

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

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS**  
**POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA E FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM**  
**FIBRA DE SISAL (*Agave sisalana*) UTILIZANDO *Trichoderma reesei***

**CLOTILDES ALVINO LEITE GUEDES**

**CAMPINA GRANDE - PB**  
**AGOSTO/2019**

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS  
POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA E FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM  
FIBRA DE SISAL (*Agave sisalana*) UTILIZANDO *Trichoderma reesei***

**CLOTILDES ALVINO LEITE GUEDES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de doutora em Engenharia de Processos.

**Área de concentração:** Desenvolvimento de Processos

**Orientadora:** Prof. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira (UFPG)

**CAMPINA GRANDE - PB**

**AGOSTO/2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

G924p

Guedes, Clotildes Alvino Leite

Produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fermentação sólida e fermentação submersa em fibra de sisal (*Agave sisalana*) utilizando *Trichoderma reesei* / Clotildes Alvino Leite Guedes. – Campina Grande, 2019. 134f.

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

“Orientação: Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira”.

Referências.

1. Enzimas fúngicas. 2. Hidrólise enzimática. 3. Lignocelulose.

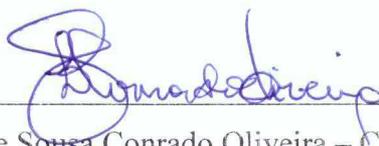
I. Título.

CDU 504:37

**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS E HEMICELULOLÍTICAS  
POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA E SUBMERSA EM FIBRA DE SISAL (*Agave  
sisalana*) UTILIZANDO *Trichoderma reesei***

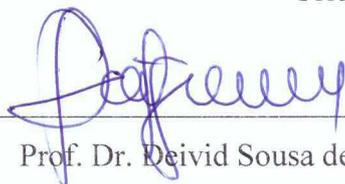
Tese aprovada em 29 / 08 / 2019

**Banca Examinadora**



Prof. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira – CCT/UFCG

Orientadora



Prof. Dr. Deivid Sousa de Figueiroa - ASCES UNITA

Examinador Externo



Prof. Dra. Mércia Melo de Almeida Mota – CTRN/UFCG

Examinador Externo



Prof. Dra. Rebeca de Almeida Silva – UNINASSAU

Examinador Externo



Prof. Dr. Raphael da Silva Eduardo – Escola Integral Cidadã de Ensino Fundamental e

Médio João Lelys

Examinador Externo

**CAMPINA GRANDE - PB**

**AGOSTO/2019**

## DEDICATÓRIA

*Dedico a meu pai Claro Alvino da Silva (in memoriam), exemplo de vida, fé e perseverança.*

## AGRADECIMENTOS

É excelente passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer e querer a tantos homenagear. É muito bom dizer obrigada a tantas pessoas que, neste período de doutorado, se mantiveram simplesmente presentes, ao meu lado. Por isso meus sinceros agradecimentos.

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, minha primeira estrutura, que durante toda a minha vida caminhou ao meu lado, e me proporcionou a oportunidade de chegar até aqui. A Ele dou graças todos os dias pelo dom da vida.

À minha família, especialmente meu pai Claro Alvino da Silva (*in memoriam*), que acreditou em mim, que sempre me apoiou na caminhada do saber, e, sobretudo, pelo seu imenso amor.

Ao meu marido Anderson Ferreira Guedes pela compreensão, apoio, companheirismo, amor e cuidado incondicionais, e pelo incentivo que com certeza não faltou.

A minha orientadora, professora Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pela orientação, conduta, ensinamentos e pela paciência em ensinar cada passo a seguir durante o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos do Laboratório, pelo companheirismo durante todo período experimental, pela troca de experiências e pela contribuição para a realização desse trabalho, por terem ajudado nos momentos mais difíceis e por não deixarem me faltar esperança.

A Eliari pela companhia e ajuda nos experimentos.

Aos funcionários dos Laboratórios de Engenharia Bioquímica e Processos Químicos da UAEQ, seu Jardes e seu Lopes pela grande colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da UFCG pela oportunidade concedida.

A Fátima e Rozy pela dedicação ao trabalho e por estarem sempre disponível a ajudar-me.

À professora Dra. Rossana Maria Feitosa de Figueirêdo e a todos do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da UFCG, por todo apoio e disponibilidade nas análises das isotermas.

A professora Dra. Crislene (Laboratórios de Análises Térmicas – LabTer da UAEMA da UFCG) por toda a ajuda e disponibilidade nas análises termogravimétricas.

Ao proprietário da Fazenda Montevideu no município de Nova Floresta – PB, por ter cedido a fibra de sisal.

Aos componentes da banca examinadora Prof. Dr. Deivid Sousa de Figueiroa, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Mércia Melo de Almeida Mota, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rebeca de Almeida Silva e Prof. Dr. Raphael da Silva Eduardo pela atenção, disponibilidade e principalmente pela contribuição ao trabalho realizado.

À Capes, pelo apoio à pesquisa e incentivo financeiro.

Finalmente, agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a conclusão desse trabalho.

## RESUMO

A ampla utilização das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas em processos biotecnológicos, tem sido limitada pelo elevado custo, logo estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de produzir essas enzimas através do processo de fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FSm) a partir de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, diminuindo assim os custos de produção dessas enzimas, e agregando valor a esses resíduos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, a partir do fungo filamentosso *Trichoderma reesei* por FES e FSm utilizando a fibra de sisal como substrato. Foi realizada a caracterização da fibra de sisal visando conhecer sua composição. Foi realizada a FES e FSm utilizando o microrganismo *Trichoderma reesei* com uma concentração de  $10^7$  esporos/g ou mL, a uma temperatura de 28 °C. O estudo da produção das enzimas celulasas (CMCase, FPase e  $\beta$ -glicosidase) e hemicelulase (Endo- $\beta$ -1,4-xilanase) foi realizado usando planejamento experimental  $2^2$  com 3 pontos centrais, analisando a influência da umidade inicial e teor de farelo de trigo na produção das enzimas na FES, e a relação m/v da concentração do substrato e teor de farelo de trigo na FSm. Pela caracterização foi comprovado que este substrato tem potencial para ser utilizado na produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, principalmente por ter apresentado um percentual de 58,40 % de celulose e 15,21 % de hemicelulose, que são indutores dessas enzimas e pH ácido de 4,35, ideal para a produção de enzimas em FES e FSm a partir de microrganismos. O tratamento estatístico dos planejamentos a um nível de 95 % de significância, mostrou que na FES as variáveis umidade inicial e teor de farelo de trigo influenciaram a atividade enzimática das enzimas CMCase, FPase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase, e na FSm as variáveis teor de farelo de trigo e relação massa/volume (m/v) da concentração do substrato também influenciaram a atividade enzimática das enzimas CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase. Na FES o ensaio realizado com 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo na composição do substrato, foi o que apresentou as maiores atividades enzimáticas para todas as enzimas estudadas. A enzima CMCase apresentou atividade máxima de 0,46 U/mL, a enzima FPase apresentou atividade máxima de 0,07 U/mL, a enzima xilanase apresentou atividade máxima de 78,96 U/mL e a enzima  $\beta$ -glicosidase apresentou atividade máxima de 13,88 U/mL. Na FSm o ensaio realizado com 5 % da concentração do substrato e 50 % de farelo de trigo, foi o que apresentou as maiores atividades enzimáticas para todas as enzimas estudadas. A enzima CMCase apresentou atividade máxima de 0,28 U/mL, a enzima xilanase apresentou atividade máxima de 78,34 U/mL e a enzima  $\beta$ -glicosidase apresentou atividade máxima de 9,47 U/mL. Diante das fermentações estudadas, a FES obteve os melhores resultados quando comparada com a FSm para a produção das enzimas CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase.

**Palavras-chaves:** enzimas fúngicas, hidrólise enzimática, lignocelulose.

## ABSTRACT

The widespread use of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes in some processes has been limited by their high cost, therefore studies have been developed with the objective of producing these enzymes through the solid state (SSF) and submerged (SmF) fermentation process from lignocellulosic agroindustrial residues, thus reducing enzyme production costs and adding value to the residue. Thus, the objective of this work was to evaluate the enzymatic production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* by solid and submerged fermentation using sisal fiber as substrate. The characterization of sisal fiber was performed with the objective of to know its composition. Solid state and submerged fermentation was performed using the *Trichoderma reesei* microorganism at a concentration of  $10^7$  spores/g or mL at a temperature of 28 °C. Cellulase (CMCase, FPase and  $\beta$ -glycosidase) and hemicellulase (Endo- $\beta$ -1,4-xylanase) enzymes were studied using experimental design  $2^2$  with 3 central points and kinetic monitoring of production for 240 h, analyzing the influence of humidity and wheat bran content on enzyme production in solid fermentation, and the ratio m/v and wheat bran content in submerged fermentation. The characterization showed that this substrate has potential to be used in the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes, mainly because it presented a satisfactory percentage of alfacellulose (58.40%) and hemicellulose (15.21%), which are inducers of these enzymes and acid pH (4.35) ideal for the production of enzymes in solid and submerged fermentation with fungi. The statistical treatment of the designs at a significance level of 95% showed that in the SSF the initial humidity and wheat bran contents influenced the enzymatic activity of the enzymes CMCase, FPase, xylanase and  $\beta$ -glycosidase, and in the FS<sub>m</sub> the variables of wheat bran and mass/volume ratio (m/v) of substrate concentration also influenced the enzymatic activity of the enzymes of the enzymes CMCase, xylanase and  $\beta$ -glycosidase. In the SSF, the assay carried out with 60% humidity and 50% wheat bran in the substrate composition showed the highest enzymatic activity for all studied enzymes. CMCase enzyme showed maximum activity of 0.46 U/mL, FPase enzyme showed maximum activity of 0.07 U/mL, xylanase enzyme showed maximum activity of 78.96 U/mL and  $\beta$ -glycosidase enzyme showed maximum activity of 13.88 U/mL. In SmF, the assay with 5% of substrate concentration and 50% of wheat bran presented the highest enzymatic activity for all enzymes studied. The CMCase enzyme showed a maximum activity of 0.28 U/mL, the xylanase enzyme presented a maximum activity of 78.34 U/mL and the enzyme  $\beta$ -glycosidase showed a maximum activity of 9.47 U/mL. Given the fermentations used, SSF obtained the best results when compared to SmF for the production of CMCase, xylanase and  $\beta$ -glycosidase enzymes.

**Keywords:** fungal enzymes; enzymatic hydrolysis; lignocellulose.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura lignocelulósica evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose.....	14
<b>Figura 2</b> - Planta de sisal ( <i>Agave sisalana</i> ).....	15
<b>Figura 3</b> - Proporção entre resíduos da agroindústria utilizados como substratos em FES para produção de enzimas de acordo com o banco de dados de Santos <i>et al.</i> (2018).....	17
<b>Figura 4</b> - Distribuição das publicações referenciando celulasas e diferentes gêneros fúngicos.....	21
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática da ação do complexo celulolítico microbiano.....	22
<b>Figura 6</b> - Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos.....	25
<b>Figura 7</b> - Evolução de pedidos de patente relacionados a tecnologias da FES, desde 1963.....	26
<b>Figura 8</b> - Distribuição de pedidos de patente relacionados a FES entre os países que mais contribuem para esse desenvolvimento tecnológico.....	27
<b>Figura 9</b> - Fibra de sisal ( <i>Agave sisalana</i> ).....	32
<b>Figura 10</b> - Fibra de sisal em pó.....	33
<b>Figura 11</b> - Fluxograma apresentando as etapas de preparação da fibra de sisal.....	33
<b>Figura 12</b> - Propagação do <i>Trichoderma reesei</i> em placa de Petri (a) e em sabugo de milho (b).....	43
<b>Figura 13</b> - Fluxograma apresentando as etapas do processo de FES.....	45
<b>Figura 14</b> - Fermentação em estado sólido em fibra de sisal utilizando o <i>Trichoderma reesei</i> .....	47
<b>Figura 15</b> - Extrato enzimático da fermentação em estado sólido em fibra de sisal utilizando o <i>Trichoderma reesei</i> .....	47
<b>Figura 16</b> - Fluxograma apresentando as etapas do processo de FSm.....	49
<b>Figura 17</b> - Fermentação submersa em fibra de sisal utilizando o <i>Trichoderma reesei</i> .....	50
<b>Figura 18</b> - Perfil granulométrico da fibra de sisal moída.....	56

<b>Figura 19</b> - Isotermas de dessorção de umidade a 28 °C dos substratos usados durante a fermentação: Sisal + 0% FT (T1), Sisal + 25% FT (T2) e Sisal + 50% FT (T3).....	59
<b>Figura 20</b> - TG e DTG da fibra de sisal <i>in natura</i> .....	61
<b>Figura 21</b> - Cinética enzimática da CMCase por fermentação em estado sólido da fibra de sisal.....	63
<b>Figura 22</b> – Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação em estado sólido com <i>Trichoderma reesei</i> em fibra de sisal com de 60% umidade e 50% de farelo de trigo (Ensaio 03).....	64
<b>Figura 23</b> - Influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima CMCase por fermentação em estado sólido.....	66
<b>Figura 24</b> - Cinética enzimática da FPase por fermentação em estado sólido da fibra de sisal.....	67
<b>Figura 25</b> – Perfil cinético do processo de produção de FPase por fermentação em estado sólido com <i>Trichoderma reesei</i> em fibra de sisal com de 60% umidade e 50% de farelo de trigo (Ensaio 03).....	68
<b>Figura 26</b> - Influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo da produção da enzima FPase por fermentação em estado sólido.....	70
<b>Figura 27</b> - Cinética enzimática da xilanase por fermentação em estado sólido da fibra de sisal.....	72
<b>Figura 28</b> – Perfil cinético do processo de produção de xilanase por fermentação em estado sólido com <i>Trichoderma reesei</i> em fibra de sisal com de 60% umidade e 50% de farelo de trigo (Ensaio 03).....	73
<b>Figura 29</b> - Influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima xilanase por fermentação em estado sólido.....	75
<b>Figura 30</b> - Superfície de resposta para a produção de xilanase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo.....	77
<b>Figura 31</b> - Cinética enzimática da β-glicosidase por fermentação em estado sólido da fibra de sisal.....	78
<b>Figura 32</b> – Perfil cinético do processo de produção de β-glicosidase por fermentação em estado sólido com <i>Trichoderma reesei</i> em fibra de sisal com de 60% umidade e 50% de farelo de trigo (Ensaio 03).....	79
<b>Figura 33</b> - Influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo da produção	81

da enzima $\beta$ -glicosidase por fermentação em estado sólido.....	
<b>Figura 34</b> - Superfície de resposta para a produção de $\beta$ -glicosidase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo.....	83
<b>Figura 35</b> - Cinética enzimática da CMCase por fermentação submersa da fibra de sisal.....	84
<b>Figura 36</b> - Influência da % de substrato e do teor de farelo de trigo na produção da enzima CMCase por fermentação submersa.....	86
<b>Figura 37</b> - Cinética enzimática da xilanase por fermentação submersa da fibra de sisal.....	88
<b>Figura 38</b> - Influência da % de substrato e do teor de farelo de trigo na produção da enzima xilanase por fermentação submersa.....	90
<b>Figura 39</b> - Cinética enzimática da $\beta$ -glicosidase por fermentação submersa da fibra de sisal.....	92
<b>Figura 40</b> - Influência da % de substrato e do teor de farelo de trigo na produção da enzima $\beta$ -glicosidase por fermentação submersa.....	94
<b>Figura 41</b> - Comparação da produção da enzima CMCase entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa.....	96
<b>Figura 42</b> - Comparação da produção da enzima xilanase entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa.....	97
<b>Figura 43</b> - Comparação da produção da enzima $\beta$ -glicosidase entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa.....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição lignocelulósica da fibra de sisal ( <i>Agave sisalana</i> ).....	16
<b>Tabela 2</b> - Composição lignocelulósica do farelo de trigo.....	18
<b>Tabela 3</b> - Níveis do planejamento experimental da produção das enzimas.....	44
<b>Tabela 4</b> - Matriz de planejamento experimental fatorial $2^2$ com 3 repetições no ponto central da produção de enzimas para fermentação em estado sólido.....	45
<b>Tabela 5</b> - Níveis do planejamento experimental da produção das enzimas.....	48
<b>Tabela 6</b> - Matriz de planejamento experimental fatorial $2^2$ com 3 repetições no ponto central da produção de enzimas para fermentação submersa.....	48
<b>Tabela 7</b> - Composição da solução salina usada para indução da atividade enzimática na fermentação submersa por <i>Trichoderma reesei</i> .....	50
<b>Tabela 8</b> - Composição da fibra de sisal.....	54
<b>Tabela 9</b> - Composição de AR e proteína da fibra de sisal e do farelo de trigo.....	57
<b>Tabela 10</b> - Valores experimentais da umidade de equilíbrio ( $U_{eq}$ ) da fibra de sisal e fibra de sisal + farelo de trigo em função da atividade de água ( $a_w$ ).....	58
<b>Tabela 11</b> - Parâmetros de ajuste das isotermas de dessorção dos substratos para o modelo de GAB.....	60
<b>Tabela 12</b> - Dados obtidos a partir das curvas de TG e DTG da fibra de sisal.....	62
<b>Tabela 13</b> - Ensaios do planejamento experimental para a produção de CMC <sub>Case</sub> em fibra de sisal por fermentação em estado sólido.....	65
<b>Tabela 14</b> - Análise de variância para a atividade de CMC <sub>Case</sub> obtida por FES.....	67
<b>Tabela 15</b> - Ensaios do planejamento experimental para a produção de FPase em fibra de sisal por fermentação em estado sólido.....	69
<b>Tabela 16</b> - Análise de variância para a atividade de FPase obtida por FES.....	71
<b>Tabela 17</b> - Ensaios do planejamento experimental para a produção de xilanase em fibra de sisal por fermentação em estado sólido.....	75
<b>Tabela 18</b> - Análise de variância para a atividade de xilanase obtida por FES.....	76
<b>Tabela 19</b> - Ensaios do planejamento experimental para a produção de $\beta$ -glicosidase em fibra de sisal por fermentação em estado sólido.....	80
<b>Tabela 20</b> - Análise de variância para a atividade de $\beta$ -glicosidase obtida por FES..	82
<b>Tabela 21</b> - Ensaios do planejamento experimental para a produção de CMC <sub>Case</sub> .	85

em fibra de sisal por fermentação em submersa.....	
<b>Tabela 22</b> - Análise de variância para a atividade de CMCase obtida por FSm.....	87
<b>Tabela 23</b> - Ensaio do planejamento experimental para a produção de xilanase em fibra de sisal por fermentação submersa.....	89
<b>Tabela 24</b> - Análise de variância para a atividade de xilanase obtida por FSm.....	91
<b>Tabela 25</b> - Ensaio do planejamento experimental para a produção de $\beta$ -glicosidase em fibra de sisal por fermentação submersa.....	93
<b>Tabela 26</b> - Análise de variância para a atividade de $\beta$ -glicosidase obtida por FSm	95
<b>Tabela 27</b> - Ensaio da FES e FSm que obtiveram a máxima atividade enzimática.	98

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABS	Absorbância
AR	Açúcares Redutores
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Carboximetilcelulases
CPATSA	Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semiárido
CTAA	Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos
DNS	Dinitrosalicílico
F <sub>c</sub>	Fator de conversão
FES	Fermentação em Estado sólido
F <sub>Sm</sub>	Fermentação Submersa
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica
pH	Potencial Hidrogeniônico
UAEQ	Unidade Acadêmica de Engenharia Química
U <sub>B.U.</sub>	Umidade em Base Úmida
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
1.1 Objetivo geral.....	12
1.2 Objetivos específicos.....	12
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
2.1 Biomassa lignocelulósica.....	13
2.2 Sisal ( <i>Agave sisalana</i> ).....	15
2.2.1 Farelo de trigo.....	16
2.3 Produção de enzimas.....	19
2.3.1 Enzimas celulolíticas.....	19
2.3.2 Enzimas hemicelulolíticas.....	22
2.4 Fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FSm).....	23
2.4.1 Microrganismos utilizados na produção de enzimas.....	28
2.8 Estado da arte.....	28
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
3.1 Local de realização do trabalho.....	32
3.2 Matéria-prima.....	32
3.3 Caracterização da fibra de sisal.....	34
3.3.1 Granulometria.....	34
3.3.2 Umidade do substrato.....	35
3.3.3 Cinzas.....	35
3.3.4 pH.....	35
3.3.5 Açúcares redutores.....	35
3.3.6 Estudo térmico (TG/DTG).....	35
3.3.7 Teor de extrativos.....	36
3.3.8 Lignina insolúvel.....	36
3.3.9 Holocelulose ( $\alpha$ -Celulose + Hemicelulose).....	37
3.3.10 $\alpha$ -Celulose e hemicelulose.....	38
3.3.11 Proteína.....	39
3.4 Isotermas de dessorção de umidade.....	40
3.5 Microrganismo.....	41
3.5.1 Propagação do <i>Trichoderma reesei</i> .....	41

3.5.2 Preparo do Inóculo do <i>Trichoderma reesei</i> .....	43
3.6 Produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.....	44
3.6.1 Planejamento experimental – fermentação em estado sólido.....	44
3.6.2 Experimentos de fermentação em estado sólido.....	45
3.6.3 Extração das enzimas no processo de FES.....	47
3.6.4 Planejamento experimental – fermentação submersa.....	48
3.6.5 Experimentos de fermentação submersa.....	49
3.7 Determinação das atividades enzimáticas.....	50
3.7.1 Endoglicanases (CMCase).....	50
3.7.2 Celulase total (FPase).....	51
3.7.3 $\beta$ -glicosidase.....	52
3.7.4 Xilanase.....	53
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
4.1 Caracterização da fibra de sisal.....	54
4.2 Isotermas de dessorção de umidade.....	57
4.2.1 Estudo térmico (TG/DTG).....	61
4.3 Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES).....	62
4.3.1 Perfil cinético da produção de CMCase por FES.....	62
4.3.1.1 Análise da produção de CMCase utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	65
4.3.2 Perfil cinético da produção de FPase por FES.....	67
4.3.2.1 Análise da produção de FPase utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	69
4.3.3 Perfil cinético da produção de xilanase por FES.....	71
4.3.3.1 Análise da produção de xilanase utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	74
4.3.4 Perfil cinético da produção de $\beta$ -glicosidase por FES.....	78
4.3.4.1 Análise da produção de $\beta$ -glicosidase utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	80
4.4 Produção de enzimas por fermentação submersa.....	83
4.4.1 Perfil cinético da produção de CMCase por fermentação submersa.....	83
4.4.1.1 Análise da produção de CMCase utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	85

de resposta.....	87
4.4.2 Perfil cinético da produção de xilanase por fermentação submersa.....	87
4.4.2.1 Análise da produção de xilanase utilizando a metodologia de superfície	
de resposta.....	89
4.4.3 – Perfil cinético da produção de $\beta$ -glicosidase por fermentação submersa..	91
4.4.3.1 Análise da produção de $\beta$ -glicosidase utilizando a metodologia de	
superfície de resposta.....	92
4.5 Comparação entre os processos de fermentação em estado sólido e submerso..	95
4.5.1 Produção de CMCase.....	95
4.5.2 Produção de xilanase.....	96
4.5.3 Produção de $\beta$ -glicosidase.....	97
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>99</b>
<b>6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO A – Resultados obtidos no processo de produção de enzimas com</b>	
<b>fibra de sisal por fermentação em estado sólido.....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO B – Resultados obtidos no processo de produção de enzimas com</b>	
<b>fibra de sisal por fermentação submersa.....</b>	<b>120</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é o recurso de carbono renovável mais generoso do mundo, com taxa de produção de 200 bilhões de toneladas de biomassa por ano. Principalmente composta de celulose (40 – 50 %), hemicelulose (20 – 30 %) e lignina (10 – 25 %), essa biomassa é decomposta por enzimas celulases e hemicelulases, as quais apresentam grande interesse industrial (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

Devido à composição rica em açúcares fermentáveis e nutrientes dos resíduos agroindustriais, os microrganismos têm a capacidade de utilizar esses substratos e, subsequentemente, os converterem em vários produtos de importância industrial, como enzimas, por exemplo (PANDA *et al.*, 2016).

A produção de etanol de segunda geração, em escala comercial, é atualmente limitada pelo alto custo das celulases, enzimas usadas na hidrólise da celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis (SIQUEIRA *et al.*, 2010). Uma das formas de diminuir o custo de produção das celulases é produzir essas enzimas por meio de processos fermentativos, como exemplo a fermentação em estado sólido e a fermentação submersa de resíduos agroindustriais ricos em componentes lignocelulósicos.

Além de reduzir os custos de produção e manter o rendimento proporcional ao uso de substrato sintéticos, o reaproveitamento de resíduos agroindustriais em bioprocessos contribui para a diminuição do acúmulo desses materiais no meio ambiente, que é considerado um problema ambiental atual (SANTOS, *et al.*, 2018).

A fibra de sisal possui teor de celulose de 52,8 % e hemicelulose de 19,3 % (LIMA *et al.*, 2013) e é uma matéria-prima de baixo custo. Uma das formas de agregar valor a este material é utilizá-la na obtenção de enzimas, tais como CMCase, FPase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase, por meio da fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando microrganismos como agente metabolizador de açúcares. A fibra de sisal é um material alternativo para a produção de celulases devido à sua alta disponibilidade, aliada ao fato do Brasil ser o maior produtor mundial de sisal.

Embora a produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais esteja bastante consolidada, após revisão da literatura constatou-se que não existem

informações referentes ao uso da fibra de sisal na produção de celulases e hemiceluloses, o que justifica uma investigação detalhada da utilização deste resíduo na produção destas enzimas.

## 1.1 Objetivo geral

Produzir as enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por meio dos processos de fermentação em estado sólido e fermentação submersa da fibra de sisal, utilizando o microrganismo *Trichoderma reesei*.

## 1.2 Objetivos específicos

– Caracterizar a fibra de sisal através da determinação da granulometria, umidade, cinzas, pH, açúcares redutores, extrativos, lignina insolúvel, holocelulose, alfacelulose, hemicelulose e proteína e o farelo de trigo através da determinação do teor de açúcares redutores e proteína;

– Obter as isotermas de dessorção de umidade da fibra de sisal e das misturas, fibra de sisal/farelo de trigo, na temperatura de 28 °C;

– Verificar o efeito da umidade inicial e da relação fibra de sisal/farelo de trigo, na fermentação em estado sólido acompanhando a cinética de produção das enzimas celulolíticas (CMCase, FPase e  $\beta$ -glicosidase) e hemicelulolítica (Endo- $\beta$ -1,4-xilanase);

– Verificar o efeito da relação m/v da composição do substrato e da relação fibra de sisal/farelo de trigo, na fermentação submersa, acompanhando a cinética de produção das enzimas celulolíticas (CMCase e  $\beta$ -glicosidase) e hemicelulolítica (Endo- $\beta$ -1,4-xilanase).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

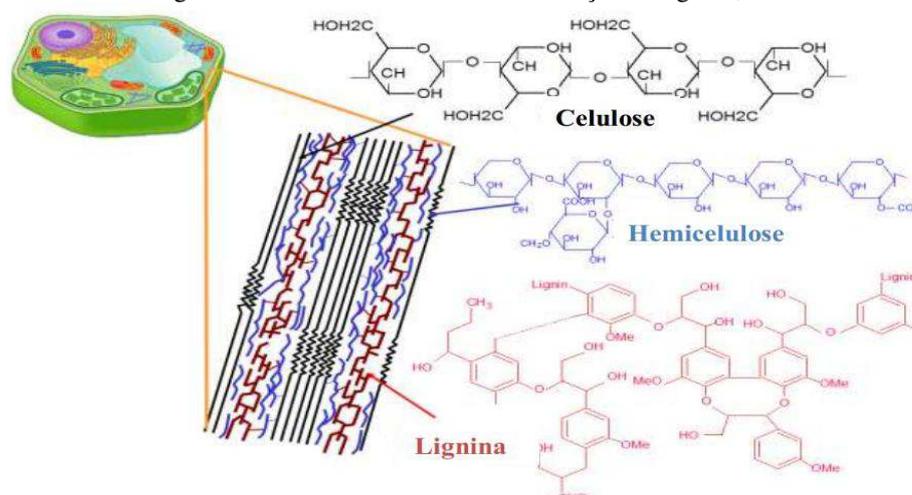
### 2.1 Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos representam cerca de metade da biomassa no planeta Terra, ou seja, 50 % da matéria orgânica em nossa biosfera é constituída por biomassa lignocelulósica. Tais materiais tem o potencial de aplicação para a produção de energia (térmica e elétrica) e de biocombustíveis, já que são renováveis e de baixo custo (SANTOS *et al.*, 2012).

A lignocelulose é um complexo rígido composto de diferentes moléculas, que constitui quase a totalidade da parcela estrutural das plantas, ou seja, a maior porcentagem da biomassa dos vegetais. É um substrato de custo baixo que é considerado resíduo industrial e agrícola, e sua composição varia e é constituído principalmente por celulose (35-50 %) seguida pela hemicelulose (20-30 %) e lignina (10-25 %) e podem ser transformados em energia e produtos químicos (KUMAR *et al.*, 2009). A proporção de cada componente depende da fonte a partir da qual o material foi extraído, além de ter influência das condições edafoclimáticas e tipo de solo (DING; HIMMEL, 2006).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos de estruturas duras e fibrosas, compostas principalmente dos polissacarídeos celulose e hemicelulose (aproximadamente 70 % da massa seca), intercalados por lignina, uma macromolécula composta de álcoois aromáticos. A lignina encontra-se fortemente unida aos polissacarídeos por ligações covalentes e hidrogênicas (NEUREITER *et al.*, 2002). A Figura 1 exibe a estrutura lignocelulósica.

