



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



**PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES A PARTIR DO  
SORGO SACARINO**

**Simone Aparecida da Silva Lins**

CAMPINA GRANDE, 2017



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

**Simone Aparecida da Silva Lins**

## **PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES A PARTIR DO SORGO SACARINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, como pré-requisito para obtenção do título de doutora em Engenharia Química.

**Orientador:** Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira (UAEQ/UFCG)

**Área de Concentração:** Desenvolvimento de Processos Químicos

CAMPINA GRANDE, 2017

# **PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES A PARTIR DO SORGO SACARINO**

Tese aprovada em 21 de fevereiro de 2017.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira  
Orientadora – (PPEQ/UFCG)

---

Profa. Dra. Ângela Maria Santiago  
Examinador Externo – (CCT/UEPB)

---

Profa. Dra. Glauciane Danusa Coelho  
Examinadora Externa – (UATEC/CDSA/UFCG)

---

Prof. Dr. Luís Gonzaga Sales Vasconcelos  
Examinador Interno – (PPEQ/DEQ/UFCG)

---

Profa. Dra. Maria Wilma Nunes Cordeiro Carvalho  
Examinadora Interna – (PPEQ/DEQ/UFCG)

CAMPINA GRANDE, 2017

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, Severino Ramos e Maria do Socorro, pelo amor incondicional, às minhas irmãs, Suelem e Soleane e ao meu querido esposo Rodrigo.*

## AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos:

À Deus, por ser o meu amigo fiel e estar presente em todos os momentos.

Aos meus pais Severino Ramos Lins e a Maria do Socorro da Silva, por me proporcionarem a educação que não puderam ter, por entender minha ausência em tantos momentos, por acreditarem em mim, por todo apoio, paciência, dedicação e amor.

À minha irmã, Soleane da Silva Lins pelo imenso carinho. Nossos laços são eternos... Independe de distância e tempo.

À minha irmã Suelen da Silva Lins, por todo apoio, ajuda e parceria durante os experimentos em laboratórios, mas principalmente por seu carinho e alegria em todos os momentos.

Ao meu marido Rodrigo Lins Rodrigues, pelo amor, carinho e companheirismo. Essa conquista não seria possível sem você e seu apoio. Meu parceiro...

À Professora Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira, pela orientação, pela amizade, por todo apoio recebido durante a realização deste trabalho, pelo conhecimento passado e principalmente por ter acreditado na minha capacidade. A senhora é o meu maior exemplo de profissional, sua humanidade engrandece a pesquisadora que é.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química PPGEQ da Universidade Federal de Campina Grande, na pessoa de seus coordenadores Dr. Luís Gonzaga Sales Vasconcelos (ex) e Dr. Heleno Bispo da Silva Junior (atual).

A todos os professores e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, em especial a secretária Maricé Pereira.

À Universidade Federal Rural a qual sou servidora, ao Professor Dr. Clistenes Williams Araújo do Nascimento e a todos que fazem parte do laboratório de Química Ambiental de Solos. Obrigada, especialmente a PNP Dr. Josângela Trezena por todo apoio e amizade.

À Professora Dra. Maria Inês Sucupira Maciel (PPGCTA/UFRPE) e a MSc. Jaqueline Ferreira, por disponibilizarem os laboratórios de alimentos do programa e seus equipamentos, e especialmente por toda a gentileza e carinho.

Ao professor Dr. Valdomiro Severino de Souza Júnior (PPGS/UFRPE) por toda sua disponibilidade durante as análises termogravimétricas.

À professora Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (PPGBA/UFRPE) e a todos do Laboratório de Tecnologia de Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por toda parceria e amizade.

À professora Dra. Ana Maria Souto Maior (DANTI/UFPE), ao Doutorando Iranildo José da Cruz Filho e a todos do Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal de Pernambuco, por todo apoio e disponibilidade nas análises cromatográficas.

A Dra. Glauciane Danusa Coelho (UATEC/UFCG), pelo apoio, por todo conhecimento passado, pela amizade, por todas as conversas e por ter me entendido nos momentos em que mais precisei.

Aos componentes da banca examinadora Dr. Luís Gonzaga Sales Vasconcelos, Dra. Maria Wilma Nunes Cordeiro Carvalho, Dra. Glauciane Danusa Coelho e Dra. Angêla Maria Santiago pela atenção, disponibilidade e principalmente pela contribuição ao trabalho realizado.

Aos amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFCG por todo apoio e amizade. Obrigada aos amigos José Mariano da Silva Neto, Clotildes Alvino, Marcio José Vasconcelos da Silva, Rebeca de Almeida, Giovanna Formiga e em especial a Deivid Sousa de Figueiroa por todas conversas de incentivos e a parceria durante todos os momentos.

Enfim, a todos que contribuíram e me apoiaram, de forma direta ou indireta, na realização desse trabalho, meus agradecimentos.

*O caminho se faz entre o alvo e a seta...*

*(Pedro Abrunhosa)*

## RESUMO

LINS, S. A. S. **Produção de celulases e hemicelulases a partir do sorgo sacarino.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Campina Grande. 120f. 2017.

Atualmente o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) vem desenvolvendo cultivares de Sorgo Sacarino com elevado potencial de produção de etanol, principalmente em períodos de entressafra da cultura canavieira. A cultivar IPA P222 além de apresentar potencial para a produção de etanol possui elevado teor de hemicelulose e celulose, tornam-se fonte de grande interesse para a produção de derivados biotecnológicos, agregando valor aos resíduos desse processo de produção. O objetivo do trabalho foi estudar a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas a partir da fermentação semissólida do bagaço de sorgo sacarino (IPA P222) incrementado com farelo de trigo como fonte indutora utilizando o fungo *Trichoderma reesei* LCB 48. Os substratos da fermentação foram caracterizados e o estudo da produção das enzimas celulases (CMCase e FPase) e hemicelulases (Endo- $\beta$ -1,4-xilanase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase) foram realizados usando planejamento experimental  $2^2$  e 4 pontos centrais e acompanhamento cinético da produção por 240 horas, analisando a influência da umidade e teor de farelo de trigo na produção das enzimas. A caracterização do bagaço do sorgo sacarino (BSS) demonstrou que é um substrato com potencial para ser utilizado na fermentação para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, por apresentar alto teor de hemicelulose e celulose satisfatório. A caracterização do farelo de trigo (FT) demonstrou que ele é uma fonte de nitrogênio importante para a indução das enzimas. As análises termogravimétricas (TG e DTG) e difração de raios-x (DRX) demonstrou que a hemicelulose obtida apresenta características amorfa e picos característicos da hemicelulose de acordo com a literatura. As isotermas de dessorção dos substratos apresentaram correlação e o modelo de GAB forneceu um bom ajuste para os dados experimentais dos substratos. As variáveis umidade inicial e teor de farelo de trigo influenciaram a atividade enzimática das celulases (CMCase e FPase) e hemicelulases (Endo- $\beta$ -1,4-xilanase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase). As maiores atividades de FPase, CMCase, xilanase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase foram obtidas quando aplicado o maior teor de farelo de trigo (50 %) ao bagaço do sorgo sacarino IPA P222, porém, em tempos diferentes fato esse que facilita em um único processo a obtenção das diferentes enzimas. A xilanase apresentou maior atividade enzimática se comparada as demais, evidenciando que a IPA P222 com elevado teor de hemicelulose é potencialmente mais indutora para essa enzima. O potencial de atuação do extrato enzimático obtido durante a fermentação foi analisado por meio de hidrólise enzimática do sorgo sacarino *in natura* e da hemicelulose extraída do BSS, no qual o extrato enzimático apresentou capacidade de hidrolisar o bagaço de sorgo *in natura* e a hemicelulose.

Palavras-chave: CMCase, xilanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, FPase.



## ABSTRACT

LINS, S. A. S. **Production of cellulases and hemicellulases from sorghum sorghum. Thesis (Doctorate)** – Federal University of Campina Grande. 120s. 2017.

Currently, the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA) has been developing sorghum saccharine cultivars with high potential for ethanol production, especially in the off season of the sugar cane crop. The cultivar IPA P222, besides presenting potential for the production of ethanol, has a high content of hemicellulose and cellulose, which is a source of great interest for the production of biotechnological derivatives, adding value to the residues of the production process. Aim of the work for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from the semisynthetic fermentation of sorghum sorghum (IPA P222) *Trichoderma reesei* LCB 48. The fermentation substrates were characterized by the study of the production of cellulase enzymes (CMCase and FPase) and hemicellulases (Endo- $\beta$ -1,4-xylanase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase) were performed using experimental design  $2^2$  and 4 central points and kinetic monitoring of production for 240 hours, analyzing an influence of moisture and wheat bran content on the production of enzymes. The characterization of the sorghum bagasse (BSS) showed that it is a substrate with potential to be used in the fermentation for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes, because it has satisfactory content of hemicellulose and cellulose content. A characterization of wheat bran (FT) has been shown to be a source of nitrogen important for induction of enzymes. As thermogravimetric analyzes (TG and DTG) and X-ray diffraction (XRD) showed that a obtained hemicellulose has amorphous characteristics and characteristic peaks of hemicellulose according to the literature. As desorption isotherms of the substrates presented correlation and GAB model, they are suitable for the experimental data of the substrates. As variables, initial moisture and wheat bran content influenced an enzyme enzyme of cellulases (CMCase and FPase) and hemicellulases (Endo- $\beta$ -1,4-xylanase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase). The major activities of FPase, CMCase, xylanase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase were obtained when applied to the higher wheat bran content (50%) to saccharin saccharin IPA P222, however, the process of obtaining the different enzymes. The xylanase presented higher enzymatic activity if compared as others, evidencing that an IPA P222 with high content of hemicellulose is potentially more inductive for this enzyme. The potential of the enzymatic extract obtained during a fermentation was analyzed by means of enzymatic hydrolysis of in saccharine sorghum and the hemicellulose extracted from the BSS, without which the enzymatic extract had the capacity to hydrolyze or sorghum bagasse and a hemicellulose.

Keywords: CMCase, Xylanase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, FPase.

## Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da lignocelulose .....	22
Figura 2. Estrutura da celulose e o padrão de ligação de hidrogênio, intra (linhas pontilhada) e inter-cadeias (linhas tracejadas) .....	24
Figura 3. Álcoois precursores da lignina .....	25
Figura 4. Açúcares que compõem a hemicelulose .....	26
Figura 5. Tipos de Sorgo: Granífero, Vassoura, Forrageiro e Sacarino .....	27
Figura 6. Colmo do sorgo sacarino .....	28
Figura 7. Representação do princípio da ação das celulasas sobre polímero de celulose liberando glicose. Celulose amorfa em preto e a celulose cristalina em vermelho.....	32
Figura 8. Regulação da biossíntese de xilanase em <i>Cryptococcus albidus</i> .....	34
Figura 9. Os componentes estruturais básicos encontrados em hemicelulose e as hemicelulasas responsáveis por sua degradação. ....	35
Figura 10. Fluxograma de preparação do bagaço do sorgo sacarino .....	40
Figura 11. Repique do <i>Trichoderma reesei</i> em placa de Petri (a) e em sabugo de milho (b) .....	52
Figura 12. Fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino utilizando <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 .....	53
Figura 13. Isotermas de dessorção dos substratos usados durante a fermentação: BSS + FT 0%, BSS + FT 25% e BSS + FT 50 %.....	62
Figura 14. Micrografia eletrônica de varredura dos substratos: (a) Farelo de trigo (341x); (b) Farelo de trigo (786x); (c) Sorgo sacarino – parte fibrosa (786x); (d) Sorgo sacarino – parte macia do colmo (1090x). ....	65

Figura 15. TG e DTG do bagaço de sorgo sacarino <i>in natura</i> .....	67
Figura 16. TG e DTG da hemicelulose extraída do bagaço do sorgo sacarino <i>in natura</i> .....	70
Figura 17. Difrátogramas de raios-x das amostras de bagaço de sorgo sacarino <i>in natura</i> e da hemicelulose do BSS.....	72
Figura 18. Espectro de FTIR das amostras de bagaço de sorgo sacarino <i>in natura</i> (a) 400 – 4000 cm <sup>-1</sup> ; (b) 800 – 1900 cm <sup>-1</sup> .....	74
Figura 19. Cinética enzimática da CMCase por fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino (BSS).....	77
Figura 20. Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semissólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de sorgo sacarino lavado (Ensaio 03, 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo).....	78
Figura 21. Influência da Umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima CMCase .....	80
Figura 22. Superfície de resposta para a produção de CMCase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo .....	82
Figura 23. Cinética enzimática da FPase por fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino (BSS).....	83
Figura 24. Perfil cinético do processo de produção de FPase por fermentação semissólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de sorgo sacarino lavado (Ensaio 03, 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo).....	84
Figura 25. Influência da Umidade inicial e do teor de farelo de trigo da produção da enzima FPase.....	87
Figura 26. Superfície de resposta para a produção de FPase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo .....	88

