtividade bem inferior.

Souza *et al.* (2018) estudaram a produção da enzima Xilanase, durante a FES do bagaço de cana-de-açúcar utilizando microrganismo *Penicilium roqueforti* ATCC 10110 e obteve máxima atividade de 19,95 UI/g, nas condições de 65 % de umidade, temperatura de 25 °C e tempo de fermentação de 72 h. Valor abaixo do encontrado neste trabalho para o ensaio nas condições de 60 % de umidade e apenas BSS compondo o substrato.

Lins (2017) trabalhando com o bagaço do sorgo sacarino IPA P222 incrementado com farelo de trigo (50 %) e 60 % de umidade em FSS, obteve atividade máxima de 577,41 U/g em 216 h de fermentação para Xilanase. Valores muito próximos ao encontrado neste trabalho, mas com produtividades bem inferiores, de 2,67 U/g.h.

Terrasán e Carmona (2015), estudaram a influência da umidade (20, 30, 40 e 50 %) do substrato bagaço de cevada na produção das xilanases por FSS utilizando o *Penicillium janczewskii* e obtiveram máxima atividade enzimática de 370,00 U/g ao trabalhar com 50 % de umidade. Para os valores abaixo de 50 % de umidade os autores obtiveram forte redução nos rendimentos enzimáticos.

Albano (2012), utilizando bagaço de cana-de-açúcar com farelo de trigo (30 %) e umidade de 80 %, obteve um resultado de aproximadamente 150 U/g de Xilanase, valor

próximo ao encontrado no ensaio 4 deste trabalho, teor de farelo de trigo (50 %) e 80 % de umidade.

4.3.3.2 Análise Estatística da produção de Xilanase

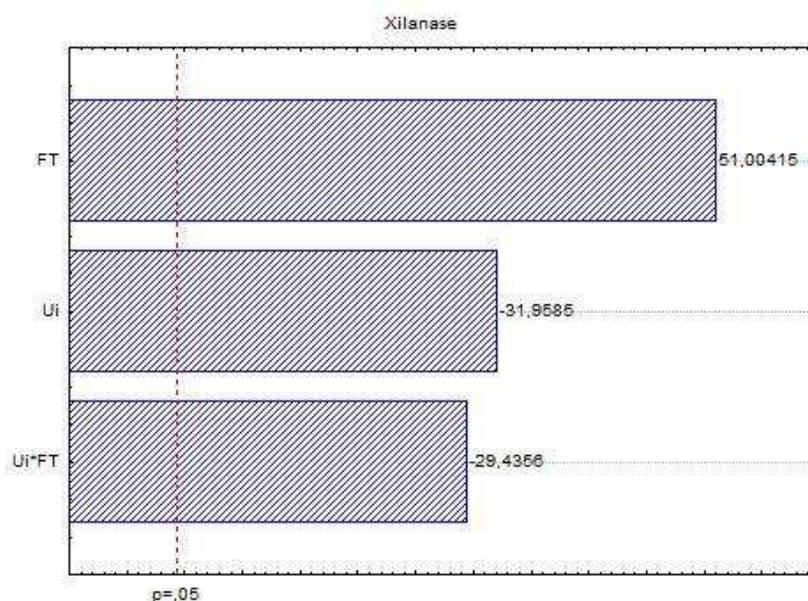
Para a análise estatística do planejamento experimental para produção de Xilanase, as atividades enzimáticas selecionadas para compor a matriz do planejamento como variável resposta, foram as obtidas no tempo de 48 horas, tempo de obtenção de maior atividade (ensaio 3), no entanto, não necessariamente a atividade enzimática foi a de valor máximo, nesse tempo, para os demais ensaios.

A Tabela 4.8 mostra os dados do planejamento experimental e como variável resposta as atividades da Xilanase no tempo de 48 horas de fermentação.

Tabela 4.8 - Ensaios do planejamento experimental para a produção de Xilanase em 48 h na FSS.

Ensaios	Ui % (b.u)	FT %	Xilanase		
			U/g	U/g.d.s	U/mL
1	60 (-1)	0 (-1)	29,16	90,10	3,89
2	80 (+1)	0 (-1)	12,86	104,05	1,71
3	60 (-1)	50 (+1)	548,71	1695,64	73,16
4	80 (+1)	50 (+1)	20,29	1231,14	20,29
5	70 (0)	25 (0)	38,35	171,52	5,11
6	70 (0)	25 (0)	44,81	200,41	5,97
7	70 (0)	25 (0)	31,89	142,64	4,25

Na Figura 4.11 é apresentado o Diagrama de Pareto mostrando a influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima Xilanase e o efeito da interação entre essas duas variáveis, para o tempo de máxima atividade que foi de 48 horas, como pode ser observado na Figura 4.10.

Figura 4.11 - Diagrama de Pareto para a produção de Xilanase em 48 horas.

Observa-se que as variáveis, umidade inicial (Ui) e teor de farelo de trigo (FT), e sua interação (Ui*FT) foram significativas. O teor de farelo de trigo (% FT) foi a variável que mais influenciou no processo. Quando passamos do nível -1 para o nível +1 do % de FT, ocorre um aumento da atividade enzimática da Xilanase. Já a umidade inicial e a interação entre as duas variáveis também influenciaram o processo, mas de maneira a diminuir a atividade enzimática da CMCase. Quando passamos do nível -1 do para o nível +1 do % de Ui, ocorre uma diminuição da atividade enzimática da FPase.

Na Tabela 4.9 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade enzimática da Xilanase do planejamento experimental.

Tabela 4.9 - Análise de Variância (ANOVA) para a produção de Xilanase em 48 horas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	187278,8248	3	62426,2749	0,54
Resíduo	37314,48631	3	12438,1621	
Total	224593,3	6		
% R²	83,39			

$$F_{\text{tabelado}} = 9,28 \quad F_{\text{calculado}} = 5,02$$

GL – Grau de Liberdade; SQ - Soma dos Quadrados; MQ. – Média Quadrática dos Desvios; Teste F = ($F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$).

Os dados foram analisados em nível estatístico de 95 % de confiança apresentando um coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) de 83,39 %. O $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao F_{tabelado} , sendo esta razão inferior a 1, logo o modelo linear não foi

estatisticamente significativo ao nível de 95 % de confiança. Provavelmente seria um modelo curvatura, podendo ser comprovado ampliando os níveis ($-\alpha$ e $+\alpha$).

4.4 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSm)

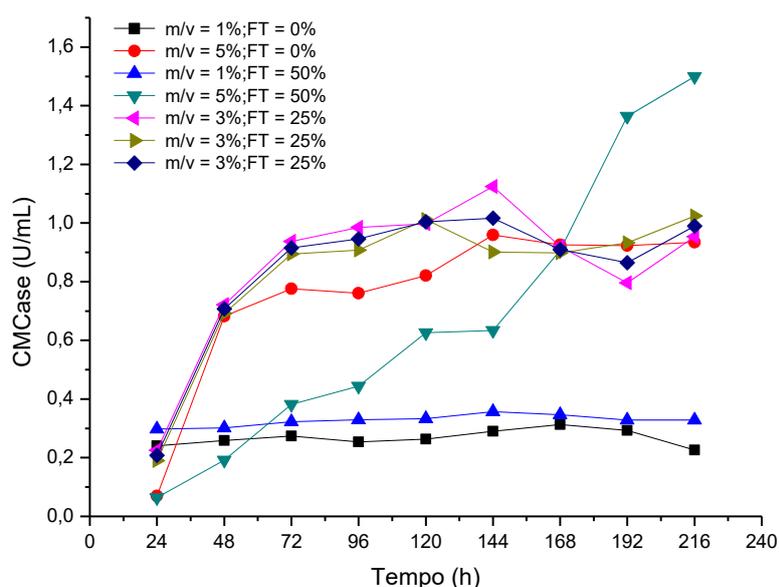
Para o processo de FSm foram analisadas a influência da relação massa/volume (m/v) da concentração do substrato (1, 3 e 5 %) e o teor de farelo de trigo (0, 25 e 50 %) compondo o substrato, durante as cinéticas de fermentação para cada experimento, com duração de 240 horas cada. Nas Figuras 4.12 e 4.16 são apresentados os perfis cinéticos para a produção das enzimas CMCase e Xilanase, referente ao planejamento experimental da Tabela 3.4.

4.4.1 CMCase

4.4.1.1 Perfil Cinético da produção de CMCase

Na Figura 4.12, estão apresentadas as cinéticas fermentativas de produção da enzima CMCase pela FSm, para os ensaios do planejamento experimental.

Figura 4.12 - Cinética da Fermentação Submersa para produção da enzima CMCase.



Observa-se na Figura 4.12 para os ensaios 1 e 2, com 1 e 5 % de concentração do substrato (m/v) e compostos apenas por BSS, apresentaram máximas atividade de CMCase de 0,31 U/mL em 168 h e 0,96 U/mL em 144 h de fermentação, respectivamente. A partir desses valores observa-se que a concentração do substrato (m/v) teve influência na atividade da Xilanase para os ensaios apenas com BSS, uma vez que a atividade para o ensaio 2 foi 3 vezes maior que a obtida no ensaio 1.