**Figura 1** – Estrutura lignocelulósica evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose



Fonte: Zampieri (2011).

A celulose responde isoladamente por aproximadamente 40 % de toda reserva de carbono disponível na biosfera. Está presente em todas as plantas e seu conteúdo pode variar de 20 a 99 % de acordo com as características de cada espécie (FENGEL; WEGENER, 1989).

Os materiais lignocelulósicos são considerados os recursos renováveis mais abundantes na natureza (HAN *et al.*, 2004). A celulose tem sido considerada como um dos mais importantes objetos de estudo na história da ciência dos polímeros (ZUGENMAIER, 2008).

A hemicelulose é ligada fortemente à celulose por grupos de pontes de hidrogênio (RAVEN, 2001) e também por meio de ligações covalentes e não covalentes com lignina, celulose e outros polímeros essenciais à parede da célula (POLIZEI *et al.*, 2005). A xilana é um dos maiores constituintes das hemiceluloses nos materiais lignocelulósicos (EBRINGEROVA; HEINZE, 2000). No sisal, as hemiceluloses são predominantemente constituídas por xilanas, elas constituem cerca de 68 % do total das hemiceluloses do sisal (MEGIATTO JÚNIOR *et al.*, 2007).

A presença da lignina na parede celular dos vegetais denota a importância de uma matriz rígida em torno das fibras de celulose/hemicelulose, assumindo, principalmente, funções de coesão e barreira frente à umidade (BURTON; GIDLEY; FINCHER, 2010). À medida que ocorre o envelhecimento da planta, a quantidade de lignina tende a aumentar (RAVEN, 2001).

## 2.2 Sisal (*Agave sisalana*)

O sisal (*Agave sisalana*) (Figura 2) é originário de Yucatan (México) e seu nome popular provém de uma erva nativa denominada zizal-xiu (MEDINA, 1959). Seu cultivo ocupa uma extensa área de solos pobres em nutrientes na região semiárida dos Estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte, em áreas onde, não raro, é a única alternativa de cultivo com resultados econômicos satisfatórios (SANTOS *et al.*, 2010).

**Figura 2** – Planta de sisal (*Agave sisalana*).



Silva e Coutinho (2006) afirmaram que apenas 3 a 5 % da massa das folhas dessa fibrosa são aproveitados, e que os resíduos do desfibramento são compostos, em média, por 15 % de mucilagem ou polpa (formado pela cutícula e por tecido palissádico e parenquimatoso), 1 % de bucha (fibras curtas) e 81 % de suco ou seiva clorofilada.

Do ponto de vista anatômico, as fibras extraídas do sisal se inserem no grupo de fibras denominadas estruturais, cuja função é dar sustentação e rigidez às folhas (LI; MAI; YE, 2000). São rígidas, apresentam superior resistência em comparação às demais fibras naturais, além de boa durabilidade (SAPUAN *et al.*, 2006).

Lima *et al.* (2013) caracterizaram a composição lignocelulósica da fibra do sisal, proveniente do município de Nova Floresta/PB. Os resultados podem ser observados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Composição lignocelulósica da fibra de sisal (*Agave sisalana*)

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Valor médio (%)</b>
Umidade	5,70
Cinzas	2,10
Celulose alfa	48,80
Celulose beta	4,00
Celulose total	52,80
Hemicelulose	19,30
Holocelulose	72,1
Lignina	13,50
Extrativos	5,80

Fonte: Lima *et al.*, (2013).

A fibra de sisal beneficiada é destinada principalmente à indústria de cordoaria (confeção de cordéis, cordas, tapetes, capachos e outros), mas também pode ser utilizada na fabricação de pasta celulósica, empregada na confecção do papel kraft e de outros tipos de papéis finos (AGOPYAN *et al.*, 2005). É usada como fibra de reforço em compósitos com plásticos para aplicação automobilística, adição de reforço no cimento e concreto para aumento da resistência mecânica e redução do peso (SILVA *et al.*, 2007). Pode ser usada também na fabricação de fios agrícolas.

### 2.2.1 Farelo de trigo

Os resíduos agroindústrias que podem ser utilizados como substratos para a FES incluem bagaço de cana, farelos de cereais como farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de aveia e farelo de soja, polpa e cascas de café, cascas de frutas e polpas, espigas de milho, palhas e cascas de diferentes origens. Esses materiais são compostos basicamente de celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e outras fibras (FARINAS, 2015).

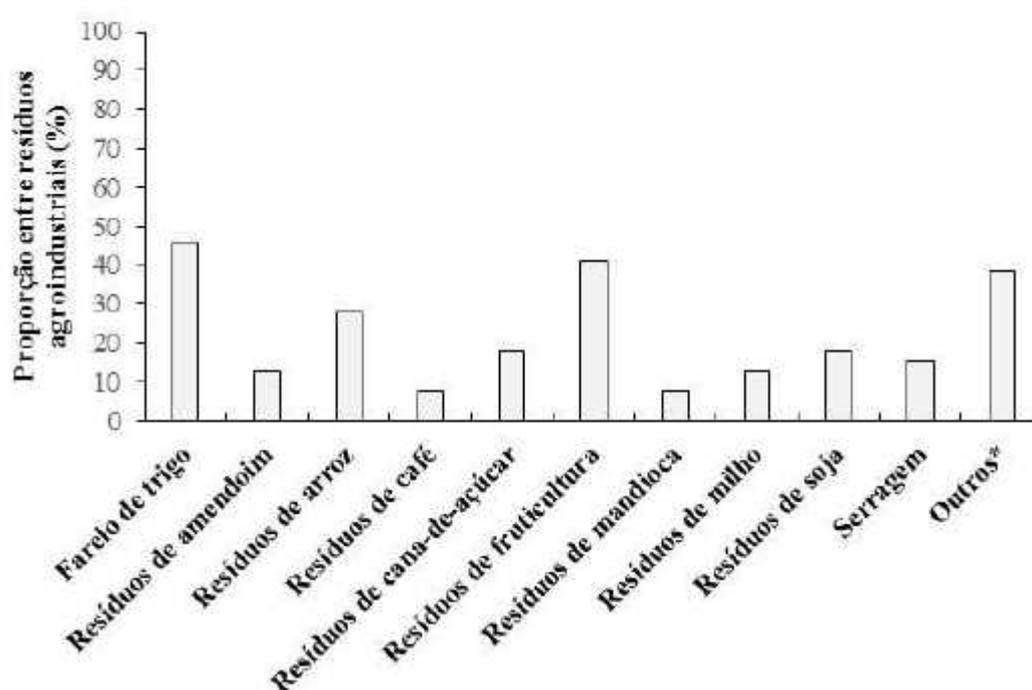
Normalmente, esses resíduos agrícolas não são apenas um sólido suporte para a absorção de nutrientes e crescimento de biomassa, mas também são uma fonte de carbono e nutrientes. Às vezes, a suplementação é necessária para fornecer todos os nutrientes necessários para o crescimento ideal (FARINAS, 2015).

Santos *et al.* (2018) ao realizar uma revisão sistemática sobre FES em resíduos da agroindústria a fim de investigar os resíduos oriundos da agroindústria usados no processo de FES, a partir do levantamento bibliográfico, foram selecionadas 37

publicações sobre produção de enzimas microbianas em FES utilizando resíduos da agroindústria como substratos.

Diferentes resíduos agroindustriais foram empregados em FES nos estudos selecionados, sendo o farelo de trigo amplamente utilizado nas pesquisas. Das 37 publicações selecionadas, 46 % estudaram farelo de trigo, conforme ilustrado na Figura 3. Os trabalhos selecionados compreenderam publicações entre os anos de 2006 a 2017.

**Figura 3** - Proporção entre resíduos da agroindústria utilizados como substratos em FES para produção de enzimas de acordo com o banco de dados de Santos *et al.* (2018).



\*Outros = polpa de beterraba, batata, casca de batata, casca de sorgo, resíduos de chá, resíduos do óleo de dendê, sementes de abóbora, farelo de grama preta, casca de palha, casca de cenoura, casca de grama verde, resíduos de berinjela, bolo de óleo de coco, folhas vegetais, torta de girassol.

Como pode ser observado na Figura 2, o farelo de trigo, usado como substrato único, foi o resíduo agroindustrial mais usado no processo de FES, segundo estudo realizado por Santos *et al.* (2018). Resíduos da fruticultura também se destacaram como substratos alternativos em FES (41 %), em especial cascas, polpas, bagaço e sementes de frutas.

O Brasil foi o principal país gerador de publicações, na última década, sobre produção de enzimas a partir de FES em resíduos agroindustriais, segundo Santos *et al.* (2018) do total de publicações selecionadas, o Brasil deteve, aproximadamente, 49 % dos estudos sobre produção de enzimas microbianas utilizando resíduos da agroindústria sob FES. Por ser um país essencialmente agrícola, o Brasil se caracteriza como um dos maiores produtores mundiais de biomassa e consequentemente, um grande volume de resíduos orgânicos é gerado pela agroindústria (SOUSA *et al.*, 2011).

Tartarine (2018) caracterizou a composição lignocelulósica do farelo de trigo e os resultados podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Composição lignocelulósica do farelo de trigo.

<b>Parâmetros analisados</b>	<b>Valor médio (%)</b>
Lignina total	11,14
Acetil	0,51
Celulose	38,29
Hemicelulose	28,04
Cinzas	4,20
Extrativos	34,56

\*Soma das porcentagens de lignina solúvel e lignina insolúvel.

Fonte: Tartarine (2018).

O farelo de trigo possui grande parte da sua composição definida como extrativos, que podem incluir proteínas, lipídeos, compostos aromáticos, entre outros e apresenta cinzas em sua composição, que podem conter íons atuantes como cofatores enzimáticos, como Ca, K e Mg (KLOCK; ANDRADE, 2005).

BANSAL *et al.* (2012) observaram que farelo de trigo foi o substrato que melhor proporcionou a produção de celulasas (310,6; 16,8 e 33,0 U/g para CMCase, FPase e  $\beta$ -glucosidase, respectivamente) quando comparado aos resíduos de milho, frutas, arroz e cana-de-açúcar.

Gomes *et al.* (2016) ao estudarem a produção de xilanase por fermentação em estado sólido (FES) por uma linhagem termotolerante de *Aspergillus fumigatus* em combinações de diferentes subprodutos agrícolas de baixo custo: bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1), bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho (1:1) e somente bagaço de cana-de-açúcar. Níveis máximos de xilanase (574 U/g de substrato

seco) foram obtidos, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1) no meio de cultura. Quando o farelo de trigo foi substituído por palha de milho um menor valor de atividade enzimática foi obtido (180 U/g), o bagaço de cana como substrato único obteve apenas 72 U/g de xilanase, confirmando a maior eficiência de fermentação com farelo de trigo para produção de enzimas. Este resultado indica que o uso de palha de milho na FES não é vantajoso para produção de xilanase. O uso dos dois resíduos é uma combinação positiva para degradação da biomassa. Esse aumento da atividade enzimática ao utilizar o farelo de trigo é devido à composição rica em açúcares fermentáveis e nutrientes deste resíduo agroindustrial (PANDA *et al.*, 2016).

Rosa *et al.* (2017) ao avaliarem a influência de diferentes fontes de carbono como farinha de chia, farinha de linhaça, farelo de trigo, farelo de aveia, farinha de trigo integral, farinha de aveia, fubá, bagaço de cana-de-açúcar, farinha de trigo, farinha de rosca, palha da bananeira, fibra do coco e extrato de soja, na produção de celulases por fermentação submersa, o farelo de trigo foi a melhor fonte de carbono, obtendo uma atividade de 5,52 U totais e 66,65 U totais, para a atividade da FPase e CMCase respectivamente. Sendo assim o farelo de trigo é uma fonte ideal de carboidratos e nitrogênio na utilização de FES para produção de enzimas.

## **2.3 Produção de enzimas**

### **2.3.1 Enzimas celulolíticas**

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores dentro das tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e sendo altamente específicas minimizam os efeitos indesejáveis (BON, 2002).

Celulase, o nome genérico correspondente às enzimas presentes na biodegradação da celulose, polímero vegetal abundante na natureza. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à

possibilidade de sua conversão em etanol (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996). As celulasas e xilanases são necessárias em grandes quantidades, para a hidrólise de materiais lignocelulósicos (OGEDA; PETRI, 2010).

As celulasas são enzimas capazes de hidrolisar a ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica da cadeia da celulose, que é o principal componente da parede celular da biomassa vegetal. Os principais obstáculos à exploração em potencial da celulase são rendimento, estabilidade, especificidade e custos de produção (MD *et al.*, 2008).

As endoglucanases são as enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise da molécula de celulose. Essas enzimas atuam aleatoriamente na região amorfa da cadeia de celulose, clivando ligações  $\beta$ -1,4 na região central da molécula e liberando como produto oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES; EGYHAZI; RECZEY, 2004).

A carboximetilcelulose é utilizada como substrato preferencial para a atividade dessas enzimas. As exoglucanases ou celobiohidrolases atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando unidades de celobiose (CAO; TAN, 2002).

As celobiohidrolases podem ser de dois tipos: a tipo I, que hidrolisa terminais redutores, e as do tipo II, que hidrolisa terminais não redutores. As celobiohidrolases sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose. Por isso é de grande importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico - as  $\beta$  - glucosidases (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

Carboidratos ou seus derivados são indutores de grande parte das enzimas celulolíticas. Por isso, a fonte de carbono utilizada é de grande importância na produção de enzimas. Altos rendimentos de celulasas têm sido obtidos pela utilização de fontes de carbono contendo celulose (JUHÁSZ *et al.*, 2005).

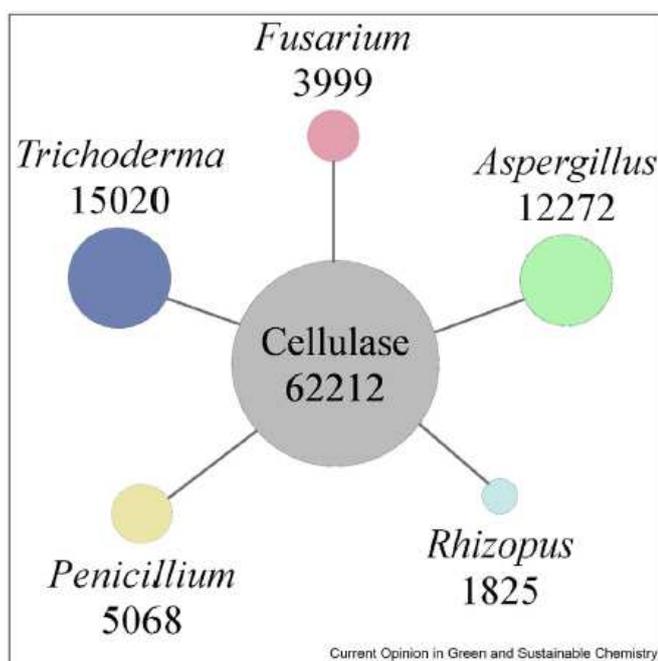
As celulasas são produzidas por uma variedade de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos. Contudo, poucos fungos e bactérias são capazes de produzir celulasas em quantidades suficientes para degradar a celulose cristalina (BHAT; BHAT, 1997).

Segundo Lynd *et al.* (2001) os fungos ocupam papel fundamental na degradação de biopolímeros de celulose e hemiceluloses sendo por isso, essenciais para a produção de complexos enzimáticos.

Para Menezes (1997) os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas. As celulases fúngicas tem sido estudadas devido ao seu potencial biotecnológico (NG, 2004). Entre os produtores de celulases estão os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma* (LYND *et al.*, 2001).

As celulases podem ser produzidas por um grande número de organismos, incluindo bactérias, actinobactérias, fungos filamentosos, bem como plantas e animais. Entre estes organismos, destacam-se os fungos filamentosos, nos quais os gêneros *Penicillium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* são conhecidos como modelos na produção em bancada de celulases (SRIVASTAVA *et al.*, 2017). Em conjunto, espécies destes três gêneros correspondem a 52 % do total das publicações científicas em periódicos, de 62.212 resultados (PASSOS *et al.*, 2018). A Figura 4 mostra a distribuição dos artigos na literatura para alguns dos gêneros fúngicos mais comuns.

**Figura 4** - Distribuição das publicações referenciando celulases e diferentes gêneros fúngicos.



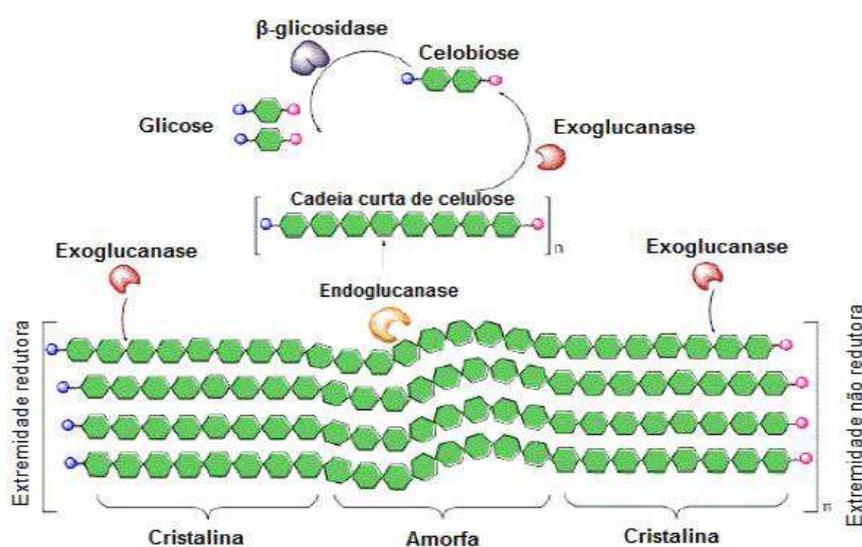
Fonte: Passos *et al.* (2018).

Como pode ser observado na Figura 4 o gênero *Trichoderma* é o mais referenciado nas publicações, seguido do gênero *Aspergillus*.

Do total de trabalhos avaliados por Santos *et al.* (2018) (37 publicações) celulase foi alvo de investigação de 41 % dos estudos. Sendo a enzima mais produzida em FES utilizando resíduos da agroindústria como substrato, de acordo com o banco de dados dos autores.

As  $\beta$ -glucosidases são enzimas que catalisam a hidrólise da celobiose a glicose, reduzindo assim a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença deste dímero (PETROVA; BAKALOVA; KOLEV, 2002). As  $\beta$ -glucosidases hidrolisam as celobioses (e, menos frequentemente, celodextrinas) em glicose (Figura 5) (HAMID *et al.*, 2015).

**Figura 5** - Representação esquemática da ação do complexo celulolítico microbiano.



Fonte: Tartarine (2018).

### 2.3.2 Enzimas hemicelulolíticas

As hemicelulases são um grupo diverso de enzimas que hidrolisam hemiceluloses - um dos mais abundantes grupos de polissacarídeos na natureza. Estas enzimas têm muitas aplicações em processos biotecnológicos e suas funções e estruturas tem sido assunto de intensa pesquisa (SHALLOM; SHOHAM, 2003). A xilanase é sem

dúvida a hemicelulase mais estudada, essa enzima participa da hidrólise da xilana que é o principal tipo de hemicelulose (BAJPAI, 2014).

O mercado de xilanases tem apresentado grande ascensão desde o início da década de 1990. Xilanases comerciais são produzidas industrialmente, por exemplo, no Japão, Finlândia, Alemanha, República da Irlanda, Dinamarca, Canadá e nos EUA. Dentre os principais microrganismos utilizados para obtenção destas enzimas industrialmente está o gênero *Trichoderma* (BAJPAI, 2014), o *Trichoderma reesei* produz um completo sistema xilanolítico que proporcionam eficiência no processo de hidrólise da hemicelulose (POUTANEN *et al.*, 1987).

A hidrólise da hemicelulose ocorre por meio das enzimas hemicelulases em ação de endo-enzimas, que atuam internamente na cadeia principal, e exo-enzimas que clivam oligossacarídeos e produzem monossacarídeos (KALOGERIS *et al.*, 2003).

A endo-1,4- $\beta$ -xilanases (1,4- $\beta$ -xilana xilohidrolase; EC 3.2.1.8) são as mais importantes enzimas xilanolíticas. Elas reduzem o grau de polimerização do substrato ao clivarem as ligações glicosídicas na cadeia principal da xilana. A xilana não é atacada aleatoriamente, mas as ligações selecionadas para a hidrólise dependerão da natureza da molécula de substrato, isto é, do comprimento da cadeia, ao grau de ramificação, e a presença de substituintes (BAJPAI, 2014).

#### **2.4 Fermentação em estado sólido (FES) e Fermentação submersa (FSm)**

Pinto *et al.* (2006) define a fermentação em estado sólido (FES) como sendo o processo em que há crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas da matriz sólida, onde a quantidade de líquido representa um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e o metabolismo dos microrganismos, mas não excede à máxima capacidade de ligação da água com a matriz.

A produtividade enzimática da fermentação em estado sólido, como todo processo biotecnológico, é definida pelo microrganismo e as condições de cultivo. Variáveis como tipo e concentração de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, pH, umidade, atividade de água e temperatura representam condições operacionais determinantes no processo de fermentação (SINGHANIA *et al.*, 2010).

De todos os parâmetros que influenciam o processo fermentativo, a água destaca-se na FES, em virtude do seu elevado grau de interação com as substâncias que compõem a fase sólida (GERVAIS; MOLIN, 2003). A água é responsável pela difusão de solutos, gases e metabólitos inibitórios, bem como pela absorção celular. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à presença da água em FES devem ser constantemente estudados para a avaliação dos efeitos causados no processo (PANDEY, 2003).

O teor de umidade ótimo em um substrato sólido está intimamente relacionado com a nutrição correta e difusão de oxigênio durante o cultivo. O alto teor de umidade diminui a porosidade, com a perda da estrutura das partículas, interferindo na difusão do oxigênio. Ao contrário, o baixo teor de umidade pode limitar a solubilidade dos nutrientes, dificultando o desenvolvimento de microrganismos (ABU YAZID *et al.*, 2017).

Robinson e Nigam (2003) afirmaram que nesses processos o teor de umidade varia entre 30 a 85% e a atividade de água típica vai de 0,40 a 0,90, mimetizando condições encontradas na natureza e permitindo até que sejam conduzidos sem prévia esterilização, visto que a contaminação é pouco provável.

A FES também apresenta as seguintes características (PINTO *et al.*, 2006):

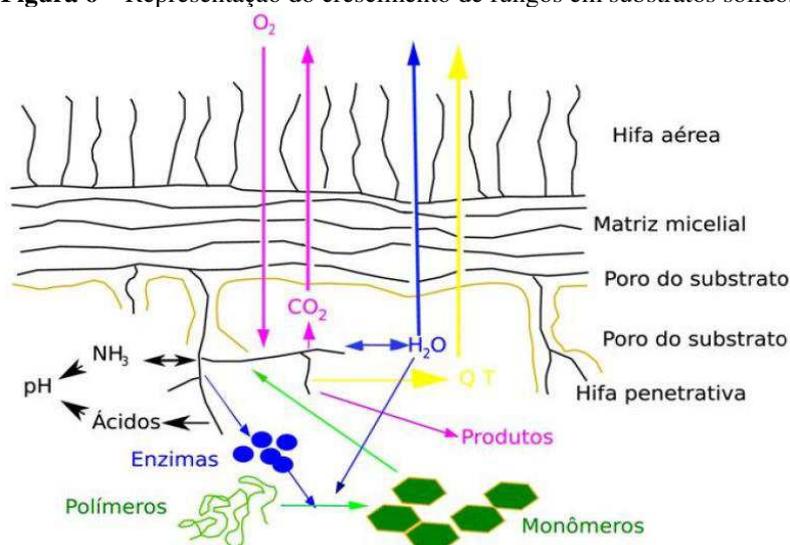
- A fase sólida atua como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento das células microbianas;
- O ar, necessário ao desenvolvimento microbiano, deve atravessar os espaços vazios do meio a pressões relativamente baixas;
- O crescimento microbiano ocorre em condições mais próximas aos do habitat natural;
- O meio apresenta alta heterogeneidade e os substratos não estão completamente acessíveis ao microrganismo.

Segundo Singhanian *et al.* (2010) a fermentação em estado sólido é vantajosa, pois, além de simular o habitat natural de microrganismos fúngicos selvagens, apresenta maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH.

Embora a fermentação em estado sólido proporcione alta produtividade, alta concentração de produtos e necessite de pouco espaço e energia; tem como desvantagem a dificuldade no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. Além disso, vários grupos microbianos não conseguem se desenvolver em baixos teores de umidade. Por isso são utilizados fungos filamentosos no processo, pois os mesmos adaptam-se bem a essa condição (PANDEY *et al.*, 1999).

A Figura 6 ilustra o crescimento de um fungo filamentoso em meio sólido.

**Figura 6** – Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos.



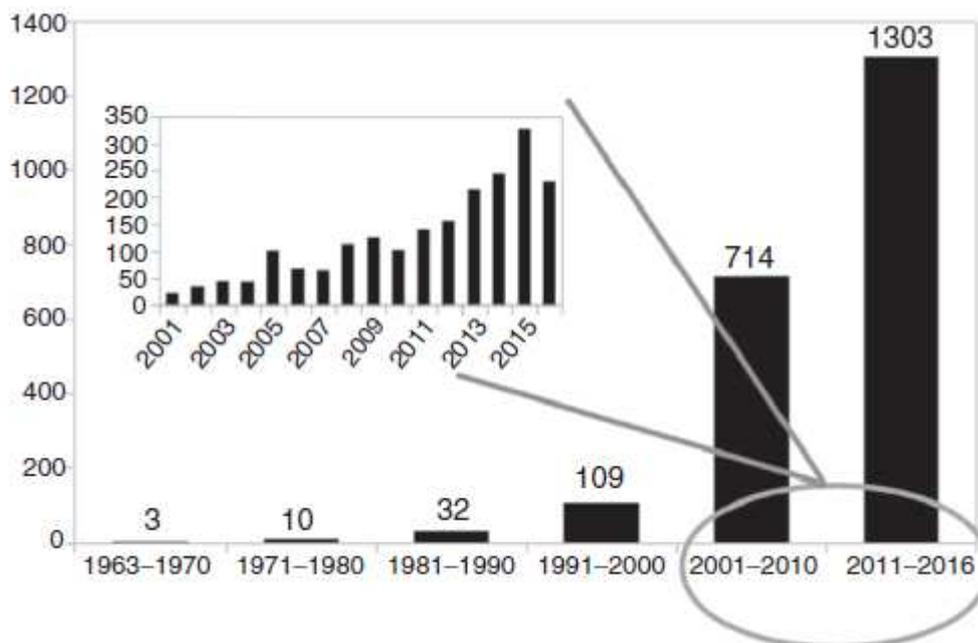
Fonte: Holker e Lenz (2005).

Diversos meios de suplementação são usados para suprir os requerimentos nutricionais dos microrganismos, em termos de carbono, nitrogênio, fósforo, vitaminas e minerais (VRIES; VISSER, 2001). Sendo necessário a suplementação do meio quando a quantidade de nutrientes estiver abaixo da mínima.

A primeira invenção patentada sobre FES foi apresentada em 1962 pela Riker Laboratories. A FES só se tornou sujeito de estudo a partir de 1950, em ritmo lento. Foi depois do final da década de 1990 que o interesse por essa tecnologia explodiu. Quase 93% do total de pedidos de patentes em todo o mundo referentes a FES (2178) foram depositados após 2001, conforme ilustrado na Figura 7. A tendência de 2001 a 2016 é destacada no gráfico. É evidente que o aumento no número de aplicações é contínuo. Não houve redução considerável em tais registros, desde 2001. A aparente diminuição

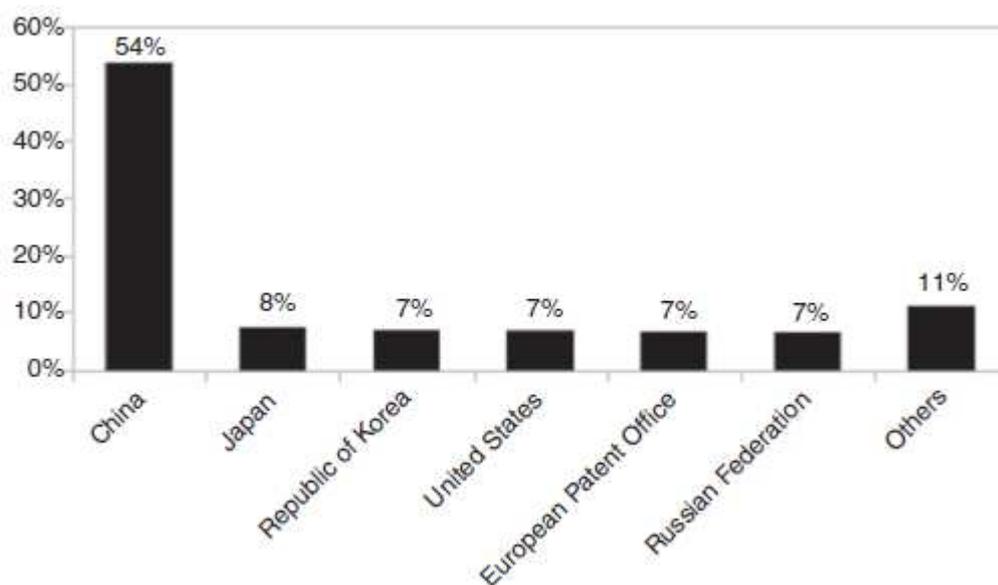
em 2016, quando comparada até 2015, pode ser explicado pelo fato de o ano ainda não ter terminado na época da submissão do artigo (SOCCOL, 2017).