Figura 27. Cinética de produção de Xilanase por fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino (BSS) de todos os ensaios do planejamento experimental. ..	89
Figura 28. Perfil cinético do processo de produção de Xilanase por fermentação semissólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de sorgo sacarino lavado (Ensaio 03, 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo) .....	91
Figura 29. Influência da Umidade inicial e do teor de farelo de trigo da produção da enzima Xilanase .....	93
Figura 30. Superfície de resposta para a produção de Xilanase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo .....	95
Figura 31. Cinética de produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino (BSS) de todos os ensaios do planejamento experimental.....	96
Figura 32. Perfil cinético do processo de produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por fermentação semissólida com <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48 em bagaço de sorgo sacarino lavado (Ensaio 03, 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo.....	97
Figura 33. Influência da Umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima $\alpha$ -L-arabinofuranosidase .....	99
Figura 34. Superfície de resposta para a produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo .....	100
Figura 35. Cinética da concentração de glicose durante hidrólise enzimática do bagaço de sorgo sacarino <i>in natura</i> .....	101
Figura 36. Cinética da concentração de xilose durante hidrólise enzimática do bagaço de sorgo sacarino <i>in natura</i> .....	102
Figura 37. Cinética da concentração de xilose (a) e glicose (b) durante hidrólise enzimática da hemicelulose.....	104

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição do Sorgo Sacarino .....	28
Tabela 2. Níveis do planejamento experimental da produção das enzimas.....	50
Tabela 3. Matriz de planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> com 4 repetições no ponto central da produção de enzimas. ....	51
Tabela 4. Composição do meio BDA para repique do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48..	51
Tabela 5. Composição da fibra do bagaço do sorgo sacarino. ....	58
Tabela 6. Composição de AR e proteína do bagaço do sorgo sacarino e do farelo de trigo.....	60
Tabela 7. Parâmetros de ajuste das isotermas de dessorção dos substratos para o modelo de GAB. ....	64
Tabela 8. Dados obtidos a partir das curvas de TG e DTG do BSS.....	69
Tabela 9. Dados obtidos a partir das curvas de TG e DTG da hemicelulose extraída do BSS.....	71
Tabela 10. Ensaios do planejamento experimental para a produção de CMCase em Bagaço de Sorgo Sacarino (BSS) por FSS .....	79
Tabela 11. Análise de variância para a atividade de CMCase .....	81
Tabela 12. Ensaios do planejamento experimental para a produção de FPase em bagaço de sorgo sacarino (BSS) por FSS .....	86
Tabela 13. Análise de variância para a atividade de FPase.....	87
Tabela 14. Ensaios do planejamento experimental para a produção de Xilanase em bagaço de sorgo sacarino (BSS) por FSS .....	92
Tabela 15. Análise de variância para a atividade de Xilanase .....	94

Tabela 16. Ensaio do planejamento experimental para a produção de $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase em Bagaço de Sorgo Sacarino (BSS) por FSS.....	98
Tabela 17. Análise de variância para a atividade de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase .....	100
Tabela 18. Atividades das enzimas do extrato bruto utilizado nas hidrólises .....	101

## **Lista de sigla e abreviações**

AR - Açúcar Redutor

BSS - Bagaço do sorgo sacarino

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CMCase - Carboximetilcelulase

CMC - Carboximetilcelulose

DNS - Ácido 3,5 dinitrosalicílico

DRX - Difração de raios-X

DTG - Derivada da análise termogravimétrica

FPase - Atividades da celulase em papel de filtro

FPU - Filter Paper Units

FTIR - Fourier transform infrared spectroscopy

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

LEB - Laboratório de Engenharia Bioquímica

TG - Termogravimetria

## Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE SIGLA E ABREVIações</b> .....	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>22</b>
3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	22
3.1.1 Celulose .....	23
3.1.2 Lignina .....	24
3.1.3 Hemicelulose .....	25
3.2 SORGO SACARINO .....	26
3.3 PRÉ-TRATAMENTOS .....	29
3.3.1 Processo Alcalino e alcalino oxidativo .....	30
3.4 ENZIMAS CELULASES E HEMICELULASES .....	31
3.4.1 CELULASE .....	31
3.4.2 HEMICELULASES .....	33
3.5 PRODUÇÃO DAS CELULASES E HEMICELULASES .....	36
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>39</b>
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO .....	39
4.2 SUBSTRATO .....	39
4.3 CARACTERIZAÇÃO .....	41



4.3.1	<i>Teor de umidade</i> .....	41
4.3.2	<i>Cinzas</i> .....	41
4.3.3	<i>Extrativos</i> .....	42
4.3.4	<i>Determinação do Teor de Holocelulose (<math>\alpha</math>-Celulose + Hemicelulose)</i> .....	42
4.3.5	<i>Determinação do Teor de <math>\alpha</math>-Celulose</i> .....	44
4.3.6	<i>Lignina</i> .....	45
4.3.7	<i>Proteína</i> .....	46
4.3.8	<i>Açúcares Redutores</i> .....	47
4.3.9	<i>Isoterma de dessorção de umidade</i> .....	48
4.3.10	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	49
4.3.11	<i>Análises termogravimétricas (TG, DTG e DSC)</i> .....	49
4.3.12	<i>Difratometria de Raios-X (DRX)</i> .....	49
4.3.13	<i>Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	49
4.4	<b>PRODUÇÃO DE ENZIMAS</b> .....	50
4.4.1	<i>Planejamento experimental</i> .....	50
4.4.2	<i>Conservação do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48</i> .....	51
4.4.3	<i>Repique do <i>Trichoderma reesei</i> LCB 48</i> .....	51
4.4.4	<i>Processo fermentativo</i> .....	53
4.5	<b>DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS</b> .....	54
4.5.1	<i>Endo-<math>\beta</math>-1,4-xilanase</i> .....	54
4.5.2	<i><math>\alpha</math>-L-Arabinofuranosidase</i> .....	54
4.5.3	<i>Endo-<math>\beta</math>-1,4-Glucanase (CMCase)</i> .....	55
4.5.4	<i>Celulase Total (FPAse)</i> .....	55
4.7	<b>EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE SORGO SACARINO</b> .....	56
4.7.1	<i>Extração com <math>H_2O_2</math> em meio alcalino</i> .....	56
4.8	<b>HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA HEMICELULOSE E DO BAGAÇO DO SORGO SACARINO</b> .....	56
4.8.1	<i>Análise dos Açúcares</i> .....	57
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>58</b>
5.1	<b>CARACTERIZAÇÃO</b> .....	58
5.1.1	<i>Determinação da composição dos substratos</i> .....	58
5.1.2	<i>Isotermas</i> .....	61
5.1.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	64

5.1.4 Termogravimetria TG/DTG .....	66
5.1.2 Difractometria de Raio-X (DRX).....	72
5.1.3 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	73
5.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS .....	76
5.2.1 CMCase.....	76
5.2.1.1 Perfil Cinético da Produção de CMCase.....	76
5.2.1.2 Análise da produção de CMCase utilizando a metodologia de superfície de resposta. ....	79
5.2.2 FPase .....	82
5.2.2.1 Perfil Cinético da produção de FPase.....	82
5.2.2.2 Análise da produção de FPase utilizando a metodologia de superfície de resposta. ....	85
5.2.3 Xilanase .....	88
5.2.3.1 Perfil Cinético da produção de Xilanase .....	89
5.2.3.2 Análise da produção de Xilanase utilizando a metodologia de superfície de resposta. ....	92
5.2.4 $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase.....	95
5.2.4.1 Perfil Cinético da produção de Arabinofuranosidase .....	95
5.2.4.2 Análise da produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase utilizando a metodologia de superfície de resposta.....	98
5.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	101
6. CONCLUSÕES .....	105
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>107</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 celulasas, hemicelulasas e ligninasas, as quais apresentam grande interesse industrial (ANWAR, GULFRAZ e IRSHAD, 2014).

As hemicelulasas formam um complexo enzimático composto por Endo-1,4- $\beta$ -xilanasas,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glucuronidase e acetil xilana esterase, que degradam a hemicelulose da biomassa, liberando glicose, arabinose, xilose, galactose e manose. As celulasas, compostas por endoglucanasas, exoglucanasas e  $\beta$ -glucosidasas, agem na biomassa liberando glicose. Os açúcares fermentescíveis obtidos a partir da hidrólise dessa biomassa podem ser utilizados na produção de etanol de segunda geração.

A demanda por combustíveis renováveis, em particular de bioetanol, está projetada para aumentar 3,4 vezes até 2035, em todo o mundo. O Departamento de Energia dos EUA, prevê que 30 % do transporte de combustíveis à base de petróleo seriam recarregados com combustíveis à base de biomassa até 2025 (BEHERA e RAY, 2016). Considerando os potenciais industriais dessas enzimas é importante a obtenção de celulasas e hemicelulasas ativas a um baixo custo.

As tecnologias disponíveis para a produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas embora bastante conhecidas, são onerosas e muitas vezes inviabilizam a rota biotecnológica para obtenção de diversos produtos. Uma alternativa para a redução desses custos é a produção de enzimas a partir de fermentação semissólida de resíduos agroindustriais, diminuindo assim os custos de produção da enzima (LINS e CONRADO, 2015).

Atualmente o Sorgo Sacarino vem sendo utilizado como cultura alternativa à cana-de-açúcar, como matéria-prima complementar na produção de álcool, principalmente em períodos de entressafra da cultura canavieira (CANAL RURAL, 2015). A extração do suco do sorgo e a fermentação deste para a produção do

bioetanol em larga escala gera uma grande quantidade de resíduos de biomassa, que se refere ao bagaço do Sorgo Sacarino (UMAGILIYAGE, COUDHARY, *et al.*, 2015).

Por se tratar de um resíduo rico em celulose e hemicelulose, teor de aproximadamente 39,42 e 25,25 %, respectivamente (YAN *et al.*, 2015), e ter ampla disponibilidade, é uma matéria-prima promissora para estudos de produção de enzimas hemicelulolíticas. A cultivar IPA P222 estudada neste trabalho como substrato é uma nova cultivar híbrida do Instituto de Agrônomo de Pernambuco, escolhida para ser usada na produção das enzimas por apresentar maior teor de hemicelulose, baixo teor de lignina e quantidade satisfatória de celulose, dentre as várias cultivares estudadas em pesquisas paralelas no laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Campina Grande.

Embora a produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais esteja bastante consolidada, após revisão da literatura constatou-se que existem poucas informações referentes ao uso do bagaço do sorgo sacarino na produção de celulasas e hemicelulasas, o que justifica uma investigação mais detalhada que leve a melhores resultados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas a partir do bagaço de sorgo sacarino (IPA P222) utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48 em fermentação semissólida.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar por meio da caracterização físico-química o teor de matéria lignocelulósica do resíduo do Sorgo Sacarino;

- Determinar por meio da caracterização o teor de açúcares redutores (AR) e nitrogênio total do farelo do trigo;

- Caracterizar a hemicelulose extraída do bagaço do sorgo sacarino por meio da degradação térmica dessa biomassa (TG/DTG e DSC), estrutura das fibras por meio do difratograma de raios-x (DRX), morfologia por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e os grupos característicos da biomassa por meio de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e comparar com as caracterizações do Bagaço do Sorgo Sacarino;

- Obter a correlação entre a atividade de água e umidade de equilíbrio para os substratos do sorgo sacarino e as misturas sorgo sacarino/farelo de trigo utilizadas durante os ensaios de fermentação, realizando o levantamento das isotermas de dessorção;

- Determinar o efeito da umidade inicial e da relação do substrato resíduo do sorgo sacarino/farelo de trigo, usando como ferramenta um planejamento experimental, na fermentação semissólida acompanhando a cinética de produção das enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) e hemicelulolíticas (Endo- $\beta$ -1,4-xilanase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase);

- Extrair a hemicelulose do bagaço do sorgo sacarino por meio de pré-tratamento químico com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em meio básico;
- Avaliar o potencial do extrato enzimático na hidrólise do bagaço do Sorgo Sacarino e na hemicelulose extraída

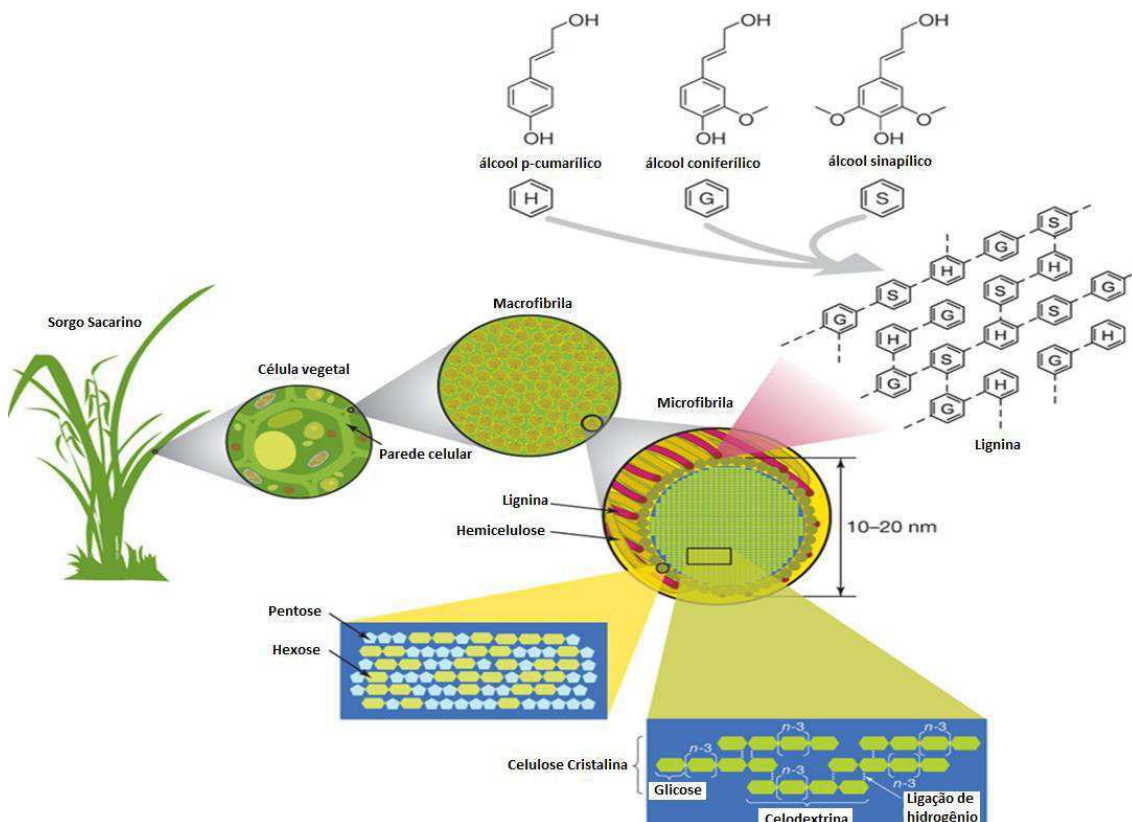
### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Segundo Nakanishi et al. (2014) o termo biomassa abrange todo o recurso renovável oriundo de matéria orgânica de origem animal ou vegetal, utilizada na produção de energia. De forma geral, as madeiras de florestas, as algas, os resíduos de processos agroindustriais e florestais, e os resíduos de humanos e de animais são considerados biomassa.