Analisando o ensaio 3, onde foi utilizado como substrato o BSS com 50 % de FT, e concentração do substrato (m/v) de 1 %, apresentou atividade máxima de 0,35 U/mL em 144 h de fermentação. Para o ensaio 4, com substrato composto por BSS e 50 % de FT, e concentração do substrato (m/v) de 5 %, o processo de produção da CMCase foi crescente, não apresentando um pico, e sim maior atividade de 1,50 U/mL nas 216 h de fermentação, indicando que se aumentássemos o tempo de fermentação poderíamos ainda ter um aumento na atividade.

Comparando os ensaios 1 e 3, podemos observar que para a concentração do substrato de 1 % (m/v), o % de FT na composição do substrato, variando de 0 % para 50 % de FT, praticamente não teve influência na atividade enzimática da CMCase. Comparando os ensaios 2 e 4 observa-se que até o tempo de 144 h a produção de CMCase foi maior para a concentração de 1 %. A partir de 168 h de fermentação que a atividade começa a ser mais expressiva para a concentração de 5 %, chegando a um aumento de 1,5 vezes na produção da enzima CMCase nas 216 h.

Os ensaios 5, 6 e 7, com concentração do substrato de 3 % (m/v) e o teor de farelo de trigo de 25 %, apresentaram aproximadamente o mesmo perfil cinético e máxima atividade de 1,12 U/mL em 144 horas de fermentação, comprovando há reprodutibilidade e repetibilidade do processo fermentativo.

Salomão (2017) estudando as melhores condições operacionais de temperatura (28, 33 ou 38 °C) e concentração de bagaço de cana (0,5, 1,6 ou 2,7 %) para produção de celulases a partir dos fungos *Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. e *Trichoderma koningii* INCQS 40331 (CFAM 422) utilizando bagaço de cana *in natura* e pré-tratado com solução ácido-base por FSm, obteve o melhor resultado para a atividade da CMCase com o fungo *Trichoderma koningii* a 28 °C e concentração de substrato *in natura* de 2,7 % de 3,130 U/mL em 72 h. Já para o bagaço pré-tratado o melhor resultado foi a 28 °C e 0,5 % de substrato com uma atividade de 1,52 U/mL, valor semelhante ao encontrado neste trabalho para a concentração de 5 % e 50 % de FT.

Albano (2012) trabalhou com 6 linhagens de fungos filamentosos, incluindo *A. fumigatus* e *T. reesei*, utilizando como substrato bagaço de cana-de-açúcar na produção de celulases e xilanases por FSm com concentração de substrato de 3 %. Para os fungos *A. fumigatus* e *T. reesei* as atividades máximas de CMCCase foram de 17, 4 e 10,7 U/g, respectivamente. Valores inferiores aos encontrados neste trabalho, usando apenas o BSS como substrato nas concentrações de 1 e 5 %.

4.4.1.2 Análise Estatística da produção de CMCCase

Para a análise estatística do planejamento experimental na produção de CMCCase na FSm, as atividades enzimáticas selecionadas para compor a matriz do planejamento como variável resposta, foram as obtidas no tempo de 216 horas, por ser esse o tempo de obtenção de maior atividade (ensaio 4), no entanto, ressalta-se que não necessariamente a atividade enzimática foi a de valor máximo para os demais ensaios, nesse tempo.

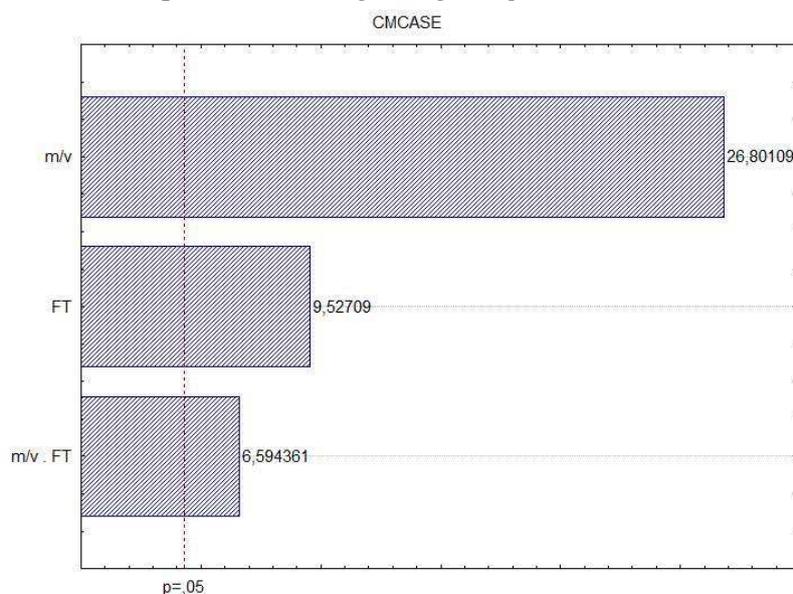
A Tabela 4.10 mostra os dados do planejamento experimental e como variável resposta as atividades de CMCCase no tempo de 216 horas de fermentação.

Tabela 4.10 - Ensaios do planejamento experimental para a produção de CMCCase em 216 h na FSm

Ensaios	m/v %	FT %	CMCCase	
			U/mL	U/g
1	1 (-1)	0 (-1)	0,226	22,60
2	5 (+1)	0 (-1)	0,9343	18,69
3	1 (-1)	50 (+1)	0,3288	32,88
4	5 (+1)	50 (+1)	1,4994	29,99
5	3 (0)	25 (0)	0,9539	32,79
6	3 (0)	25 (0)	1,024	34,13
7	3 (0)	25 (0)	0,9897	32,98

Na Figura 4.13 é apresentado o Diagrama de Pareto mostrando a influência da concentração do substrato (m/v) e o teor de farelo de trigo (FT) na produção da enzima CMCCase e o efeito da interação entre essas duas variáveis (m/v.FT).

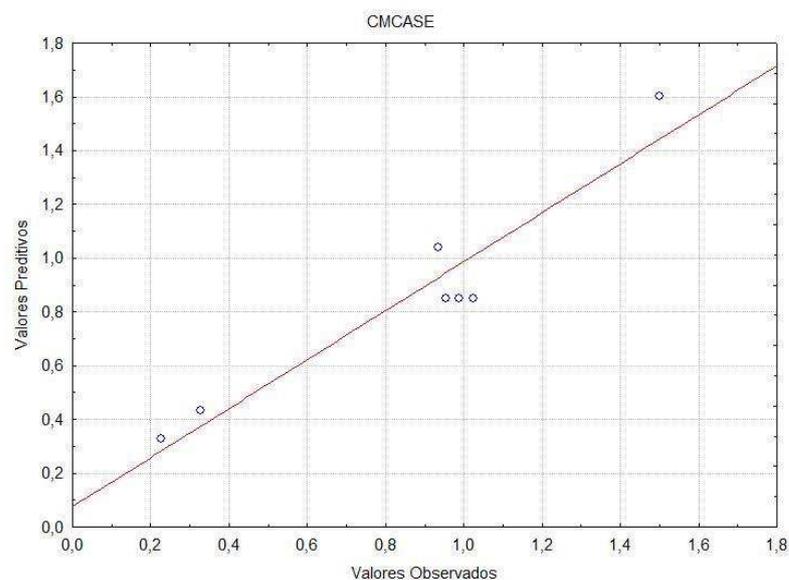
Figura 4.13 - Diagrama de Pareto para a produção de CMCCase em 216 horas.



Fica evidente que as duas variáveis estudadas e a interação entre elas são parâmetros estatisticamente significativos no processo da FSm, influenciando positivamente na obtenção de atividade celulolítica. A concentração do substrato (% m/v) foi a variável que mais influenciou no processo. Quando passamos do nível -1 (menor % m/v) para o nível +1 (maior % m/v), ocorre o aumento da atividade enzimática da CMCCase.

Na Figura 4.14 é apresentado o gráfico de dispersão entre os valores previstos pelo modelo estatístico e os valores observados para cada ensaio do planejamento experimental.

Figura 4.14 – Gráfico dos valores preditivos versus valores observados para a produção de CMCCase em 216 horas.



A partir dos dados observados constata-se uma excelente concordância entre os valores observados e os esperados, confirmando o modelo como linear, onde os resíduos do modelo seguem distribuição normal, visto que os pontos se aproximam da reta identidade.

Na Tabela 4.11 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade enzimática da CMCCase do planejamento experimental.

Tabela 4.11 - Análise de Variância (ANOVA) para a produção de CMCCase em 216 horas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	1,047519228	3	0,3492	1,10
Resíduo	0,102915047	3	0,0343	
Total	1,140434	6		
% R²	91,05			

$$F_{\text{tabelado}} = 9,28 \quad F_{\text{calculado}} = 10,18$$

GL – Grau de Liberdade; SQ - Soma dos Quadrados; MQ. – Média Quadrática dos Desvios; Teste F = (Fcalculado / Ftabelado).