**Figura 7** - Evolução de pedidos de patente relacionados a tecnologias da FES, desde 1963.



A Figura 8 apresenta a distribuição das aplicações de patentes relacionadas com FES. A China é o país com mais pedidos de patentes no mundo, com uma grande margem para o Japão, a Coreia do Sul, os Estados Unidos, a União Europeia e a Rússia. Isso se deve, provavelmente, ao fato de que essa tecnologia só atraiu interesse recente de cientistas e indústrias ocidentais, devido à sua aplicabilidade na produção de vários produtos que usam resíduos da indústria como substrato. Além disso, o FES tem sido usado na China para produção de alimentos e bebidas há milhares de anos e continua sendo relevante até o momento (SOCCOL, 2017).

**Figura 8** - Distribuição de pedidos de patente relacionados a FES entre os países que mais contribuem para esse desenvolvimento tecnológico.



O Brasil, como um dos países agropecuários mais importantes do mundo, possui um forte potencial para o FES devido a sua alta disponibilidade de resíduos sólidos, comumente usados como substrato nesse tipo de fermentação. Ele não aparece no ranking mundial, mas tem registrado um número considerável de patentes em seu escritório local de patentes (173) (SOCCOL, 2017).

A fermentação submersa, definida como sendo aquela onde a fase aquosa é abundante, apresenta a vantagem de possibilitar um melhor controle dos parâmetros do processo, como temperatura, pH, aeração, agitação, e concentração de nutrientes. Pode ser realizada em frascos agitados, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial. Todos esses fatores são importantes para o rendimento do produto de interesse, e por esse motivo a fermentação submersa tem sido a mais aplicada na indústria. São conhecidos como inconvenientes do processo: a maior probabilidade de contaminação, devido à maior quantidade de água; e o favorecimento à repressão catabólica, quando comparada à fermentação em estado sólido, pelo fato de os açúcares (glicose) estarem dispersos em todo o meio líquido (SÁNCHEZ, 2009).

### 2.4.1 Microrganismos utilizados na produção de enzimas

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural (ROBSON; CHAMBLISS, 1989).

Isolados de *Trichoderma* podem ser reconhecidos por suas características, tais como, rápido crescimento em cultura e produção de numerosos esporos (conídios), os quais comumente são verdes e micélio aéreo (BISSET, 1991). *Trichoderma reesei* é economicamente um importante produtor de celulases e hemicelulases e também é usado para produção heteróloga de proteínas (KUBICEK; PENTTLILA, 1998).

*Trichoderma reesei* é o microrganismo mais conhecido capaz de produzir celulases e xilanases (KOPPRAM; ALBERS; OLSSON, 2012). De acordo com Ahamed e Vermette (2008), a celulase produzida por fungos filamentosos, *Trichoderma reesei*, é o sistema enzimático mais eficiente para a hidrólise completa de substratos celulósicos em componentes monoméricos de glicose, que é um açúcar fermentescível.

O complexo celulolítico extracelular do *Trichoderma reesei* é composto por 60 a 80% de celobiohidrolases ou exogluconases, 20 a 36 % de endoglicanases e 1 % de  $\beta$ -glucosidases, os quais atuam em sinergia na conversão de celulose em glicose. A reação sinérgica ocorre como resultado da ação sequencial cooperativa entre os três componentes do complexo enzimático, onde o produto de uma reação enzimática torna-se substrato para outra (AHAMED; VERMETTE, 2008). A espécie *T. reesei* foi melhorada ao longo dos anos, por mutagênese aleatória, o que resultou no aumento da produtividade substancial da enzima (LI *et al.*, 2016).

### 2.5 Estado da arte

Coelho *et al.* (2018) ao estudarem a produção de endoglucanase (CMCase) por FSS pelo fungo filamentoso *Aspergillus* sp obtido a partir da fase termofílica de um processo de compostagem, tendo bagaço de coco verde como substrato, avaliaram o efeito da umidade inicial do meio (U) em (b.u.) e a temperatura (°C) de incubação na produção enzimática, os valores foram, 45 % (-1), 55 % (0), 65 % (+1) e 30 °C (-1), 37

°C (0) e 45 °C (+1). No Ensaio com (45 °C e 45 % de umidade) foi verificado o melhor resultado para a produção de CMCase com atividade máxima de 0,6 U/mL.

Marques *et al.*, (2018) ao estudarem a produção das enzimas celulase,  $\beta$ -glicosidase, FPase e xilanase por fermentação em estado sólido usando como substrato uma mistura (1:1) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo por 7 dias, a 28 °C, com a umidade inicial de 70 % e o fungo *Trichoderma viridae* PAJ 01 (5 discos miceliais como inóculo), a atividade das enzimas foram 64,56, 2,97, 0, 26 e 351,74 U/g respectivamente.

Lopez-Ramirez *et al.* (2018) ao estudarem a produção de celulase e xilanase usando *Trichoderma harzianum* por fermentação em estado sólido usando serragem de pinho como substrato com umidade inicial de 65 %, avaliaram o efeito da temperatura de incubação (26, 28, 30, 32, 34 e 36 °C), a produção máxima de xilanase ( $100 \pm 8$  U/g) foi obtido nas temperaturas de 30 a 34 °C, que foi cerca de 2 vezes maior que os valores encontrados em 26 e 28 °C, e a produção de celulase foi independente ( $9,11 \pm 0,13$  U/g) de temperatura na gama de 26 a 36 °C.

Verma *et al.* (2018) investigaram a produção de celulase sob várias temperaturas (25, 27, 30, 32 e 35 °C) e condições de pH (3, 4, 5, 6, 7 e 8) por fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* em casca de *Luffa cylindrica* (bucha) e *Litchi chinensis* (lecheira). A temperatura e o pH mais eficazes para o crescimento e produção de celulase foram de 30 °C e 5,0. A atividade máxima de celulase foi (4,0 IU/mL) e (1,7 IU/mL) usando *Luffa cylindrica* e *Litchi chinensis* respectivamente.

Bharti *et al.* (2018) ao analisarem a produção de celulase, FPase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase sob fermentação em estado sólido usando *Talaromyces stipitatus* em diferentes fontes de carbono (sabugo de milho, palha de arroz, casca de arroz, farelo de trigo, palha de trigo, grama de cenoura e cana de açúcar) nas condições de fermentação: Tempo de incubação de 6 dias, temperatura de 30 °C, umidade inicial de 75 % e pH inicial de 5,0. A atividade máxima de celulase foi observada usando grama de cenoura (30 UI/gds) seguido de farelo de trigo (26,4 UI/gds) e palha de arroz (16,7 IU/gds). A atividade máxima de FPase (2,86 FPU/gds) e  $\beta$ -glicosidase (33 UI/gds) também foi observada usando a grama de cenoura, seguido de farelo de trigo que resultou em 2,22 FPU/gds e 25,2 UI/gds de FPase e  $\beta$ -glicosidase, respectivamente. A atividade máxima

de xilanase (604 UI/gds) foi observada usando farelo de trigo como fonte de carbono seguido por grama de cenoura (582,9 IU/gds).

Li *et al.* (2018) ao estudarem perfis de pH (4, 5, 6 e 6,5) na produção de enzimas (celulase e xilanase) por *Aspergillus foetidus*, obtiveram atividade máxima em pH 4 para celulase e xilanase, 0,58 e 98,9 U/mL respectivamente, no 3º dia de fermentação, usando como substrato farelo de soja em fermentação submersa.

Marín *et al.* (2019) ao avaliarem a produção de celulases através de fermentação em estado sólido em casca de laranja, bagaço de maçã e fibra de arroz, obtiveram atividade máxima de 8, 7,8 e 2,1 UI/g para o bagaço de maçã, casca de laranja e fibra de arroz, respectivamente.

Silva *et al.* (2018) ao avaliar o efeito de pré-tratamentos como: hidrotérmico (HT), peróxido de hidrogênio-alcálico (PH-A), ácido-alcálico (AA) e alcálico (AL), na palha de carnaúba (*Copernicia prunifera*) para a produção de enzimas (celulases e xilanases) por *Trichoderma reesei* CCT-2768 por 168 horas de fermentação a 30 °C, utilizando fermentação em estado sólido. Obtiveram no extrato de resíduo pré-tratado por PH-A maior atividade de CMCase (13 U/g), com este pico de produção ocorrendo após 96 h de fermentação. Os resultados para atividade de xilanase mostrou que o extrato usando a palha submetida ao pré-tratamento AA levou a um pico de 99,5 U/g, após 48 h de fermentação, seguida de 94,2 U/g para o extrato enzimático pré-tratado com PH-A.

Salomão *et al.* (2019) ao avaliarem a produção de celulases por fungos filamentosos (*Penicillium* sp., *Rhizomucor* sp. e *Trichoderma koningii*) por fermentação em estado sólido usando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natural, pré-tratado com solução ácido-base e pré-tratado com solução de peróxido de hidrogênio nas condições operacionais de temperatura (28, 33 e 38 °C) e umidade (50 %, 60 % e 70 %) para cada fungo e para cada substrato (bagaço natural, pré-tratado com solução ácido-base e pré-tratado com peróxido de hidrogênio). O melhor resultado obtido foi com o fungo *Trichoderma koningii* na menor temperatura, 28 °C e 50 % de umidade (8,20 UI/g) usando o bagaço de cana-de-açúcar natural. O bagaço tratado com solução ácido-base utilizando o fungo *Trichoderma koningii* apresentou melhor resultado a 28 °C e 70 % de umidade (1,28 UI/g) e o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio utilizando o fungo *Trichoderma koningii*

apresentou melhor resultado a 28 °C e 50 % de umidade (3,39 UI/g). A produção do *Penicillium* sp. foi menor quando comparado ao *Trichoderma koningii* e o fungo *Rhizomucor* sp. teve produção insignificante de celulase.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de realização do trabalho

Os experimentos de fermentação em estado sólido e submersa foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Unidade Acadêmica de Engenharia Química (UAEQ) do Centro de Ciências e Tecnologia (CCT) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

As isotermas de dessorção foram realizadas no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da UFCG.

As análises de TG/DTG foram realizadas no Laboratório de Análises Térmicas (LabTer) da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais da UFCG.

#### 3.2 Matéria-prima

A matéria-prima utilizada, como meio de cultivo no processo de fermentação em estado sólido e submersa para obtenção de enzimas, foi a fibra de sisal (*Agave sisalana*) (Figura 9), cedida pela fazenda Montevidéu no município de Nova Floresta - PB, com baixo teor de umidade, uma vez que, depois do desfibramento as fibras foram secas ao sol.

**Figura 9** – Fibra de sisal (*Agave sisalana*).



Como fonte indutora no processo fermentativo foi utilizado o farelo de trigo, *in natura* e seco, adquirido comercialmente da empresa Grings Alimentos Saudáveis.

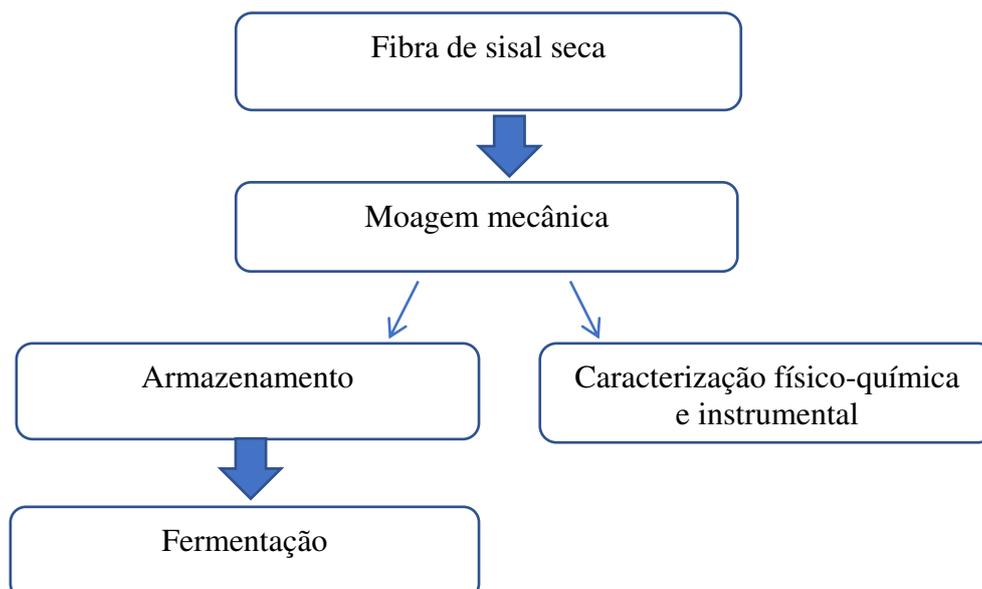
A fibra de sisal foi triturada em moinho de facas da marca TECNAL MARCONI MA 048 e acondicionada em vidro hermeticamente fechado para posterior análise da caracterização do material. A Figura 10 ilustra o aspecto da fibra de sisal em pó.

**Figura 10** – Fibra de sisal em pó



A Figura 11 é apresentado um fluxograma que representa as etapas de preparação do substrato.

**Figura 11** - Fluxograma apresentando as etapas de preparação da fibra de sisal



### 3.3 Caracterização da fibra de sisal

A caracterização da fibra de sisal em pó foi realizada, em triplicata, avaliando-se a granulometria, seguindo as recomendações da NBR 7181 da ABNT (ABNT, 1984), pH da suspensão, umidade do substrato, cinzas (Brasil, 2005), açúcares redutores (MILLER, 1959) e estudo térmico (TG/DTG).

As análises de extrativos, lignina insolúvel, holocelulose, alfacelulose e hemicelulose foram realizadas de acordo com as metodologias descritas por Morais *et al.* (2010), baseadas nos procedimentos para análise de material lignocelulósico.

#### 3.3.1 Granulometria

O perfil granulométrico da fibra de sisal em pó, foi determinado a partir de 50 g da fibra de sisal em uma balança analítica, os quais foram transferidos para um agitador de peneiras PRODUTEST na velocidade de agitação de 50 rpm por 13 min, em jogo constituído por sete peneiras da série Tyler, seguindo as recomendações da NBR 7181 da ABNT (ABNT, 1984): 14 mesh (1,180 mm), 20 mesh (0,850 mm), 24 mesh (0,710 mm), 35 mesh (0,425 mm), 42 mesh (0,355 mm), 65 mesh (0,212 mm) e 115 mesh (0,125 mm). O material retido em cada peneira foi pesado e os resultados expressos percentualmente em relação a massa da amostra analisada.

O cálculo do diâmetro médio da partícula (D) foi obtido utilizando-se a equação de Sauter (Equação 1) apresentada por Pereira *et al.* (2009).

$$D = \frac{1}{\sum_i \frac{\Delta x_i}{D_i}} \quad (1)$$

Em que:

D - Diâmetro médio da partícula

$\Delta x_i$  - Fração mássica retida sobre cada peneira

$D_i$  - Diâmetro médio de abertura das peneiras superior e inferior

### **3.3.2 Umidade do substrato**

A determinação da umidade do material foi realizada seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005). As amostras foram colocadas em estufa a 105 °C até massa constante.

### **3.3.3 Cinzas**

O teor de cinzas contidos na fibra de sisal foi determinado em mufla a 550 °C, até obter massa constante com as cinzas brancas ou ligeiramente acinzentadas, seguindo a metodologia descrita em Brasil (2005).

### **3.3.4 pH**

Preparou-se uma suspensão com 20,0 mL de água destilada e 2,0 g da amostra. Após homogeneização, a suspensão foi deixada em repouso por um período de 30 min, depois o pH foi mensurado em pHmetro, previamente calibrado com as soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 (BRASIL, 2005).

### **3.3.5 Açúcares redutores**

A concentração de açúcares redutores foi determinada seguindo a metodologia descrita por Miller (1959), que 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.

### **3.3.6 Estudo térmico (TG/DTG)**

As curvas termogravimétricas (TG/DTG) foram obtidas em analisador térmico Shimadzu, em atmosfera de ar sintético, massa de 10 mg, razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> até 1000 °C.

### 3.3.7 Teor de extrativos

Para a determinação do teor de extrativos foi empregado o método de extração em Soxhlet, de acordo com Morais *et al.* (2010), sendo utilizados 6,0 g da amostra e 200 mL de uma mistura de ciclohexano e etanol na proporção de 1:1 (ciclohexano/etanol). As amostras foram acondicionadas em um cartucho confeccionado com papel de filtro e colocadas no extrator Soxhlet. O material foi extraído durante um período de 6 horas. Após a extração, os cartuchos foram secos em estufa à temperatura de 105 °C até massa constante, por meio da diferença entre massa do conjunto recipiente/extrativos (MRE) e da massa do conjunto recipiente/resíduo de solvente (MRRS), fazendo-se uma correção com relação ao teor de umidade (TU), calculou-se o teor de extrativos conforme as Equações 2 e 3.

$$EX = \frac{MRE - MRRS}{MA} \times 100 \quad (2)$$

EX - Extrativos (%)

MRE - Massa do recipiente + massa de extrativos (g)

MRRS - Massa do recipiente + massa do resíduo de solvente (g)

MA - Massa da amostra (g)

$$EX \text{ Corrigido} = \frac{EX \times (100 - TU)}{100} \quad (3)$$

Em que:

EX corrigido – Extrativos corrigido (%)

TU – Teor de umidade (%)

### 3.3.8 Lignina insolúvel

Para a determinação de lignina de Klason, utilizou-se cerca de 1,0 g de amostra, na sua forma sem extrativos. Esse material foi colocado em um almofariz e adicionou-se 17 mL de ácido sulfúrico (72 %), previamente resfriado em geladeira a 10 - 15 °C. Agitou-se vigorosamente a mistura com o pistilo durante 15 min, até não haver mais

partículas visíveis não solubilizadas, a seguir a mistura permaneceu em repouso por um período de 24 horas para digestão. Depois de 24 horas de digestão, adicionou-se 306 mL de água destilada no almofariz para diluir a solução de ácido sulfúrico a 4 %. A mistura foi quantitativamente transferida para um balão de 1000 mL. O balão foi levado para uma manta aquecedora, conectada em um condensador, então o material ficou sob aquecimento e refluxo por 4 horas, contadas a partir do início da fervura. Após o resfriamento o material foi filtrado em kitassato e seco em estufa a 105 °C até massa constante. O teor de lignina insolúvel (TLI) foi quantificado pelas Equações 4 e 5, com base na massa do funil limpo e seco (MF) e na massa do funil somada à massa de lignina, após a secagem em estufa (MFL), seguindo a metodologia de Morais *et al.* (2010).

$$TLI = \left( \frac{MFL - MF}{MA} \times 100 \right) - CZ \quad (4)$$

Em que:

TLI - Teor de lignina insolúvel (%)

MFL - Massa do funil + massa de lignina seca (g)

MF - Massa do funil seco (g)

MA - Massa da amostra (g)

CZ - Cinzas na amostra (%)

$$\% \text{ TLI corrigido} = \frac{\% \text{ TLI} \times [100 - (\% \text{ TE} - \% \text{ TU})]}{100} \quad (5)$$

Em que:

TH - Teor de lignina insolúvel

TE - Teor de extrativos

TU - Teor de umidade

### 3.3.9 Holocelulose ( $\alpha$ -Celulose + Hemicelulose)

Para a determinação do teor de holocelulose foi adicionado em um Erlenmeyer de 500 mL 3,0 g da amostra, 120 mL de água destilada, 2,5 g de clorito de sódio

(NaClO<sub>2</sub>) e 1 mL de ácido acético concentrado. A mistura permaneceu sob agitação em agitador até que o clorito fosse dissolvido. O conjunto Erlenmeyer-reagente foi coberto com um Erlenmeyer de 25 mL e a mistura foi mantida sob agitação à temperatura de 75 °C por 1 hora. A mesma quantidade de reagentes foi adicionada ao Erlenmeyer a cada hora, totalizando um período de digestão de 3 h. O sistema foi resfriado, e depois filtrado a vácuo. O resíduo foi lavado com água destilada, e seco em estufa a 105 °C até massa constante e medido em balança analítica. O teor de holocelulose foi determinado pela diferença entre massa do funil somada à massa de holocelulose, após a secagem em estufa (MFH) e da massa do funil limpo e seco (MF), podendo-se calcular o teor de holocelulose (TH), conforme as Equações 6 e 7, descritas por Morais *et al.* (2010).

$$TH = \frac{MFH - MF}{MA} \times 100 \quad (6)$$

Em que:

TH - Teor de holocelulose (%)

MFH - Massa do funil + massa de holocelulose (g)

MF - Massa do funil seco (g)

MA - Massa da amostra (g)

$$\% TH \text{ corrigido} = \frac{\% TH \times [100 - (\% TE + \% TU)]}{100} \quad (7)$$

Em que:

TH - Teor de holocelulose

TE - Teor de extrativos

TU - Teor de umidade

### 3.3.10 $\alpha$ -Celulose e hemicelulose

Os teores de  $\alpha$ -celulose e hemicelulose foi determinado seguindo a metodologia de Morais *et al.* (2010). Para 1,0 g de holocelulose seca colocada em um almofariz, adicionou-se 15 mL de uma solução de NaOH a 17,5 %. Após 2 min de contato entre a solução e a holocelulose, iniciou-se a maceração do material por 8 min. Terminando esse tempo adicionou-se 40 mL de água destilada ao almofariz e então realizou-se a

filtração do material que, em seguida, foi seco em estufa a 105 °C até massa constante. O teor de  $\alpha$ -celulose (TA) foi determinado por meio das Equações 8 e 9, com base na massa do funil limpo e seco (MF), na massa da amostra de holocelulose (MAH) e na massa do funil somada à massa de  $\alpha$ -celulose, após a secagem em estufa (MFA). O teor de hemicelulose foi obtido a partir da diferença entre holocelulose e celulose, conforme a Equação 10.

$$TA = \frac{MFA - MF}{MAH} \times 100 \quad (8)$$

Em que:

TA - Teor de  $\alpha$ -celulose (%)

MFA - Massa do funil + massa de  $\alpha$ -celulose (g)

MF - Massa do funil seco (g)

MAH - Massa de holocelulose (g)

$$\% \text{ TA corrigido} = \frac{(\% \text{ TH corrigido} \times \% \text{ TA})}{100} \quad (9)$$

Em que:

TA - Teor de  $\alpha$ -celulose

TH - Teor de holocelulose

$$\text{TheC corrigido} = \text{TH corrigido} - \text{TA corrigido} \quad (10)$$

### 3.3.11 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.

### 3.4 Isotermas de dessecção de umidade

Foi realizado o levantamento das isotermas de dessecção de umidade da fibra de sisal na temperatura de 28 °C. A atividade de água da fibra de sisal foi determinada em higrômetro Aqualab 3TE (Decagon) no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande - PB.

O método estático-indireto foi utilizado para determinação da isoterma de dessecção de acordo com metodologia usada por Crapiste e Rotstein (1982). Inicialmente, as amostras (Sisal sem adição de farelo de trigo (T1), sisal + 25 % de farelo de trigo (T2) e sisal + 50 % de farelo de trigo (T3)) foram umidificadas com água destilada. Em seguida, cada amostra foi colocada em embalagem hermética e foi mantida sob refrigeração a 8 °C “*overnight*” até uniformização da umidade do substrato.

Após “*overnight*”, as amostras a temperatura ambiente, foram submetidas a determinação das isotermas. 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 que foi a temperatura próxima a utilizada para produção das enzimas. Em seguida, a amostra foi levada a estufa a temperatura de 40 °C por 5 minutos. Após, esse período a amostra foi resfriada em dessecador para medida de atividade de água e pesagem em balança analítica. A amostra foi submetida repetidamente a esse processo até alcançarem valores de atividades de água próximos a 0,1, quando foram levadas a estufa a 105 °C, até massa constante, para determinação da 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 11:

$$X_{eq} = \frac{m_{eq} - m_s}{m_s} \times 100 \quad (11)$$

Em que:

$X_{eq}$  - Umidade de equilíbrio (% base seca)

$m_{eq}$  - Massa da amostra no equilíbrio (g)

$m_s$  - Massa seca da amostra (g)

Para o ajuste matemático do modelo de GAB (Equação 12) as isotermas de desorção de umidade da fibra de sisal (T1, T2 e T3), utilizou-se o programa STATISTICA versão 7.0 (STATSOFT, 1995).

$$X_{eq} = \frac{X_m * C * K * a_w}{(1 - K * a_w) (1 - K * a_w + C * K * a_w)} \quad (12)$$

Em que:

$X_{eq}$  - Umidade de equilíbrio (% b.s)

$a_w$  - Atividade de água (decimal)

$X_m$  - Umidade na monocamada molecular (% b.s)

C e K - Parâmetros que dependem da temperatura e da natureza do produto

### 3.5 Microrganismo

Foi utilizado o fungo lignocelulolítico *Trichoderma reesei*, proveniente do estoque de culturas da Embrapa Semiárido, localizada em Petrolina, Pernambuco. O *Trichoderma reesei* foi mantido em tubos tipo Eppendorf em blocos de ágar de 4 a 6 mm<sup>3</sup>, na presença de água destilada autoclavada a 120 °C por 15 min, e estocados a temperatura de 8 °C (CASTELLANI, 1939).

#### 3.5.1 Propagação do *Trichoderma reesei*

A partir do tubo tipo Eppendorf contendo o fungo em água destilada autoclavada foi realizada a primeira propagação. Para tal, foram retiradas algumas gotas da suspensão de esporos do Eppendorf e em seguida transferidas para placas de Petri contendo meio Batata - Dextrose - Ágar (BDA).

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 o meio formado foi autoclavado por 15 min a 120 °C em Erlenmeyer de 250 mL. Após resfriamento o meio estéril foi distribuído nas placas de Petri e após a solução de ágar solidificar o microrganismo foi inoculado.

Após inocular o *Trichoderma reesei* em placas de Petri, as mesmas foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C por um período de 10 a 12 dias ou tempo necessário para que as placas ficassem totalmente cobertas por esporos.

A partir da propagação em placas de Petri, foi realizada uma segunda propagação em sabugo de milho como meio de cultivo, partindo dos esporos da primeira propagação. O sabugo é apropriado para este fim, uma vez que o fungo cresce em uma superfície maior e conseqüentemente aumenta a esporulação. Este meio de cultura foi preparado segundo protocolo da EMBRAPA/CNPAT, no qual primeiro prepara-se as seguintes soluções:

– Solução A: pesou-se 20 g de fosfato de potássio monobásico, dissolveu em água destilada e transferido para um balão volumétrico de 100 mL e aferido.

– Solução B: pesou-se 3,96 g de sulfato de zinco e dissolveu-se em um pouco de água destilada. Adicionou-se 4,60 g de sulfato de ferro, 0,01 g de sulfato de manganês e 0,5 mL de ácido sulfúrico (95–97 %). Após completa dissolução, avolumou-se a 100 mL com água destilada.

– Solução umidificante: pesou-se 2,8 g de peptona em um pouco de água destilada, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionou-se 0,19 mL da solução A e 0,025 mL da solução B, avolumou-se e homogeneizou.

Após o preparo das soluções, pesou-se 4,6 g de sabugo de milho triturado e seco (55 °C) em Erlenmeyers de 125 mL e adicionou-se 6 mL da solução umidificante, em cada Erlenmeyer. O Erlenmeyer foi tampado com tampão de algodão envolvido com gaze, homogeneizado e esterilizado em autoclave por 30 min a 120 °C.

Para inoculação no meio de sabugo de milho foi adicionado 10 mL de espessante Tween 80 a 0,3 % (v/v) nas placas com microrganismo da primeira propagação (Figura 12a) e com auxílio de uma alça de platina, os microrganismos foram desprendidos, homogeneizados e transferido 1 mL dessa suspensão para cada Erlenmeyer contendo o sabugo de milho. Os Erlenmeyers foram agitados e incubados em estufa a  $28 \pm 2$  °C por um período de 10 dias. Após este período os Erlenmeyer foram armazenados sob refrigeração por um período máximo de três meses e utilizados como inóculo nos ensaios de fermentação (Figura 12b).

**Figura 12** – Propagação do *Trichoderma reesei* em placa de Petri (a) e em sabugo de milho (b).



### 3.5.2 Preparo do inóculo do *Trichoderma reesei*

O preparo do inóculo para as fermentações foi realizado adicionando-se 40 mL de espessante Tween 80 a 0,3 % (v/v) aos Erlenmeyers contendo sabugo de milho com esporos. Após agitação, os esporos foram transferidos para béquer estéril (autoclavados a 120 °C por 15 minutos) com auxílio de gaze e algodão estéril para a contagem e posteriormente ser inoculado.

A quantificação da suspensão de esporos obtida foi feita por meio de contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada, também conhecida como hemacitômetro e um microscópio óptico. Para a contagem de esporos, diluiu-se a suspensão do inóculo e promoveu-se a homogeneização com uma vigorosa agitação. Colocou-se esta solução, com o auxílio de uma micropipeta estéril, entre a câmara de Neubauer e a lamínula, previamente limpas com álcool 70 % (v/v). Realizou-se a contagem dos esporos em microscópio óptico.

O volume da suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a se ter um inóculo de  $10^7$  esporos por grama de meio.

A concentração de esporos do inóculo foi calculada segundo a Equação 13 e o volume de suspensão a ser inoculada foi calculado por meio da Equação 14.

$$C_{\text{Esporos}} = \bar{E} \times 25 \times 10^4 \times F_D \quad (13)$$

$$V_{\text{Suspensão}} = \frac{C_{\text{Inóculo}} \times m}{C_{\text{Esporos}}} \quad (14)$$

Em que:

$C_{\text{Esporos}}$  - Concentração de esporos na suspensão (esporos/mL);

E - Média de Esporos contados na Câmara de Neubauer;

$F_D$  - Fator de diluição para contagem na Câmara de Neubauer;

$C_{\text{Inóculo}}$  - Concentração de Inóculo desejada para a fermentação (esporos/g) ou (esporos/mL);

m - Massa de substrato utilizada (g) ou volume de substrato utilizada (mL);

$V_{\text{suspensão}}$  - Volume de suspensão a ser inoculada (mL).