Formada principalmente por celulose, hemicelulose, lignina e frações de lipídios, proteínas, amidos e açúcares simples, a biomassa lignocelulósica também contém componentes inorgânicos e uma fração de água. A combinação de celulose, hemicelulose e lignina é chamada de “lignocelulose” e representa o recurso renovável orgânico mais abundante na Terra (SAIDUR et al., 2011). Na Figura 1 observa-se a estrutura detalhada da lignocelulose.

Figura 1. Estrutura da lignocelulose



Fonte: Adaptado de (RUBIN, 2008).

A estrutura da lignocelulose (Figura 1) é formada por microfibrilas que são organizados em macrofibrilas, as quais proporcionam a estabilidade estrutural na parede celular de plantas (RUBIN, 2008).

Sendo a lignocelulose fonte de carbono mais abundante na Terra há, portanto, a necessidade de agregar valor e de aumentar o leque de possíveis aplicações dessa biomassa.

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

Lins e Conrado (2015), utilizaram o resíduo agroindustrial do caju como fonte lignocelulósica para a produção de enzimas celulasas por meio de um processo de fermentação semissólida. Também visando a produção de enzimas Perret et al. (2015) usaram substratos lignocelulósicos (casca de arroz, casca de aveia, tegumento de soja, farelo de arroz desengordurado e sabugo de milho) para a obtenção de endoxilanases.

Brienzo et al. (2015) estudaram a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa de bagaço de cana-de-açúcar.

Reddy e Krishnan (2016) produziram xilo-oligossarídeos a partir do bagaço de cana de açúcar usando enzimas xilanase.

Sene et al. (2011) utilizando bagaço do Sorgo Sacarino obtiveram xilitol por meio de um processo biotecnológico como via alternativa a obtenção comercial atual, catálise química.

### 3.1.2 Celulose

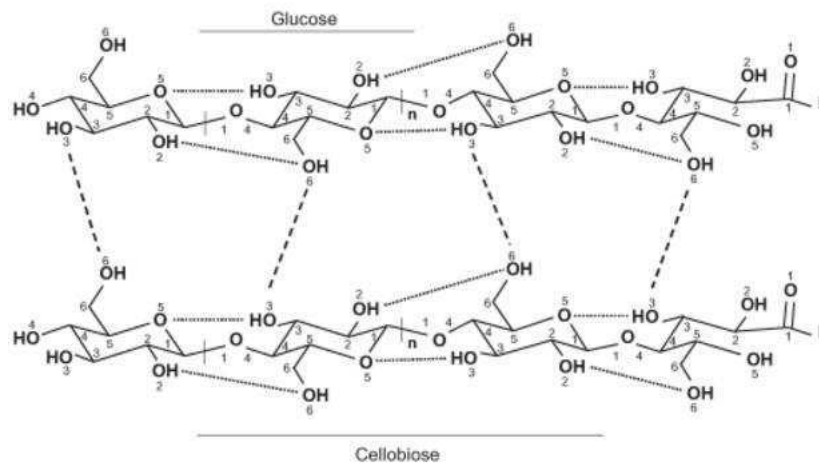
O principal componente da lignocelulose é a celulose, cadeia de moléculas de glicose vinculadas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (Figura 2). As ligações de hidrogênio entre as diferentes camadas dos polissacarídeos contribuem para a cristalinidade da celulose



dando resistência à degradação por hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (RUBIN, 2008).

O dímero, dois resíduos de moléculas de glicose, chamado celobiose é a unidade estrutural repetitiva da cadeia de celulose (FESTUCCI-BUSELLI, OTONI e JOSHI, 2007).

Figura 2. Estrutura da celulose e o padrão de ligação de hidrogênio, intra (linhas pontilhada) e inter-cadeias (linhas tracejadas)

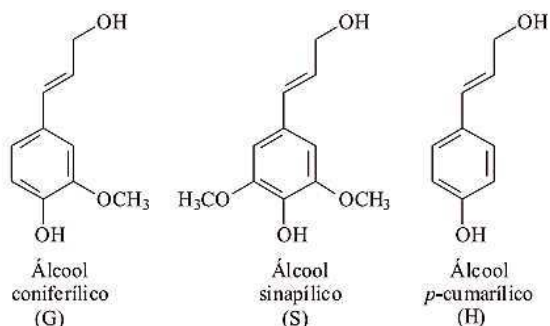


Fonte: Festucci-Buselli, Otoni e Joshi (2007).

### 3.1.2 Lignina

A lignina é um desafio especial, porque não existe estrutura definida, contudo é constituída por três componentes fenólicos principais, a saber, álcool coniferílico (G), álcool sinapílico (S) e álcool p-cumarílico (H) (Figura 3). A lignina é sintetizada por polimerização destes componentes, gerando unidades p-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, e sua proporção no interior do polímero varia entre diferentes plantas, tecidos e camadas da parede celular da madeira (RUBIN, 2008).

Figura 3. Álcoois precursores da lignina



Fonte: Kirk (1971).

Cardoso et al. (2012), afirmam em seus estudos que a lignina e a sua distribuição constituem o fator responsável pela recalcitrância dos materiais lignocelulósicos à degradação enzimática, limitando a acessibilidade da enzima.

Resultados semelhantes foram obtidos por Durrant et al. (1991). Segundo eles a lignina não permite que as enzimas hidrolíticas como a celulase e a xilanase entre outras, atuem nas fontes de carbono, impossibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para a formação de frutificação.

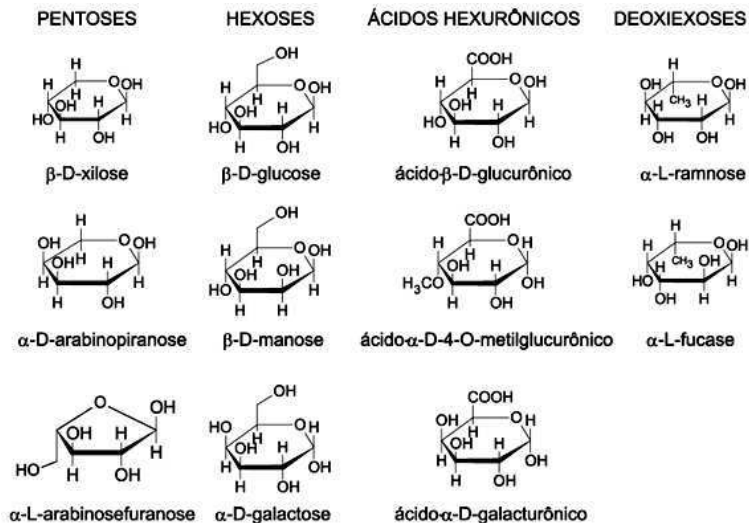
Tais resultados corroboram com Rajarathnam et al. (1992), que ao pesquisar a influência de microrganismos em contato com a lignina, observaram que essa macromolécula forma uma barreira física que dificulta a atividade de inúmeros organismos produtores de enzimas celulolíticas, uma vez que a lignina age limitando os sítios de ataques enzimáticos e impedindo a entrada de enzimas de maior peso molecular, devido ao reduzido tamanho dos capilares da biomassa, restringindo o ataque à superfície externa. Logo, a lignina é um dos principais problemas para o processo de conversão da biomassa lignocelulósica.

### 3.1.3 Hemicelulose

A hemicelulose, o segundo componente mais abundante da lignocelulose, é um grupo de polissacarídeos composto de várias unidades monoméricas de açúcar formadas por cinco (pentoses) e seis carbonos (hexoses) (Figura 4) (RUBIN, 2008). A

condensação das pentoses forma polímero conhecido como pentosanas (xilanas e arabinoxilanas) e a hexoses formam hexosanas (mananas, glucanas, glucomananas e galactanas) (CASTRO et al., 2010).

Figura 4. Açúcares que compõem a hemicelulose



Fonte: Fengel e Wegener (1989).

A hemicelulose é um grupo bastante heterogêneo de polissacarídeos ramificados e lineares os quais estão ligados com as microfibrilas de celulose na parede celular da planta e também covalentemente ligado à lignina, formando assim uma estrutura altamente complexa (SHALLOM e SHOHAM, 2003).

A xilana é o principal tipo de hemicelulose. É um polímero linear de unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosil ligadas por ligações (1 $\rightarrow$ 4) glicosídicas. Na natureza, a cadeia principal desse polissacarídeo pode ser adicionada de unidades de 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucuronopiranosil, grupos acetil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil, e outros em proporções variáveis (BAJPAI, 2014).

### 3.2 SORGO SACARINO

Planta da família *gramineae*, da espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench (NÓBILE e NUNES, 2014), o sorgo é uma planta C4 caracterizada pela alta eficiência

fotossintética, açúcares fermentescíveis e alto rendimento de biomassa verde (com 20-30 toneladas secas / ha) (MAO et al., 2015).

As iniciativas de introdução desta gramínea, de origem africana, no Brasil foram realizadas em diferentes épocas, mas contam os esforços de institutos de pesquisa e universidades, sobretudo a partir da década de 1950 (PURCINO, 2011).

Há basicamente quatro tipos de sorgo, como mostra a Figura 5, o granífero, o forrageiro, o vassoura e o sacarino, esta classificação está ligada à sua natureza e a forma de sua utilização (TABOSA et al., 1999).

Figura 5. Tipos de Sorgo: Granífero, Vassoura, Forrageiro e Sacarino



Fonte: Adaptado de Embrapa (2015), Embrapa (2015), Tardin (2014), Barreto e Delfino (2012).

O sorgo sacarino possui porte alto, caracterizado, principalmente, por apresentar colmo doce (Figura 6) e succulento como o da cana-de-açúcar (ITA, 2015), curto ciclo vegetativo, que está entre 90 e 120 dias, menor necessidade de fertilizantes, uma elevada eficiência na utilização da água (1/3 da cana e 1/2 do milho), e maior tolerância à salinidade e seca, quando comparando com cana de açúcar e milho (DEESUTH et al., 2015).

Figura 6. Colmo do sorgo sacarino



Fonte: Embrapa, (2012).

Na Tabela 1, podemos observar que estudos anteriores apontam que o sorgo sacarino possui teor médio de 23,67 a 47,47 % de celulose, 17,02 a 38,19% de hemicelulose e 8,58 a 23,84 % de lignina.

Tabela 1. Composição do Sorgo Sacarino

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
36,90	17,80	19,70	Umagiliyage et al. (2015)
47,47	28,00	19,00	Pengilly et al. (2012)
39,42	25,25	18,93	Yan et al. (2015)
24,10	36,96	8,71	Araújo et al. (2014)
23,67	38,19	8,58	Araújo et al. (2014)
40,40	20,00	19,80	Barcelos et al. (2016)
37,68	17,02	13,84	Zheting et al. (2017)
44,83	31,33	23,84	Prathyusha et al. (2016)
36,60	22,96	-	Marx et al. (2014)

Frente a essas características a comunidade acadêmica tem identificado o Sorgo Sacarino como matéria-prima promissora para a conversão em combustíveis e produtos biotecnológicos. Embora o sorgo sacarino venha sendo reportado na literatura como resíduo de interesse para a sua produção de etanol de segunda geração, a produção de enzimas de interesse industrial, como a celulase e a hemicelulase, são pouco reportadas na literatura. Por possuir em sua composição altos teores de celulose e hemicelulose o resíduo agroindustrial do Sorgo Sacarino torna-se bastante interessante para estudos de produção dessas enzimas por meio de fermentação semissólida dessa biomassa.

Umagiliyage et al. (2015) chamam a atenção para o potencial do bagaço do Sorgo Sacarino na produção de biocombustível lignocelulósico. Segundo os autores a fermentação do suco de sorgo para a obtenção de etanol é uma abordagem comum de produção de bioetanol a partir de Sorgo Sacarino. No entanto, em larga escala da extração desse suco gera uma grande quantidade de resíduos de biomassa que se refere ao bagaço de Sorgo Sacarino (BSS). Considerando os altos teores de celulose e hemicelulose encontrados no bagaço (Tabela 1), confirma-se como matéria-prima realmente atraente para a produção do etanol de 2ª geração.