Os dados foram analisados em nível estatístico de 95 % de confiança apresentando um coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) de 91,05 %.

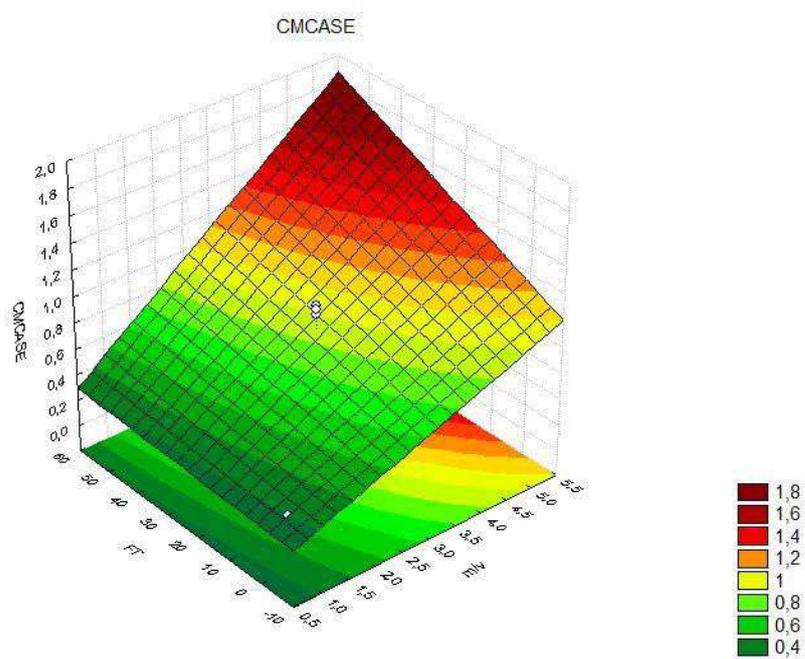
Segundo Barros Neto *et al.* (1995) para valores de F maior que 1,0 o modelo estatístico é considerado significativo. Neste caso para a produção de CMCCase o modelo é significativo ao nível de 95 % de confiança, uma vez que o valor de F foi de 1,10.

O modelo estatístico codificado com as variáveis significativas para a atividade enzimática da CMCCase é apresentado na Equação 4.3.

$$CMCase \left(\frac{U}{mL} \right) = 0,850 + 0,470 m/v + 0,167 FT + 0,116 m/v.FT \quad (4.3)$$

A Figura 4.15 apresenta a superfície de resposta para a variável atividade enzimática da CMCCase em função da concentração do substrato (% m/v) e do teor de farelo de trigo adicionado ao BSS, usado como substrato na fermentação submersa. Observa-se que nos intervalos estudados a maior atividade enzimática da CMCCase ocorre para o nível +1 da concentração do substrato (% m/v) e o nível +1 do teor de farelo de trigo (FT %).

Figura 4.15 - Superfície de resposta para a produção de CMCase em 72 horas.



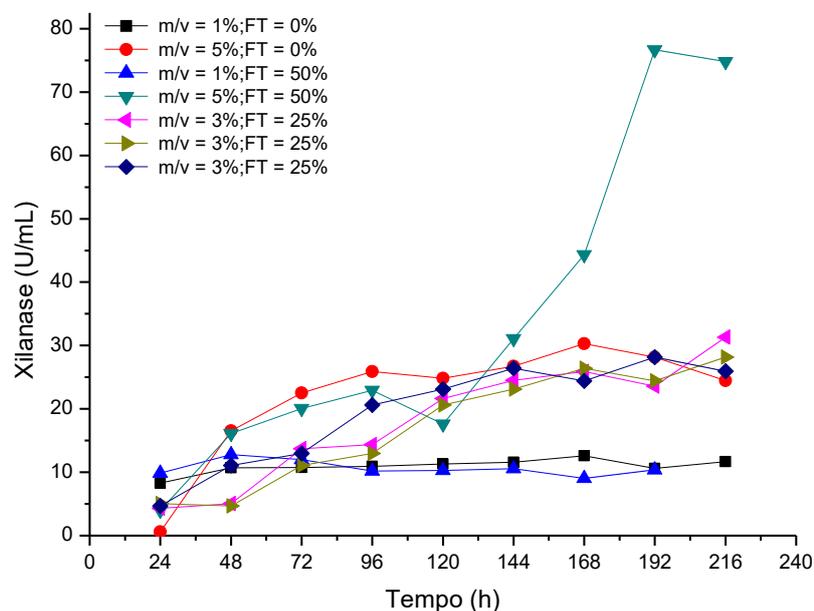
Observa-se que o aumento da concentração do substrato (% m/v) e o aumento do teor de farelo de trigo (FT %), fonte adicional de nitrogênio, propicia um aumento na atividade enzimática, onde se operando nos níveis +1 (5 % m/v) e +1 (50 % FT) para estas variáveis, respectivamente, obtém-se atividades enzimáticas acima de 1,50 U/mL.

4.4.2 Xilanase

4.4.2.1 Perfil Cinético da produção Xilanase

Na Figura 4.16, estão apresentadas as cinéticas fermentativas de produção da enzima Xilanase pela FSm, para os ensaios do planejamento experimental.

Figura 4.16 - Cinética da Fermentação Submersa para produção da enzima Xilanase.



Observa-se na Figura 4.16 para os ensaios 1 e 2, com 1 e 5 % de concentração do substrato (m/v) e compostos apenas por BSS, ambos apresentaram picos de atividade em 168 h de fermentação de 12,58 e 30,29 U/mL de Xilanase, respectivamente. A partir desses valores observa-se que, a concentração do substrato (m/v) teve influência na atividade da Xilanase para os ensaios apenas com BSS, uma vez que a atividade para o ensaio 2 foi mais que 2 vezes superior à obtida no ensaio 1, para o mesmo tempo de atividade máxima.

Analisando o ensaio 3, onde foi utilizado como substrato o BSS com 50 % de FT, e concentração do substrato (m/v) de 1 %, observa-se que o perfil cinético apresentou um pico de atividade máxima de 12,79 U/mL em 48 h de fermentação. Já o ensaio 4, com substrato composto por BSS e 50 % de FT, e concentração do substrato (m/v) de 5 %, apresentou o maior pico de atividade e maior produtividade para a produção da Xilanase de 76,68 U/mL em 192 h de fermentação, com produtividade de 0,399 U/mL.h.

Comparando os ensaios 1 e 3, pode-se observar que para a concentração do substrato de 1 % (m/v), o % de FT na composição do substrato, variando de 0 % para 50 % de FT, praticamente não teve influência na atividade enzimática da Xilanase. Comparando os ensaios 2 e 4 com concentração do substrato de 5 %, teve-se um aumento de 2,5 vezes na produção da enzima Xilanase.

Os ensaios 5, 6 e 7, com concentração do substrato de 3 % (m/v) e o teor de farelo de trigo de 25 %, apresentaram aproximadamente o mesmo perfil cinético e máxima atividade de 26,90 U/mL em 144 horas de fermentação, demonstrando novamente que o processo fermentativo desenvolvido nessa pesquisa foi reprodutível.

Silva *et al.* (2018) estudaram a produção de enzimas celulases e xilanases, utilizando *Trichoderma reesei* QM9414 no processo de FSm, com concentração de substrato de 3 %, e obtiveram uma máxima atividade de Xilanase de 93,08 U/mL (0,387 U/mL.h) utilizando o bagaço de cana-de-açúcar sob pré-tratamento alcalino em 240 h de fermentação. Valor acima do encontrado neste trabalho para o ensaio com 5 % mas com menor produtividade.

Florencio *et al.* (2016) estudando o efeito dos processos de fermentação, submersa (FSm) e sequencial (FSL), sobre a produção de enzimas utilizando como substrato o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (concentração de 1 %) e glicose (10 g/L), obtiveram atividades de xilanase na FSL maiores que as produzidas por FSm. Utilizando o *Trichoderma reesei* Rut C30, as máximas atividades para a FSm e FSL foram de 7,9 e 18,3 U/mL, respectivamente, e usando o fungo *Aspergillus niger* A12, as máximas atividades de xilanase foram de 7,8 e 26,4 U/mL para a FSm e FSL, respectivamente. Valores para a FSm inferiores ao encontrado nesse trabalho para os ensaios apenas com BSS e concentração de substrato de 1 %. Já para a FSL os valores foram próximos aos encontrados neste trabalho com concentração de 3 % e 25 % de FT.

Dutra (2013) estudou a influência de várias fontes de carbono na indução de celulases e hemicelulases utilizando o fungo *Chrysosporthe cubensis*, fungo patógeno de eucalipto, na FSm. O *C. cubensis* produziu os maiores níveis de atividades celulolíticas e hemicelulolíticas quando crescido em farelo de trigo e CMC (concentração de 1 % m/v), com valores de máximas atividades de Xilanase de 14,2 U/mL e 10,7 U/mL, respectivamente.