### 3.6 Produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas

#### 3.6.1 Planejamento experimental – fermentação em estado sólido

Foi estudada a produção das enzimas celulolíticas (CMCase, FPAse e  $\beta$ -glicosidase) e hemicelulolítica (xilanase), utilizando o fungo *Trichoderma reesei* em fermentação em estado sólido da fibra de sisal a  $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . O estudo teve uma abrangência de 240 horas, sendo retiradas amostras em intervalos de 24 horas para a construção da cinética de fermentação. Nessas amostras foram realizadas análises de pH, AR (açúcares redutores), umidade e atividade das enzimas.

Durante o processo de fermentação para produção das enzimas foram analisadas a influência das seguintes variáveis no processo: Umidade inicial ( $U_i$ , em % b.u.) e teor de farelo de trigo (FT, em %). Para isso foi realizado um planejamento experimental  $2^2$  com 3 repetições no ponto central. As Tabelas 3 e 4 detalham, respectivamente, os níveis e a matriz do planejamento, os quais foram baseados na literatura existente (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2011).

**Tabela 3** - Níveis do planejamento experimental da produção das enzimas.

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

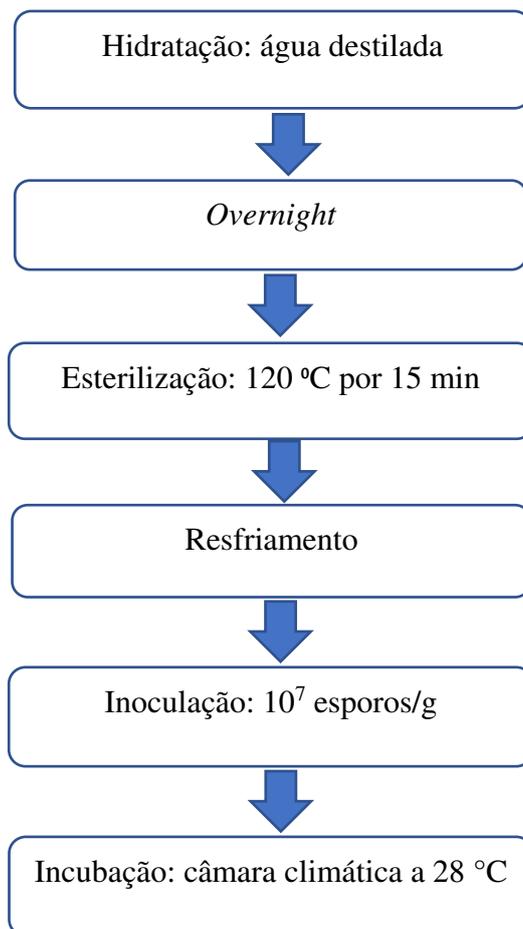
**Tabela 4** - Matriz de planejamento experimental fatorial  $2^2$  com 3 repetições no ponto central da produção de enzimas para fermentação em estado sólido.

<b>Ensaio</b>	<b><math>U_i</math> (% b.u.)</b>	<b>FT (%)</b>
1	60	0
2	80	0
3	60	50
4	80	50
5	70	25
6	70	25
7	70	25

### 3.6.2 Experimentos de fermentação em estado sólido

A Figura 13 apresenta um fluxograma que representa as etapas do processo de FES.

**Figura 13** - Fluxograma apresentando as etapas do processo de FES



Os testes das fermentações em estado sólido foram realizados em Erlenmeyers de vidro de 250 mL contendo 15 g do substrato previamente umidificado. A umidade inicial do meio foi ajustada para 60, 70 e 80 % pela adição de um volume definido de água destilada, que foi determinado por meio de um balanço de massa, seguindo a Equação 15, o qual leva em consideração que a densidade da água é aproximadamente igual a 1,00 g/cm<sup>3</sup>.

$$V_{AA} = m_{AA} = \frac{m_i (U_2 - U_1)}{(1 - U_2)} \quad (15)$$

Em que:

$V_{AA}$  - Volume de água a ser adicionada ao meio (mL);

$m_i$  - Massa de meio a ser umidificado (g);

$U_1$  - Umidade do meio (decimal);

$U_2$  - Umidade do meio desejada (decimal)

Por fim, adicionou-se ao substrato a água destilada e homogeneizou-se completamente. O meio foi deixado em repouso por 15 horas em geladeira a 8 °C.

Após as 15 horas, 15 g do substrato foi colocado em Erlenmeyers de 250 mL, vedados com algodão envolvido com gaze e papel alumínio e em seguida autoclavados por 15 min a 120 °C a 1 atm.

Após resfriamento, o substrato foi inoculado com suspensão de esporos de *Trichoderma reesei*. As suspensões foram ajustadas para conter 10<sup>7</sup> esporos por massa de substrato. Os Erlenmeyers foram incubados em câmara climática a 28 °C, sendo esta a temperatura favorável ao desenvolvimento do microrganismo (Figura 14). Em intervalos regulares de 24 horas foram retiradas periodicamente as amostras do processo, determinando-se a umidade (base úmida), pH, açúcares redutores e atividade enzimática. Para cada amostragem um Erlenmeyer era retirado da câmara climática, ou seja, a cada 24 horas um Erlenmeyer foi analisado, estando todos nas mesmas condições iniciais do processo. As análises realizadas ao longo das fermentações de umidade, pH e açúcares redutores seguiu as mesmas metodologias utilizadas na caracterização da fibra de sisal. A metodologia utilizada para determinar a atividade enzimática será descrita posteriormente.

**Figura 14** - Fermentação em estado sólido em fibra de sisal utilizando o *Trichoderma reesei*.



### 3.6.3 Extração das enzimas no processo de FES

A extração do complexo enzimático foi realizada segundo o procedimento descrito por Portela (2011): 6 g do meio fermentado foi incubado com 45 mL de tampão citrato de sódio 50 mol/L, pH 4,8, na temperatura de 4 °C, velocidade de agitação de 150 rpm, por 30 min, em incubadora do tipo shake da marca MARCONI. A amostra foi filtrada em papel de filtro qualitativo e algodão, ambos estéreis (autoclavados a 120 °C por 15 minutos), para remoção dos esporos. O extrato enzimático (Figura 15) foi utilizado para a determinação da atividade enzimática expressa em carboximetilcelulase, celulases totais,  $\beta$ -glicosidase e xilanase e açúcares redutores.

**Figura 15** – Extrato enzimático da fermentação em estado sólido em fibra de sisal utilizando o *Trichoderma reesei*.



### 3.6.4 Planejamento experimental – fermentação submersa

Foi estudada a produção da enzima celulolíticas (CMCase e  $\beta$ -glicosidase) e hemicelulolítica (xilanase), utilizando o fungo *Trichoderma reesei* em fermentação submersa da fibra de sisal a 28 °C. O estudo teve uma abrangência de 240 horas, sendo retiradas amostras em intervalos de 24 horas para a construção da cinética de fermentação. Nessas amostras eram realizadas análises de pH e atividade das enzimas.

Durante o processo de fermentação para produção das enzimas foram analisadas a influência das seguintes variáveis no processo: substrato (fibra de sisal + farelo de trigo) (S, em % m/v.) e teor de farelo de trigo (FT, em %). Para isso foi realizado um planejamento experimental 2<sup>2</sup> com 3 repetições no ponto central. As Tabelas 5 e 6 detalham, respectivamente, os níveis e a matriz do planejamento, os quais foram baseados na literatura existente (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2011).

**Tabela 5** - Níveis do planejamento experimental da produção das enzimas.

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

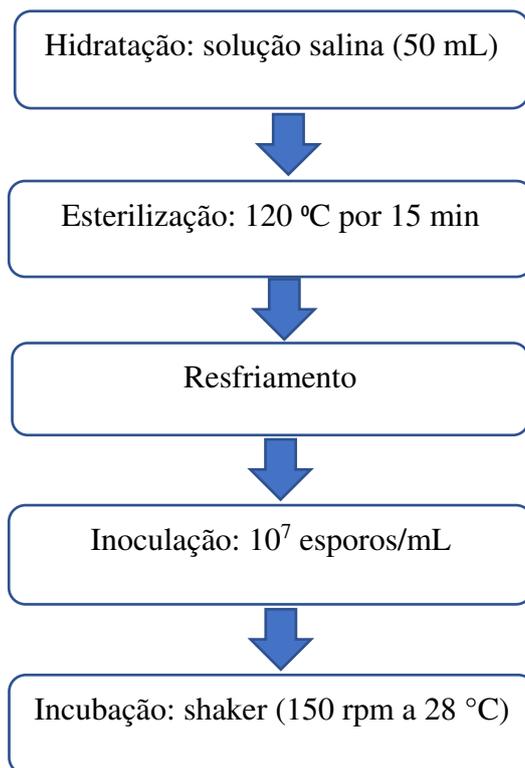
**Tabela 6** - Matriz de planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> com 3 repetições no ponto central da produção de enzimas para fermentação submersa.

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

### 3.6.5 Experimentos de fermentação submersa

A Figura 16 apresenta um fluxograma que representa as etapas do processo de FSm.

**Figura 16** - Fluxograma apresentando as etapas do processo de FSm.



Os ensaios via fermentação submersa foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de solução salina com pH ajustado para 5,0 e o substrato na concentração determinada pela matriz de experimentos (1, 3 ou 5 %). Os frascos foram autoclavados a 120 °C por 15 minutos e posteriormente após o resfriamento, o substrato foi inoculado com suspensão de esporos de *Trichoderma reesei* de 10<sup>7</sup> esporos/mL. A composição da solução salina está descrita na Tabela 7.

**Tabela 7** - Composição da solução salina usada para indução da atividade enzimática na fermentação submersa por *Trichoderma reesei*.

Componentes	Concentração (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
Micronutrientes*	1

Tabela 1(\*) 1 g/L de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,05 g/L de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e 0,2 g/L de ZnSO<sub>4</sub>. Fonte: Albano (2012)

Os ensaios foram realizados em incubadora shaker de agitação orbital a 150 rpm a temperatura de 28 °C (Figura 17). Os meios de cultivo foram filtrados à vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº 1, e o extrato enzimático livre de biomassa foi submetido a análise para determinação da atividade enzimática de CMCcase, xilanase e β-glicosidase.

**Figura 17** - Fermentação submersa em fibra de sisal utilizando o *Trichoderma reesei*.



### 3.7 Determinação das atividades enzimáticas

#### 3.7.1 Endoglicanases (CMCase)

A atividade celulolítica de endoglicanases, também chamadas de carboximetilcelulases (CMCase), foi analisada seguindo o procedimento descrito em Ghose (1987), que se baseia na capacidade do extrato enzimático em liberar açúcares

redutores na presença de carboximetilcelulose devido à hidrólise da fonte de celulose em glicose.

Para a análise, foi colocado em um tubo de ensaio 0,5 mL do extrato enzimático contendo 0,5 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 1 % (m/v), preparada em solução de citrato de sódio 50 mol/L, pH 4,8, a uma temperatura de 50 °C por 30 minutos. Após esse tempo, foi colocado no tubo de ensaio 1 mL de DNS para determinar a concentração de açúcares redutores conforme à metodologia de Miller (1959). Uma amostra em branco foi realizada para cada análise, empregando 0,5 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 1 % com 0,5 mL do extrato enzimático. Para o branco do reagente empregou-se 0,5 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 1 % com 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mol/L, pH 4,8.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de açúcar redutor, por minuto, a 50 °C e, neste trabalho, a atividade enzimática foi expressa U/g de substrato úmido, a qual foi calculada seguindo a Equação 16.

$$\text{CMCase(U/g)} = \frac{\text{AR}_{\text{Liberado}} \times 10^6}{180 \times 30} = \frac{(\text{AR}_{\text{Com CMC}} - \text{AR}_{\text{Sem CMC}}) \times 10^6}{180 \times 30} \quad (16)$$

Nessa Equação,  $10^6$  é um fator de conversão que transforma as unidades de massa em micrograma (portanto, mol em micromol), 180 é a massa molar da glicose (g/mol), 30 é o tempo de reação em minutos,  $\text{AR}_{\text{Com CMC}}$  é a leitura de açúcares redutores no tubo contendo o substrato, em que ocorreu a reação enzimática e  $\text{AR}_{\text{Sem CMC}}$  é a leitura de açúcares redutores no tubo da amostra em branco, com a qual não houve reação enzimática.

### 3.7.2 Celulase total (FPase)

Para determinação da atividade de celulase total (FPase), foi utilizado o procedimento recomendado por Ghose (1987), empregado como substrato o papel de filtro Whatman nº 1, cortado em tiras de 1x6 cm. Inicialmente, 1 mL de tampão citrato de sódio 50 mol/L, pH 4,8 foi transferido para um tubo de ensaio, no qual foi

adicionado 0,5 mL do extrato enzimático. O tubo foi transferido para um banho termostático a 50 °C. A tira de papel foi imersa no tubo, dando início à reação das enzimas com a celulose do papel. A reação enzimática ocorreu a 50 °C, durante 60 min. Para o branco do reagente empregou-se 1,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mol/L, pH 4,8. Em seguida, os açúcares redutores foram quantificados conforme à metodologia de Miller (1959).

As unidades de FPase foram assumidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de açúcar redutor por minuto. O ensaio em branco não tinha o papel. O resultado foi calculado com o auxílio da Equação 17.

$$\text{FPase (U/g)} = \frac{\text{AR}_{\text{Liberado}} \times 10^6}{180 \times 60} = \frac{(\text{AR}_{\text{Com papel}} - \text{AR}_{\text{Sem papel}}) \times 10^6}{180 \times 60} \quad (17)$$

### 3.7.3 $\beta$ -glicosidase

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi quantificada segundo método descrito por Ghose (1987) adaptado, foram incubados 1 mL de extrato enzimático com 1 mL de solução de celobiose 15 mM, preparada diariamente em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8 por 15 min a 50 °C. Após o tempo de reação os tubos foram incubados imediatamente a 100 °C por 5 min, de forma a promover a inativação das enzimas. Ao término da reação, as amostras foram colocadas em um banho de gelo para deter a reação, em seguida 1 mL de reagente GOD POD foi acrescentado para ocasionar a reação colorimétrica. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 37 °C como indicado pelo fabricante do kit glicose oxidase/peroxidase (GOD POD). Transcorridos os 10 minutos mediu-se a intensidade da cor rosa formada no espectrofotômetro a 505 nm.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de glicose, por minuto, a 50 °C e, neste trabalho, a atividade enzimática foi expressa U/g de substrato úmido, a qual foi calculada seguindo a Equação 18.

$$\beta\text{-glicosidas e (U/g)} = \frac{Gli_{\text{Liberada}} \times 10^6}{180 \times 15} = \frac{(Gli_{\text{Com Celobiose}} - Gli_{\text{Sem Celobiose}}) \times 10^6}{180 \times 15} \quad (18)$$

### 3.7.4 Xilanase

A determinação das atividades de xilanases foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992). Em cada tubo de ensaio foram adicionados 0,1 mL de caldo enzimático e 0,9 mL de solução de xilana obtido de madeira de faia (Sigma) a 1 % (m/v) - preparada em tampão citrato de sódio 50 mol/L, pH 4,8, e previamente aquecida a 50 °C. Os tubos foram mantidos em banho a 50 °C, por 5 min. A reação foi interrompida adicionando-se no tubo de ensaio 1,5 mL de DNS e 0,1 mL do extrato enzimático nos tubos do branco da enzima e 0,1 mL de tampão citrato no tubo do branco do reagente. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100 °C por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. Após resfriamento a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 540 nm. Uma 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 19.

$$\text{Xilanase (U/g)} = \frac{AR_{\text{Liberado}} \times 10^6}{150 \times 5} = \frac{(AR_{\text{Amostra}} - AR_{\text{Branco}}) \times 10^6}{150 \times 5} \quad (19)$$

Nessa Equação,  $10^6$  é um fator de conversão que transforma as unidades de massa em micrograma (portanto, mol em micromol), 150 é a massa molar da xilose (g/mol), 5 é o tempo de reação em minutos,  $AR_{\text{Com CMC}}$  é a leitura de açúcares redutores no tubo contendo o substrato, em que ocorreu a reação enzimática e  $AR_{\text{Sem CMC}}$  é a leitura de açúcares redutores no tubo da amostra em branco, com a qual não houve reação enzimática.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização da fibra de sisal

A caracterização da fibra de sisal visou conhecer a sua composição quanto ao como percentual de celulose e hemicelulose e açúcares redutores, que são importantes na síntese por fermentação em estado sólido e submersa das celulases e hemicelulases, bem como, variáveis que afetam o processo de fermentação em estado sólido: pH, umidade e granulometria. Os resultados da caracterização estão expressos na Tabela 8.

**Tabela 8** – Composição da fibra de sisal.

Parâmetros analisados	Fibra de sisal <i>in natura</i>
Umidade (b.u.) (%)	8,21±0,28
Cinzas (%)	2,40±0,16
pH	4,34±0,08
AR (%)	0,32±0,04
Extrativos (%)	7,22±0,06
Lignina Insolúvel (%)	11,08±0,02
Alfacelulose (%)	58,40±0,94
Hemicelulose (%)	15,21±2,13

A umidade encontrada para a fibra de sisal foi de 8,21 %, maior que a umidade encontrada por Lima *et al.* (2013) que foi de 5,70 % para o mesmo material desta pesquisa. Para utilizar a fibra de sisal como substrato para produção de enzimas por FES, é necessário a adequação do teor de umidade, para estabelecer uma atividade de água adequada ao desenvolvimento do microrganismo. Sendo assim foi necessário a adição de água no substrato para o desenvolvimento do *Trichoderma reesei*.

Quanto ao teor de cinzas da fibra de sisal, o valor encontrado foi de 2,40 %. Este valor foi próximo ao encontrado por Lima *et al.* (2013) que caracterizou a fibra de sisal e encontrou valor de 2,10 % e maior que o encontrado por Martin *et al.* (2009) que foi de 1,5 %.

O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. O valor de pH encontrado neste trabalho para o extrato aquoso da fibra de sisal foi de 4,34. Geralmente, os fungos preferem pH entre 4,5 e 5,0 (SANTOS *et al.*,

2005). Assim o pH do extrato aquoso da fibra de sisal pode vir a promover a produção de enzimas sem necessidade do ajuste do pH.

A quantidade de açúcares redutores presente na fibra de sisal foi de 0,32 %. Esta quantidade de açúcares foi suficiente para o crescimento inicial dos microrganismos. Lins (2012) encontrou valor de açúcares redutores de 0,21 % no pedúnculo de caju usado na produção de celulase por fermentação em estado sólido.

A porcentagem de extrativos presentes na fibra de sisal (7,22 %) foi semelhante a porcentagem encontrada nas amostras de bagaço de caju lavado (7,60 %) (LINS, 2012).

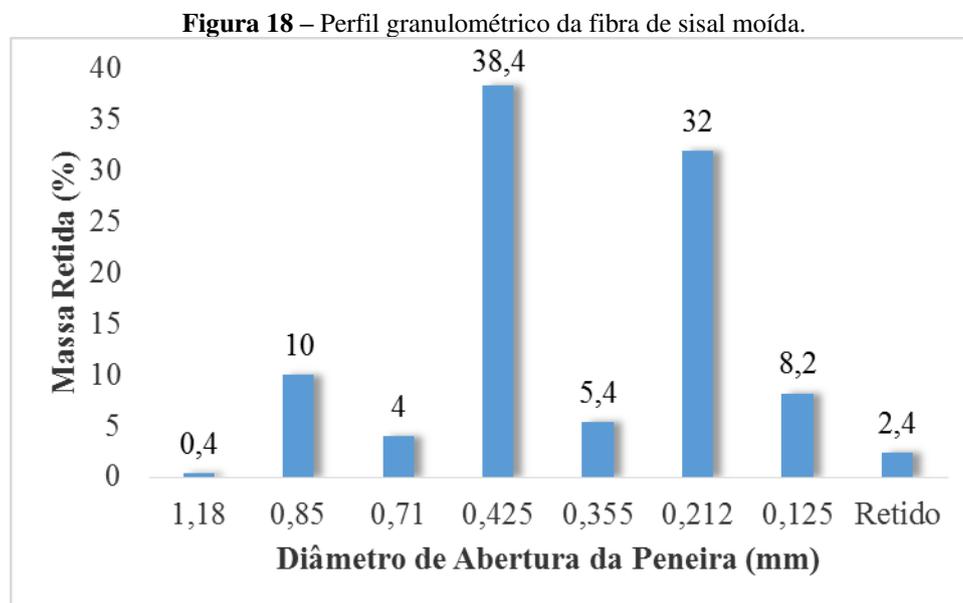
O percentual de lignina encontrado para a fibra de sisal (11,08 %) foi maior que o encontrado por Lima *et al.* (2013) que foi de 5,80 % e semelhante o resultado obtido por Martin *et al.* (2009) que foi de 11,04 % para a fibra de sisal.

Avaliando-se o teor de alfa celulose encontrado para a fibra de sisal (58,40 %) observa-se a presença da fonte indutora para produção de celulase. O valor encontrado neste trabalho foi bem superior ao encontrado por Lima *et al.* (2013) na fibra de sisal que foi de 48,80 %. Esta diferença é devido ao teor de celulose variar de acordo com a idade da planta. O valor de alfa celulose encontrado neste trabalho é superior aos valores de celulose total de alguns resíduos industriais, como o bagaço de cana-de-açúcar com 46,62 % (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA *et al.*, 2011) e a palha de sorgo com 34 % de celulose total (HERRERA *et al.*, 2004). Lima *et al.* (2013) encontraram valor de celulose total de 52,8 % para fibra de sisal e Martin (1998) encontrou valor de 75,20 %.

Para hemicelulose da fibra de sisal foi obtido valor de 15,21 %, o qual foi maior que o encontrado por Martin (1998) que foi de 13,87 %, menor que o valor encontrado por Lima *et al.* (2013) que foi de 19,3 % e maior que o valor encontrado por Martin *et al.* (2009) que foi de 10,3 % para fibra de sisal.

A caracterização da fibra de sisal demonstrou que este é um substrato com potencial para ser utilizado na fermentação para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, principalmente por apresentar um percentual de alfacelulose (58,40 %) e hemicelulose (15,21 %) satisfatórios, já que esses componentes são fontes de carbono indutor dessas enzimas.

A Figura 18 ilustra a distribuição granulométrica da fibra de sisal após moagem mecânica.



A caracterização física com relação à morfologia do substrato é essencial, sobretudo, quanto ao tamanho e a porosidade, visto que estas propriedades governam a área superficial acessível ao microrganismo (SANTOS *et al.*, 2005).

A moagem mecânica do material lignocelulósico é classificada como um tratamento físico que aumenta a área de superfície exposta ao microrganismo. Como pode ser observado pela distribuição granulométrica, a fibra de sisal apresenta a maioria (70,4 %) das suas partículas com um diâmetro de 0,425 e 0,212 mm, o que corresponde as peneiras de 35 e 65 mesh. Segundo Mitchell; Berovic e Krieger (2000), o tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio. Partículas com tamanhos menores que 1 mm a 1 cm tem sido frequentemente usadas em FES.

Aplicando a equação de Sauter obteve-se um diâmetro médio de 0,28 mm para as partículas de fibra de sisal. Que foi o diâmetro do material utilizado no processo fermentativo.

A Tabela 9 ilustra os dados da composição de AR e proteína da fibra de sisal e do farelo de trigo usados como substrato e fonte indutora nas fermentações e produção das enzimas.

**Tabela 9** - Composição de AR e proteína da fibra de sisal e do farelo de trigo.

Componentes (%)	Teor	
	Fibra de sisal	Farelo de Trigo
AR	0,32 ± 0,00	1,43 ± 0,00
Proteína	2,87 ± 0,00	18,42 ± 0,00

Os teores de açúcar redutor e proteína encontrados na fibra de sisal e no farelo de trigo, 0,32 e 2,87 % para o sisal e 1,43 e 18,42 % para o farelo de trigo, foram semelhantes aos observados por Lins (2017) que encontrou valores de açúcares redutores de 0,20 e teor de proteína de 2,63 % no sorgo sacarino e 1,50 de açúcar redutor e 17,84 % de proteína no farelo de trigo, usados na produção de enzimas por fermentação em estado sólido.

O uso de farelo de trigo justifica-se devido à alta produtividade de celulases e xilanases obtidas em fermentações realizadas com esse substrato. Esse material apresenta-se como fonte de carbono e nitrogênio de fácil acesso sendo, portanto, considerado na literatura como o substrato ideal.

#### 4.2 Isotermas de dessorção de umidade

Foram realizadas isotermas de dessorção dos substratos usados nos ensaios de fermentação, sendo estes compostos por sisal sem adição de farelo de trigo (T1), sisal + 25 % de farelo de trigo (T2) e sisal + 50 % de farelo de trigo (T3).

De acordo com Reid e Fennema (2010), as curvas do teor de umidade de equilíbrio ( $U_{eq}$ ) em função da atividade de água ( $a_w$ ), chamadas de isotermas de dessorção de umidade, são úteis para determinar o conteúdo de umidade necessário ao crescimento do microrganismo de interesse durante um processo, essas isotermas relacionam o teor de massa de água por unidade de massa de matéria seca (umidade de equilíbrio) no substrato e a sua atividade de água.

As isotermas de dessorção foram realizadas no presente trabalho para conhecer o comportamento do substrato que foi utilizado na fermentação como também determinar em que umidade de equilíbrio, para os diversos substratos, deve-se começar a

fermentação, para garantir que a atividade de água seja ideal para o processo de fermentação e o crescimento microbiano.

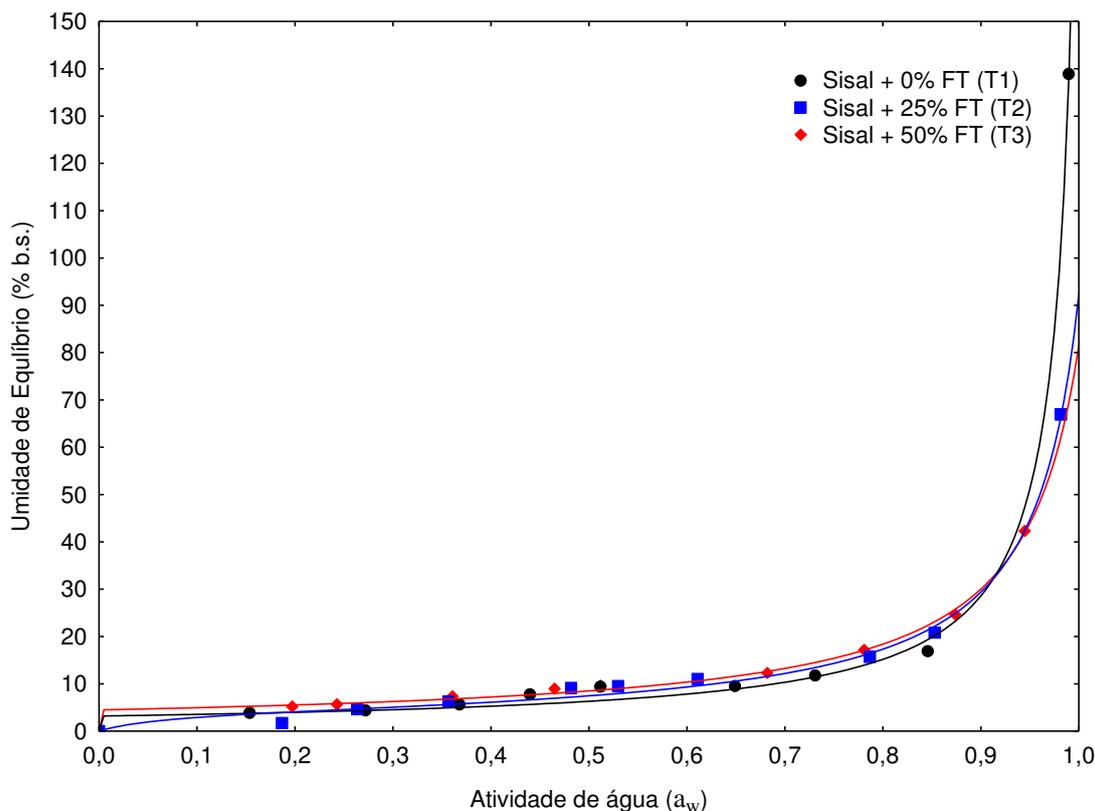
Tem-se na Tabela 10 os resultados dos valores experimentais da umidade de equilíbrio da fibra de sisal e da fibra de sisal com farelo de trigo e suas respectivas atividades de água.

**Tabela 10** - Valores experimentais da umidade de equilíbrio ( $U_{eq}$ ) da fibra de sisal e fibra de sisal + farelo de trigo em função da atividade de água ( $a_w$ ).

T1 (Sisal + 0% FT)		T2 (Sisal + 25% FT)		T3 (Sisal + 50% FT)	
$a_w$	$U_{eq}$ (% b.s.)	$a_w$	$U_{eq}$ (% b.s.)	$a_w$	$U_{eq}$ (% b.s.)
0,990	138,8737	0,990	66,8649	0,945	42,3052
0,846	16,8627	0,853	20,7589	0,874	24,6958
0,731	11,7577	0,787	15,677	0,781	17,1488
0,649	9,5407	0,611	11,045	0,682	12,2875
0,512	9,3815	0,53	9,544	0,512	9,6033
0,440	7,8129	0,482	9,1475	0,465	9,0068
0,368	5,5922	0,357	6,3154	0,361	7,3600
0,272	4,3883	0,264	4,6162	0,243	5,6873
0,154	3,8796	0,187	1,6992	0,197	5,1893

Na Figura 19 são apresentadas as isotermas de dessorção de umidade dos substratos usados durante a fermentação, representando os valores da umidade de equilíbrio (b.s) em função da atividade de água, ajustadas com o modelo de GAB.