### **3.3 PRÉ-TRATAMENTOS**

Apesar da biomassa lignocelulósica ser fonte promissora de derivados biotecnológicos, o uso dela como fonte de açúcares fermentescíveis para produção de etanol de segunda geração, de xilitol e produção de enzimas, esbarram muitas vezes em barreiras físicas que impedem o acesso de microrganismos e enzimas.

De acordo com Zabed et al. (2016), a celulose contida na biomassa lignocelulolítica é geralmente revestida por hemiceluloses formando complexo celulose-hemicelulose, esses complexos são ainda encapsulados com lignina e produzem uma barreira física à hidrólise da biomassa para produzir açúcares fermentáveis. Portanto, o pré-tratamento é necessário para desestruturar o complexo lignina-celulose-hemicelulose por meio da alteração das estruturas macroscópicas, submicroscópicas e microscópicas da biomassa, tornando-o acessível às enzimas hidrolíticas que finalmente convertem celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis.

O pré-tratamento é escolhido de acordo com o componente que se deseja isolar da biomassa ou de acordo com as alterações da biomassa ocorridas durante o pré – tratamento, podendo ser remoção de lignina, a diminuição da cristalinidade da celulose e o aumento da área superficial e da porosidade da biomassa. Alguns processos de pré-tratamento também podem libertar açúcares fermentescíveis por hidrólise da fração de hemicelulose (ZABED et al., 2016).

Os pré-tratamentos mais comumente aplicados para materiais lignocelulósicos, incluem pré-tratamentos físicos (redução de tamanho), pré-tratamentos físico-químicos (água quente/líquida, explosão a vapor, explosão fibra de amônia), pré-tratamentos químicos (ácidos, alcalinos, alcalino / oxidativo, oxidação úmida, ozonólise) e pré-tratamentos biológicos (fungos de degradação branca e hidrólise enzimática) (TOQUERO e BOLADO, 2014; TALEBNIA, KARAKASHEV e ANGELIDAKI, 2010).

O presente trabalho se concentra em pré-tratamento alcalino oxidativo para extração da hemicelulose do bagaço de sorgo sacarino IPA P222. Sendo essa hemicelulose obtida utilizada como substrato da hidrólise enzimática e obtenção de açúcares fermentescíveis (Xilose) usável em produção de xilitol e etanol de 2ª geração. O pré-tratamento alcalino-oxidativo foi escolhido por apresentar bons resultados de rendimento de extração e alta solubilidade da hemicelulose extraída.

### **3.3.1 Processo Alcalino e alcalino oxidativo**

Os tratamentos alcalinos (NaOH, por exemplo) e alcalino oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alcalino) são métodos químicos eficazes para pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos. O hidróxido de sódio (NaOH) é amplamente utilizado nesses materiais, podendo remover lignina e hemicelulose parcial da biomassa por quebrar as ligações éster da biomassa e assim aumentar sua porosidade (Xu et al., 2010 e Zhang et al., 2011).

O peróxido alcalino vem sendo usado para pré-tratamento da lignocelulose em anos recentes, podendo melhorar a hidrólise enzimática por deslignificação. Cao et al. (2012) mostraram que o pré-tratamento com peróxido alcalino foi um dos métodos mais eficazes na extração de lignina do bagaço do Sorgo Sacarino utilizado na hidrólise enzimática e produção de etanol.

Embora vários métodos de pré-tratamento mostraram a eficácia de muitas pesquisas, a combinação de dois ou mais métodos de pré-tratamento pode ser mais

eficaz do que um único. Além disso, a seleção de processo de pré-tratamento para um determinado material depende do tipo de material de biomassa (CAO et al., 2012).

Segundo Brienzo, Siqueira e Milagres (2009) a hemicelulose do bagaço de cana é predominantemente removida durante extrações alcalinas de peróxido de hidrogênio (processo oxidativo). Em termos de rendimento elevado, de cor clara e degradação mínima de hemicelulose, um tratamento ótimo foi verificado ao utilizar de 6% (m/v) de peróxido de hidrogênio, durante 4 horas a 20°C. De acordo com estes resultados o tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino do bagaço de cana tem um grande potencial para o isolamento de bagaço de cana hemicelulose com rendimentos elevados atingindo 90%.

### **3.4 ENZIMAS CELULASES E HEMICELULASES**

#### **3.4.1 CELULASE**

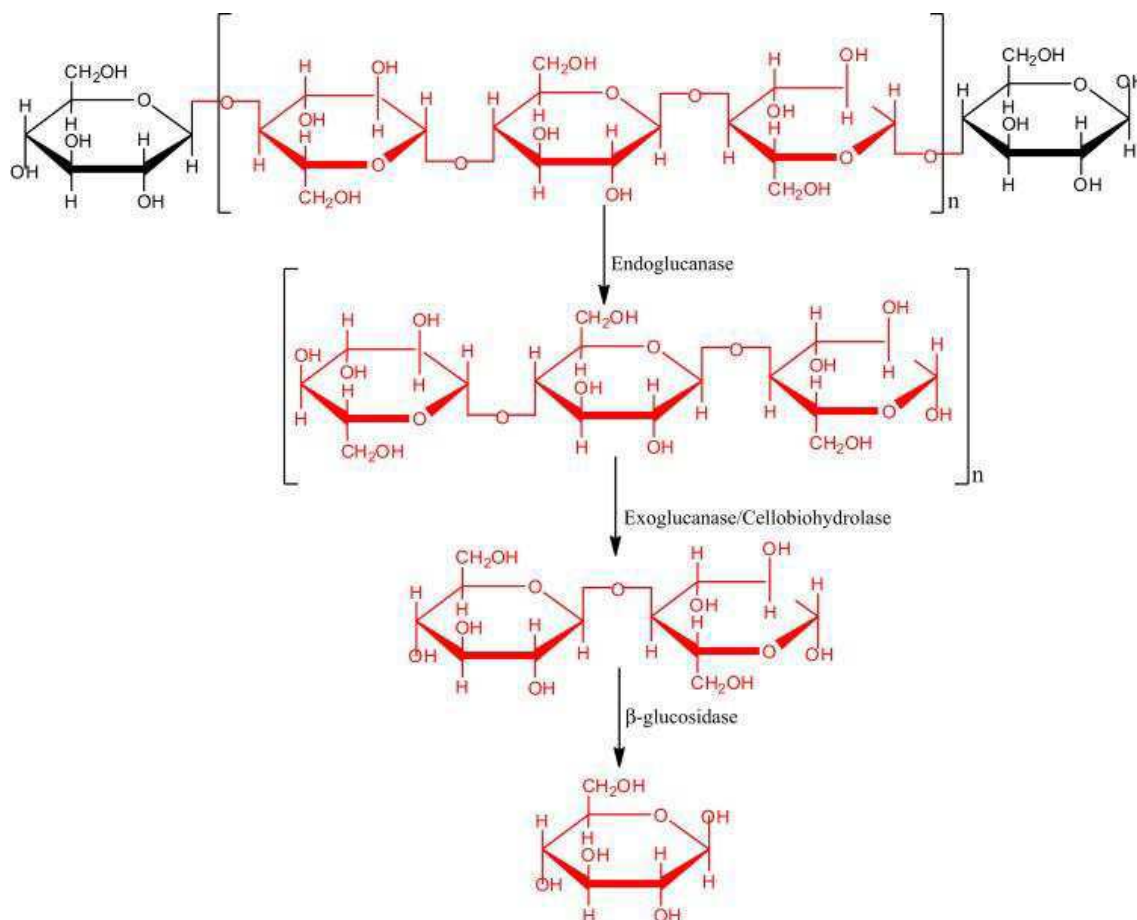
Três celulasas trabalhando sinergicamente são responsáveis pela realização da hidrólise da celulose, as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4), exoglucanases (E.C.3.2.1.176) (E.C.3.2.1.91) e  $\beta$ -glucosidases (E.C.3.2.1.21).

Na Figura 7 temos a representação da ação das celulasas sobre a celulose liberando glicose.

Endoglucanases hidrolisam as ligações glicosídicas, de maneira aleatória, nas regiões amorfas da celulose gerando oligômeros de cadeia longa para a ação de exoglucanases ou celobio-hidrolases, que clivam as cadeias de oligossacáridos longos geradas pela ação de endoglucanases em oligossacáridos de cadeia curta. Existem dois tipos de exoglucanases, que atuam uni-direcionalmente nos oligômeros de cadeia longa, quer a partir das extremidades reductoras (CE 3.2.1.176) ou extremidades não reductoras (CE 3.2.1.91) liberando celobiose, que é posteriormente hidrolisado em glicose por  $\beta$ -glucosidases (CE 3.2.1.21) (Figura 7) (JUTURU e WU, 2014).



Figura 7. Representação do princípio da ação das celulases sobre polímero de celulose liberando glicose. Celulose amorfa em preto e a celulose cristalina em vermelho.



Fonte: Juturu e Wu (2014)

As endoglucanases hidrolisam além da celulose amorfa, as celuloses quimicamente modificadas e solúveis como a carboximetilcelulose (CMC), a partir desta característica as endoglucanases também possuem o nome de CMCases. Essas enzimas iniciam a hidrólise das ligações glicosídicas mais internas da cadeia de celulose, nas regiões de menor organização estrutural. As cadeias amorfas são dessa forma facilmente atacadas por não apresentarem ligações tão fortes como as envolvidas nas cadeias cristalinas, ligadas por interações intermoleculares das pontes de hidrogênio (MARTINS, 2005).

Ao contrário das endoglucanases, o grupo das enzimas exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) atuam na celulose cristalina, em vermelho na Figura 6.

As exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) não atuam sobre celulose solúvel por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes

como carboximetílico (CMC). As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Assim, ensaios de atividade sobre CMC são característicos para endoglucanases, enquanto que a atividade contra celulose microcristalina (Avicel ®) caracteriza as celobiohidrolases, tornando possível a diferenciação entre as enzimas (MARTINS, 2005).

As  $\beta$ -glucosidades, também denominadas celobiasas, possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas endoglucanases e celobiohidrolases em glicose. Estritamente falando,  $\beta$ -glucosidades não são celulases legítimas, uma vez que elas agem sobre substratos solúveis, mais sua contribuição é muito importante para eficiência da hidrólise da celulose e remoção da celobiose do meio reacional (MEDVE, 1997). A atividade das  $\beta$ -glucosidades pode ser determinada usando celobiose, a qual não é hidrolisada por endoglucanases nem exoglucanases (GHOSE, 1987).

### 3.4.2 HEMICELULASES

As hemicelulases são um grupo diverso de enzimas que hidrolisam hemiceluloses – segundo abundante grupo de polissacarídeos na natureza. Estas enzimas têm muitas aplicações em processos biotecnológicos, suas funções e estruturas tem sido assunto de intensa pesquisa (SHALLOM e 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 os 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

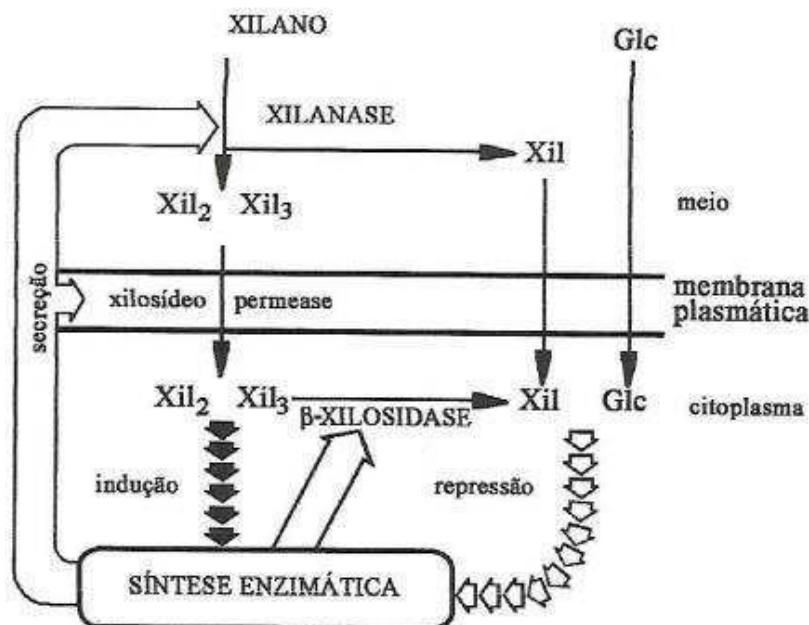
que clivam oligossacarídeos e produzem monossacarídeos (KALOGERIS et al., 2003).

De acordo com a literatura as hemicelulases mais estudadas são as que hidrolisam a hemicelulose do tipo xilana, essas são chamadas de xilanases e agem catalisando a hidrólise de ligações endo-1,4- $\beta$ -D-xilosídicas na molécula da xilana (POUTANEN et al., 1987).

As enzimas xilanólíticas estão em localizações extra ou intracelular. Mas em geral são enzimas extracelulares indutíveis, produzidas em substratos que contenham xilana e também estão sujeitas a repressão catabólica (COELHO, 2002).

A xilana não consegue entrar na célula por se tratar de uma estrutura polimérica de alta massa molar, havendo assim a necessidade de ser degradada no meio extracelular. Portanto, enzimas como as endo-xilanases e as esterases são secretadas pelas células para o meio circundante (Figura 8). Os principais produtos de degradação da xilana por enzimas extracelulares são os xilo-oligossacarídeos, ácido acético, L-arabinose, ácido 4-O-metil-D-glucurônico e D-xilose (BIELY, 1985).