4.4.2.2 Análise Estatística da produção de Xilanase

Para a análise estatística do planejamento experimental na produção de Xilanase na FSm, as atividades enzimáticas selecionadas para compor a matriz do planejamento como variável resposta, foram as obtidas no tempo de 192 horas, tempo de obtenção de maior atividade (ensaio 4), que não necessariamente foi o tempo, de maior atividade para os demais ensaios.

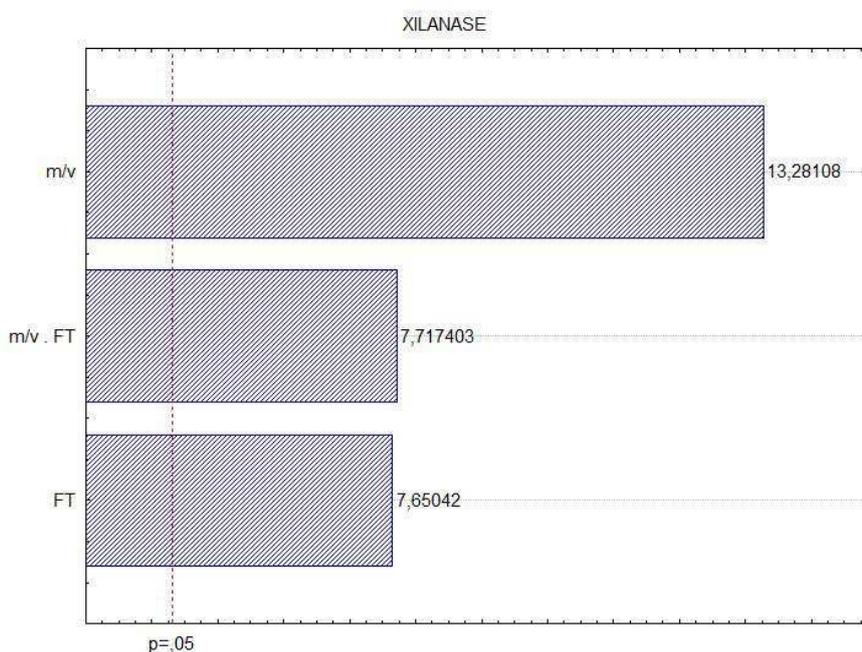
Tabela 4.12 mostra os dados do planejamento experimental e como variável resposta as atividades de Xilanase no tempo de 192 horas de fermentação

Tabela 4.12 - Ensaios do planejamento experimental para a produção de Xilanase em 192 h na FSM.

Ensaios	m/v %	FT %	Xilanase	
			U/mL	U/g
1	1 (-1)	0 (-1)	10,59	1058,54
2	5 (+1)	0 (-1)	28,15	563,05
3	1 (-1)	50 (+1)	10,37	1037,39
4	5 (+1)	50 (+1)	76,68	1533,53
5	3 (0)	25 (0)	25,00	833,33
6	3 (0)	25 (0)	31,32	1043,81
7	3 (0)	25 (0)	28,16	938,57

Na Figura 4.17 é apresentado o Diagrama de Pareto mostrando a influência da concentração do substrato (m/v) e o teor de farelo de trigo (FT) na produção da enzima Xilanase e o efeito da interação entre essas duas variáveis.

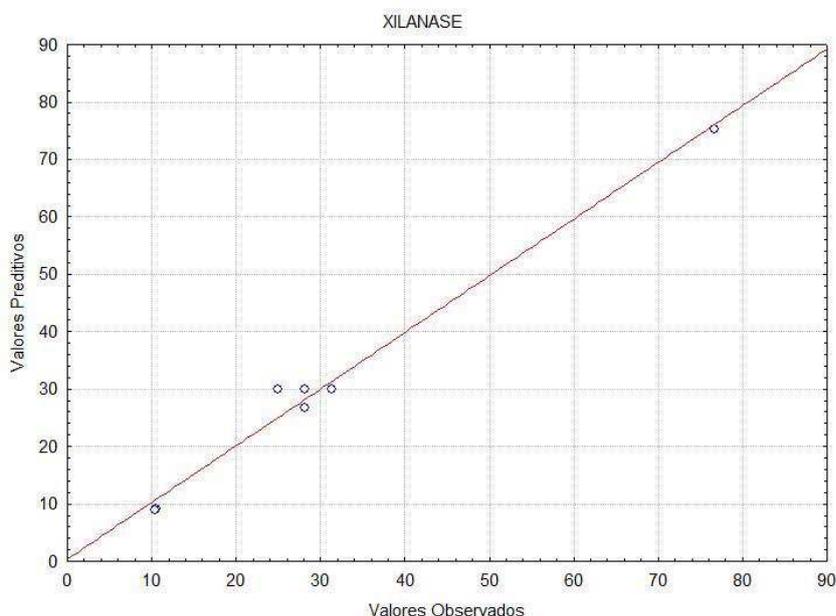
Figura 4.17 - Diagrama de Pareto para a produção de CMCase em 216 horas.



Observa-se que as duas variáveis estudadas e a interação entre elas são parâmetros estatisticamente significativos no processo da FSM, influenciando positivamente na obtenção de atividade xilanolítica. A concentração do substrato (% m/v) foi a variável que mais influenciou no processo. Quando passamos do nível -1 (menor % m/v) para o nível +1 (maior % m/v), ocorre o aumentando da atividade enzimática da Xilanase.

Na Figura 4.18 é apresentado o gráfico de dispersão entre os valores previstos pelo modelo estatístico e os valores observados para cada ensaio do planejamento experimental.

Figura 4.18 – Gráfico dos valores preditivos versus valores observados para a produção de Xilanase em 192 horas.



A partir dos dados observados constata-se uma excelente concordância entre os valores observados e os esperados, onde os resíduos do modelo seguem distribuição normal, visto que os pontos se aproximam da reta identidade, confirmando o modelo como linear.

Na Tabela 4.13 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade enzimática da Xilanase do planejamento experimental.

Tabela 4.13 - Análise de Variância (ANOVA) para a produção de Xilanase em 192 horas.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	2935,851027	3	978,6170	8,23
Resíduo	38,46307842	3	12,8210	
Total	2974,314	6		
% R²	98,70			

$$F_{\text{tabelado}} = 9,28 \quad F_{\text{calculado}} = 76,33$$

GL – Grau de Liberdade; SQ - Soma dos Quadrados; MQ. – Média Quadrática dos Desvios; Teste F = (Fcalculado / Ftabelado).

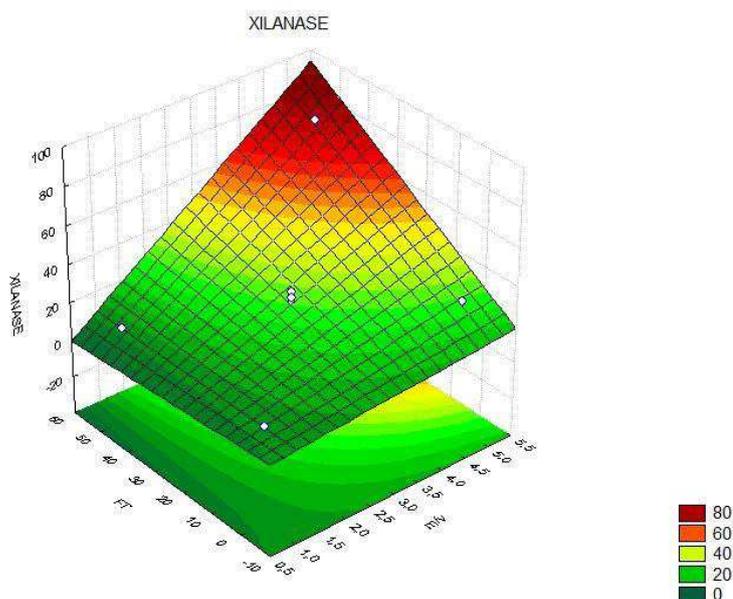
Os dados foram analisados em nível estatístico de 95 % de confiança apresentando um coeficiente de determinação de 98,70 %, percentual de variações explicadas pelo modelo.

Segundo Barros Neto *et al.* (1995) para valores de F maior que 1,0 o modelo estatístico é considerado significativo, indicando que há relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que um modelo não seja apenas estatisticamente significativo, mas também útil para fins preditivos, o valor do teste F deve ser no mínimo maior que 4,0. Neste caso para a produção de Xilanase o modelo é significativo e preditivo ao nível de 95 % de confiança, uma vez que o valor de F foi de 8,23. O modelo estatístico codificado com as variáveis significativas para a atividade enzimática da CMCase é apresentado na Equação 4.4.

$$Xilanase \left(\frac{U}{mL} \right) = 30,038 + 20,967 m/v + 12,078 FT + 12,184 m/v.FT \quad (4.4)$$

A Figura 4.19 apresenta a superfície de resposta para a variável atividade enzimática da Xilanase em função da concentração do substrato (% m/v) e do teor de farelo de trigo adicionado ao BSS, usado como substrato na fermentação submersa. Observa-se que nos intervalos estudados a maior atividade enzimática da Xilanase ocorre para o nível +1 da concentração do substrato (% m/v) e o nível +1 do teor de farelo de trigo (FT %).