**Figura 19** - Isotermas de dessorção de umidade a 28 °C dos substratos usados durante a fermentação: Sisal + 0% FT (T1), Sisal + 25% FT (T2) e Sisal + 50% FT (T3).



Pode-se perceber a taxa de dessorção é mais alta no início do processo, mostrando uma maior facilidade de redução da umidade. Verifica-se que as umidades de equilíbrio aumentam com o aumento da atividade de água ( $a_w$ ).

A isoterma do sisal incrementado com farelo trigo não apresentou diferença quando comparado ao substrato sem o farelo de trigo, mostrando que a diferença na composição química não influenciou no formato da isoterma.

O teor de água é um fator bastante significativo no processo fermentativo. Elevada atividade de água causa a diminuição da porosidade do substrato, diminuindo assim a troca de gases. Por outro lado, uma baixa atividade de água pode acarretar diminuição do crescimento microbiano e consequente menor produção de enzima (SANTOS *et al.*, 2012).

Segundo Biachi, Moraes e Capalbo (2014), cada microrganismo tem um nível de  $a_w$  mínimo para que possa efetuar suas atividades metabólicas e os fungos apresentam uma  $a_w$  mínima de 0,7 para o seu crescimento. Nas isotermas de dessorção da Figura 19

observa-se que a partir de uma umidade de 18 % (b.s.) que corresponde a 67 % (b.u.) os substratos apresentam atividade de água suficiente para o crescimento de fungos.

Nas umidades estudadas (60, 70 e 80 % b.u.) a umidade de 60 % (b.u.) obteve os melhores valores de atividade enzimática nos processos de fermentação, o que indica que a falta de água disponível para esta umidade, visualizada pelo menor crescimento do microorganismo *Trichoderma reesei* comparada com as demais, ocasionou um estresse e o levou a clivar a matéria prima que possui carbono para sobreviver produzindo assim uma maior quantidade de enzimas.

Em geral, no processo de fermentação em estado sólido, o teor de umidade varia entre 30-85 % e a atividade de água típica vai de 0,40-0,90. Estas condições podem simular aquelas encontradas na natureza, possibilitando o processo de fermentação (ROBINSON e NIGAM, 2003).

Na Tabela 11 temos as informações dos parâmetros de ajuste das isotermas de dessorção dos substratos (28 °C) para o modelo de GAB, obtidos por meio de regressão não-linear.

**Tabela 11** - Parâmetros de ajuste das isotermas de dessorção dos substratos para o modelo de GAB.

Substrato	$X_m$	C	K	$R^2$
Sisal + 0 % FT (T1)	3,1959	6,4015	0,9868	0,9993
Sisal + 25 % FT (T2)	4,1700	15,9444	0,9549	0,9975
Sisal + 50 % FT (T3)	4,4883	8,6470	0,9449	0,9986

Os dados exibidos na Tabela 10 demonstram que os valores da umidade da monocamada ( $X_m$ ) variaram de 3,19 a 4,48 % (b.s.), com pouco aumento com o aumento do teor de farelo de trigo a fibra de sisal.

O parâmetro C, que é função das interações entre os sítios ativos do produto e as moléculas de água, teve seu maior valor, de 15,94, no substrato com 75 % de Sisal + 25 % FT. Quanto ao parâmetro K do modelo de GAB, que representa o fator de correlação das propriedades das moléculas na multicamada com relação ao volume do líquido, apresentou valores em torno de 0,9.

Para Brunauer as isotermas são classificadas em classe II:  $0 < K \leq 1$  e  $C > 2$  e classe III:  $0 < K \leq 1$  e  $0 \leq C \leq 2$ . As isotermas de dessorção da fibra de sisal e da fibra

de sisal com farelo de trigo são curvas do tipo II, seguindo a classificação de Brunauer (BRUNAUER *et al.*, 1938), com  $0 < K \leq 1$  e  $C > 2$ .

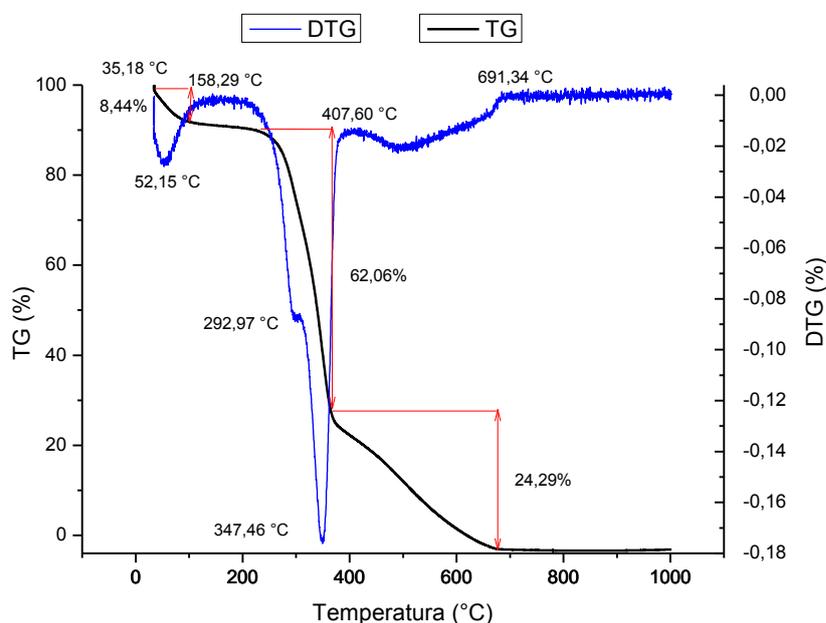
O modelo de GAB (Guggenheim-Anderson-deBoer) forneceu um bom ajuste para os dados experimentais, fato demonstrado a partir dos valores do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), acima de 0,99.

#### 4.2.1 Estudo térmico (TG/DTG)

As análises termogravimétricas TG e DTG foram utilizadas para o estudo do comportamento térmico da amostra de fibra de sisal *in natura*.

Na Figura 20 estão as curvas termogravimétricas TG/DTG para a fibra de sisal. As curvas termogravimétricas TG representam a perda de massa, em porcentagem, em função da temperatura, enquanto as curvas DTG correspondem à derivada primeira das curvas TG e apresentam a variação da massa em relação ao tempo, registrada em função da temperatura.

**Figura 20** - TG e DTG da fibra de sisal *in natura*.



Analisando as curvas TG/DTG da fibra de sisal presente na Figura 20, observa-se uma primeira etapa de perda de massa ocorrendo entre 35,18 – 103,51 °C, sendo característico da desidratação do material, indicando 8,44 % de perda de massa. A segunda etapa de perda de massa ocorre entre 103,51 – 369,97 °C, caracterizando a

decomposição da hemicelulose com 62,06 % de perda de massa. Na terceira etapa do gráfico ocorre a decomposição da celulose e lignina entre 369,97 – 676,53 °C, indicando 24,29 % de perda de massa.

Santos *et al.* (2011) reportaram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho para a TG e DTG do bagaço da cana-de-açúcar. O primeiro estágio de perda de massa apresentou temperaturas inferiores a 100 °C, relativas à evaporação gradual da água contida no bagaço. Houve um segundo estágio, entre 275 e 305 °C, atribuído à decomposição da hemicelulose, o terceiro, entre 300 e 325 °C, atribuído à decomposição da celulose e um quarto estágio acima de 400 °C atribuído à decomposição da lignina.

A Tabela 12, a seguir, apresenta os dados obtidos a partir das curvas de TG e DTG (Figura 18).

**Tabela 12** - Dados obtidos a partir das curvas de TG e DTG da fibra de sisal.

Amostra	Etapas	Intervalo de temperatura (°C)	Temperatura de pico (°C)	Perda de massa (%)	Atribuições
Fibra de sisal	1	35,18 – 103,51	158,29	8,44	Desidratação
	2	103,51 – 369,97	407,60	62,06	Decomposição da hemicelulose
	3	369,97 – 676,53	691,34	24,29	Decomposição da celulose e lignina

O somatório das perdas de massas (%), apresentados na Tabela 12, revelam um total de 94,79 %, restando 5,21 % de resíduo.

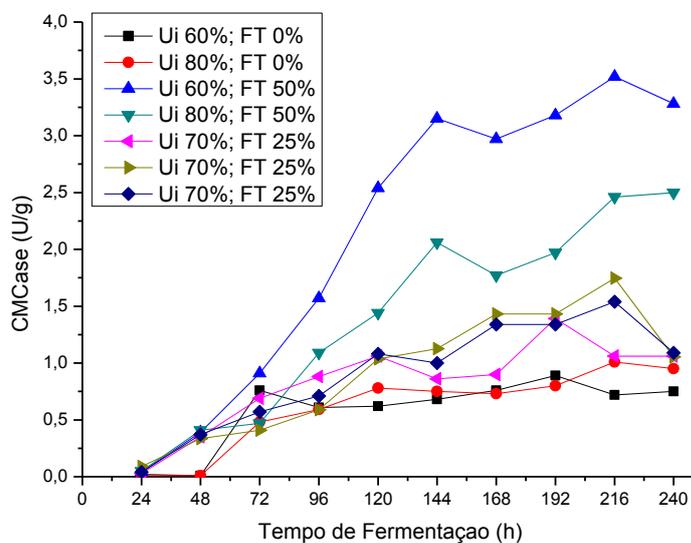
### 4.3 Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES)

Nos próximos itens são apresentados e discutidos os resultados provenientes das cinéticas do processo fermentativo em estado sólido da fibra de sisal e análise estatística do planejamento experimental realizado.

#### 4.3.1 Perfil cinético da produção de CMCase por FES

No gráfico da Figura 21 temos o esboço geral da produção de CMCase para os ensaios do planejamento experimental detalhado na Tabela 4.

**Figura 21** - Cinética enzimática da CMCCase por fermentação em estado sólido da fibra de sisal.



O acompanhamento cinético da produção das CMCases, observado na Figura 21, demonstra que a atividade máxima dessa enzima, 3,52 U/g, foi atingida com 216 horas de fermentação para o ensaio 3 no qual o substrato da fibra de sisal apresenta 60 % de umidade inicial e 50 % (m/m) de incremento de farelo de trigo.

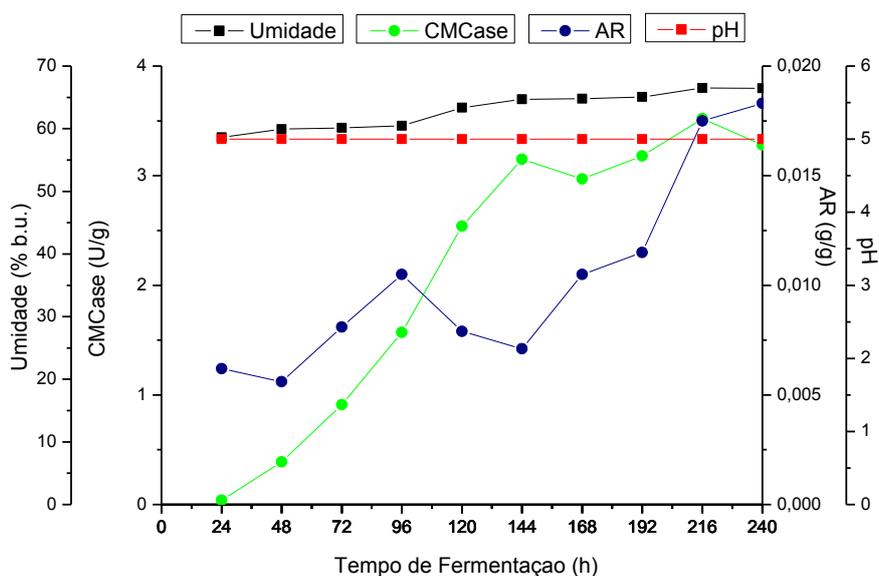
O ensaio 4 com 80 % de umidade e 50 % de farelo de trigo apresentou atividade máxima de CMCCase em 240 horas de fermentação de 2,50 U/g. Valor inferior ao encontrado no ensaio 3 com 60 % de umidade e a mesma porcentagem de farelo de trigo (50 %).

Nos ensaios 1 e 2, sem adição de farelo de trigo, a atividade enzimática variou de 0,01 a 1,01 U/g.

Nos ensaios 5, 6 e 7 com 70 % de umidade e 25 % de farelo de trigo a maior atividade de CMCCase foi no ensaio 6 (1,74 U/g) em 216 horas de fermentação.

Na Figura 22 está o acompanhamento cinético do processo de produção de CMCCase por FES com *Trichoderma reesei* em fibra de sisal, para o Ensaio 3, com 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo. Ensaio no qual obteve-se o maior pico de atividade enzimática dentre os ensaios do planejamento.

**Figura 22** – Perfil cinético do processo de produção de CMCCase por fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* em fibra de sisal com 60% umidade e 50% de farelo de trigo (Ensaio 3).



A partir da Figura 22, observa-se a ocorrência de atividade enzimática já com 48 horas de cultivo, a partir de 48 horas de fermentação, observa-se uma produção crescente na atividade de CMCCase.

A umidade permaneceu praticamente constante no substrato com 60 % de umidade, com valores entre 58 a 60 % durante 66 horas de fermentação, havendo um aumento após este tempo, tendo-se no final uma umidade de 66,47 %. Para fermentação em estado sólido essa umidade constante é importante para manter o crescimento do microrganismo e seu metabolismo (PANDEY, 2003). O pH do meio apresentou um comportamento geral constante no decorrer das 240 horas de fermentação.

O maior pico de atividade enzimática de CMCCase utilizando 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo ocorre as 216 horas de fermentação, atingindo 3,52 U/g. Lins e Conrado (2015), trabalhando com o bagaço de caju lavado, sem adição de farelo de trigo, utilizando o *Trichoderma reesei* LCB 48 como agente da fermentação, obtiveram uma atividade máxima de 0,71 U/g em 238 horas de fermentação.

Salomão *et al.* (2019) ao avaliarem a produção de celulasas pelo fungo filamentoso *Trichoderma koningii* por fermentação em estado sólido usando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar em sua forma natural, nas condições operacionais de temperatura de 28 °C e umidade de 50 % obtiveram atividade de 8,20 UI/g em 72 h de fermentação.

Andrade *et al.* (2018) ao avaliar a produção de CMCase por FES usando como substrato o bagaço de cajá *in natura* a partir do *Bacillus* sp, a melhor atividade apresentada foi 0,5314 U/mL na temperatura de incubação de 30 °C em 120 horas de fermentação, valor superior ao encontrado neste trabalho 0,47 U/mL no ensaio 3, que obteve a maior atividade enzimática de CMCase.

Lins (2017) ao estudar a produção de CMCase em sorgo sacarino incrementado com farelo de trigo obteve um pico de 7,55 U/g em 72 horas de fermentação.

Amorim (2016) ao estudar a produção da enzima CMCase em resíduo de acerola, verificou a maior atividade enzimática de 1,25 U/g em 216 horas de fermentação, valor inferior ao encontrado neste trabalho.

#### 4.3.1.1 Análise da produção de CMCase utilizando a metodologia de superfície de resposta

Para a análise estatística do planejamento experimental, foi selecionado o tempo onde foram observadas as atividades máximas de CMCase, como pode ser visto na Figura 21. Baseado nesse pressuposto foi montada a Tabela 13 com os dados do planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> com 3 pontos centrais e tendo como variável resposta as atividades de CMCase no tempo de 216 horas de fermentação.

**Tabela 13** - Ensaio do planejamento experimental para a produção de CMCase em fibra de sisal por fermentação em estado sólido.

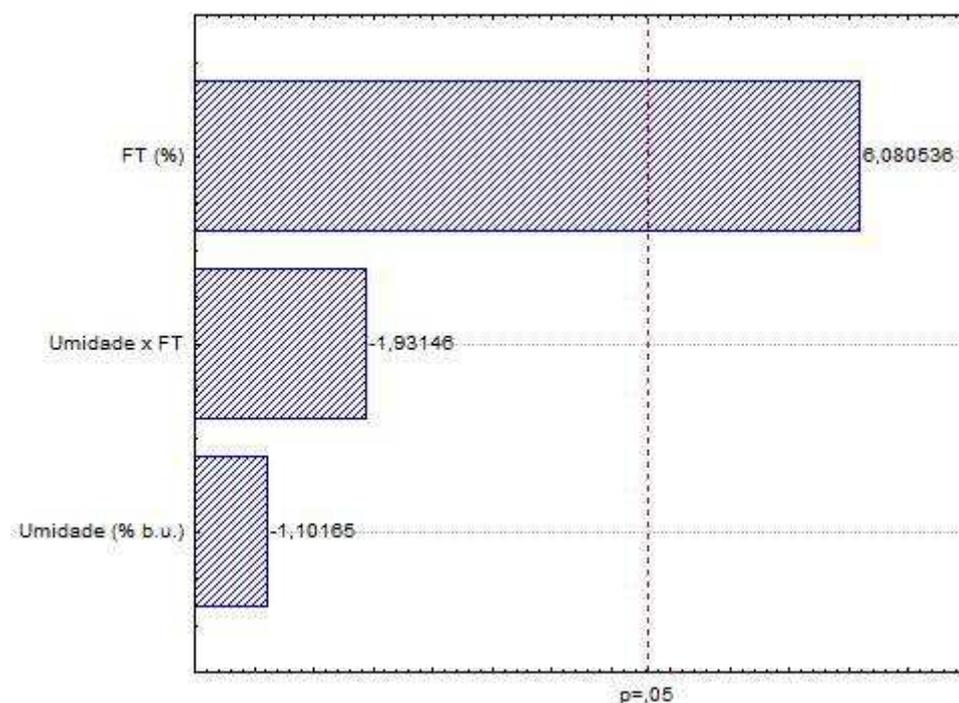
Ensaio	CMCase		
	U/g	U/gds	U/MI
1	0,72	1,05	0,09
2	1,01	1,48	0,13
3	3,52	5,17	0,47
4	2,46	6,61	0,33
5	1,06	1,55	0,14
6	1,74	2,55	0,23
7	1,54	2,26	0,20

Na Tabela 13, observa-se que a atividade com 216 horas de fermentação variou de 0,72 a 3,52 U/g de CMCase. As menores atividades foram obtidas nos ensaios compostos apenas por fibra de sisal (ensaio 1 e 2) e as maiores atividades foram obtidas

com o sisal suplementado com o nível mais alto de farelo de trigo (50 %), obtendo 3,52 U/g.

A Figura 23 apresenta o gráfico de Pareto mostrando a influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima CMCCase e o efeito da interação dessas variáveis.

**Figura 23** - Influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima CMCCase por fermentação em estado sólido.



Em análise do gráfico de Pareto observa-se que o aumento da atividade enzimática de CMCCase é decorrente principalmente do aumento do teor de farelo de trigo no substrato de sisal. Quando passamos do nível -1 (menor % de FT) para o nível +1 (maior % de FT), ocorreu o aumento da atividade enzimática da CMCCase, a umidade e as interações entre a umidade e teor de farelo de trigo não foram estatisticamente significativas a 95 % de confiança, não influenciando a produção da enzima CMCCase.

Na Tabela 14 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade de CMCCase do planejamento experimental.

**Tabela 14** - Análise de variância para a atividade de CMCase obtida por FES.

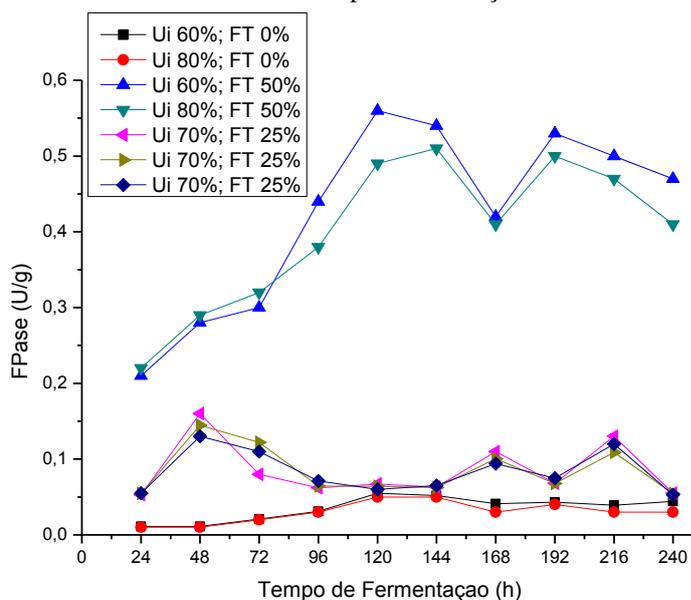
Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	5,119	3	1,706	0,86
Resíduo	0,640	3	0,213	
Total	5,760	6		
R <sup>2</sup> (%)	88,87			
	F <sub>tabelado</sub> = 9,28		F <sub>calculado</sub> = 8,01	

GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios; Teste F - (F<sub>calculado</sub> / F<sub>tabelado</sub>).

O teste F observado na Tabela 14, mostra que o modelo não foi significativo ao nível de 95 % de confiança, pois a razão de F<sub>calculado</sub> por F<sub>tabelado</sub> foi igual a 0,86, estando abaixo de 1,0 (RODRIGUES; IEMMA, 2005), e o coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) foi de 88,87 %.

#### 4.3.2 Perfil cinético da produção de FPase por FES

O acompanhamento da cinética de produção de FPase dos ensaios do planejamento experimental, detalhado na Tabela 4, está disposto na Figura 24.

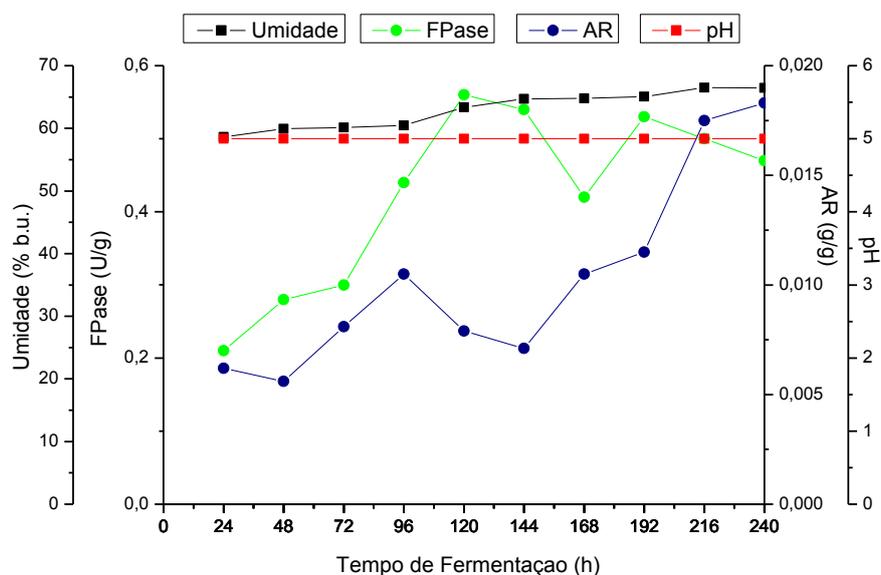
**Figura 24** - Cinética enzimática da FPase por fermentação em estado sólido da fibra de sisal.

Na Figura 24 temos o perfil cinético da produção de FPase, nota-se que os ensaios 3 e 4 compostos por fibra de sisal e 50 % de farelo de trigo, com 60 e 80 % de umidade respectivamente, se destacaram frente aos demais ensaios do planejamento. Os demais ensaios apresentaram atividade máxima de FPase inferiores a 0,2 U/g.

Os ensaios 5, 6 e 7 com 70 % de umidade inicial e 25 % de farelo de trigo apresentaram o mesmo perfil cinético, demonstrando reprodutibilidade nos dados.

O perfil cinético do Ensaio 3 está disposto na Figura 25, detalhando os parâmetros avaliados durante a fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* em fibra de sisal e 50 % de farelo de trigo, com 60 % de umidade.

**Figura 25** – Perfil cinético do processo de produção de FPase por fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* em fibra de sisal com de 60% umidade e 50% de farelo de trigo (Ensaio 03).



A FPase semelhante a CMase, apresentou atividade após as 24 horas de fermentação. Observa-se o pico de atividade em 120 horas com 0,56 U/g.

Durante todo o processo de fermentação a umidade e pH mantiveram-se praticamente constantes.

Florencio *et al.* (2016), em fermentação semissólida (FSS) e submersa (FSM) usando o bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor como fonte indutora, obtiveram 0,04 (FSS) e 0,02 U/mL (FSM) de FPase ao usar o *Aspergillus niger*. Resultados

inferiores aos encontrados nesse trabalho (0,074 U/mL) no ensaio 3 com 60 % de umidade e 50 % de FT.

Andrade *et al.* (2018) ao avaliar a produção de FPase por FES usando como substrato o bagaço de cajá *in natura* a partir do *Bacillus* sp na temperatura de cultivo de 30 °C, a atividade enzimática atingiu 1,2 U/mL às 96 horas. Valor superior ao encontrado neste trabalho.

#### 4.3.2.1 Análise da produção de FPase utilizando a metodologia de superfície de resposta

As análises estatísticas foram feitas a partir do tempo no qual o *Trichoderma reesei* produziu o valor máximo de atividade enzimática FPase, 120 horas. Na Tabela 15 observa-se o planejamento experimental 2<sup>2</sup> com 3 pontos centrais e a variável resposta, atividade enzimática FPase.

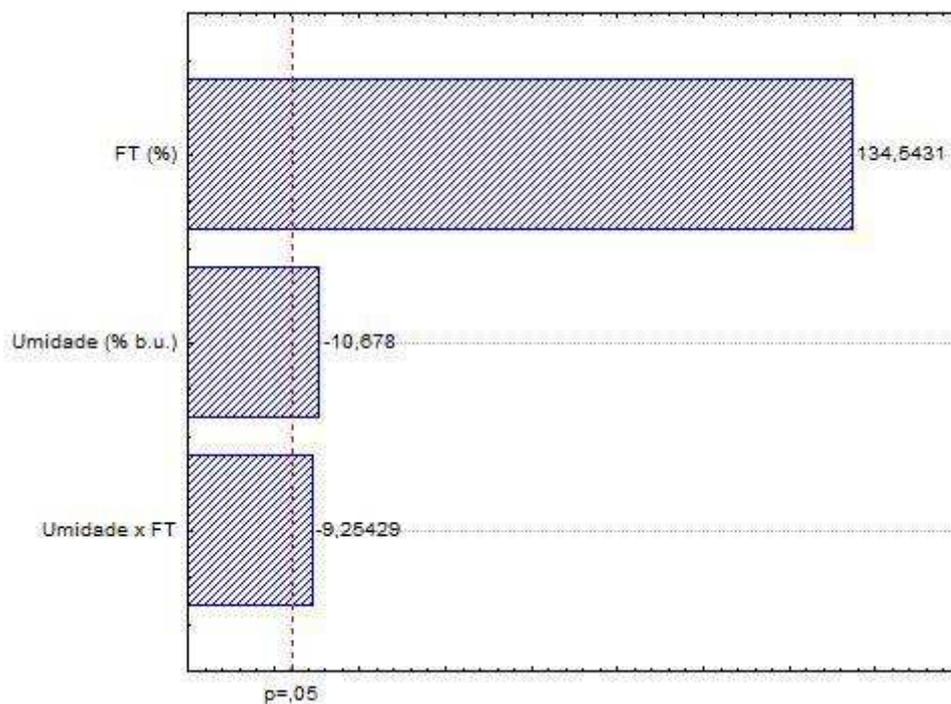
**Tabela 15** - Ensaios do planejamento experimental para a produção de FPase em fibra de sisal por fermentação em estado sólido.

Ensaios	FPase		
	U/g	U/gds	U/mL
1	0,05	0,07	0,006
2	0,05	0,07	0,006
3	0,56	0,82	0,074
4	0,49	0,72	0,065
5	0,06	0,08	0,008
6	0,06	0,08	0,008
7	0,06	0,08	0,008

Analisando a Tabela 15, observa-se que a atividade de FPase, apresentou uma variação entre 0,05 e 0,56 U/g. Os menores valores de atividade foram encontrados nos ensaios sem fonte indutora de farelo trigo e o maior valor de atividade no Ensaio 03 contendo o maior teor de farelo de trigo (50 %) e menor nível de umidade do planejamento (60 %).

A Figura 26 apresenta o gráfico de Pareto mostrando a influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo da produção da enzima FPase e o efeito das variáveis.

**Figura 26** - Influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo da produção da enzima FPase por fermentação em estado sólido.



De acordo com o gráfico de Pareto percebe-se que tanto as variáveis independentes, teor de farelo de trigo e umidade inicial, como a interação entre elas apresentaram influência estatisticamente significativa sobre a variável de estudo, FPases, sendo a variável com maior influência a porcentagem de farelo de trigo, que influencia o processo, quando passamos do nível -1 para o nível +1 da % de FT, ocorre o aumentando da atividade enzimática da enzima FPase, já a umidade e a interação entre elas influencia, quando passamos do nível -1 do para o nível +1 da % de Umidade, ocorre uma diminuição da atividade enzimática da enzima FPase. De acordo com os estudos realizados, conclui-se que o farelo de trigo é uma fonte potencial para a produção da enzima FPase.

A análise de variância para os dados de produção de FPase do planejamento experimental estão expostos na Tabela 16.

**Tabela 16** - Análise de variância para a atividade de FPase obtida por FES.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	0,225	3	0,075	0,28
Resíduo	0,086	3	0,029	
Total	0,312	6		
R <sup>2</sup> (%)	92,20			
	F <sub>tabelado</sub> = 9,28		F <sub>calculado</sub> = 2,59	

GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios; Teste F - (F<sub>calculado</sub> / F<sub>tabelado</sub>).