Figura 8. Regulação da biossíntese de xilanase em *Cryptococcus albidus*.



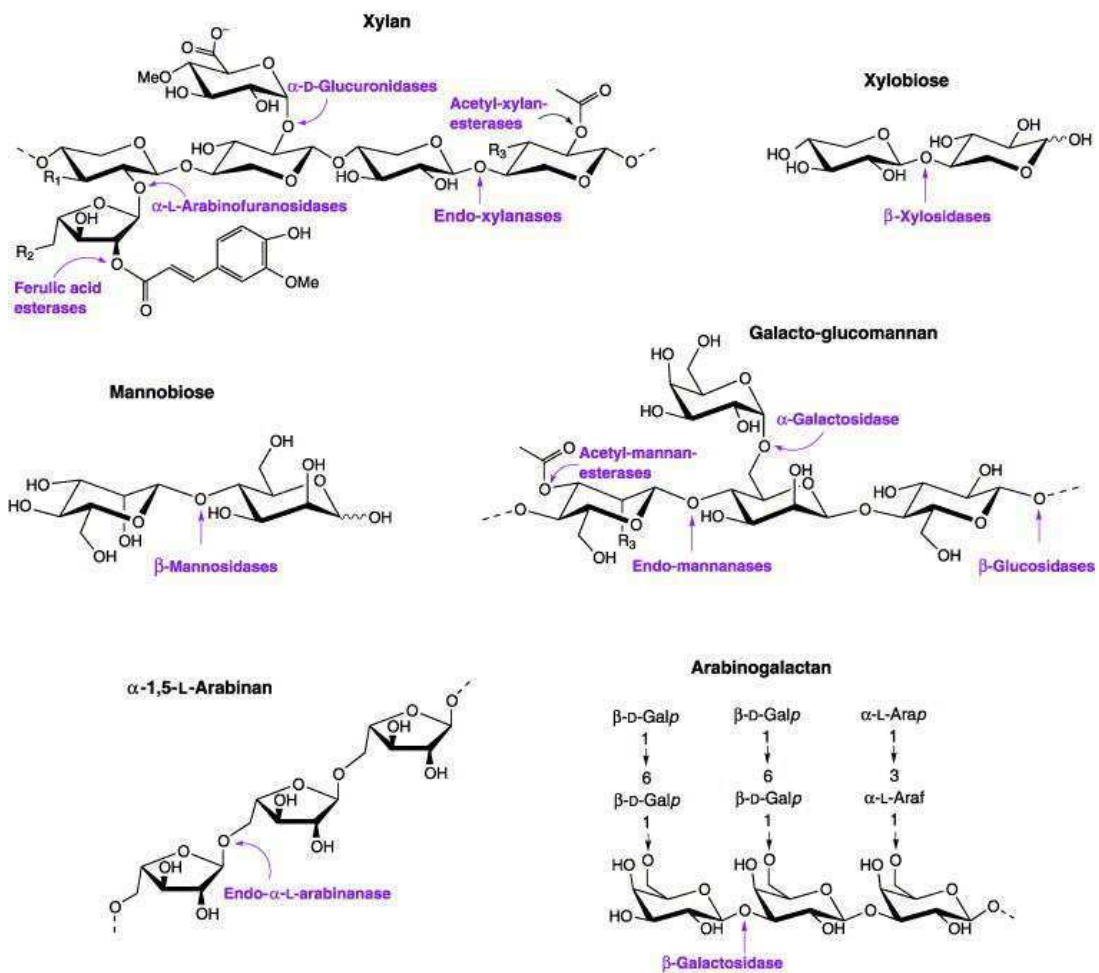
Glc – D-glicose; Xil – xilose; Xil<sub>2</sub> – xilobiose; Xil<sub>3</sub> – xilotriose.

Fonte: Biely (1985), modificado por Coelho (2002).

Devido à heterogeneidade e complexa natureza química da xilana, a sua quebra completa requer a ação de um complexo de várias enzimas hidrolíticas, que atuam cooperativamente para converter a xilana em seus açúcares constituintes (BAJPAI, 2014).

A Figura 9 nos mostra os componentes estruturais básicos encontrados em hemiceluloses e as hemicelulases responsáveis por sua degradação.

Figura 9. Os componentes estruturais básicos encontrados em hemicelulose e as hemicelulases responsáveis por sua degradação.



Current Opinion in Microbiology

Fonte: Shallom e Shoham (2003).

A endo-1,4-β-xilanases (1,4-β-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; PULS e POUTANEN, 1989).

As xilanases e as xilosidases são induzíveis: são produzidas em quantidades elevadas durante o crescimento em matriz que contenha xilana e a síntese das enzimas é reprimida por fontes de carbono facilmente metabolizadas, tais como glicose e/ou xilose. No entanto, a síntese das enzimas xilanolíticas é acelerada quando envolve fragmentos de menor massa molar, ou seja, xilobiose e xilotriose (Figura 8) (BIELY, 1985).

A enzima  $\beta$ -xilosidase (1,4- $\beta$ -D-xilosido xilohidrolase) faz parte da maioria dos sistemas xilanolíticos microbianos, níveis altos de produção dessas enzimas tem sido encontrado de forma extracelular e associado à célula, intracelular (Figura 8). Essas enzimas podem hidrolisar xilooligossacarídeos e xilobiose a xilose por remoções sucessivas de D-xilose a partir da terminação não redutora. Porém, as  $\beta$ -carxilosidases purificadas mostram maior atividade em direção a xilobiose, nenhuma atividade em relação a xilana e a atividade em relação aos xilooligossacarídeos geralmente diminui com o aumento do comprimento da cadeia (BAJPAI, 2014).

A  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase faz parte da classe das arabinases, elas hidrolisam grupos não-redutores  $\alpha$ -L-arabinofuranosil de arabinanas, arabinoxilanas e arabinogalactanas. Há dois tipos de arabinofuranosidases: Exo- $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) e endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.99). As exo são ativas em arabinanas ramificadas e as endo são ativas apenas com arabinanas lineares (BAJPAI, 2014).

### **3.5 PRODUÇÃO DAS CELULASES E HEMICELULASES**

Os processos de fermentação para obtenção de enzimas podem ser divididos em dois sistemas: fermentação submersa (FSM), que se baseia no cultivo de microrganismos num meio líquido contendo nutrientes, e fermentação em estado

sólido ou semi-sólido (FSS), que consiste no crescimento e formação do produto microbiano em partículas sólidas na quase ausência de água. No entanto, o substrato deve conter umidade suficiente para permitir o crescimento do microrganismo e metabolismo (PANDEY, 2003).

Nos últimos anos, FSS recebeu mais interesse dos pesquisadores. Vários estudos têm demonstrado que este processo pode levar a maiores rendimentos e produtividades ou características de produtos melhores do que FSM. Além disso, a produção de enzimas por FSS é vantajosa, em relação aos demais processos de cultivo, devido à capacidade de utilizar substratos sólidos constituídos por resíduos agroindustriais que servem como fontes de carbono e energia para o crescimento de microrganismos. O baixo volume de água em FSS tem também um grande impacto sobre a economia do processo, principalmente devido ao menor tamanho do fermentador, redução de processamento *downstream*, agitação reduzida e menores custos de esterilização (HÖLKER e LENZ, et al., 2005, MARTINS et al., 2011, PANDEY, 2003; FLORENCIO, et al., 2016 e RAGHAVARAO et al., 2003).

Utilizando fermentação submersa Goluguri et al. (2015) obtiveram atividade de endo-xilanase de 31,0 U/g utilizando resíduo de palha de arroz como fonte de carbono. Já a fermentação semissólida do resíduo agroindustrial do bagaço do limão foi estudada por Rodríguez-Fernández et al. (2011), utilizando um biorreator com capacidade de 2 kg foi obtida uma atividade de endo-xilanase equivalente a 65,38 IU/g. Corroborando com o que foi dito pelos autores anteriormente, a FSS apresentou maior produção de enzimas xilanases quando comparada com a FSM.

Resultados semelhantes são reportados na literatura para celulases, Herculano et al. (2011) observaram valores máximos de atividade de 953,4 U/gds (FPase), 191,6 U/gds (CMCase), e 88,3 U/gds ( $\beta$ -glucosidase) ao trabalhar com fermentativo semi-sólido da torta de mamona e *Aspergillus japonicus*. No entanto, ao trabalharem com o mesmo microrganismo em fermentação submersa usando fonte indutora carboximetilcelulose (2 %) obtiveram valor de 0,37 U/mL de atividade de CMCase.

Florencio et al. (2016) estudando o efeito do método de cultivo sobre a produção de enzimas por *A. niger* e *T. reesei*, obtiveram resultados semelhantes. Os dois fungos filamentosos foram capazes de crescer e produzir enzimas sob os

diferentes sistemas avaliados (FSS e FSM), porém, reportaram atividades de xilanase, endoglucanase, FPase e  $\beta$ -glucosidase no coquetel enzimático FSS de *A. niger* e *T. reesei* maiores que as produzidas por FSM. Demonstrando que o método de cultivo da fermentação semissólida foi mais eficiente ao produzir enzimas.

O interesse na produção dessas enzimas deve-se ao uso crescente das xilanases e celulasas em diversos processos, onde se destacam a produção de compostos medicinais como agentes anti-glicêmicos e anti-carcinogênicos, melhoramento do sabor do vinho, aumento da qualidade do pão, tratamento de polpas vegetais, clarificação de sucos, aumento da qualidade de rações, produção de bioetanol e síntese de oligossacarídeos (NUMAN e BHOSLE, 2005).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO**

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Engenharia Bioquímica (LEB), da Universidade Federal de Campina Grande, em Campina Grande – Paraíba e no Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife – Pernambuco.

### **4.2 SUBSTRATO**

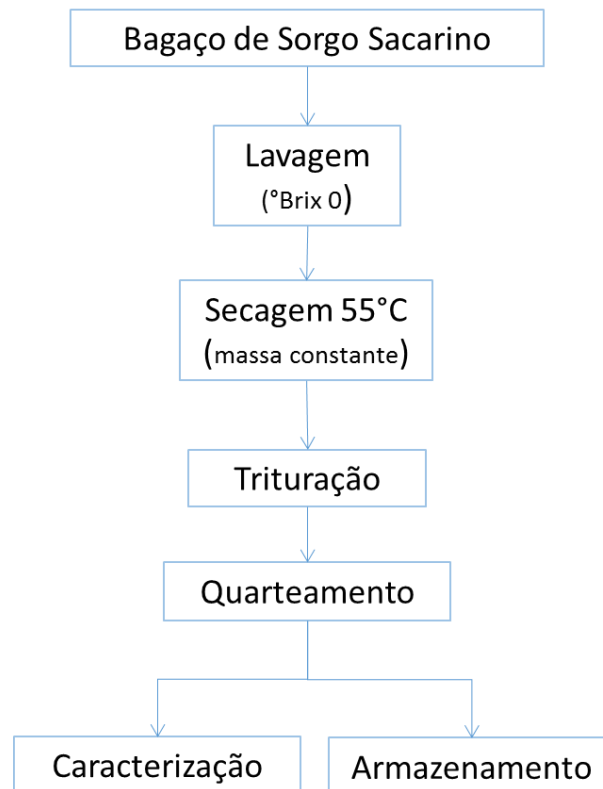
Como substrato, do processo fermentativo e de extração das hemiceluloses, foi utilizado o Sorgo Sacarino cedido pelo Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). Como incremento no processo fermentativo foi utilizado o farelo de trigo, *in natura* e seco, adquirido comercialmente da empresa Grings Alimentos Saudáveis. O qual foi usado como fonte indutora das celulasas e hemicelulasas (GASPAR et al., 1997).

O substrato (bagaço do sorgo sacarino) passou por processo de lavagem com água destilada para remover os açúcares facilmente assimiláveis contidos no substrato já que, de acordo com a literatura, a glicose, lactose e xilose em alta concentração podem ser repressoras na produção das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas (GASPAR et al., 1997), a remoção dos sólidos solúveis totais (SST) foi acompanhada pela medida do °Brix do lixiviado em refratômetro.

O fluxograma (Figura 10) a seguir, apresenta todo o processo de preparação do bagaço de sorgo sacarino para armazenamento e posterior uso nas fermentações e extração da hemicelulose.



Figura 10. Fluxograma de preparação do bagaço do sorgo sacarino



Como observado na Figura 10 o resíduo, após lavagem, foi seco em estufa com circulação de ar forçada a uma temperatura de 55 °C até atingir massa constante, temperatura suficiente para secagem sem comprometer a qualidade nutritiva do bagaço. Após atingir massa constante, o resíduo foi triturado em moinho de facas da marca Tecnal, para obtenção da granulometria necessária.

O bagaço sorgo sacarino lavado, triturado e seco à 55°C foi homogeneizado, e submetido ao quarteamento para obtenção da amostra representativa para caracterização físico-química e instrumental do substrato. O bagaço foi armazenado em embalagem hermeticamente fechada a temperatura ambiente, até o momento de ser utilizado.