Figura 4.19 - Superfície de resposta para a produção de Xilanase em 192 horas.



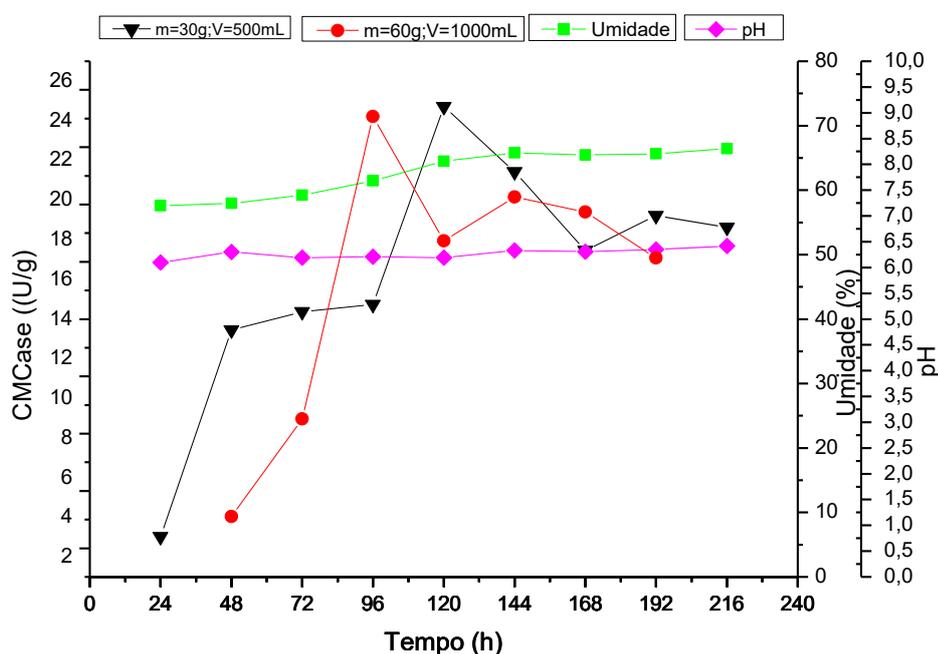
Verifica-se a grande influência que a concentração do substrato tem na produção de Xilanase e que também a suplementação do BSS com farelo de trigo, contribui para o aumento da atividade da Xilanase produzida por *Trichoderma reesei* LCB 048.

4.5 AUMENTO DE ESCALA PARA A FERMENTAÇÃO SEMISSÓLIDA

4.5.1 CMCCase

Na Figura 4.20 estão os acompanhamentos cinéticos dos aumentos de escala do processo de produção da CMCCase, por fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em BSS, com 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo, condições na qual obteve-se o maior pico de atividade enzimática da CMCCase (19,64 U/g) dentre os ensaios do planejamento experimental da Tabela 3.2.

Figura 4.20 - Cinéticas da Fermentação Semissólida para os aumentos de escala da produção da enzima CMCCase.



Observa-se na Figura 4.20 que o aumento de escala em massa da produção de CMCCase utilizando 30 gramas de meio em erlenmeyer de 500 mL, obteve-se um pico de atividade de 24,72 U/g (0,21 U/g.h) de CMCCase em 120 h de fermentação, e para a segunda condição de aumento de escala utilizando 60 gramas de meio em erlenmeyer de 1000 mL o pico de atividade foi de 21,07 U/g em 96 h, com produtividade de 0,22 U/g.h.

Ambas as condições de aumento de escala em massa, apresentaram maiores atividades de CMCase quando comparadas a escala inicial, que foi de 19,64 U.g⁻¹, e embora tenha apresentado um valor de atividade um pouco inferior, apresentou maior produtividade.

Observa-se que a umidade do meio se manteve praticamente constante durante toda a cinética fermentativa, variando de 58 a 65 %. O controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo de fermentação semissólida. Andrade (2013) ao estudar a produção de proteases utilizando uma porcentagem de farelo de trigo, afirma que a presença desse substrato ajuda a tornar a umidade do meio constante em todo o processo fermentativo, sem precisar controlá-la, facilitando a produção da enzima.

O pH do meio apresentou um comportamento praticamente constante no decorrer das 240 horas, com uma pequena variação entre 6,1 e 6,5. O pH no processo fermentativo é um dos parâmetros mais críticos, afetando diretamente o metabolismo dos microrganismos e, conseqüentemente, sua produção. Muitos meios de cultivo, como o desse trabalho, apresentam uma boa capacidade tamponante, diminuindo a necessidade de controle dessa variável.

Santos *et al.* (2015) trabalhando com bagaço de sabugo de milho e palha de milho incrementados com 50 % FT e com 60 % de umidade inicial, utilizando o fungo FSDE16 na FES, realizaram as fermentações em erlenmeyer de 1000 mL com 100 g de meio durante 7 dias. A máxima atividade de CMCase obtida com o sabugo de milho e farelo de trigo foi de 7,96 U/g em 168 h, enquanto para a palha de milho e farelo de trigo foi de 6,44 U/g a 168h. Comparando esses valores com a segunda condição de aumento de escala deste trabalho, foi utilizado o mesmo reator mas a massa foi maior, o que pode ter acarretado um aumento na espessura do meio, e como consequência uma redução na atividade enzimática, quando comparada a obtida neste trabalho.

Barros *et al.* (2014) estudaram a produção de celulasas pelo fungo isolado do solo da indústria sucroalcooleira, o *FSDE3*, através da FSS utilizando como substrato, o bagaço da cana com 50 % de farelo de trigo e a palha da cana com 50 % de farelo de trigo. As fermentações foram realizadas em erlenmeyers de 1000 mL contendo 100g do substrato, com umidade de 50 %, durante 120 horas. Não foi observado crescimento de fungo no bagaço, já na palha o fungo se desenvolveu bem, obtendo pico de atividade de CMCase para o *FSDE3* 6,21 U/g em 120 h.

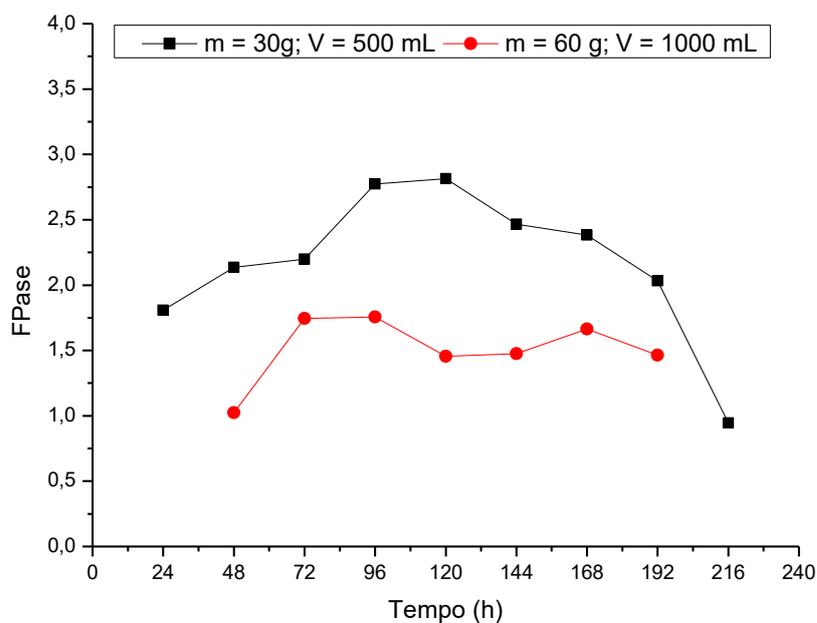
Valores bem inferiores comparando com a segunda condição do aumento de escala deste trabalho, sendo semelhante as utilizadas pelos autores acima.

Almeida (2012) trabalhando com a mistura bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e 75 % de farelo de trigo, 70 % de umidade, utilizando o fungo *Trichoderma reesei* RUT C-30 na em FSS, utilizando 30 g de meio em Erlenmeyer de 500 g, obteve atividade de aproximadamente 25 U/g em 168 h, valor bem próximo ao encontrado neste trabalho para as mesmas condições, mas com produtividade inferior. Em 21 dias de fermentação atingindo um pico de 93,7 U/g para CMCase. Embora seja um valor superior ao encontrado nesse trabalho, a produtividade foi inferior (0,19 U/g.h), sendo o *T. reesei* RUT C-30 um fungo geneticamente modificado propiciando níveis elevados de celulases.

4.5.2 FPase

Na Figura 4.21 estão os acompanhamentos cinéticos dos aumentos de escala do processo de produção da FPase, por fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em BSS, com 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo, condição na qual obteve-se o maior pico de atividade enzimática da FPase (2,06 U/g) dentre os ensaios do planejamento experimental da Tabela 3.2.

Figura 4.21 - Cinéticas da Fermentação Semissólida para os aumentos de escala da produção da enzima FPase.