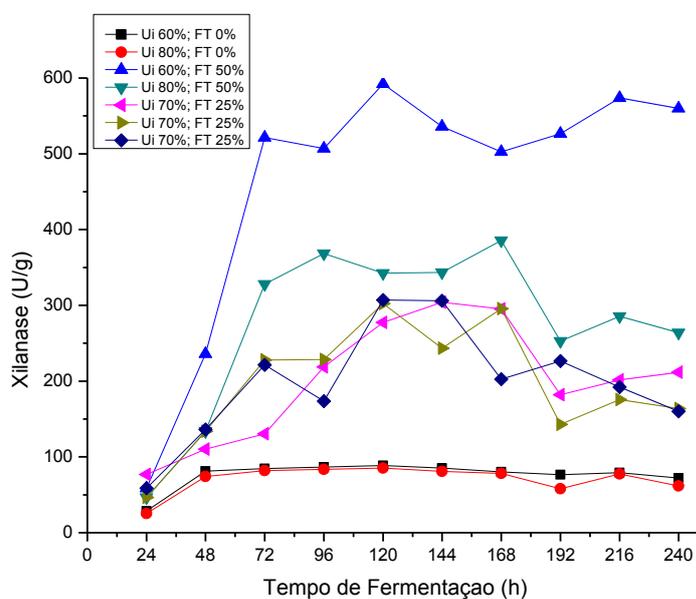
Segundo Rodrigues e Iemma (2005) para valores de F maior que 1,0 o modelo estatístico é considerado significativo, indicando que há relação entre as variáveis independentes e dependentes.

O teste F observado na Tabela 16, mostra que a regressão não foi significativa, ao nível de 95 % de confiança, pois a razão de F<sub>calculado</sub> por F<sub>tabelado</sub> foi igual a 0,28, estando abaixo de 1,0 (RODRIGUES e IEMMA, 2005), indicando que não houve relação entre as variáveis independentes do planejamento. O coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) foi de 92,20 %

#### 4.3.3 Perfil cinético da produção de xilanase por FES

A Figura 27 apresenta o acompanhamento da cinética de produção de xilanase dos ensaios do planejamento experimental, detalhado na Tabela 4.

**Figura 27** - Cinética enzimática da xilanase por fermentação em estado sólido da fibra de sisal.



Na Figura 27 observa-se que o Ensaio 3, composto por sisal e 50 % de farelo de trigo, com 60 % de umidade, se sobressai quando comparado com os demais, semelhante ao reportado para as outras enzimas estudadas. A atividade máxima observada para xilanase foi de 592,24 U/g em 120 horas de fermentação, no entanto, um outro ponto de maior produtividade foi encontrado em 216 horas de fermentação, com valor de 573,55 U/g de xilanase.

Nota-se pela Figura 27 que os ensaios contendo farelo de trigo nas proporções 25 e 50 % apresentaram melhores resultados que os ensaios 1 e 2 contendo apenas fibra de sisal. Evidenciando o farelo de trigo como uma importante fonte indutora da produção de xilanase.

Os valores da atividade de xilanase nos Ensaios 1 e 2 sem farelo de trigo variaram de 25,26 a 88,61 U/g. O Ensaio 4 com 50 % de farelo de trigo e 80 % de umidade obteve atividade máxima de xilanase de 385,60 U/g em 168 horas de fermentação.

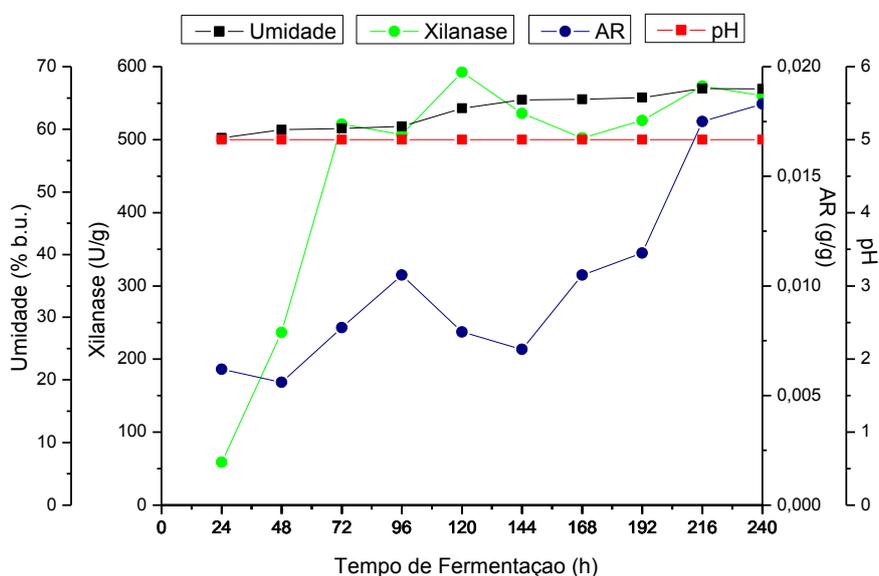
Os Ensaios 5, 6 e 7 com 25 % de farelo de trigo e 70 % de umidade apresentou atividade máxima da enzima xilanase de 307,01 U/g no ensaio 7.

Gomes *et al.* (2016) ao estudar a produção de xilanase por fermentação em estado sólido com *Aspergillus fumigatus* usando bagaço cana e farelo de trigo (1:1)

obteve atividade máxima de xilanase de 574 U/g após 24h de fermentação, valor inferior ao encontrado neste trabalho (592,24 U/g), ao usar apenas o bagaço de cana a atividade máxima de xilanase obtida foi de 72 U/g após 96 h de fermentação, confirmando o aumento da produção da enzima com o uso do farelo de trigo.

O perfil cinético do Ensaio 3 para a produção de xilanase, está disposto na Figura 28, detalhando os parâmetros, pH, umidade e AR avaliados durante a fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* em fibra de sisal e 50 % de farelo de trigo, com 60 % de umidade.

**Figura 28** – Perfil cinético do processo de produção de Xilanase por fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* em fibra de sisal com de 60% umidade e 50% de farelo de trigo (Ensaio 03).



O pico de atividade para xilanase foi obtido com 120 horas de fermentação, com pH 5 (592,24 U/g). Lins (2017) obteve atividade máxima para xilanase de 577,41 U/g em 216 horas de fermentação e pH 6,1 em fermentação em estado sólido usando como substrato o sorgo sacarino incrementado com farelo de trigo.

Marques *et al.*, (2018) ao estudarem a produção da enzima xilanase por fermentação em estado sólido usando como substrato uma mistura (1:1) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo por 7 dias, a 28 °C, com a umidade inicial de 70 % e o fungo *Trichoderma viridae* PAJ 01 (5 discos miceliais como inóculo), a atividade da enzima foi 351,74 U/g, valor inferior ao encontrado neste trabalho 592,24 U/g.

Lopez-Ramirez *et al.* (2018) ao estudarem a produção de xilanase usando *Trichoderma harzianum* por fermentação em estado sólido usando serragem de pinho como substrato com umidade inicial de 65 %, avaliaram o efeito da temperatura de incubação (26, 28, 30, 32, 34 e 36 °C), a produção máxima de xilanase ( $100 \pm 8$  U/g) foi obtido nas temperaturas de 30 a 34 °C, que foi cerca de 2 vezes maior que os valores encontrados em 26 e 28 °C.

Souza *et al.* (2018) estudaram a produção da enzima xilanase, durante a FES do bagaço de cana-de-açúcar utilizando microrganismo *Penicilium roqueforti* e obtiveram atividade máxima de 19,95 UI/g, nas condições operacionais de 65 % de umidade, temperatura de 25 °C e tempo de fermentação de 72 h. Valor muito abaixo do encontrado neste trabalho.

Almeida *et al.* (2012) ao estudarem a produção de xilanase incrementada com farelo de trigo no bagaço de cana-de-açúcar usando o *Trichoderma reesei* RUT C-30 observaram que o uso do farelo de trigo melhorou os níveis de atividade enzimática.

Terrasán e Carmona (2015), ao estudarem a produção de xilanases por fermentação em estado sólido e *Penicillium janczewskii* no bagaço de cevada observaram atividade enzimática máxima de 370,00 U/g, valor inferior ao encontrado neste trabalho.

Gomes *et al.* (2012) ao estudarem a produção de xilanase com o fungo filamentosos selvagem AF22 em bagaço de cana-de-açúcar a atividade enzimática foi de 66,96 U/g, ao incrementar o bagaço de cana-de-açúcar com farelo de trigo a atividade enzimática aumentou para 788,81 U/g.

#### **4.3.3.1 Análise da produção de xilanase utilizando a metodologia de superfície de resposta**

A variável resposta, xilanase, da Tabela 17 foi obtida a partir do tempo no qual o *Trichoderma reesei* produziu o valor máximo de atividade enzimática de Xilanase, 120 horas.

**Tabela 17** - Ensaio do planejamento experimental para a produção de xilanase em fibra de sisal por fermentação em estado sólido.

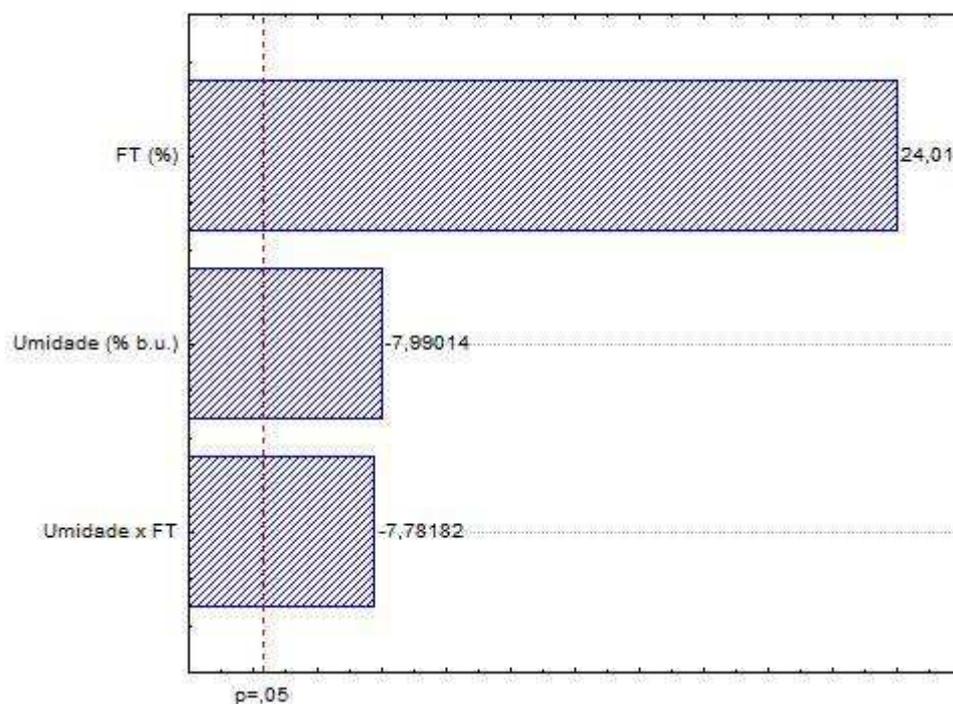
Ensaio	Xilanase		
	U/g	U/gds	U/mL
1	88,61	130,30	11,81
2	85,31	125,45	11,37
3	592,24	870,94	78,96
4	342,40	503,52	45,65
5	277,56	408,17	37,00
6	302,40	444,70	40,32
7	307,01	451,48	40,93

A atividade de xilanase variou entre 85,31 e 592,24 U/g, sendo este o maior valor obtido com 120 horas de fermentação.

Observa-se na Tabela 17 que ao incrementar o substrato de sisal com a fonte indutora farelo de trigo em 25 e 50 % a atividade da xilanase teve um aumento substancial.

A Figura 29 apresenta o gráfico de Pareto mostrando a influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima xilanase e o efeito das variáveis.

**Figura 29** - Influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima xilanase por fermentação em estado sólido.



De acordo com o gráfico de Pareto o teor de farelo de trigo, a umidade inicial e a interação entre essas variáveis são significativas em um nível de 95 % de confiança. O percentual de FT provoca um efeito positivo no processo, ou seja, ao passarmos do nível -1 para o nível +1 há um aumento na atividade enzimática. A umidade provoca um efeito inverso no processo, ou seja, ao passarmos do nível -1 para o nível +1, há um decréscimo na atividade enzimática e em decorrência desse efeito, a interação umidade e FT, que também é significativo a 95 % de confiança, provoca o mesmo efeito no processo fermentativo para a atividade enzimática em xilanase. De acordo com os estudos realizados, observa-se que o farelo de trigo é uma fonte importante e imprescindível para se obter maiores valores da atividade em xilanases.

A análise de variância para os dados de produção de xilanase do planejamento experimental estão expostos na Tabela 18.

**Tabela 18** - Análise de variância para a atividade de xilanase obtida por FES.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	175889,18	3	58629,72	17,39
Resíduo	1089,63	3	363,21	
Total	176978,8	6		
R <sup>2</sup> (%)	99,38			
	F <sub>tabelado</sub> = 9,28		F <sub>calculado</sub> = 161,42	

GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios; Teste F - (F<sub>calculado</sub> / F<sub>tabelado</sub>).

Os dados foram analisados em nível estatístico de 95 % de confiança apresentando um coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) de 99,38 %.

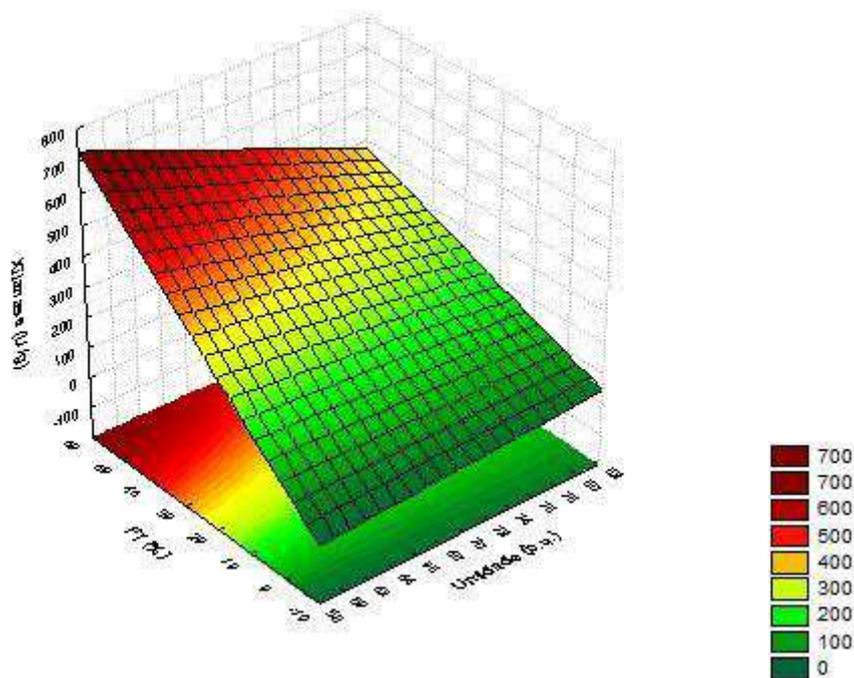
Segundo Rodrigues e Iemma (2005) para valores de F maior que 1,0 o modelo estatístico é considerado significativo, indicando que há relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que um modelo não seja apenas estatisticamente significativo, mas também útil para fins preditivos, o valor 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 17,39, indicando que há relação entre as variáveis independentes e dependentes do planejamento.

A Equação 20 descreve o modelo de primeira ordem previsto para atividade de xilanase em função das variáveis codificadas, Umidade inicial ( $U_i$ ) e teor de Farelo de trigo (FT), de acordo com o planejamento experimental da Tabela 3. O modelo foi obtido a partir dos coeficientes da regressão linear com 95 % de confiança.

$$\text{Xilanase (U/g)} = 285,07 - 63,2850U_i + 190,1800FT - 61,6550U_i \times FT \quad (20)$$

Sendo o modelo da resposta em estudo estatisticamente significativo, pode-se construir a superfície de resposta da atividade enzimática da xilanase em função das variáveis umidade inicial e do teor de farelo de trigo, apresentada na Figura 30.

**Figura 30** - Superfície de resposta para a produção de xilanase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo.

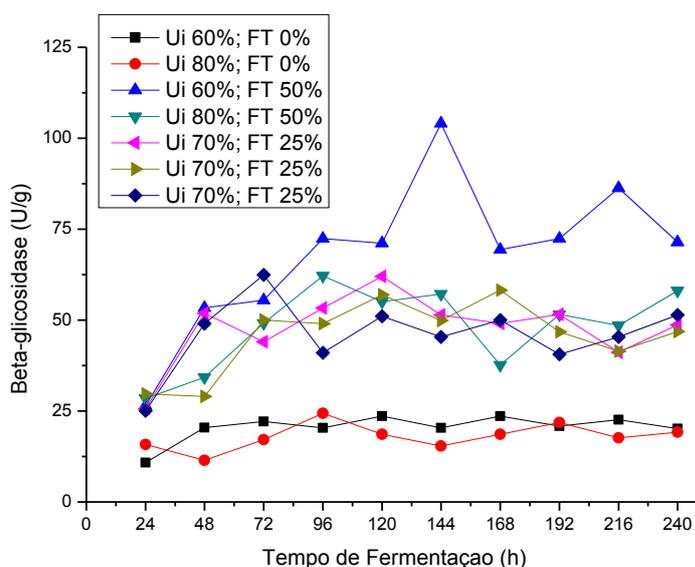


Observa-se na superfície de resposta que nos intervalos estudados, 60 a 80 % de umidade e 0 a 50 % de farelo de trigo, as maiores atividades enzimáticas ocorreram para os teores mais altos de farelo de trigo, e para os menores níveis de umidade, indicando que a diminuição da umidade e o aumento da fonte adicional de farelo de trigo propicia um aumento na atividade enzimática da enzima xilanase.

#### 4.3.4 Perfil cinético da produção de $\beta$ -glicosidase por FES

A Figura 31 apresenta o acompanhamento da cinética de produção de  $\beta$ -glicosidase dos ensaios do planejamento experimental, detalhado na Tabela 4.

**Figura 31** - Cinética enzimática da  $\beta$ -glicosidase por fermentação em estado sólido da fibra de sisal.



Na Figura 31 observa-se o comportamento cinético da  $\beta$ -glicosidase no decorrer das 240 horas de fermentação. A enzima apresenta uma atividade crescente a partir de 24 horas, chegando a um pico de atividade de 104,10 U/g em 144 horas e 86,28 U/g em 216 horas no Ensaio 3 com 50 % de farelo de trigo e 60 % de umidade, ensaio que apresentou o maior valor de atividade.

Nos Ensaios 1 e 2 sem farelo de trigo a atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase variou de 10,8 a 24,38 U/g. O ensaio 4, com 50 % de farelo de trigo e 80 % de umidade apresentou valores semelhantes aos reportados para os ensaios do ponto central (5, 6 e 7) com 25 % de farelo de trigo e umidade de 70 %, variando de 25,62 a 62,18 U/g.

Há um grande aumento de atividade nos ensaios contendo farelo de trigo em relação aos ensaios 1 e 2 com substrato composto apenas por sisal.

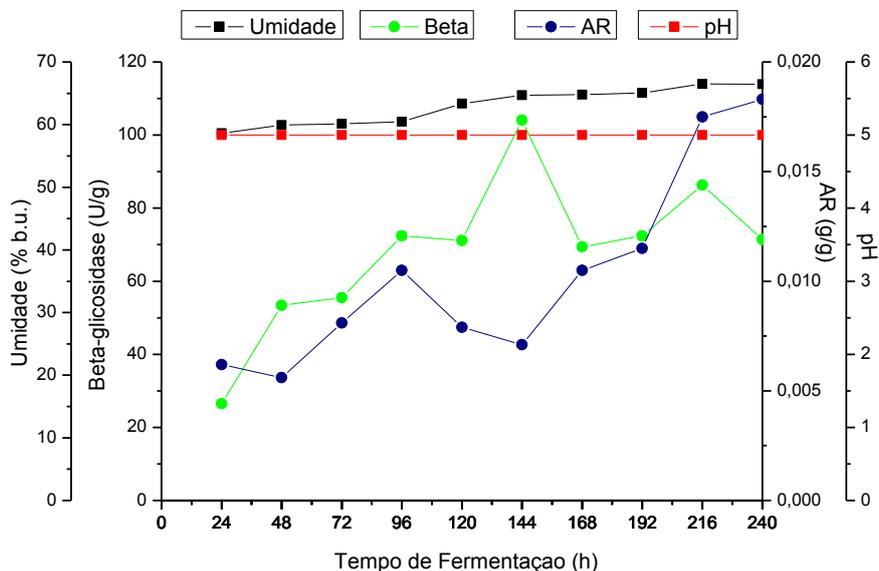
Marques *et al.*, (2018) ao estudarem a produção da enzima  $\beta$ -glicosidase por fermentação em estado sólido usando como substrato uma mistura (1:1) de bagaço de

cana-de-açúcar e farelo de trigo por 7 dias, a 28 °C, com a umidade inicial de 70 % e o fungo *Trichoderma viridae* PAJ 01 (5 discos miceliais como inóculo), a atividade da enzima foi, 2,97, U/g, valor inferior ao encontrado neste trabalho (104,10 U/g).

Scholl *et al.* (2015) ao estudarem a produção de  $\beta$ -glicosidase com o fungo filamentosso *Penicillium echinulatum* S1M29 em capim elefante (50 %) e farelo de trigo (50 %) pré-tratado por explosão a vapor e submetido a lavagem, em fermentação em estado sólido a maior atividade da  $\beta$ -glicosidase foi de 148,90 U/g obtida no 5° dia de cultivo (96 horas), valor superior ao encontrado neste trabalho, que pode estar associado ao uso do pré-tratamento por explosão a vapor.

O perfil cinético do Ensaio 3 para a produção de  $\beta$ -glicosidase está disposto na Figura 32, detalhando os parâmetros, pH, umidade e AR avaliados durante a fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* em fibra de sisal e 50 % de farelo de trigo, com 60 % de umidade.

**Figura 32** – Perfil cinético do processo de produção de  $\beta$ -glicosidase por fermentação em estado sólido com *Trichoderma reesei* em fibra de sisal com de 60% umidade e 50% de farelo de trigo (Ensaio 03).



A umidade permaneceu praticamente constante no substrato com 60% de umidade, com valores entre 58 a 60 % durante 66 horas de fermentação, havendo um aumento após este tempo, tendo-se no final uma umidade de 66,47 %. Para fermentação em estado sólido essa umidade constante é importante para manter o crescimento do

microrganismo e seu metabolismo (PANDEY, 2003). O pH do meio apresentou um comportamento geral constante no decorrer das 240 horas de fermentação.

#### 4.3.4.1 Análise da produção de $\beta$ -glicosidase utilizando a metodologia de superfície de resposta

Para a análise estatística dos dados foram utilizadas as atividades enzimáticas de  $\beta$ -glicosidase obtidas com 144 horas de fermentação, para todos os ensaios do planejamento fatorial  $2^2$  com 3 pontos centrais.

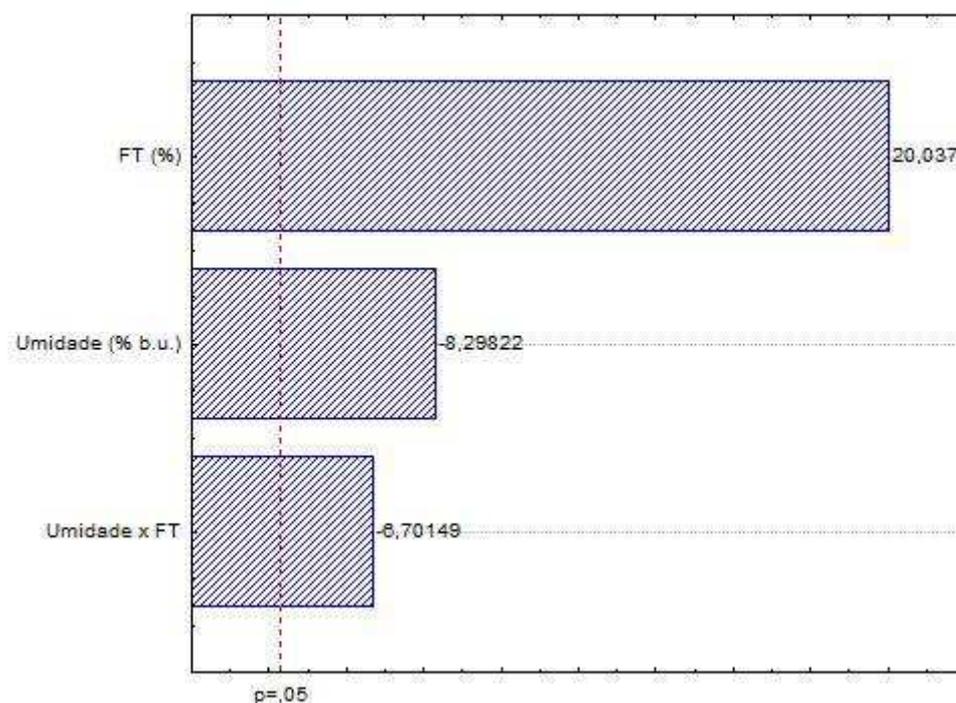
**Tabela 19** - Ensaios do planejamento experimental para a produção de  $\beta$ -glicosidase em fibra de sisal por fermentação em estado sólido.

Ensaios	$\beta$ -glicosidase		
	U/g	U/gds	U/mL
1	20,37	29,95	2,71
2	15,37	22,60	2,04
3	104,1	153,08	13,88
4	57,13	84,01	7,61
5	51,43	84,45	7,65
6	49,88	73,35	6,65
7	45,40	59,41	5,38

Na Tabela 19, observa-se a atividade de  $\beta$ -glicosidase, com 144 horas de fermentação, dos ensaios do planejamento. A atividade enzimática variou entre 15,37 a 104,1 U/g (2,04 e 13,88 U/mL). O pico de atividade de 104,1 U/g foi obtido com umidade de 60 % e teor de farelo de trigo de 50 % adicionado a fibra de sisal.

A Figura 33 apresenta o gráfico de Pareto mostrando a influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima  $\beta$ -glicosidase e o efeito das variáveis.

**Figura 33** - Influência da umidade inicial e do teor de farelo de trigo da produção da enzima  $\beta$ -glicosidase por fermentação em estado sólido.



Observa-se que, as variáveis teor de farelo de trigo, umidade e a interação entre elas apresentaram efeito significativo a 95 % de confiança. O percentual do teor de farelo de trigo FT, influencia de forma positiva no processo, ou seja, ao passar do nível -1 para o nível +1 há um aumento na atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase, a umidade e a interação entre essas variáveis apresentam influência inversa, ou seja, ao passar do nível -1 para o nível +1 há uma redução na atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase, ou seja, o aumento desses fatores acarreta numa diminuição da variável resposta, atividade enzimática.

A análise de variância para os dados de produção da enzima  $\beta$ -glicosidase do planejamento experimental estão expostos na Tabela 20.

**Tabela 20** - Análise de variância para a atividade de  $\beta$ -glicosidase obtida por FES.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	5052,52	3	1684,17	3,74
Resíduo	145,63	3	48,54	
Total	5198,15	6		
R <sup>2</sup> (%)	99,21			
	F <sub>tabelado</sub> = 9,28		F <sub>calculado</sub> =34,69	

GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios; Teste F - (F<sub>calculado</sub> / F<sub>tabelado</sub>).

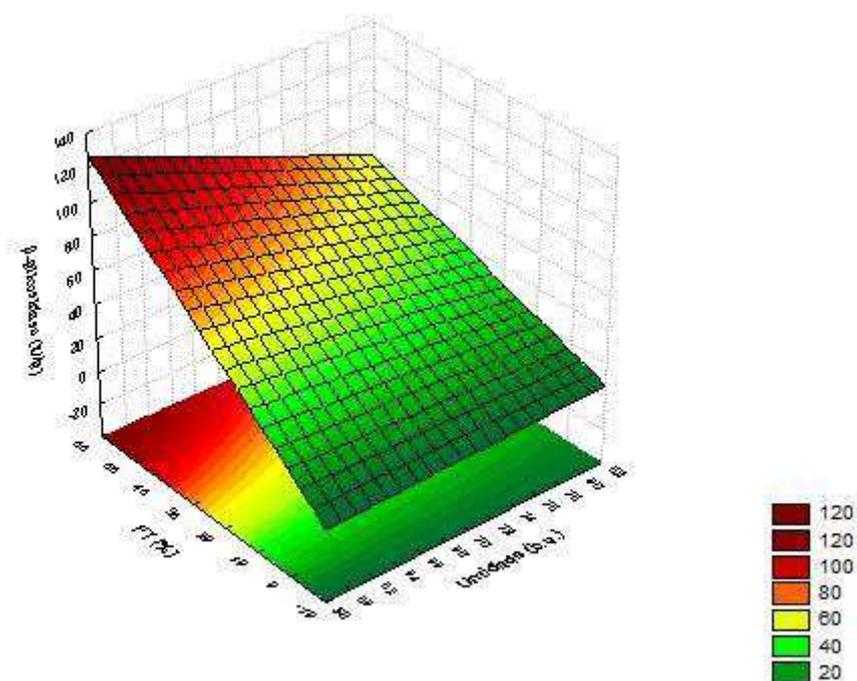
De acordo com a Tabela 20, observa-se que a análise de variância da produção da enzima  $\beta$ -glicosidase foi significativa ao nível de 95 % de confiança, pois a razão de F<sub>calculado</sub> por F<sub>tabelado</sub> foi igual a 3,74, estando acima de 1,0 (RODRIGUES e IEMMA, 2005), e o coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) foi de 99,21 %.