## 4.3 CARACTERIZAÇÃO

### 4.3.1 Teor de umidade

A análise do teor de umidade seguiu metodologia preconizada por AOAC (1975). Para determinação da umidade do material foram colocadas cápsulas de alumínio na estufa a 105 °C por 24 h e em seguida transferidas para um dessecador por 20 min. Após esse período,  $2,0 \pm 0,0001$  g do material foram pesados em balança analítica (Shimadzu). Amostra e recipiente, foram levados a estufa sob às mesmas condições de temperatura e tempo. Ao término das 24 horas, o conjunto foi levado imediatamente para resfriamento em dessecador, em seguida em balança analítica foi determinada a massa seca da amostra. Para o cálculo do teor de umidade, em base úmida, foi usada a Equação 1:

$$U_{b.u.}(\%) = \frac{m_u - m_s}{m_u} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

$U_{b.u.}$  – umidade base úmida

$m_u$  - massa úmida

$m_s$  - massa seca

### 4.3.2 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado segundo metodologia da AOAC (1975). Os cadinhos de porcelanas foram colocados em mufla a 600°C por 30 minutos, após esse tempo, os cadinhos foram retirados e deixados em dessecador, por 30 minutos, para esfriar, posteriormente foram pesados, obtendo-se a tara dos mesmos. Foi adicionado  $2 \text{ g} \pm 0,1 \text{ mg}$  do material em cada cadinho (triplicata), e em seguida, foram levados para a chapa elétrica para realização da pré-queima, para facilitar a combustão na mufla. Dando prosseguimento, os cadinhos foram levados à mufla por 2 horas a 600°C, prolongando-se por mais 2 horas, após as quais, foram retirados e transferidos para um dessecador, por 30 minutos, para esfriar e proceder a determinação da massa em balança em analítica. O cálculo foi realizado conforme Equação 2:

$$CZ(\%) = \frac{m_{cz} - m_{cad}}{m_A} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

CZ - cinzas

$m_{cz}$  - massa do cadinho + cinza

$m_{cad}$  - massa do cadinho

$m_A$  - massa da amostra, em grama

### 4.3.3 Extrativos

O teor de extrativos totais foi determinado seguindo o método TAPPI T 204 cm-07 (TAPPI, 2010). Uma amostra de 10 g da amostra seca foi pesada e submetida à extração com sistema solvente (ciclo-hexano e etanol, 2:1) em aparelho tipo Soxhlet, acondicionada em cartucho confeccionado por papel de filtro quantitativo previamente tarado, por 8 horas. Após este tempo o solvente foi removido, e os resíduo obtido no cartucho foi seco em estufa a 105°C até massa constante, para a determinação do teor de extrativos totais. A porcentagem de extrativos foi determinada com base na diferença de massa conforme a Equação 3.

$$\% EX = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

EX - extrativos

$m_i$  - massa inicial, g

$m_f$  - massa final, g

### 4.3.4 Determinação do Teor de Holocelulose ( $\alpha$ -Celulose + Hemicelulose)

A análise do teor de holocelulose seguiu-se de acordo com metodologia preconizada por Moraes, Rosa e Marconcini (2010). Em um frasco do tipo erlenmeyer de 500 mL, foram adicionados 3,0 g do material vegetal seco, livre de extrativos. Em seguida, foram acrescentados 120 mL de água destilada. Em uma capela de exaustão, foi preparado um banho-maria, mantido a temperatura constante de 70 °C. Ao erlenmeyer, foram acrescentados 2,5 g de clorito de sódio ( $\text{NaClO}_2$ ), com pureza

aproximada de 80%, e 1 mL de ácido acético glacial, com pureza  $\geq 99,85\%$ . O conjunto erlenmeyer-reagentes foi tampado com um outro erlenmeyer de 25 mL, mergulhado no banho, aquecido por uma hora, e mantido sobre agitação magnética. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de ácido acético e 2,5 g de clorito de sódio, com intervalo de 1 hora foi realizada uma nova adição dos reagentes ao conjunto, que permaneceu em aquecimento e agitação por mais três horas. Com o período de reação finalizado, o conteúdo do erlenmeyer foi transferido para o sistema de filtração a vácuo com agitação constante evitando assim a perda de precipitado no interior do erlenmeyer. Para a realização da filtração foram utilizados funis de vidro sinterizados, previamente lavados, secos em estufa e pesados em balança analítica.

Após esta etapa, o precipitado recolhido no funil foi lavado com água destilada e, por fim, levado para estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceu por 24 horas, até massa constante.

Posteriormente à secagem, o conjunto funil-holocelulose foi levado até o dessecador por 30 minutos, e a massa do funil somada à massa de holocelulose foi medida, em uma balança analítica.

Com base nos dados obtidos pode ser calculado o teor de holocelulose (TH%), conforme a Equação 4:

$$TH (\%) = \left[ \frac{(MFH - MF)}{MA} \times 100\% \right] \quad (4)$$

Em que:

TH – teor de holocelulose

MFH – massa do funil + massa de holocelulose

MF – massa do funil seco

MA – massa da amostra

Como os dados foram referentes a massa da amostra seca e sem extrativos, logo, foi necessário a correção dos valores do material original usando a Equação 5.

$$TH (\%) \text{ corrigido} = \left[ \frac{TH (\%) - [100 - (TE(\%) + TU(\%))]}{100} \right] \quad (5)$$

Em que:

TH – teor de holocelulose

TE – teor de extrativos

TU – teor de umidade

#### 4.3.5 Determinação do Teor de $\alpha$ -Celulose

A determinação do teor de  $\alpha$ -celulose foi realizada de acordo com metodologia preconizada por Moraes, Rosa e Marconcini (2010). Inicialmente, cerca de 1,0 g das amostras de holocelulose secas, obtidas anteriormente, foram pesadas, e em seguida colocadas em um almofariz, à temperatura ambiente. Um volume de 15 mL de uma solução de NaOH a 17,5% (m/v) foram adicionados, e após dois minutos em repouso, o material foi macerado por oito minutos. Foi acrescentado 40 mL de água destilada ao almofariz, e o conteúdo passou por filtração a vácuo e o precipitado recolhido foi lavado com água destilada. Realizada a filtração, o funil foi levado para estufa a 105 °C, por 24 horas. Após a secagem, o conjunto funil-holocelulose foi colocado em dessecador, por 30 minutos, e a massa do funil somada à massa de  $\alpha$ -celulose foi pesada em balança analítica.

Com o conhecimento dos dados obtidos foi possível a determinação do teor de  $\alpha$ -celulose (TA%) em percentagem, de acordo com a Equação 6:

$$TA (\%) = \left[ \frac{(MFA - MF)}{MAH} \right] \times 100\% \quad (6)$$

Em que:

TA – teor de  $\alpha$ -celulose

MFA – massa do funil + massa de  $\alpha$ -celulose

MF – massa do funil seco

MAH – massa de hemicelulose

O teor corrigido de  $\alpha$ -celulose, com base no teor corrigido de holocelulose, foi calculado a partir da Equação 7:

$$TA (\%)_{\text{corrigido}} = \left[ \frac{(TH (\%)_{\text{Corrigido}} - TA (\%))}{100} \right] \quad (7)$$

Em que:

TA – teor de  $\alpha$ -celulose

TH – teor de holocelulos

#### 4.3.6 Lignina

O teor de lignina foi obtido de acordo com metodologia preconizada por Moraes, Rosa e Marconcini (2010). Na determinação de lignina foi utilizado cerca de 1,0 g de amostra moída, na sua forma sem extrativos. O material foi colocado em almofariz e adicionados 17,0 mL de ácido sulfúrico 72% (v/v), resfriado em geladeira a 15 °C. O material foi macerado por 15 minutos cuidadosamente com o pistilo, até eliminar partículas visíveis não solubilizadas, e deixado em repouso por 24 horas para digestão.

Ao material digerido foram adicionados 306 mL de água destilada ao almofariz para diluição do ácido sulfúrico a 4 % (v/v). Em seguida, o conteúdo foi transferido quantitativamente para o balão de 500 mL, o qual foi conectado a um condensador de bolas, permanecendo sob aquecimento e refluxo por 4 horas, o qual foi contabilizado a partir do início da fervura. Após esse tempo de refluxo o material foi deixado em repouso até temperatura ambiente.

Para o processo de filtração, papéis de filtro foram colocados em estufa a 105 °C, até massa constante e guardados em um dessecador, até o momento da utilização, quando a massa foi medida.

Para realização da filtração a vácuo, o material foi transferido aos poucos para o funil, com agitação constante, para evitar a perda do precipitado. Após a transferência de todo o material contido no balão volumétrico, este foi lavado com água destilada, para que nenhum resíduo de lignina insolúvel fosse perdido.

O precipitado recolhido no papel de filtro foi lavado com água destilada até o pH próximo ao da água utilizada. Posteriormente, o papel de filtro foi levado para estufa a 105 °C onde permaneceu por 24 horas. Após a secagem, o conjunto papel-lignina foi resfriado em dessecador por 30 minutos e em balança analítica foi medida a massa do papel somada à massa da lignina.

Com base nos dados obtidos pode-se calcular o teor de lignina insolúvel (TLI%), conforme a Equação 8:

$$TLI (\%) = \left[ \frac{(MFL - MF)}{MA} \times 100\% \right] - CZ (\%) \quad (8)$$

Em que:

TLI – teor de lignina insolúvel

MFL – massa do funil + massa de lignina seca

MF – massa do funil seco

MA – massa da amostra

CZ – teor de cinzas na amostra

#### 4.3.7 Proteína

Para determinação da proteína bruta foi utilizado o método semi-micro Kjeldahl conforme Malavolta, Vitti e Oliveira (1989). Em um tubo de digestão foi adicionado 0,1 g da amostra, 0,7 g de mistura digestora e 7 mL de ácido sulfúrico. O conjunto foi deixado por 12 horas em pré-digestão. Em seguida, em bloco digestor as amostras foram aquecidas a 350 °C, partindo da temperatura ambiente e aumentando-se 40 °C a cada 30 minutos até a temperatura citada, permanecendo assim até o final da digestão, caracterizada pela obtenção de um líquido incolor ou levemente esverdeado. As amostras foram retiradas do bloco, resfriadas a temperatura ambiente e levadas ao destilador de nitrogênio conectado a um erlenmeyer de 125 mL contendo 5 mL de solução indicadora de ácido bórico na ponta do destilador. Ao digerido foi adicionado 25 mL de NaOH 10 mol/L e a torneira do vapor de água foi aberta para dar início a destilação, a qual terminou ao completar cerca de 50 mL de destilado em erlenmeyer contendo a solução indicadora. O destilado foi titulado com HCl 0,02 N até o ponto de viragem do indicador. Em paralelo, foi realizado uma prova em branco, contendo apenas os reagentes. Por meio da Equação 9 obteve-se o teor de nitrogênio. O teor de proteína foi obtido a partir da multiplicação do teor de nitrogênio pelo fator de conversão 5,83 para o farelo de trigo e 6,25 para o sorgo sacarino (Equação 10) (IAL, 2008).

$$\% N = \frac{(V_{branco} - V_{amostra}) \times 0,02 \times F}{m_{amostra}} \quad (9)$$

$$\% P = \% N \times 6,25 \quad (10)$$

Em que:

N – nitrogênio

P – proteína

V<sub>branco</sub> – volume gasto na titulação na prova em branco

V<sub>amostra</sub> – volume gasto na titulação na amostra

M<sub>amostra</sub> – massa da amostra

#### **4.3.8 Açúcares Redutores**

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

Para o desenvolvimento da metodologia 1 g da amostra (m<sub>A</sub>) foi diluída em volumes variados de água destilada (V<sub>A</sub>), em seguida a mistura foi homogeneizada e mantida em repouso por 30 minutos. As diferentes diluições foram feitas de forma que a absorbância lida no espectrofotômetro estivesse dentro da curva de calibração e assim a concentração de açúcares redutores e redutores totais fossem calculadas com base no fator de conversão (F<sub>C</sub>) da curva de calibração realizada previamente.

Para a determinação dos açúcares redutores, 1mL do extrato da amostra foi colocado em tubo de ensaio contendo 1 mL do DNS e levado à fervura em banho-maria por exatos 5 minutos. Em seguida, o tubo de ensaio foi resfriado em água fria e 8mL de água destilada foram adicionados. A leitura da absorbância da amostra foi então realizada em um espectrofotômetro UV-Vis em um comprimento de onda de 540 nm, previamente zerado com uma amostra em branco submetida ao mesmo procedimento, no qual 1mL de extrato da amostra, foi substituído por 1 mL de água destilada que foi o fluido utilizado na extração dos açúcares presentes na amostra a ser analisada.

Os resultados de açúcares redutores foram expressos em gramas de açúcares redutores por grama de amostra analisada, seguindo a Equação 11.



$$AR (g_{AR}/g_A) = \frac{Abs \times F_C \times V_A}{m_A \times 1000} \quad (11)$$

Onde:

Abs – Absorbância

F<sub>C</sub> – Fator de conversão, baseado do DNS.

V<sub>A</sub> – Volume de água destilada

m<sub>A</sub> – massa da amostra

#### 4.3.9 Isoterma de dessorção de umidade

As isotermas de dessorção foram obtidas a partir dos dados de atividade de água e umidade de equilíbrio, utilizando o medidor de atividade de água Aqualab (Decagon), estufa de secagem microprocessada (Marconi) e balança analítica (Shimadzu).