Observa-se na Figura 4.21 que o aumento de escala em massa da produção de FPase utilizando 30 gramas de meio em erlenmeyer de 500 mL, obteve-se um pico de

atividade de 2,81 U/g de FPase em 120 h de fermentação. Se destacando como a maior atividade e produtividade de FPase deste trabalho.

Já para a segunda condição de aumento de escala utilizando 60 gramas de meio em erlenmeyer de 1000 mL o pico de atividade foi de 1,75 U/g em 96 h. Valor um pouco inferior ao encontrado na escala inicial. Esse decaimento na atividade pode ter sido influenciado pela espessura do meio no biorreator.

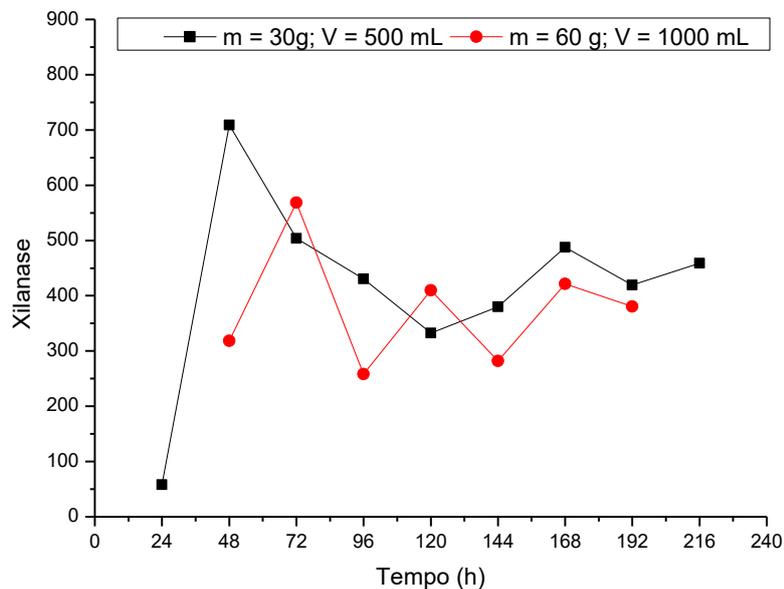
As variáveis massa de substrato e espessura da camada do meio dentro do biorreator estão diretamente relacionadas com o crescimento e metabolismo do microrganismo para produção de enzimas. Pandey (2004) verificou que, com altura de substrato acima de 40 mm, a transferência de massa e calor, era limitada, dificultando a produção enzimática.

Apesar da capacidade do biorreator ter sido, 2 e 4 vezes maior que a capacidade do biorreator inicial, seus diâmetros não apresentam crescimento proporcionais, acarretando um aumento na espessura da camada, quando se dobrou e quadruplicou a massa de substrato a ser fermentada.

4.5.3 Xilanase

Na Figura 4.22 estão os acompanhamentos cinéticos dos aumentos de escala do processo de produção da Xilanase, por fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em BSS, com 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo, condição na qual obteve-se o maior pico de atividade enzimática da Xilanase (548,71 U/g) dentre os ensaios do planejamento experimental da Tabela 3.2.

Figura 4.22 - Cinéticas da Fermentação Semissólida para os aumentos de escala da produção da enzima Xilanase.



Observa-se na Figura 4.22 que o aumento de escala em massa da produção de Xilanase utilizando 30 gramas de meio em erlenmeyer de 500 mL, obteve-se um pico de atividade de 708,90 U/g de Xilanase em 48 h de fermentação. Se destacando como a maior atividade e produtividade de Xilanase deste trabalho.

Já para a segunda condição de aumento de escala utilizando 60 gramas de meio em erlenmeyer de 1000 mL o pico de atividade foi de 568,60 U/g em 72 h. Valor de atividade superior a escala inicial, mas com produtividade inferior.

5. CONCLUSÕES

- A caracterização físico-química do bagaço do sorgo sacarino IPA P15 demonstrou o potencial do BSS, para produção das enzimas CMCCase, FPase e Xilanase por FSS, devido aos altos teores de celulose e hemicelulose encontrado;
- As isotermas de dessorção dos substratos apresentaram correlação entre a atividade de água e umidade de equilíbrio para os substratos. O modelo de GAB forneceu um bom ajuste para os dados experimentais dos substratos estudados, com coeficiente de correlação entre 0,9989 – 0,9997, e pôde-se obter parâmetros com significado físico como o valor da umidade da monocamada;
- As variáveis umidade inicial e teor de farelo de trigo influenciaram significativamente a atividade enzimática das celulasas (CMCase e FPase) e xilanase (Endo- β -1,4-xilanase) no processo de fermentação semissólida, e as maiores atividades de CMCCase, FPase e Xilanase foram obtidas usando-se 50 % (m/m) de farelo de trigo ao bagaço do sorgo sacarino IPA P15 e umidade inicial de 60 %, em tempos diferentes, 72 h, 96 h e 48 h, respectivamente, fato esse que facilita em um único processo a obtenção das diferentes enzimas;
- As variáveis teor de farelo de trigo e relação massa/volume (m/v) da concentração do substrato influenciaram significativamente a atividade enzimática da celulase (CMCase) e xilanase (Endo- β -1,4-xilanase) no processo de fermentação submersa, e as maiores atividades de CMCCase e Xilanase foram obtidas usando-se 50 % (m/m) de farelo de trigo ao bagaço do sorgo sacarino IPA P15 e concentração de substrato de 5 %, em tempos diferentes, 216 h e 192 h, respectivamente, fato esse que facilita em um único processo a obtenção das diferentes enzimas;
- As maiores atividades enzimáticas para a CMCCase, FPase e Xilanase deste trabalho foram obtidas com o aumento da escala inicial, usando-se 50 % de FT ao BSS e umidade inicial de 60 %, em 30 gramas de substrato e biorreator com 500 mL de capacidade, nos tempos de 120 h, 120 h e 48 h, respectivamente.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, F.; MCGUIRE, T. M.; LEE, R. S.; BECVAR, E. **Considerations for the Design of Organic Mulch Permeable Reactive Barriers.** Remediation Journal, v.18, p.59-72, 2007.

AKCAPINAR, G. B.; GUL, O.; SEZERMAN, U. O. **From in silico to in vitro: Modelling and production of *Trichoderma reesei* endoglucanase 1 and its mutant in *Pichia pastoris*.** *Journal of Biotechnology*, n.159, p.61– 68, 2012.

ALBANO, M. **Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido.** Dissertação de Mestrado. São José do Rio Preto/SP, 2012.

ALMEIDA, M.C.O. **Indução de celulases e xilanase por *trichoderma reesei* e *penicillium variabile* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos.** Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis/SC, 2012.

ANDRADE, D.B. **Produção de proteases utilizando por *Aspergillus Oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando farelo de trigo e canola.** UFMA, 2013.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. **Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity.** *Journal of Biotechnology*, n.23, p.257-270, 1992.

BAJPAI, P. **Xylanolytic Enzymes.** 1^a. ed. [S.l.]: Elsevier, 2014.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. **Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massa (PI-CG/EM).** *Química Nova*, v. 31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.

BARCELOS, C. A. MAEDA, R. N. SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA JR, N. **Sweet sorghum as a whole-crop feedstock for ethanol production.** *Biomass and Bioenergy*, n. 94, p. 46-56, 2016.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos.** Campinas: Editora da Unicamp, 1995, p. 480 p, 1995.

BARROS, T. V. F.; BONFIM, K. S.; MELO, A. L. M.; SANTOS, F. A.; SANTOS, S. F. **PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FUNGO *FSDE3* EM CULTIVO SEMISSÓLIDO.** *REVISTA SAÚDE E CIÊNCIA On line*, v.3, pag 164-173, 2014.

BATISTA, V. A. P. **Avaliação Bioenergética de Sorgos Biomassa, Sacarino e Forrageiro.** Dissertação de Mestrado. Viçosa/MG, 2016.

BÉGUIN, P. **Molecular biology of cellulose degradation.** *Annual Review of Microbiology*, v. 44, p. 219-248, 1990.

BEHERAA, S. S.; RAY, R. C. **Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v.86, p.656–669, 2016.

BI, Z.; ZHANG, J.; PETERSON, E.; ZHU, Z.; XIA, CHUNJIE.; LIANG, Y.; WILTOWSKI, T. **Biocrude from pretreated sorghum bagasse through catalytic hydrothermal liquefaction.** *Fuel*, v.188, p. 112-120, 2017.

BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: SCHIMIDELL, W., *et al.* **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica.** 1ª ed. São Paulo: Edgar Blucher, v. 2, Cap. 13, p. 247-276, 2014.

BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; FERRARA, M. A.; COELHO, R. R. R. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado.** Interciência Brasil, 1ª ed, p.241-271, Rio de Janeiro, 2008.

CAO, Y.; TAN, H. **Effects of cellulase on the modification of cellulose.** Carbohydrate Research, v.337, n.14, p.1291–1296, 2002.