A Equação 21 descreve o modelo de primeira ordem previsto para atividade de  $\beta$ -glicosidase em função das variáveis codificadas, Umidade inicial (Ui) e teor de Farelo de trigo (FT), de acordo com o planejamento experimental da Tabela 3. O modelo foi obtido a partir dos coeficientes da regressão linear com 95 % de confiança.

$$\beta\text{-glicosidas e (U/g)} = 137,81 - 25,4925U_i + 63,8725FT - 27,9925U_i \times FT \quad (21)$$

Sendo o modelo da resposta estatisticamente significativo, pode-se construir a superfície de resposta da atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase em função das variáveis independentes, umidade inicial e teor de farelo de trigo, Figura 34.

**Figura 34** - Superfície de resposta para a produção de  $\beta$ -glicosidase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo.



A superfície de resposta apresentada na Figura 34 mostra que nos intervalos estudados, 60 a 80 % de umidade e 0 a 50 % de farelo de trigo, as maiores atividades enzimáticas de  $\beta$ -glicosidase ocorreram para os teores mais altos de farelo de trigo, e para os menores níveis de umidade.

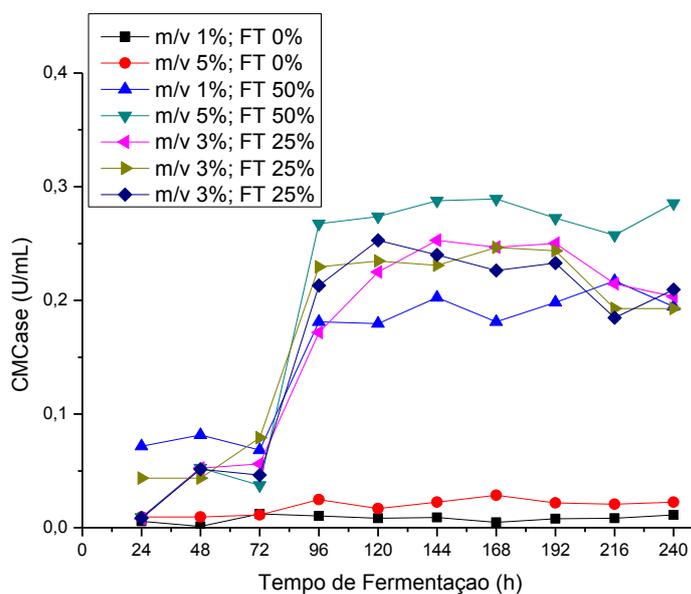
#### 4.4 Produção de enzimas por fermentação submersa

Nos próximos itens são apresentados e discutidos os resultados provenientes das cinéticas da fermentação submersa da fibra de sisal e análise estatística do planejamento experimental realizado.

##### 4.4.1 Perfil cinético da produção de CMCase por fermentação submersa

No gráfico da Figura 35 temos o esboço geral da produção de CMCase para os ensaios do planejamento experimental detalhado na Tabela 6.

**Figura 35** - Cinética enzimática da CMCCase por fermentação submersa da fibra de sisal.



Como pode ser observado na Figura 35, a atividade máxima da enzima CMCCase foi de 0,28 U/mL em 168 horas de fermentação no ensaio 4 com 5 % (m/v) de substrato e 50 % de farelo de trigo.

Os ensaios 5, 6 e 7 com 3 % de substrato e 25 % de farelo de trigo apresentou atividade máxima de CMCCase em 120 horas de fermentação (0,25 U/mL). Os valores da atividade de CMCCase nos ensaios do ponto central variaram de 0,00 a 0,25 U/mL, apresentando valores maiores que os encontrados no ensaio 3 com 1 % de substrato e 50 % de farelo de trigo.

Os ensaios 3 e 4 com 1 e 5 % de substrato, respectivamente e 50 % de farelo de trigo apresentaram atividade máxima de CMCCase (0,28 U/mL), no ensaio 4 com 5 % de substrato, mostrando que quanto maior a porcentagem de substrato, maior a atividade enzimática.

Nos ensaios 1 e 2, sem adição de farelo de trigo, a atividade enzimática de CMCCase variou de 0,00 a 0,02 U/mL, valores menores que os encontrados nos ensaios com 25 e 50 % de farelo de trigo.

Li *et al.* (2018) ao estudarem a produção das enzimas celulase por *Aspergillus foetidus*, obtiveram atividade máxima de celulase de 0,58 U/mL, no 3º dia de fermentação, usando como substrato farelo de soja em fermentação submersa.

Salomão (2017) estudando a produção de celulases a partir do fungo *Trichoderma koningii* utilizando bagaço de cana-de-açúcar *in natura* por FSM na temperatura de 28 °C e concentração de bagaço de cana-de-açúcar de 2,7 %, obteve atividade de CMCase de 3,13 U/mL em 72 h, valor superior ao encontrado neste trabalho.

#### 4.4.1.1 Análise da produção de CMCase utilizando a metodologia de superfície de resposta

Para a análise estatística do planejamento experimental, foi selecionado o tempo onde foram observadas as atividades máximas de CMCase, como pode ser visto na Figura 33. Baseado nesse pressuposto foi montada a Tabela 21 com os dados do planejamento experimental fatorial  $2^2$  com 3 pontos centrais e tendo como variável resposta as atividades de CMCase no tempo de 168 horas de fermentação.

**Tabela 21** - Ensaios do planejamento experimental para a produção de CMCase em fibra de sisal por fermentação submersa.

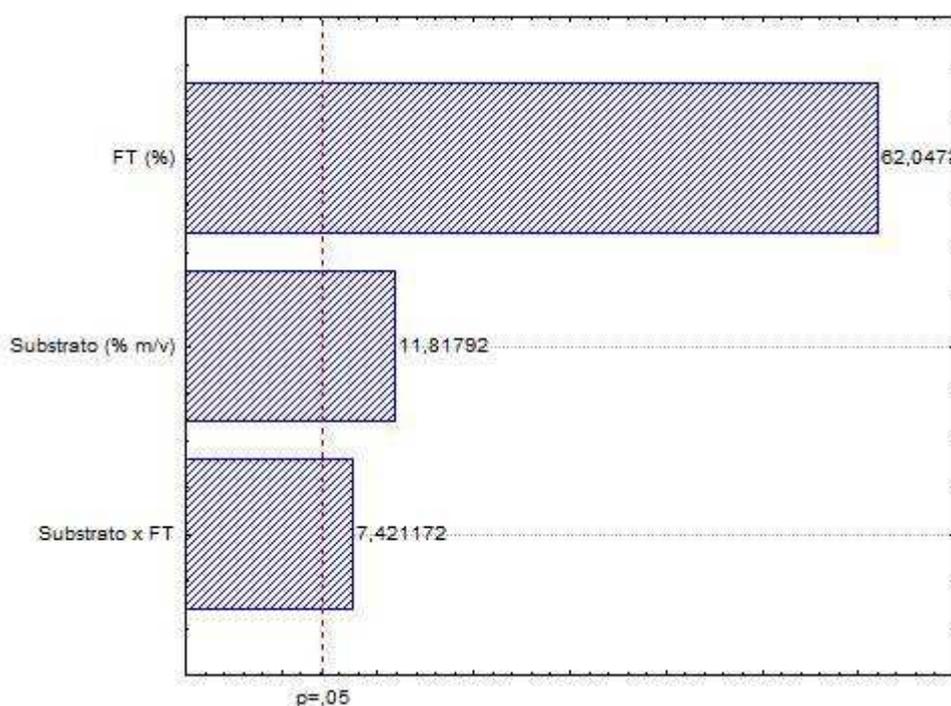
Ensaios	CMCase	
	U/g	U/mL
1	0,4756	0,0047
2	0,5707	0,0285
3	18,1272	0,1812
4	5,784	0,2892
5	8,1444	0,2468
6	8,1312	0,2464
7	7,1412	0,2164

Na Tabela 21, observa-se que a atividade com 168 horas de fermentação variou de 0,0 a 0,28 U/mL de CMCase. As menores atividades foram obtidas nos ensaios compostos apenas por fibra de sisal (ensaio 1 e 2) e as maiores atividades foram obtidas com o sisal suplementado com farelo de trigo. Esse material apresenta-se como fonte de

carbono e nitrogênio de fácil acesso sendo, portanto, considerado na literatura como o substrato ideal.

A Figura 36 apresenta o gráfico de Pareto mostrando a influência da % m/v de substrato e do teor de farelo de trigo na produção da enzima CMCase e o efeito da interação dessas variáveis.

**Figura 36** - Influência da % de substrato e do teor de farelo de trigo na produção da enzima CMCase por fermentação submersa.



Em análise do gráfico de Pareto observa-se que a % m/v de substrato e o teor de farelo trigo e a interação entre as variáveis influenciaram o aumento da atividade enzimática de CMCase. O % FT foi a variável que mais influenciou no processo. Quando passamos do nível -1 (menor % FT) para o nível +1 (maior % FT), ocorre o aumento da atividade enzimática da enzima CMCase.

Na Tabela 22 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade de CMCase do planejamento experimental.

**Tabela 22** - Análise de variância para a atividade de CMCase obtida por FSm.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	0,053	3	0,018	0,28
Resíduo	0,021	3	0,007	
Total	0,075	6		
R <sup>2</sup> (%)	81,40			
	F <sub>tabelado</sub> = 9,28		F <sub>calculado</sub> = 2,57	

GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios; Teste F - (F<sub>calculado</sub> / F<sub>tabelado</sub>).

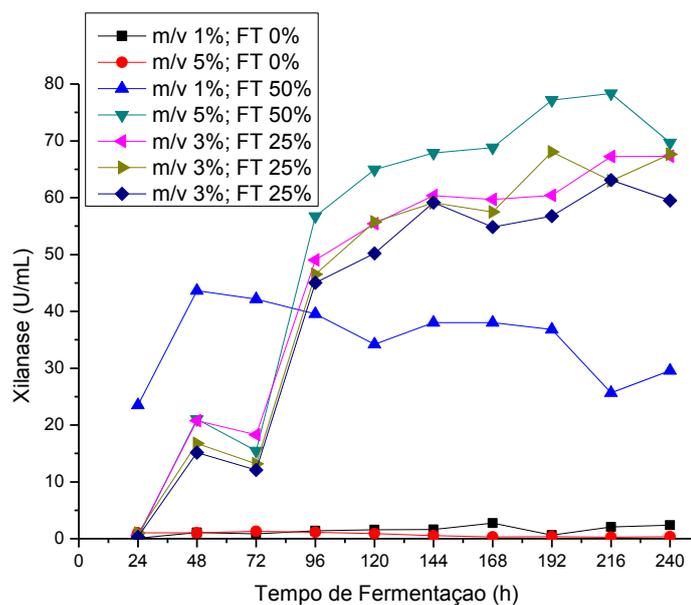
Os dados foram analisados em nível estatístico de 95 % de confiança apresentando um coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) de 81,40 %, explicando 81,40 % da variabilidade dos dados.

Segundo Rodrigues e Iemma (2005) para valores de F maior que 1,0 o modelo estatístico é considerado significativo. Neste caso para a produção de CMCase o modelo não foi significativo ao nível de 95 % de confiança, uma vez que o valor de F foi de 0,28.

#### 4.4.2 Perfil cinético da produção de xilanase por fermentação submersa

A Figura 37 apresenta o acompanhamento da cinética de produção de xilanase dos ensaios do planejamento experimental, detalhado na Tabela 6.

**Figura 37** - Cinética enzimática da xilanase por fermentação submersa da fibra de sisal.



Na Figura 37 observa-se que o Ensaio 4, composto por 5 % de substrato e 50 % de farelo de trigo, se sobressai quando comparado com os demais, semelhante ao reportado para as outras enzimas estudadas. A atividade máxima observada para xilanase foi de 78,34 U/mL em 216 horas de fermentação, no entanto, um outro ponto de maior atividade foi encontrado em 192 horas de fermentação, com valor de 77,19 U/mL de xilanase.

Os valores de xilanase reportados no ensaio 4 (5 % de substrato e 50 % de FT) foram superiores aos valores encontrados no ensaio 3 com 50 % de farelo de trigo e 1 % de substrato.

Nota-se pela Figura 35 que os ensaios contendo farelo de trigo nas proporções 25 e 50 % apresentaram melhores resultados que os ensaios 1 e 2 contendo apenas fibra de sisal. Evidenciando o farelo de trigo como uma importante fonte indutora da produção de xilanase.

Os valores da atividade de xilanase nos Ensaios 1 e 2 sem farelo de trigo variaram de 0,08 a 2,74 U/mL e nos Ensaios 5, 6 e 7 com 25 % de farelo de trigo variaram de 0,32 a 68,02 U/mL.

Li *et al.* (2018) ao estudarem perfis de pH (4, 5, 6 e 6,5) na produção da enzima xilanase por *Aspergillus foetidus*, obtiveram atividade máxima em pH 4 para xilanase,

de 98,9 U/mL, no 3º dia de fermentação, usando como substrato farelo de soja em fermentação submersa, valor superior ao encontrado neste trabalho (78,34 U/mL).

Silva *et al.* (2018) estudaram a produção da enzima xilanase, utilizando *Trichoderma reesei* QM9414 no processo de FSm, utilizando o bagaço de cana-de-açúcar sob pré-tratamento alcalino em 240h de fermentação, com concentração de substrato de 3 %, e obtiveram atividade máxima de xilanase de 93,08 U/mL. Valor superior ao encontrado neste trabalho, o uso do pré-tratamento pode ter aumentado a atividade da enzima xilanase.

#### 4.4.2.1 Análise da produção de xilanase utilizando a metodologia de superfície de resposta

A variável resposta, xilanase, da Tabela 23 foi obtida a partir do tempo no qual o *Trichoderma reesei* produziu o valor máximo de atividade enzimática de xilanase, 216 horas.

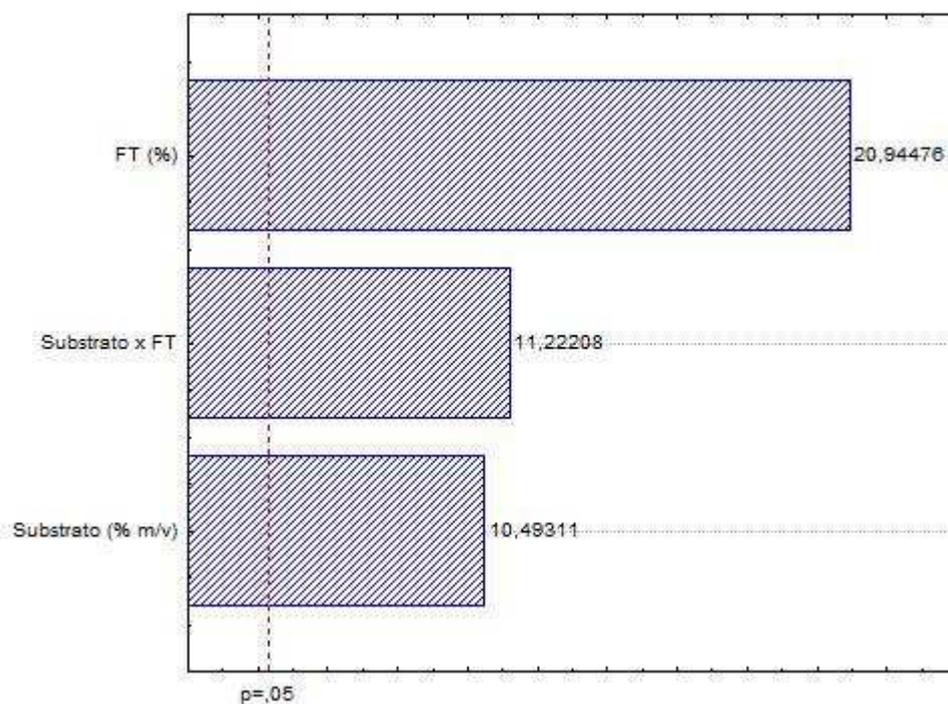
**Tabela 23** - Ensaios do planejamento experimental para a produção de xilanase em fibra de sisal por fermentação submersa.

Ensaio	Xilanase	
	U/g	U/mL
1	205,0137	2,0501
2	5,6232	0,2811
3	2564,4281	25,64428
4	1566,818	78,3409
5	2218,6758	67,2326
6	2078,3466	62,9802
7	2081,6532	63,0804

A atividade de xilanase variou entre 0,28 a 78,34 U/mL, sendo este o maior valor obtido com 216 horas de fermentação.

A Figura 38 apresenta o gráfico de Pareto mostrando a influência da % m/v de substrato e do teor de farelo de trigo na produção da enzima xilanase e o efeito das variáveis.

**Figura 38** - Influência da % de substrato e do teor de farelo de trigo na produção da enzima xilanase por fermentação submersa.



De acordo com o gráfico de Pareto o teor de farelo de trigo, a % m/v de substrato e a interação entre essas variáveis influenciaram na produção da enzima xilanase, influenciando positivamente na obtenção da enzima. O teor de farelo de trigo foi a variável que mais influenciou no processo. Quando passamos do nível -1 (menor % FT) para o nível +1 (maior % FT), ocorre o aumentando da atividade enzimática da enzima xilanase.

Na Tabela 24 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade de xilanase do planejamento experimental.

**Tabela 24** - Análise de variância para a atividade de xilanase obtida por FSM.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	3973,41	3	1324,47	0,17
Resíduo	2467,95	3	822,65	
Total	6441,37	6		
R <sup>2</sup> (%)	81,68			
	F <sub>tabelado</sub> = 9,28		F <sub>calculado</sub> = 1,61	

GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios; Teste F - (F<sub>calculado</sub> / F<sub>tabelado</sub>).

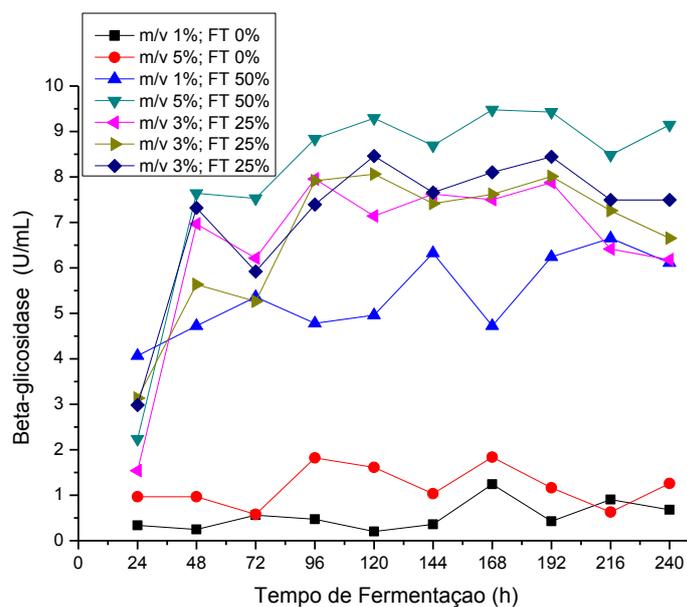
O coeficiente de determinação ou explicação (R<sup>2</sup>) quantifica a qualidade do ajustamento, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Os dados foram analisados em nível estatístico de 95 % de confiança apresentando um coeficiente de determinação de 81,68 %, percentual de variações explicadas pelo modelo.

Segundo Rodrigues e Iemma (2005) para valores de F maior que 1,0 o modelo estatístico é considerado significativo, indicando que há relação entre as variáveis independentes e dependentes. Neste caso para a produção de xilanase o modelo não foi significativo ao nível de 95 % de confiança, uma vez que o valor de F foi de 0,17, indicando que não há relação entre as variáveis independentes e dependentes do processo.

#### 4.4.3 Perfil cinético da produção de $\beta$ -glicosidase por fermentação submersa

A Figura 39 apresenta o acompanhamento da cinética de produção de  $\beta$ -glicosidase dos ensaios do planejamento experimental, detalhado na Tabela 6.

**Figura 39** - Cinética enzimática da  $\beta$ -glicosidase por fermentação submersa da fibra de sisal.



Na Figura 39 observa-se o comportamento cinético da  $\beta$ -glicosidase no decorrer das 240 horas de fermentação. A enzima apresenta uma atividade crescente a partir de 24 horas, atingindo atividade máxima em 168 horas de 9,47 U/mL e em 192 horas de 9,42 U/mL, no Ensaio 4 com 50 % de farelo de trigo e 5 % de substrato, ensaio que apresentou o maior valor de atividade.

O ensaio 4, com 50 % de farelo de trigo e 5 % de substrato apresentou valores acima dos reportados para o ensaio 3 com 50 % de farelo de trigo e 1 % de substrato.

Nos Ensaio 1 e 2 sem farelo de trigo a atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase variou de 0,24 a 1,83 U/mL. Valores inferiores aos observados nos demais ensaios contendo 25 e 50 % de farelo de trigo.

#### 4.4.3.1 Análise da produção de $\beta$ -glicosidase utilizando a metodologia de superfície de resposta

Para a análise estatística dos dados foram utilizadas as atividades enzimáticas de  $\beta$ -glicosidase obtidas com 168 horas de fermentação, para todos os ensaios do planejamento fatorial  $2^2$  com 3 pontos centrais.

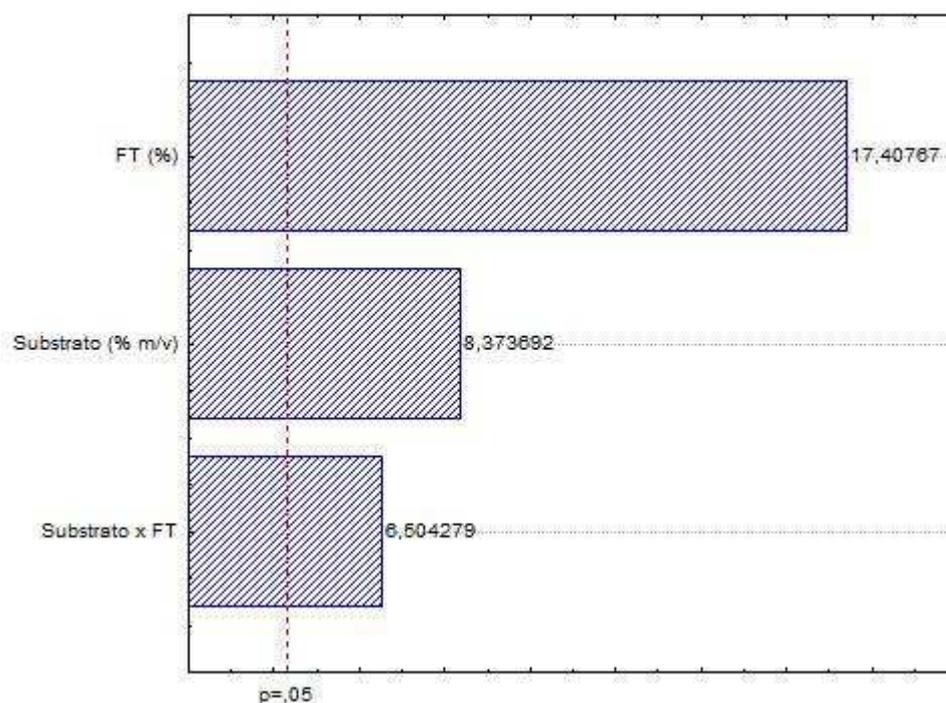
**Tabela 25** - Ensaios do planejamento experimental para a produção de  $\beta$ -glicosidase em fibra de sisal por fermentação submersa.

Ensaios	$\beta$ -glicosidase	
	U/g	U/mL
1	124,20	1,2421
2	36,78	1,8392
3	472,47	4,7247
4	189,53	9,4768
5	247,51	7,5006
6	251,37	7,6174
7	267,39	8,1029

Na Tabela 25, observa-se a atividade de  $\beta$ -glicosidase, com 168 horas de fermentação, dos ensaios do planejamento. A atividade enzimática variou entre 1,24 e 9,47 U/mL). O pico de atividade de 9,47 U/mL foi obtido com 5 % de substrato e teor de farelo de trigo de 50 % adicionado a fibra de sisal.

A Figura 40 apresenta o gráfico de Pareto mostrando a influência da % m/v de substrato e do teor de farelo de trigo na produção da enzima  $\beta$ -glicosidase e o efeito das variáveis.

**Figura 40** - Influência da % de substrato e do teor de farelo de trigo na produção da enzima  $\beta$ -glicosidase por fermentação submersa.



Como pode ser observado no gráfico de Pareto, as variáveis estudadas % m/v de substrato e % de farelo de trigo tiveram influência positiva na produção da enzima  $\beta$ -glicosidase, assim como a interação entre as variáveis. A porcentagem de farelo de trigo (% FT) foi a variável que mais influenciou no processo fermentativo, seguido da concentração de substrato. Quando passamos do nível -1 (menor % FT e menor % m/v) para o nível +1 (maior % FT e maior % m/v), ocorre o aumentando da atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase.

Na Tabela 26 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade de  $\beta$ -glicosidase do planejamento experimental.

**Tabela 26** - Análise de variância para a atividade de  $\beta$ -glicosidase obtida por FSm.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	42,384	3	14,128	0,23
Resíduo	20,250	3	6,750	
Total	62,634	6		
R <sup>2</sup> (%)	77,66			
	F <sub>tabelado</sub> = 9,28		F <sub>calculado</sub> = 2,09	

GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios; Teste F - (F<sub>calculado</sub> / F<sub>tabelado</sub>).

Os dados foram analisados em nível estatístico de 95 % de confiança apresentando um coeficiente de determinação (porcentagem de variação explicada) de 77,66 %. O F<sub>calculado</sub> foi inferior ao F<sub>tabelado</sub>, sendo esta razão inferior a 1 (0,23), logo o modelo linear não foi estatisticamente significativo ao nível de 95 % de confiança.

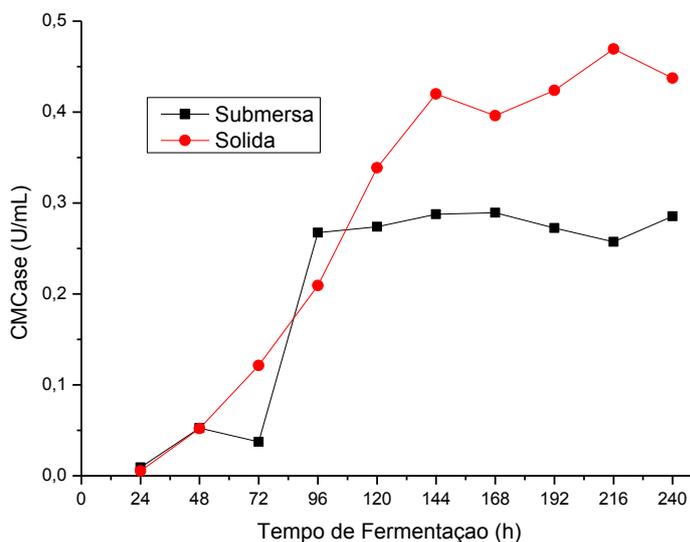
#### 4.5 Comparação entre os processos de fermentação em estado sólido e submerso

Nos próximos itens são apresentados e discutidos os resultados provenientes das cinéticas da fermentação em estado sólido e submersa da fibra de sisal que apresentaram maior valor de atividade enzimática.

##### 4.5.1 Produção de CMCase

A Figura 41 apresenta os ensaios da fermentação em estado sólido e da fermentação submersa que obtiveram a máxima atividade da enzima CMCase, os ensaios 3 e 4 respectivamente.

**Figura 41** - Comparação da produção da enzima CMCCase entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa.

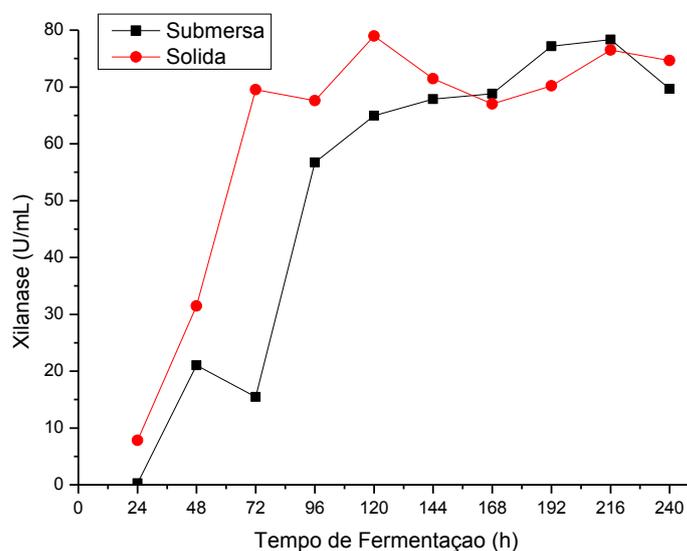


Os ensaios para determinação das atividades da enzima CMCCase mostraram, que a produção foi maior na fermentação em estado sólido quando comparada com a fermentação submersa (Figura 41). A atividade máxima na FES foi de 0,46 U/ml em 216 horas de fermentação e na FSm foi de 0,28 U/mL em 168 horas de fermentação.

#### 4.5.2 Produção de Xilanase

A Figura 42 apresenta os ensaios da fermentação em estado sólido e da fermentação submersa que obtiveram a máxima atividade da enzima xilanase, o ensaio 3 da FES (com 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo) e o ensaio 4 da FSm (com 5 % de substrato e 50 % de farelo de trigo).