O método estático-indireto foi utilizado para determinação das isotermas de acordo com metodologia usada por Capriste e Rotstein (1982). Inicialmente, amostras dos substratos usados nos ensaios da fermentação (Sorgo sacarino sem adição de farelo de trigo, sorgo sacarino + 25% de farelo de trigo e sorgo sacarino + 50% de farelo de trigo) foram umidificadas com água destilada. Em seguida, cada amostra em embalagem hermeticamente fechada foi mantida sob refrigeração “*overnight*” até uniformização da umidade do substrato.

Após “*overnight*”, as amostras a temperatura ambiente, foram submetidas as análises. Em balança analítica foi medido 1,5 g de cada amostra e levada ao equipamento Aqualab para a determinação da atividade de água (aw) na temperatura de 28°C que foi a temperatura próxima a utilizada para produção das enzimas. Em seguida, a amostra foi levada a estufa de secagem a temperatura de 40 °C por 5 minutos. Após, esse período a amostra foi resfriada em dessecador para posterior análise no medidor de atividade de água e pesagem em balança analítica. A amostra foi submetida repetidamente a esse processo (estufa-dessecador-Aqualab-balança) até que sua última leitura fosse igual ou superior a penúltima. Ao final, a amostra foi submetida a estufa a 105 °C, até massa constante, para obtenção da sua massa seca.

#### **4.3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As micrografias das amostras dos substratos foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (Vega 3, Tescan) com detector OXFORD (elétron secundário) a uma potência do feixe de elétrons de 20 kV. As amostras foram fixadas com fita adesiva de carbono dupla face condutora convencional em suporte de alumínio (stubs) depois foram metalizadas com carbono, em câmara metalizadora acoplada a um sistema de aquecimento das fibras de carbono (2000 °C).

#### **4.3.11 Análises termogravimétricas (TG, DTG e DSC)**

As curvas termogravimétricas (TG/DTG) das amostras foram obtidas em analisador térmico, em atmosfera de ar sintético, razão de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup> da temperatura ambiente até 1100 °C. As curvas calorimétricas (DSC) foram obtidas em calorímetro exploratório diferencial, em atmosfera de ar sintético, razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> da temperatura ambiente até 1100 °C.

#### **4.3.12 Difractometria de Raios-X (DRX)**

As amostras de bagaço de sorgo sacarino e a hemicelulose extraída do BSS, foram analisadas em difratômetro Shimadzu com varredura entre 5° e 70° (2θ) e velocidade de 0,033°/s. Os DRX das amostras foram realizadas utilizando difratômetro Shimadzu com varredura entre 5° e 70° (2θ) e velocidade de 0,033°/s.

#### **4.3.13 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A análise do bagaço do sorgo sacarino e da hemicelulose extraída foram realizadas por FTIR. As amostras secas em estufa a 60 °C por 12 horas, foram moídas

e armazenadas em ambiente livre de umidade, dessecador, até o momento da análise. Para a leitura 2 mg de amostra foi homogeneizada com 225 mg de KBr e em seguida analisada em equipamento FTIR (Perkin Elmer).

## 4.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

### 4.4.1 Planejamento experimental

A produção das enzimas das enzimas celulolíticas (CMCase e FPase) e hemicelulolíticas (xilanas e  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase) foi estudada utilizando o fungo *Trichoderma reesei* LCB 48 em fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino a 30 °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, AR (açúcar redutor), 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 4 repetições no ponto central. As Tabelas 2 e 3 detalham, respectivamente, os níveis e a matriz do planejamento, os quais foram baseados na literatura existente (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011)

Tabela 2. 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 3. Matriz de planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> com 4 repetições no ponto central da produção de enzimas.

Ensaio	U <sub>i</sub> (b.u. %)	FT (%)
1	60	0
2	80	0
3	60	50
4	80	50
5	70	25
6	70	25
7	70	25
8	70	25

O programa computacional Estatística TM (Versão 10.0, da Statsoft, Inc.) foi usado para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como dados relativos à Análise de variância (ANOVA) e superfície de resposta.

#### 4.4.2 Conservação do *Trichoderma reesei* LCB 48

O microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48 foi obtido da coleção da Embrapa Semiárido, localizada em Petrolina, Pernambuco. O mesmo foi mantido em tubos tipo eppendorf em blocos de ágar de 4-6 mm<sup>3</sup>, na presença de água destilada esterilizada e estocado a temperatura de 8 °C, conforme metodologia de Castellani (1939), até ser utilizado.

#### 4.4.3 Repique do *Trichoderma reesei* LCB 48

Para realização do primeiro repique foram retiradas gotas da suspensão de esporos do tubo tipo eppendorf e em seguida transferidos para placas de Petri contendo meio BDA (Tabela 4).

Tabela 4. Composição do meio BDA para repique do *Trichoderma reesei* LCB 48.

Componentes	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )
Dextrose	3,0
Batata	1,0
Ágar	20,0

Após inocular o *Trichoderma reesei* LCB 48 em placas de Petri (Figura 11a) as mesmas foram incubadas a 28 °C por um período de 10 a 12 dias tempo necessário para que as placas estivessem totalmente cobertas por esporos.

Figura 11. Repique do *Trichoderma reesei* em placa de Petri (a) e em sabugo de milho (b)



A partir do repique em placas de Petri, foi realizado um segundo repique (Figura 11b), sendo esse em sabugo de milho de acordo com metodologia de Couri (1993), o qual proporciona maior esporulação do fungo. O meio de sabugo de milho foi preparado a partir de sabugos previamente cozidos, triturados e umidificado com solução contendo peptona e elementos traços.

Para preparo do inóculo, foi adicionado a cada placa de Petri com microrganismo *Trichoderma reesei* LCB 48, entre 5 e 8 mL de Tween 80 0,3% v/v e, com o auxílio da alça de platina, foi feito o desprendimento dos esporos contidos no meio de cultivo deixando a suspensão homogênea. Com o auxílio de um pipetador, inoculou-se 1 mL de suspensão de esporos em cada erlenmeyer contendo sabugo de milho previamente autoclavado e homogeneizado. Em seguida, os erlenmeyers de 250 mL foram incubados a 28 °C por período de 10 a 15 dias, até que todo o sabugo estivesse coberto de esporos (Figura 11b). Após o período de cultivo do microrganismo, os erlenmeyers foram mantidos sob refrigeração por período máximo de até 3 meses e utilizados como inoculos nos ensaios de fermentação

#### 4.4.4 Processo fermentativo

O preparo do inóculo para a fermentação foi realizado adicionando-se 40 mL de uma solução de Tween 80 a 0,3% (v/v) em frascos tipo erlenmeyer contendo os esporos do *T. reesei* em sabugo de milho. Após, leve agitação, os esporos foram transferidos para béquer estéril com auxílio de gaze e algodão estéril para a contagem. A quantificação da suspensão obtida foi feita por meio de contagem de esporos em Câmara de Neubauer espelhada. 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.

Para o processo de fermentação e produção das enzimas foram utilizados erlenmeyer de vidro de 250 mL como biorreatores. O meio de cultivo semi-sólido umidificado, de acordo com planejamento experimental, foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C e inoculado com  $1,0 \times 10^7$  esporos/g (contagem em Câmara de Newbauer) com *Trichoderma reesei* LCB 48. Em seguida foi incubado em BOD com temperatura controlada de 30 °C (Figura 12), durante o período de 240 horas para estudo de sua cinética.

Figura 12. Fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino utilizando *Trichoderma reesei* LCB 48



A extração das enzimas foi feita com tampão citrato de sódio pH 4,8 (BAILEY, BIELY e POUTANEN, 1992), sob agitação agitados em shaker à temperatura ambiente. A cada biorreator foi adicionado 7,5 mL do tampão por grama de substrato e homogeneizado por 30 minutos. A filtração foi realizada com gaze e algodão,

obtendo-se o extrato enzimático para determinação da atividade enzimática. No momento da extração da enzima foi também realizada análise de pH, umidade e açúcar redutor (AR) do fermentado.

## **4.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS**

### **4.5.1 Endo- $\beta$ -1,4-xilanase**

A atividade da xilanase foi realizada segundo Bailey, Biely e Poutanen (1992), seguida pela quantificação dos açúcares redutores pelo método de Miller (1959). O procedimento consiste na reação de 900  $\mu$ L de xilana 1 % (Birchwood – Sigma), preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8, com 100  $\mu$ L de extrato enzimático a 50 °C por 300 segundos (5 minutos). A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). No ensaio em branco, ou ensaio controle, a solução DNS foi adicionada antes da adição da enzima. Em seguida os tubos contendo a reação foram fervidos a 100 °C por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. A leitura foi realizada com absorbância em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração foi convertida em concentração de xilose a partir da curva analítica.

### **4.5.2 $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase**

A atividade da  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase foi determinada de acordo com Reddy e Krishnan (2016), usando como substrato o 4-nitrofenil- $\alpha$ -L-Arabinofuranosideo (pNPAf) 0,5 mM preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8. A reação em 500  $\mu$ L de volume a 45 °C por 10 minutos, contendo 250  $\mu$ L de pNPAf e 250  $\mu$ L de extrato enzimático, foi finalizada por adição de 500  $\mu$ L de solução  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e a absorbância foi mensurada em 410 nm. No ensaio controle a solução saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  foi adicionada antes do extrato enzimático. Os valores de absorbância foram convertidos por meio de curva analítica do 4-nitrofenol. Uma

unidade de atividade de  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase foi definida como a quantidade de enzima liberada por 1  $\mu$ mol de 4-nitrofenol em 1 minuto.

#### **4.5.3 Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase (CMCase)**

A atividade da CMCase foi determinada de acordo com metodologia desenvolvida por Ghose (1987), seguida pela quantificação dos açúcares redutores preconizada pela metodologia de Miller (1959).

A mistura contendo 500  $\mu$ L de solução de carboximetilcelulose 2% (m/v) preparada em tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8, e 500  $\mu$ L do extrato enzimático, foi submetida a temperatura de 50 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), diluída em 8 mL de água destilada. No ensaio em branco, a solução de CMC 2% foi substituída por solução tampão citrato de sódio. Em seguida os tubos contendo a reação foram fervidos a 100 °C por 5 minutos e resfriados em banho de gelo. A leitura foi realizada com absorbância em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração foi convertida em concentração de glicose a partir da curva analítica.

#### **4.5.4 Celulase Total (FPase)**

Para determinação da atividade de FPase seguiu-se o protocolo de Ghose (1987) e dosagem dos açúcares redutores pela metodologia de Miller (1959).

A mistura reacional contendo 1mL de extrato enzimático, 1 mL de solução tampão citrato de sódio 0,05 M, pH 4,8 e fita de papel de filtro Whatman nº 1 medindo 1,0 x 6,0 cm foi incubada a 50 °C por 60 minutos. O açúcar redutor liberado foi determinado usando solução de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração foi convertida em concentração de glicose a partir da curva analítica. A atividade de FPase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de glicose por minuto.



## **4.7 EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE SORGO SACARINO.**

### **4.7.1 Extração com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em meio alcalino**

A extração da hemicelulose foi realizada de acordo com o método descrito por Xu et al. (2006) e modificado por Brienzo et al. (2009). Antes da extração, o bagaço moído foi lavado com 0,2% (m/v) de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) durante 1 h a 90 °C para remoção de íons metálicos, tais como ferro e manganês. Segundo Brienzo et al. (2009) estes íons promovem a decomposição de peróxido de hidrogênio reduzindo o seu desempenho na deslignificação. O material foi submetido a uma deslignificação oxidativa utilizando uma solução alcalina de peróxido de hidrogênio. Uma amostra de 10 g de bagaço sem extrativos foi tratada com solução de peróxido alcalino 4% e sulfato de magnésio a 0,25 % com o pH ajustado a 11,6 com NaOH, num volume de reação de 200 mL e incubada em banho de água termostaticado (40 °C). Após 10 h, o resíduo insolúvel recolhido por filtração foi lavado com água destilada até o pH ser neutro, e, em seguida, secado a 45 °C. O fluido sobrenadante foi ajustado a pH 6 com HCl 6 M e em seguida concentrado até cerca de um terço do seu volume sob circulação de ar a 45 °C. Ao sobrenadante concentrado contendo a hemicelulose foi adicionado três volumes de etanol a 95% para precipitar a hemicelulose, e em seguida lavada quatro vezes com etanol a 70%. A hemicelulose decantada foi seca por circulação de ar a 45 °C.

## **4.8 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA HEMICELULOSE E DO BAGAÇO DO SORGO SACARINO**

A hemicelulose e o bagaço de sorgo sacarino *in natura* foram hidrolisados pelo extrato enzimático, obtidos anteriormente (item 4.4). Em frascos tipo erlenmeyer de 250 mL esterilizado foi adicionado 1 e 0,5 grama de biomassa, 100 mL do extrato enzimático em tampão citrato pH 4,8 (50mM) e 0,4 mL solução de tetraciclina 10mg/mL. Os frascos foram tampados e mantido sob agitação em incubadora Shaker à 50 °C, com rotação de 150 rpm por período de 72 horas. Durante a hidrólise

amostras de 1 mL foram retiradas em tempos regulares de 0, 12, 24, 36, 48 e 72 horas, para verificar a produção de glicose e xilose.

#### **4.8.1 Análise dos Açúcares**

As concentrações de glicose e xilose do hidrolisado foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em equipamento Agilent (série 1100), coluna analítica Aminex HPX87H (Bio-Rad), temperatura de 65 °C, fase móvel composta de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mM, fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e detector (IR) índice de refração para a identificação e quantificação dos componentes. As amostras foram previamente filtradas em filtro 0,20 µm antes do procedimento analítico.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO

Neste capítulo apresenta-se os dados da caracterização bagaço do sorgo sacarino (BSS) usado para extração da hemicelulose e como substrato nos ensaios de fermentação, bem como o farelo de trigo (FT) fonte indutora das enzimas. A hemicelulose extraída do BSS utilizada durante a hidrólise enzimática também será caracterizada em etapas seguintes da pesquisa.