CAPRISTE, G. H.; ROTSTEIN, E. **Prediction of sorption equilibrium data for starch-containing foodstuffs.** Journal of Food Science, Chicago, v.47, p.1501-107, 1982.

CARDOSO, W. S.; SANTOS, F. A.; MOTA, C. M.; TARDIN, F. D.; RESENDE, S. T.; QUEIROZ, J. H. **Pré-tratamentos de biomassa para produção de etanol de segunda geração.** Revista Analytica, v.56, p.64-76, 2012.

CARVALHO, F. P. **Enzimas Celulolíticas e xilanolíticas de leveduras isoladas do cerrado mineiro.** Tese de Doutorado, UFLA, Lavras/MG, 2013.

CASTELLANI, A. **Viability of some pahogenic fungi in sterile distilled water.** Journal of Tropical Medicine and Hygiene, p.225-226, 1939.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N.; **Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrolise de resíduos agroindustriais.** Química Nova, Scielo, v.33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CASTRO, F. M. R. **Potencial agrônômico e energético de genótipos de sorgo biomassa.** Dissertação de Mestrado, Lavras/MG, 2014.

CASTRO, G. H. F.; RODRIGUEZ, N.M.; GONÇALVES, L.C.; MAURICIO, R.M. **Características produtivas, agrônomicas e nutricionais do capim-tanzânia em cinco diferentes idades ao corte.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.62, n.3, p.654-666, 2010.

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, Springer, [S.l.], v.6, n.6, p. 1085–1093, 2015.

CHOVAU, S.; DEGRAUWE, D.; VAN DER BRUGGEN, B. **Critical analyses of techno-economic estimatives for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol.** *Renew Sust. Energ. Rev.*, v.26, p.307-321, 2013.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. **Xylanases, xilanases families and extremophilic xilanases.** *FEMS Microbiology Reviews.* v.29, p.3-23, 2005.

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. **Sorgo (Período março/2014).** Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_11_17_31_44_sorgomarco2014.pdf>; Acesso em 20 de setembro de 2014.

DAMASO, M. C. T; TERZIL, S. C.; FARIAS, A. X.; OLIVEIRA, A. C. P.; FRAGA, M. E.; COURI, S. **Selection of cellulolytic fungi isolated from diverse substrates.** *Braz. arch. biol. technol.* n.4, v.55, p. 513-520, 2012.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus*.** Dissertação de Mestrado, Porto Alegre/RS 2007.

DE CARLI, C. M. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol de 2G.** Dissertação de Mestrado, São Carlos/SP, 2011.

DENCE, C. W.; LIN, S. Y. **Methods in Lignin Chemistry.** Springer Verlag, New York, 1992.

DIAS, L. M. **Produção de celulasas e hemicelulasas por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* utilizando sorgo biomassa como a principal fonte de carbono.** Dissertação de Mestrado, Uberlândia/MG, 2017.

DUARTE, J. O. **Cultivo do sorgo: Mercado e comercialização.** Embrapa Milho e Sorgo Sistemas de Produção, 6^a ed, 2010.

DUTRA, T. R. **Influência das fontes de carbono na indução de celulases e hemicelulases em *Chrysosporthe cubensis* cultivado em meio líquido.** Viçosa/MG, 2013.

EMBRAPA. **Sorgo Granífero: Entenda sua safrinha com segurança.** Documentos 176, v.176, n.1, Sete Lagoas, 2015.

EMBRAPA. **Sorgo Sacarino: Tecnologia Agronômica e Industrial para alimentos e energia.** Agroenergia em Revista, Ano II, n.3, 2011.

FEITOSA, I. C. **Produção de Enzimas Lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa.** Dissertação de Mestrado. UNIT, Aracaju/SE, 2009.

FERREIRA, O.E. **Produção de etanol a partir de sorgo sacarino com tratamento enzimático.** Tese de doutorado, Jaboticabal, 2015.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M. BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. XIMENES, E.; LADISCH, M. R. **Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged sequential fermentation process: enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis.** Enzyme and Microbial Technology, v. 90, p. 53-60, 2016.

FREITA, L. A.; SANTORO, D.C.J.; PEREIRA, T.T.; ROVIERO, J.P.; RABELO, S.C.; MUTTON, M.J.R. **Caracterização físico-química de bagaço de sorgo comparado com cana-de-açúcar.** Ciência e Tecnologia: FATEC-JB, v.8, Número Especial, Jaboticabal/SP, 2016.

GHOSE, T.K. **Measurement of cellulase activities.** Pure and Applied Chemistry, v.59, p.257-268, 1987.

GUIMARAES, C.C. **Desenvolvimento e validação de modelos quimiométricos baseados em espectroscopia no infravermelho próximo para a predição de**

parâmetros do caldo e da biomassa do sorgo sacarino visando à produção de etanol.

Dissertação de mestrado, UFMG, Minas Gerais, 2014.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. **Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review.** Renewable and Sustainable Energy Reviews, Elsevier, v. 41, p. 550–567, 2015.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ZUPANCIC, S. **Production of fungal xylanases.** Bioresource Technology, v.58, p.137-161, 1996.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S. A.; RINZEMA, A. **Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal. v. 21, p. 265-272, 2004.

HASSUANI, S.J. **Resíduos agrícolas: palha.** In: Curso Internacional: “Energia na Indústria de Açúcar e Álcool”, CTC – Copersucar, Piracicaba/SP, 2005.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. **Biotechnological advantages of laboratory-scale solidstate fermentation with fungi.** Applied Microbiology Biotechnology. v. 64, p. 175-186, 2004.

IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Instituto Adolfo Lutz, p.1020, São Paulo, 2008.

JEFFRIES, T.W. **Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes.** Biodegradation, v.1, p.163-176, 1990.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** Process Biochemistry, v.40, p.3519- 3525, 2005.

KABEL, M. A.; VAR DER MAAREL, M. J. E. C.; KLIP, G.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H.A.B. **Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials.** Biotechnol Bioeng. V.93, p. 56-63, 2005.

KLOCK, U.; MUÑIS, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; DE ANDRADE, A. S. **Química da Madeira**. 3ª ed, UFPR, Curitiba/PR, 2005.

KULKARNI, N.; SHENDYE, A.; RAO, M. **Molecular and biotechnological aspects of xylanases**. FEMS Microbiology Reviews, v.23(4), p.411–456, 1999.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. **Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.35(5), p.377–391, 2008.

LEE, J. **Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol**. Journal of Biotechnology. v.56, p. 1-24. 1997.

LI, J.; YUAN, H.; YANG, J. Bacteria and lignin degradation. **Frontiers of Biology in China**, v.4, n.1, p.29-38, 2009.

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. **Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa**. Revista de Ciências Ambientais, v.1, p 5-18, 2007.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D., **Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum***. Food Technology and Biotechnology, v.41, p.105-110, 2003.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. **Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospect**. Prog. Energy Combust. Sci., v.38, p. 449-467, 2012.

LINS, S. A. S. **Produção de celulases e hemicelulases a partir do sorgo sacarino**. Tese de Doutorado. Campina Grande/PB, 2017.

LINS, S. A. D. S.; CONRADO, L. D. S. **Cellulase production under solid state fermentation in cashew apple bagasse by *Thichoderma resei* LCB 48**. Defect and Diffusion Forum, v. 365, p. 323-328, 2015.

LORENCINE, P. **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana para sua utilização como substrato na produção biológica de Hidrogênio**. Dissertação de Mestrado, Ribeirão Preto, 2013.

LYND, L.R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W .H.; PRETORIUS, I. S. **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology**. Microbiol. Mol. Biol. Rev. n.66, v.3, p. 506-77, 2002.

MAGALHÃES, P. C.; SOUZA, T. C.; MAY, A.; LIMA FILHO, O. F.; SANTOS, F. C.; MOREIRA, J. A. A.; LEITE, C. E. P.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; FREITAS, R. S. **Exigências edafoclimáticas e fisiologia da produção**. In: Borém, A.; Pimentel, L. D.; Parrela, R. *Sorgo: do plantio à colheita*. Editora UFV, p. 275, 2014.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do Estado Nutricional das Plantas**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 201, 1989.

MARQUES, N. P.; PEREIRA, J. C.; GOMES, E.; SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁNA, K. J.; BOCCHINIA, D. A. **Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse**. *Industrial Crops & Products*, v. 122, pags 66-75, 2018.

MÉLO, B. C. A.; SILVA, R. A.; KUBO, G. T. M.; CONRADO, L. S.; SCHIMDELL, W. **Avaliação do Resíduo Agroindustrial de Acerola para Produção de Celulases por Fermentação em Estado Sólido**. COBEC 2014, Florianópolis/SC, 2014.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. **New development in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors.** Process Biochemistry, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica.** Documento 236, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

MORALES, M.; QUINTERO, J.; CONEJEROS, R.; AROCA, G. **Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: Environmental impacts and energy balance.** Renew. Sust. Energ. Rev., v.42, p.1349-1361, 2015.

MUSSATTO, I.S. **Influência do Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz na Produção de Xilitol por Candida guilliermondii.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Brasil. 2002.