**Figura 42** - Comparação da produção da enzima xilanase entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa.

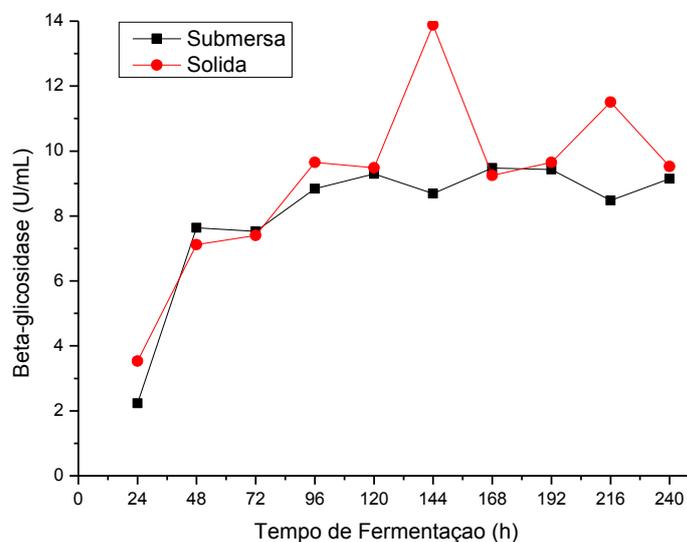


Como pode ser observado na Figura 42, a atividade máxima da enzima xilanase foi obtida na FES (78,96 U/mL) em 120 horas de fermentação, este valor é semelhante ao valor máximo obtido na FSm (78,34 U/mL) em 216 horas de fermentação.

#### 4.5.3 Produção de $\beta$ -glicosidase

A Figura 43 apresenta os ensaios da fermentação em estado sólido e da fermentação submersa que obtiveram a máxima atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase, os ensaios 3 e 4 respectivamente.

**Figura 43** - Comparação da produção da enzima  $\beta$ -glicosidase entre fermentação em estado sólido e fermentação submersa.



Os ensaios para determinação das atividades da enzima  $\beta$ -glicosidase mostraram, que a produção foi maior na fermentação em estado sólido quando comparada com a fermentação submersa (Figura 43). A atividade máxima na FES foi de 13,88 U/ml em 144 horas de fermentação e na FSm foi de 9,47 U/mL em 192 horas de fermentação.

A Tabela 27 apresenta os ensaios da FES e da FSm que obtiveram a máxima atividade das enzimas CMCCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase.

**Tabela 27** – Ensaio da FES e FSm que obtiveram a máxima atividade enzimática.

Tipo de fermentação	CMCase	Xilanase	$\beta$ -glicosidase	Condição
FES	0,46 U/mL	78,96 U/mL	13,88 U/mL	60% umidade e 50% FT
FSm	0,28 U/mL	78,34 U/mL	9,47 U/mL	5% m/v e 50% FT

## 5 CONCLUSÕES

- A caracterização físico-química da fibra de sisal demonstrou ser essa, uma matéria-prima viável para ser utilizada como substrato para obtenção de celulases e hemicelulases por meio de fermentação em estado sólido e submersa, principalmente por apresentar um percentual de celulose e hemicelulose, substâncias indutoras dessas enzimas, satisfatórios.
- As variáveis umidade inicial e teor de farelo de trigo influenciaram a atividade enzimática das celulases (CMCase, FPase e  $\beta$ -glicosidase) e hemicelulase (Endo- $\beta$ -1,4-xilanase) no processo de fermentação em estado sólido. As maiores atividades de FPase, CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase foram obtidas quando aplicado o maior teor de farelo de trigo (50 %) a fibra de sisal e umidade inicial de 60 %, em tempos diferentes, o que facilita em um único processo a obtenção das diferentes enzimas.
- Na fermentação submersa as variáveis estudadas teor de farelo de trigo e relação massa/volume (m/v) da concentração do substrato influenciaram a produção das enzimas CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase e as maiores atividades foram obtidas usando-se 50 % de farelo de trigo e concentração de substrato de 5 %, em tempos diferentes, o que facilita em um único processo a obtenção das diferentes enzimas;
- Diante das fermentações utilizadas, a fermentação em estado sólido obteve os melhores resultados quando comparado com a fermentação submersa para a produção das enzimas CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase.
- Os resultados obtidos comprovam que a utilização da fibra de sisal pelas indústrias como uma alternativa para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, se torna viável devido ao seu baixo custo.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Utilizar outros produtos lignocelulósicos da *Agave sisalana* (pó de batedeira e bagaço) para produção de enzimas;
- Usar o sisal híbrido como substrato para produção de enzimas;
- Pré-tratamento dos substratos;
- Fazer avaliação da estabilidade térmica das enzimas produzidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 7181: Solo - Análise Granulométrica**. [S. l.]. 1984.

ABU YAZID, N.; BARRENA, R.; KOMILIS, D.; SÁNCHEZ, A. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. **Sustainability**. v. 9, n. 2, p 224, 2017.

AGOPYAN, V.; SAVASTANO JUNIOR, H.; JOHN, V. M.; CINCOTTO, M. A. Developments on vegetable fibre-cement based materials in São Paulo, Brazil: an overview. **Cement and Concrete Composites**. v. 27, p. 527-536, 2005.

ALBANO, M. **Comparação da Produção de Celulases e Xilanases por Fungos Filamentosos em Fermentação Submersa e Estado Sólido**. São José do Rio Preto: UNESP, 2012, 64p. (Dissertação de Mestrado).

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399-407, 2008.

ALMEIDA, M. C. O.; CASTRO, A. F.; LOPES, L. A.; LOPES, H. J. S.; MIRANDA, L. P.; CASTRO, R. C. A.; OLIVEIRA FILHO, J. C.; SOUZA, M. L. G. E.; BOLZAN, A.; LIMA, W. J. N. L. **Determinação da umidade em fermentação semi-sólida para produção de enzimas celulolíticas pelo *Trichoderma reesei* RUT C-30**. In: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - ENZITEC, 2012, Blumenau - SC. Livro de resumos do X ENZITEC 2012, 2012.

AMORIM, B. C. **Produção de celulases por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (*Malpighia* sp.) utilizando *Trichoderma reesei***. Florianópolis: UFSC, 2016, 114p. (Tese de Doutorado).

ANDRADE, A. S. A.; NETO, N. J. O.; DIAS, E. C.; GERVÁSIO, D. K. L.; LIMA, M. K. L.; SANTOS, S. F. M.; SOUSA, A. C. B.; ALMEIDA, A. F. Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, (maio a agosto de 2018). 502 p.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agroindustrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bioenergy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, n. 7, p. 163-173, 2014.

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.

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. ed. [S.l.]: Elsevier, 2014.

BANSAL, N.; TEWARI, R.; SONI, R.; SONI, S.K. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste management**, v. 32, p. 1341-1346, 2012.

BHARTI, A. K.; KUMAR, A.; KUMAR, A.; DUTT, D. Exploitation of *Parthenium hysterophorous* biomass as low-cost substrate for cellulase and xylanase production under solid-state fermentation using *Talaromyces stipitatus* MTCC 12687. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 11, p. 271 – 280, 2018.

BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachibasium*. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, p. 2374-2417, 1991.

BRASIL, M. D. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 1017 p., 2005.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, p. 583-620, 1997.

BON, E. P. S. Enzimas industriais: política e gestão. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2002, Brasília. **Anais**. Brasília, DF, 2002.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. **Enzimas na produção de etanol**. In: *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. 1. ed. Rio de Janeiro. BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; FERRARA, M. A.; COELHO, R. R. R. (eds.). Interciência Brasil. p. 241-271, 2008.

- BURTON, R. A.; GIDLEY, M. J.; FINCHER, G. B. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. **Nature Chemical Biology**, v. 6, p. 724-732, 2010.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, 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.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 225-226, 1939.
- COELHO, G. D.; FREITAS, C. S.; BARBOSA, E. G.; Belém, G. L.; SILVA, L. R. I.; LEÃO, M. C.; RODRIGUES, R. L.; NASCIMENTO, A. V. S. Produção e Caracterização da Celulase (CMCase) por Fungo Isolado da Fase Termofílica de um Processo de Compostagem em Fermentação em Estado Sólido Tendo Bagaço de Coco Verde como Substrato. **Revista Saúde e Ciência online**, v. 7, n. 2, 502 p., 2018.
- DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RECZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 11-21, 2004.
- DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 597-606, 2006.
- EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1 - naturally occurring xylans structures, procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542-556, 2000.
- Farinas, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 52, 179-188, 2015.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- 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.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 85-101, 2003.

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

GOMES, A. C. S.; MAINARDI, P. H.; FONSECA, I. C.; SANTOS, E. A. O.; ALVES PRADO, H. F. **Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados em região de Cerrado**. In: X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - Enzitec, 2012, Blumenau, SC. Anais do X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2012.

GOMES, A. F. S.; SANTOS, B. S. L.; FRANCISCON, E. G.; BAFFI, M. L. Substrate and temperature effect on xylanase production by *Aspergillus fumigatus* using low cost agricultural wastes. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 4, p. 915-921, 2016.

HAMID, S. B. A.; ISLAM, M. M.; DAS, R. Cellulase biocatalysis: key influencing factors and mode of action. **Cellulose**, v. 22, n. 4, p. 2157-2182, 2015.

HAN, S. O.; CHO, H.; YUKAWA, H.; INUI, M.; DOI, R. H. Regulation of expression of cellulosomes and noncellulosomal (hemi)cellulolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186 (13), p. 4218-4227, 2004.

HERRERA, A.; SIMÓN, J. T. L.; CABRIALES, J. J. G.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 63, n. 1, p. 103-109, 2004.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

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.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.. Production and characterization of

cellulolytic enzyme from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KLOCK, U; ANDRADE, A. S. **Química da madeira**. 3. ed. Revisada. Curitiba, 2005.

KOPPRAM, R.; ALBERS, E.; OLSSON, L. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. **Biotechnol Biofuels**,5(5):32, 2012.

KUBICEK, C. P.; PENTTLILA, M. E. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P. **Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications**. London : Taylor and Francis Ltd, p. 49-72, 1998.

KUMAR, P., BARRETT, D. M., DELWICHE, M. L. J. E.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Ind. Engineering Chemical Research**, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

LIMA, C. S. S.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, F. L. H.; CONRADO, L. S.; LEÃO, D. A. S. Characterization of acid hydrolysis of sisal. **Applied Energy**, v. 102, p. 254 - 259, 2013.

LI, Y.; MAI, Y. W.; YE, L. Sisal fibre and its composites: a review of recent developments. **Composites Science and Technology**, v. 60, p. 2037-2055, 2000.

LI, Y.; LIU, C.; BAI, F.; ZHAO, X. Overproduction of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 through batch-feeding of synthesized low-cost sugar mixture. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 503-510, 2016.

LI, Q.; LOMAN, A. A.; CALLOW, N. V.; ISLAM, S. M. M.; JU, L. Leveraging pH profiles to direct enzyme production (cellulase, xylanase, polygalacturonase, pectinase,  $\alpha$ -galactosidase, and invertase) by *Aspergillus foetidus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 137, p. 247–254, 2018.

LINS, S. A. S. **Produção de celulasas por fermentação semi-sólida com bagaço de pedúnculo do caju utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48**. Campina Grande: UFCG, 2012, 74p. (Dissertação de Mestrado).

LINS, S. A. S. **Produção de celulases e hemicelulases a partir do sorgo sacarino**. Campina Grande: UFCG, 2017, 125p. (Tese de Doutorado).

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

LOPEZ-RAMIREZ, N.; VOLKE-SEPULVEDA, T.; GAIME-PERRAUD, I.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 291–298, 2018.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S.. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2001.

MARQUES, N. P.; PEREIRA, J. C.; GOMES, E.; SILVA, R.; ARAÚJO, A. R.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, A.; DUSSÁN, K. J.; BOCCHINI, 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**, n. 122, p. 66–75, 2018.

MARÍN, M.; SANCHEZ, A.; ARTOLA, A. Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 209, p. 937-946, 2019.

MARTIN, A. R. **Avaliação das propriedades de fibras de sisas de diferentes variedades visando aplicação em compósitos poliméricos**. São Carlos: UFSC, 1998. (Dissertação de Mestrado).

MARTIN, A. R.; MARTINS, M. A.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, O. R. R. F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros**, v. 19, n. 1, p. 40-46, 2009.

MEDINA, J. C. **O sisal**. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. São Paulo, 286p. 1954.

MEDINA, J. C. **Plantas fibrosas da flora mundial**. Instituto Agrônômico de Campinas. Campinas, 913 p. 1959.

- MEGIATTO JÚNIOR, J. D.; HOAREAU, W.; GARDRAT, C.; FROLLINI, E.; CASTELLAN, A. Sisal Fibers: Surface chemical modification using reagent obtained from a renewable source; characterization of hemicellulose and lignin as model study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8576-8584, 2007.
- MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, 31, n. 2, p. 116-120. 1997.
- MD, Z. ALAM, A. A. MAMUN, I. Y. QUDSIEH, S. A. MUYIBI, H. M. SALLEH, N. M. OMAR Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68, p. 61 - 138, 2000.
- MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. **Definition, characterization and economic evaluation**. Solid Substrate Cultivation: Elsevier, London, 1992.
- MORAIS, J. P. S; ROSA, M. F. R.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para Análise Lignocelulósica**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.
- NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dillute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 49-58, 2002.
- NG, T. B. Peptides and proteins from fungi. **Peptides**, New York, v. 25, p. 1055-1073, 2004.
- OGEDA, T.L.; PETRI, D. F. S. Biomass enzymatic hydrolysis. **Quim Nova**, 33(7):1549 e 58, 2010.
- OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.

PANDA, S. K.; MISHRA, S. S.; KAYITESI, E.; RAY, R. C. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental research**, v. 146, p.161-172, 2016.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.

PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2/3, p. 81-84, 2003.

PASSOS, D. F.; PEREIRA JR, N.; CASTRO, A. M. A comparative review of recent advances in celulasas production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60–66, 2018.

PEREIRA, V. R.; COSTA, S. S.; ROCHA, S. C. S. Análise do crescimento da celulose microcristalina granulada em leite vibrofluidizado. CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009, Uberlândia/MG, **Anais...** Campus de Santa Mônica: UFU, 2009.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 2107- 2111, 2002.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v. 74, p. 17-20, 2006.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, p. 577-591, 2005.

PORTELA, D. G. **Estudo da produção de enzimas celulolíticas por fermentação semi-sólida do bagaço do caju deslignificado**. Iniciação Científica CNPq/UFCEG/PIBIC. Campina Grande. 2011.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Hoogan. 2001.

- REID, D. S.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. In: DAMODARAM, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 25-74.
- ROBINSON, T.; NIGAM, P. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 197, 2003.
- ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 11, p. 626-644, 1989.
- ROBINSON, T.; NIGAM, P.; **Biochemical Engineering Journal**. 2003, 13, 197.
- 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, 2011.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Casa do Pão Editora, p. 325, 2005.
- ROSA, T. M. F.; MARINHO, B. M.; BENASSI, V. M. Produção de celulases e formação de açúcares fermentescíveis pela degradação do bagaço de cana-de-açúcar. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal (SP)**, v. 9, n. 1, p. 38-43, 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, p. 1–6, 2019.
- SALOMÃO, G. S. B. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato**. São Mateus: UFES, 2017. (Dissertação de Mestrado).
- SANTOS, M. B.; SANTOS, C. Y.; ALMEIDA, M. A.; SANTOS, C. R. S.; SANT'ANNA, H. L. S.; SANTOS, O. S. N.; SILVA, F.; MARTINS, G. N. Efeito inibitório in vitro de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 13-17, 2010.
- SANTOS, P. S. dos; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S., BRAGA Jr, A. C. R.; ASSIS, F. G. V. de; LEAL. P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 04, n. 02, p. 0181-0188, 2018.

SANTOS, P. S. dos; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; LIMA, G. S.; BRAGA Jr, A. C. R.; ASSIS, F. G. V. de; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences** , v. 04, n. 02, 2018.

SANTOS, S. F. M.; NOBREGA, J. E.; PINTO, G. A. S.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H. **Caracterização do resíduo seco do pedúnculo do caju visando sua utilização como substrato para fermentação semi-sólida**. Anais - XV Simpósio Brasileiro de Bioprocessos. Recife. 2005.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; T. REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 13 jan 2012.

SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1299-1304, 2012.

SANTOS, M. L. dos; LIMA, O. J. de; NASSAR, E. J.; CIUFFI, K. J.; CALEF, P. S. Estudos das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 507-511, 2011.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advance**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SAPUAN, S. M.; LEENIE, A.; HARIMI, M.; BENG, Y. K. Mechanical properties of woven banana fibre reinforced epoxy composites. **Materials & Design**, v. 27, p. 689-693, 2006.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F. da; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation** v. 1, p. 52-71, 2017.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P. W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. **Renewable e Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 2379–2386, 2017.

- SCHOLL, A. L.; MENEGOL, D.; PITARELO, A. P.; FONTANA, R. C.; ZANDONÁ FILHO, A.; RAMOS, L. P.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 97-107, 2015
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.
- SILVA, F. L.; CAMPOS, A. O.; SANTOS, D. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; PADILHA, C. E. A.; SOUSA JUNIOR, F. C.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Pretreatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. **Renewable Energy**, v.116 p. 299-308, 2018.
- SILVA, O. R. R. F. da; COUTINHO, W. M. **Cultivo do Sisal**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPQ, 2006.
- SILVA, O. R. R. F. da; SUINAGA, F. A.; COUTINHO, W. M.; CARTAXO, W. V. Cadeia produtiva. In: ANDRADE, W. **O sisal do Brasil**. Cap. 3, p. 30-45, 2007.
- SILVA, O. R. R. da; BELTRÃO, N. E. de M. **O agronegócio do sisal no Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPQ, 1999. 205 p.
- 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.
- SIQUEIRA, F. G. de; SIQUEIRA, L. G. de; JARAMILLO, P. M. D.; SILVEIRA, M. H. L.; ANDREAUS, J.; COUTO, F. A.; BATISTA, L. R.; FERREIRA FILHO, E. X. The potential of agroindustrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 64, p. 20-26, 2010.
- SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; SILVA, M. DE J.M.; LIMA, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

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

TARTARINE, N. **Celulases de fungos endofíticos: estudo da produção por fermentação submersa e aplicação na sacarificação da palha de cana-de-açúcar**. Araraquara: UNESP, 2018, 99p. (Dissertação de Mestrado).

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.

VERMA, N.; KUMAR, V.; BANSAL, M. C. Utility of *Luffa cylindrica* and *Litchi chinensis* peel, an agricultural waste biomass in cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state cultivation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 483–492, 2018.

VRIES, R. P. de; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497-522, 2001.

ZAMPIERI, D. **Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum***. Caxias do Sul: UCS, 2011. (Dissertação de Mestrado).

ZUGENMAIER, P. **Crystalline cellulose and derivatives**. New York: Springer, 285 p. 2008.

## ANEXO A

- Resultados obtidos no processo de produção de enzimas com fibra de sisal por fermentação em estado sólido.

Tabela A1 - Resultados de umidade, AR, pH, CMC<sub>Case</sub>, FPAse, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 1.

Tempo de fermentação (horas)	Umidade (%)	AR (g/g)	pH	CMCase (U/g)	FPAse (U/g)	Xilanase (U/g)	$\beta$ -glicosidase (U/g)
24	60,27	0,0030	4,75	0,02	0,011	28,64	10,80
48	60,12	0,0034	4,61	0,01	0,011	81,09	20,44
72	58,97	0,0048	4,47	0,76	0,021	84,76	22,15
96	59,99	0,0053	4,44	0,61	0,031	86,69	20,38
120	59,62	0,0061	4,36	0,62	0,055	88,61	23,61
144	59,04	0,0061	4,18	0,68	0,052	85,14	20,37
168	58,87	0,0070	4,17	0,76	0,041	80,16	23,60
192	60,16	0,0076	4,08	0,89	0,043	76,64	20,87
216	58,87	0,0070	3,98	0,72	0,039	79,26	22,60
240	58,38	0,0085	4,01	0,75	0,044	72,14	20,14

**Tabela A2 - Resultados de umidade, AR, pH, CMC<sub>Case</sub>, FPAse, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 2.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>AR (g/g)</b>	<b>pH</b>	<b>CMCase (U/g)</b>	<b>FPAse (U/g)</b>	<b>Xilanase (U/g)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/g)</b>
24	80,12	0,0010	4,57	0,01	0,01	25,26	15,80
48	80,44	0,0010	4,76	0,01	0,01	74,06	11,44
72	79,23	0,0020	4,54	0,48	0,02	81,79	17,15
96	80,64	0,0010	4,43	0,59	0,03	83,71	24,38
120	81,27	0,0020	4,18	0,78	0,05	85,31	18,61
144	80,18	0,0026	4,20	0,75	0,05	80,91	15,37
168	80,75	0,0017	4,42	0,73	0,03	78,22	18,60
192	81,05	0,0022	4,24	0,80	0,04	58,06	21,87
216	80,52	0,0028	4,56	1,01	0,03	77,36	17,60
240	78,70	0,0039	4,34	0,95	0,03	61,85	19,14

**Tabela A3- Resultados de umidade, AR, pH, CMCCase, FPase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 3.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>AR (g/g)</b>	<b>pH</b>	<b>CMCase (U/g)</b>	<b>FPase (U/g)</b>	<b>Xilanase (U/g)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/g)</b>
24	58,62	0,0062	5	0,04	0,21	58,64	26,50
48	59,92	0,0056	5	0,39	0,28	236,11	53,37
72	60,13	0,0081	5	0,91	0,30	521,50	55,51
96	60,47	0,0105	5	1,57	0,44	507,01	72,39
120	63,37	0,0079	5	2,54	0,56	592,24	71,16
144	64,70	0,0071	5	3,15	0,54	535,91	104,1
168	64,77	0,0105	5	2,97	0,42	502,66	69,40
192	65,06	0,0115	5	3,18	0,53	526,39	72,39
216	66,50	0,0175	5	3,52	0,50	573,55	86,28
240	66,47	0,0183	5	3,28	0,47	559,99	71,44

**Tabela A4 - Resultados de umidade, AR, pH, CMC<sub>Case</sub>, FPAse, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 4.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>AR (g/g)</b>	<b>pH</b>	<b>CMCase (U/g)</b>	<b>FPAse (U/g)</b>	<b>Xilanase (U/g)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/g)</b>
24	77,85	0,0045	5	0,05	0,22	46,47	28,47
48	79,22	0,0043	5	0,41	0,29	133,72	34,26
72	81,07	0,0027	5	0,47	0,32	327,91	49,17
96	80,79	0,0027	5	1,09	0,38	368,55	62,18
120	81,99	0,0030	5	1,44	0,49	342,40	55,09
144	82,35	0,0029	5	2,06	0,51	343,40	57,13
168	81,71	0,0029	5	1,77	0,41	385,60	37,65
192	82,94	0,0022	5	1,97	0,50	252,81	51,58
216	82,83	0,0019	5	2,46	0,47	285,66	48,50
240	82,50	0,0017	5	2,50	0,41	263,93	58,07

**Tabela A5 - Resultados de umidade, AR, pH, CMCCase, FPAse, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 5.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>AR (g/g)</b>	<b>pH</b>	<b>CMCase (U/g)</b>	<b>FPAse (U/g)</b>	<b>Xilanase (U/g)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/g)</b>
24	67,04	0,0039	5	0,03	0,053	76,81	25,62
48	68,12	0,0028	5	0,35	0,160	110,14	51,92
72	67,52	0,0049	5	0,69	0,080	130,44	44,05
96	68,33	0,0024	6	0,88	0,062	218,90	53,27
120	71,88	0,0047	6	1,06	0,067	277,56	62,03
144	71,61	0,0062	6	0,86	0,063	304,08	51,43
168	71,25	0,0034	6	0,90	0,110	295,29	49,11
192	70,56	0,0086	6	1,39	0,068	181,95	51,58
216	70,14	0,0070	6	1,06	0,130	201,54	41,13
240	69,56	0,0129	6	1,06	0,055	211,62	48,66

**Tabela A6 - Resultados de umidade, AR, pH, CMC<sub>ase</sub>, FPA<sub>ase</sub>, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 6.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>AR (g/g)</b>	<b>pH</b>	<b>CMC<sub>ase</sub> (U/g)</b>	<b>FPA<sub>ase</sub> (U/g)</b>	<b>Xilanase (U/g)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/g)</b>
24	68,63	0,0012	6	0,0903	0,0545	46,47	29,69
48	69,20	0,0020	6	0,3352	0,1447	133,72	29
72	71,12	0,0025	6	0,4083	0,1221	227,91	50
96	71,47	0,0046	6	0,5888	0,0645	228,55	49,01
120	71,07	0,0039	6	1,0358	0,0640	302,40	56,97
144	70,17	0,0044	6	1,1261	0,0623	243,40	49,88
168	71,97	0,0044	6	1,4313	0,1003	295,60	58,24
192	71,39	0,0059	6	1,4313	0,0676	142,81	46,79
216	68,92	0,0052	6	1,7450	0,1090	175,66	41,40
240	70,92	0,0063	6	1,0530	0,0545	163,93	46,87

**Tabela A7 - Resultados de umidade, AR, pH, CMCCase, FPAse, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 7.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>AR (g/g)</b>	<b>pH</b>	<b>CMCase (U/g)</b>	<b>FPAse (U/g)</b>	<b>Xilanase (U/g)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/g)</b>
24	69,37	0,0019	6	0,04	0,055	58,64	25,09
48	68,04	0,0032	6	0,37	0,130	136,11	49,01
72	70,29	0,0036	6	0,57	0,110	221,50	62,40
96	70,72	0,0057	6	0,71	0,071	173,55	41,02
120	70,71	0,0041	6	1,08	0,060	307,01	51,02
144	71,74	0,0049	6	1,00	0,065	305,91	45,40
168	70,78	0,0047	6	1,34	0,094	202,66	49,98
192	70,91	0,0062	6	1,34	0,075	226,39	40,56
216	69,24	0,0068	6	1,54	0,120	192,24	45,37
240	68,36	0,0053	6	1,09	0,053	159,99	51,38

## ANEXO B

- **Resultados obtidos no processo de produção de enzimas com fibra de sisal por fermentação submersa**

**Tabela B1 - Resultados de CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 1.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>CMCase (U/mL)</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/mL)</b>
24	0,0056	0,0878	0,3387
48	0,0011	1,0836	0,2484
72	0,0120	0,8493	0,5645
96	0,0103	1,3765	0,4742
120	0,0083	1,5815	0,2032
144	0,0089	1,6401	0,3613
168	0,0047	2,7471	1,2421
192	0,0078	0,6150	0,4290
216	0,0083	2,0501	0,9033
240	0,0111	2,4015	0,6775

**Tabela B2 - Resultados de CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 2.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>CMCase (U/mL)</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/mL)</b>
24	0,0095	1,0543	0,9679
48	0,0095	1,0543	0,9679
72	0,0111	1,3003	0,5808
96	0,0246	1,1246	1,8229
120	0,0167	0,9137	1,6133
144	0,0223	0,5271	1,0325
168	0,0285	0,3163	1,8392
192	0,0218	0,3514	1,1617
216	0,0207	0,2811	0,6291
240	0,0223	0,3514	1,2583

**Tabela B3 - Resultados de CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 3.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>CMCase (U/mL)</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/mL)</b>
24	0,0717	23,5180	4,0701
48	0,0815	43,6210	4,7267
72	0,0684	42,1390	5,3602
96	0,1812	39,5617	4,7832
120	0,1795	34,2138	4,9602
144	0,2025	38,0153	6,3267
168	0,1812	38,0153	4,7247
192	0,1983	36,7911	6,2402
216	0,2170	25,6442	6,6506
240	0,1947	29,5746	6,1129

**Tabela B4 - Resultados de CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 4.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>CMCase (U/mL)</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/mL)</b>
24	0,0436	0,9955	3,1336
48	0,0436	16,7431	5,6335
72	0,0790	13,1618	5,2633
96	0,2293	46,4971	7,9135
120	0,2347	55,7227	8,0605
144	0,2307	59,0802	7,4178
168	0,2464	57,4811	7,6174
192	0,2436	68,0235	8,0133
216	0,1927	62,9802	7,2610
240	0,1927	67,6181	6,6513

**Tabela B5 - Resultados de CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 5.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>CMCase (U/mL)</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/mL)</b>
24	0,0078	0,5311	1,5380
48	0,0523	20,7581	6,9689
72	0,0562	18,2795	6,2111
96	0,1716	49,0255	7,9530
120	0,2249	55,4046	7,1415
144	0,2529	60,3374	7,6243
168	0,2468	59,6923	7,5006
192	0,2502	60,4231	7,8744
216	0,2146	67,2326	6,4135
240	0,2034	67,2608	6,1814

**Tabela B6 - Resultados de CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 6.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>CMCase (U/MI)</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/mL)</b>
24	0,0092	0,2655	2,2359
48	0,0526	21,0237	7,6389
72	0,0374	15,4468	7,5308
96	0,2674	56,7153	8,8390
120	0,2738	64,9300	9,2936
144	0,2876	67,8568	8,6935
168	0,2892	68,8305	9,4768
192	0,2724	77,1901	9,4291
216	0,2573	78,3409	8,4810
240	0,2853	69,6659	9,1486

**Tabela B7 - Resultados de CMCase, xilanase e  $\beta$ -glicosidase obtidos durante o processo de produção das enzimas no ensaio 7.**

<b>Tempo de fermentação (horas)</b>	<b>CMCase (U/mL)</b>	<b>Xilanase (U/mL)</b>	<b><math>\beta</math>-glicosidase (U/mL)</b>
24	0,0085	0,3262	2,9813
48	0,0515	15,1266	7,3191
72	0,0464	12,0813	5,9239
96	0,2131	45,0156	7,3947
120	0,2529	50,1905	8,4607
144	0,2400	59,1667	7,6568
168	0,2264	54,8216	8,1029
192	0,2328	56,7662	8,4435
216	0,1848	63,0804	7,4934
240	0,2094	59,4931	7,4934