NETO, J. M. S. **Isolamento de Frações Celulolíticas e Hemicelulolíticas do Bagaço do Sorgo Sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e Síntese de Acetato de Celulose.** Dissertação de Mestrado, Campina Grande/PB, 2018.

NIEVES, R. A.; EHERMAN, C. I.; ADNEY, W. S.; ELANDER, R. T. HIMEEL, M. E. **Technical communication: survey and analysis of commercial cellulase preparations suitable for biomass conversion to ethanol.** World J. Microb. Biot. v.14, p. 301-304, 2009.

OLIVEIRA, I. K. C. P.; HUMBERTO, S.; CONRADO, L. S.; SILVA, F. L. H **Caracterização físico-químico do bagaço do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*) para hidrólise ácida do material lignocelulósico.** VIII COBEQ, Uberlândia/MG, 2009.

PACHECO, T.F.; GONÇALVES, S.B.; MACHADO, M.M.; PARRELLA, R.A.C. **Avaliação do Bagaço e Biomassa de Genótipos de Sorgo Sacarino para a Produção de Etanol Celulósico.** XX CPBEC, Florianópolis/SC, 2014.

PANAGIOTOPOULOS, I.A.; BAKKER, R.R.; VRIJE, T.; KOUKIOS, E.G.; CLAASSEN, P.A.M. **Pretreatment of sweet sorghum bagasse for hydrogen**

production by *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. International Journal of Hydrogen Energy, v.35, p. 7738-7747, 2010.

PANDEY, A. **Concise encyclopedia of bioresource technology**. New York: Food Products Press, 2004.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81-84, 2003.

PAPAGIANNI, M. **Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes**. Biotechnology Advances, v.22, p.189-259, 2004.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. Sao Paulo: McGraw-Hill, v.1, 573p, 1980.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. **Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp.** Biotechnology Letters, v.24, p. 2107- 2111, 2002.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. **Xylanases from fungi: Properties and industrial applications**. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.67, p. 577-591, 2005.

POUTANEN, K.; RATTO, M.; PULS, JURGEN, VIKARI, L. **Evaluation of different microbial xylanolytic systems**. Journal of Biotechnology, n. 6, p. 49-60, 1987.

PRATHYUSHA, N.; KAMESH, R.; RANI, K. Y.; SUMANA, C.; SRIDHAR, S.; PRAKASHAM, R. S.; YASHWANTH, V. V. N.; SHEELU, G.; KUMAR, M. P. **Modelling of pretreatment and saccharification with different feedstocks and kinetic modeling of sorghum saccharification**. Bioresource Technology, v. 221, p. 550-559, 2016.

QUIROZ-CASTANEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. **Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives.** *Biotecnología Aplicada*, Scielo, v.28, n.4, p.205–215, La Habana, 2011.

RABELO S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração.** Campinas: Tese de Doutorado da Faculdade de Engenharia Química, 2010.

RAGAUSKAS, A. J.; BECKHAM, G. T.; BIDDY, M. J.; CHANDRA, R.; CHEN, F.; DAVIS, M. F.; DAVISON, B. H.; DIXON, R. A.; GLINA, P.; KELLER, M.; LANGAN, P.; NESKAR, A. K.; SADDLER, J. N.; TSCHAPLINSKI, T. J.; TUSKAN, G. A.; WYMAN, C. E. **Lignin valorizatin: improving lignina processing in the biorefinery.** *Science*, 344, 1246843, 2014.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. **Biopotentialites of the basidiomacromycetos.** *Advences in Applied Microbiology*, v. 37, p. 223-361, 1992.

RIBAS, P. M. Origem e importância econômica. In: BORÉM, A.; PIMENTEL, L.; PARRELA, R. **Sorgo: do plantio à colheita.** Editora UFV, 275p, 2014.

RODRIGUES, J. A. S. **Sistema de produção do sorgo.** Embrapa Milho e Sorgo. *Sistemas de Produção*. v. 2, 2010.

RODRIGUES, J. A. S. **Cultivo do Sorgo.** Embrapa Milho e Sorgo, *Sistemas de Produção*, v. 2, 4º Ed, Sete Lagoas, 2008.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. **Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, ago. 2011.

SAIDUR, R.; ABDELAZIZ, E. A.; DEMIRBAS, A.; HOSSAIN, M. S.; MEKHILEF, S. A review on biomass as a fuel for boilers. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p. 2262 – 2289, 2011.

SALOMÃO, G. S. B. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato.** Dissertação de Mestrado. São Mateus (ES), 2017.

SALOMÃO, G. S. B.; AGNEZI, J. C.; PAULINO, L. B.; HENCKER, L. B.; LIRA, T. S.; TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. **Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.17, pag. 1-6, 2019.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. **Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstoks.** *Bioresource Technology*, Essex, v. 99, p. 5270-5295, 2008.

SANTOS, F. A.; CARDOSO, A. L. C.; FEITOSA, N. T.; SENA, P. M. V.; SANTOS, S. F. M. **Utilização de resíduos provenientes do milho na produção de celulases pelo fungo FSDE16 em cultivo semissólido.** XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Campinas, 2015.

SANTOS, T. C.; ROCHA, T. J. O.; OLIVEIRA, A. C.; ABREU FILHO, G.; FRANCO, M. **Aspergillus niger como produtor de enzimas celulolíticas a partir do farelo de cacau (*Theobroma Cacao*).** *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 80, n. 1, p. 65-71, 2013.

SANTOS, T. C.; FILHO, J. A.; ROCHA, T. J. H.; FONSECA, S. F.; FRAN, M. **Palma forrageira como matéria prima para a produção de enzimas celulolíticas.** *Revista Verde*, v.7, n.2, p 270-276, 2012.

SILVA, D. F.; HERGESELA, L. M.; CAMPIONIA, T. S.; CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. O. **Evaluation of different biological and chemical treatments in agroindustrial residues for the production of fungal glucanases and xylanases.** *Process Biochemistry*, v. 67, pags 29–37, 2018.

SILVA, M, J, V. **Avaliação do potencial de diferentes cultivares de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) para produção de etanol de 1ª e 2ª geração.** Tese de Doutorado. Campina Grande/PB, 2017.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. **Recent advances in solid-state fermentation.** Biochemical Engineering Journal, Elsevier, [S.l.], v.44, n.1, p. 13–18, 2009.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases.** Enzyme and Microbial Technology, v. 46, p. 541–549, 2010.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; RAJASREE, K. P.; MATEW, A.; GOTTUMUKKALA, L.; PANDEY, A. **Properties of a major beta-glucosidase-BGL1 from *Aspergillus niger* NII-08121 expressed differentially in response to carbon sources.** Process Biochemistry, v.46, n.7, p. 1521-1524, 2011.

SINGHVI, M. S.; CHAUDHARI, S.; GOKHALE, D. V. **Lignocellulose processing: a current challenge.** RSC Adv., v.4, p.8271-8277, 2014.

SOCCOL, C. R. **Physiologie et Métabolisme de Rhizopus en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+)^{Lactique}.** These de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion et Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne/France, p. 218, 1992.

SOUZA, L. O.; BRITO, A. R.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FERRAZ, J. L. A. A.; OLIVEIRA, E. A.; FERNANDES, A. G. A.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. **Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. v. 16, pags 277–284, 2018.

STATSOFT. **Statistica for Windows computer program manual.** Tulsa: StatSoft, 1995.

SUKUMARAN, R. R.; SINGANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. **Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bioethanol production.** Renewable Energy, v.34, n°.2, p. 421-424, Oxford, 2009.

TAHERZADEH-GHAHFAROKHI, M.; PANAHI, R.; MOKHTARANI, B. **Optimizing the combination of conventional carbonaceous additives of culture media to produce lignocellulose-degrading enzymes by *Trichoderma reesei* in solid state fermentation of agricultural residues.** Renewable Energy, v. 131, pags 946-955, 2019.

TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. **Solid-state fermentation of brewer's spent grain for xylanolytic enzymes production by *Penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate.** Bioscience Journal, Uberlândia, v. 31, n. 6, p. 1826-1836, 2015.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. **Chemical principles of textile conservation.** Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heimann, 1998.

VANDAMME, E. J. **Agroindustrial residue utilization for industrial biotechnology products.** In: NIGAM, P. S.; PANDEY, A. Biotechnology for agroindustrial residues utilization: utilization of agro-residues. New York: Springer, p. 462, 2009.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C; CHUA, A. S. M. **Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production.** Biomass and Bioenergy, Elsevier, [S.l.], v.67, p. 319–338, 2014.

YUE, Y.; SINGH, H.; SINGH, B.; MANI, S. **Torrefaction os sorghum biomass to improve fuel properties.** Bioresource Techonology, v. 232, p. 372-379, 2017.

ZAMPIERI, D. **Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum*.** Dissertação de Mestrado, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.

ZAMORA, H. D. **Produção de hemi(celulases) e açúcares redutores por *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de *Alstroemeria sp.*** 2017.

ZÚÑINGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; BERTUCCINETO, V. COURI, S.; CRESTANA, S. **Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido.** *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.46, n.8, p.912-919, ago. 2011.