#### 5.1.1 Determinação da composição dos substratos

A Tabela 5 apresenta a composição da fibra do bagaço do sorgo sacarino *in natura* usado nos ensaios de fermentação semissólida e na extração da hemicelulose.

Tabela 5. Composição da fibra do bagaço do sorgo sacarino.

Componentes (%)	Teor
	Bagaço de sorgo sacarino
Umidade (b.s.)	9,39 ± 0,96
Cinzas	4,04 ± 0,44
Extrativos	13,99 ± 1,03
Lignina	12,82 ± 1,21
Celulose	25,07 ± 0,94
Hemicelulose	37,03 ± 0,86

A composição lignocelulósica do bagaço do sorgo sacarino está de acordo com os valores relatados na literatura. Observa-se na Tabela 5 uma umidade de 9,39 % para o bagaço do sorgo sacarino, valores menores foram reportados por Oliveira et al. (2009), 7,4 e 7,7 % de umidade para o bagaço de sorgo sacarino lavado e não-lavado, respectivamente. Campos (2015), ao caracterizar o sorgo sacarino para utilizá-lo como substrato para produção de etanol de segunda geração encontrou um valor 6,44 %.

O valor do teor de cinza encontrado, 4,04 %, foi semelhante aos reportados na literatura para resíduos lignocelulolíticos. García, Alriols e Jabidi (2014) encontraram valores de 4,0 e 4,5 % de cinzas para resíduo da casca de eucalipto e bagaço da haste do algodão. Valor superior foi observado por Campos (2015) que obteve 5,76 % de cinzas em sorgo sacarino.

O teor de 13,99 % de extrativos equivalem a frações de taninos, óleos essenciais, ceras, ácidos graxos, compostos fenólicos e açúcares simples presentes no substrato. Resultados semelhantes foram obtidos por Campos (2015), também trabalhando com bagaço do sorgo sacarino, 18,06 %.

O teor de 12,82 % de lignina encontrado no bagaço do sorgo sacarino são próximos ao reportado por Zheting et al. (2017) ao caracterizar o sorgo sacarino, obtendo um teor de 13,84 %. Resultados superiores foram encontrados por Barcelos et al. (2016) obtendo 19,80 % ao caracterizar o bagaço do sorgo sacarino usado como matéria prima de etanol. Prathyusha et al. (2016) ao caracterizar sorgo sacarino para ensaios de sacarificação obtiveram 23,84 % de teor de lignina.

De acordo com a literatura estudada o sorgo sacarino possui teor médio de 23,67 – 47,47 % de celulose, 17,02 – 38,19% de hemicelulose e 8,58 – 23,84 % de lignina (Tabela 1).

O percentual de celulose encontrado para o bagaço do sorgo sacarino foi de 25,07 %. Resultados semelhantes foram reportados por Araújo et al. (2014) ao analisar a biomassa lignocelulósica de diferentes genótipos de sorgo, obtendo 24,10 e 23,67 % de celulose. Umagiliyage et al. (2015) ao estudar o uso do sorgo sacarino como substrato de hidrolise enzimática reportaram teor mais elevado de celulose, apresentando teor de 36,9 %. Zheting et al. (2017) ao caracterizar bagaço de sorgo reportaram valores semelhantes de 37,68 % de celulose.

A hemicelulose do bagaço do sorgo sacarino apresentou um teor de 37,03%, semelhante aos percentuais, 36,96 e 38,19 %, de dois genótipos de sorgo estudados por Araújo (2014). Umagiliyage et al. (2015) e Yan et al. (2015), observaram valores inferiores, 17,8 e 25,25 % de hemicelulose.

Benardino et al. (2012) ao caracterizar 25 cultivares de Sorgo Sacarino, do programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo, visando a produção de etanol de primeira e segunda geração, observou variação de 30,88 a 43,80 % de celulose, 15,93 a 23,67 % de hemicelulose e 4,93 a 8,73 % de lignina.

Resultados semelhantes foram observados por Araújo (2014), ao estudar 16 genótipos de sorgo, também cedido pela Embrapa Milho e Sorgo. O autor reportou valores de 18,01 a 29,69 % de celulose, 24,67 a 44,33 % de hemicelulose e 6,38 a 9,34 % de lignina.

A tabela 6 disponibiliza os dados da composição em termos de AR e proteína do bagaço do sorgo sacarino e do farelo de trigo usados como substrato e fonte indutora na fermentação e produção das enzimas.

Tabela 6. Composição de AR e proteína do bagaço do sorgo sacarino e do farelo de trigo

Componentes (%)	Teor	
	Bagaço de sorgo sacarino	Farelo de Trigo
AR	0,20 ± 0,00	1,50 ± 0,00
Proteína	2,62 ± 0,00	17,84 ± 0,10

Os teores de proteína encontrados para o bagaço de sorgo sacarino e farelo de trigo, 2,62 e 17,87 (%), foram semelhantes aos observados por Rodríguez-Zúñiga et al. (2011) para o bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, 1,52 e 17,61 (%).

A concentração de açúcares redutores obtidos para o bagaço do sorgo sacarino de aproximadamente foi de 0,2 %. Considerando-se que o substrato foi lavado, o resultado está de acordo com o valor de 0,21 % obtido por Lins e Conrado (2015) ao trabalhar com bagaço do caju lavado como substrato de fermentação semissólida. Já o farelo de trigo apresentou 1,5 % de açúcares redutores, teor mais elevado que o teor do BSS.

De acordo com Araújo et al. (2014), as mudanças observadas na composição química das plantas no geral acompanham e dependem do seu estágio de maturação, à medida que a planta envelhece, a proporção dos componentes digestíveis tende a diminuir e a de fibras aumentarem. Em consequência dessa maturidade e com

decorrer do ciclo ocorre o aumento da lignina e aumento da parede celular dos tecidos vegetais. A variedade do sorgo sacarino também influencia os teores dos constituintes lignocelulósicos.

A caracterização do bagaço do sorgo sacarino IPA P222 demonstrou que este é um substrato com potencial para ser utilizado na fermentação para produção de enzimas celulases e hemicelulases, principalmente por apresentar um percentual de celulose (25,07 %) e hemicelulose (37,03 %) satisfatórios, já que esses componentes são fontes de carbono indutor dessas enzimas.

### **5.1.2 Isotermas**

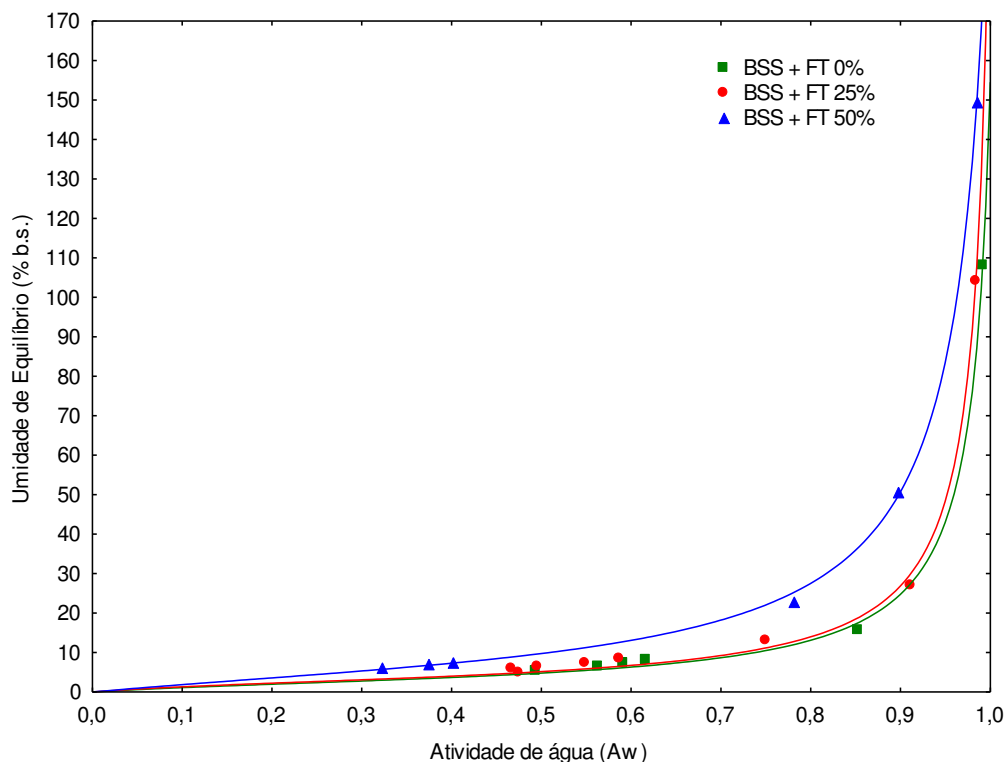
Foram realizadas isotermas de dessorção dos substratos usados nos ensaios de fermentação (item 4.4.1, Tabela 3), sendo estes compostos por bagaço de sorgo sacarino *in natura* (BSS) (0 % de FT), BSS incrementado com 25 % e 50 % de farelo de trigo.

De acordo com Reid e Fennema (2010), as curvas de conteúdo de água dos substratos, chamadas de isotermas de dessorção, 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 atividade de água.

Além de determinar a umidade e atividade de água limite para o crescimento do fungo, as isotermas de dessorção foram realizadas no presente trabalho no intuito de conhecer o comportamento do substrato que foi utilizado durante o período de fermentação.

Na Figura 13 são apresentadas as isotermas de dessorção dos substratos usados durante a fermentação.

Figura 13. Isotermas de dessorção dos substratos usados durante a fermentação: BSS + FT 0%, BSS + FT 25% e BSS + FT 50 %



Pode-se perceber que a atividade de água diminui com o decaimento da umidade de equilíbrio. A taxa de dessorção é mais alta no início do processo, mostrando uma maior facilidade de redução da umidade. Resultados semelhantes foram reportados por Gouveia et al. (2004) ao estudarem as isotermas de dessorção da banana prata.

A isoterma do bagaço de sorgo sacarino incrementado com 50% de farelo trigo apresentou maior diferença quando comparado aos demais substratos, mostrando que a diferença na composição química influencia no formato da isoterma (SHIBATA, 2016).

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 crescimento. Nas isotermas da Figura 13, nota-se que a partir de uma umidade em torno de 20 % (b.s.) os substratos

apresentam  $a_w$  suficiente para o crescimento de fungos. Para a produção das enzimas foram estudados os valores de umidade inicial dos substratos de 60, 70 e 80 % em base úmida (150, 233 e 400 % base seca), umidade suficiente para o crescimento do fungo *Trichoderma reesei*.

Parkin (2010), afirma que as enzimas necessitam de  $a_w$  diferentes para a função catalítica. A  $a_w$  mínima, ou limite, requerida para a atividade enzimática varia de 0,25 - 0,70 para várias oxidorreduções, e 0,025 - 0,960 para diversas hidrolases. Muitas enzimas exibem uma  $a_w$  ótima para atividade, sendo usualmente maior que 0,90.

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

Drapon (1986), reporta produção de enzimas amilases em farinha de centeio e trigo com uma atividade de água mínima de 0,75 e 0,36, respectivamente. Já para proteases em farinha de trigo a  $a_w$  mínima foi de 0,96.

Santos et al. (2011) estudaram três níveis de atividade de água (0,943, 0,971 e 0,985 / 40, 50 e 60 %) do resíduo de seriguela utilizado na fermentação semissólida e o fungo *Rhizopus sp.* durante 120 horas a 35 °C. O pico de atividade de CMCase foi observado com 72 horas de fermentação no ensaio com 0,971 de atividade de água, correspondendo a 50 % de umidade.

Na Tabela 7 temos as informações dos parâmetros de ajuste das isotermas de dessecção dos substratos (30 °C) para o modelo de GAB, obtidos por meio de regressão não-linear.



Tabela 7. Parâmetros de ajuste das isotermas de dessorção dos substratos para o modelo de GAB.

Substrato	$X_m$	C	K	$R^2$
BSS + 0 % FT	2,9921	4,6146	0,9807	0,9995
BSS + 25 % FT	3,0851	5,7002	0,9864	0,9986
BSS + 50 % FT	6,7326	3,1107	0,9702	0,9998

Os dados exibidos na Tabela 7 demonstram que os valores da umidade da monocamada ( $X_m$ ) variaram de 2,99 a 6,73 % (b.s.), com uma tendência crescente com o aumento do teor de farelo de trigo ao bagaço do sorgo sacarino. Resultados superiores foram reportados por Timmermann et al. (2001) ao estudar a isoterma de dessorção do trigo à 25 °C obtendo 10,24 % (b.s.) de  $X_m$ . Já Bonner e Kenney (2013) em suas isotermas de Sorgo encontraram 7,78 % (b.s.) de umidade na monocamada na temperatura de 30 °C.

Para Blahovec (2004) por meio das constantes K e C do modelo de GAB pode-se classificar as isotermas de acordo com as classes de isotermas de Brunauer. Partindo desse princípio as isotermas estudadas neste trabalho com  $0 < K \leq 1$  e  $C > 2$ , são classificadas como isotermas classe II.

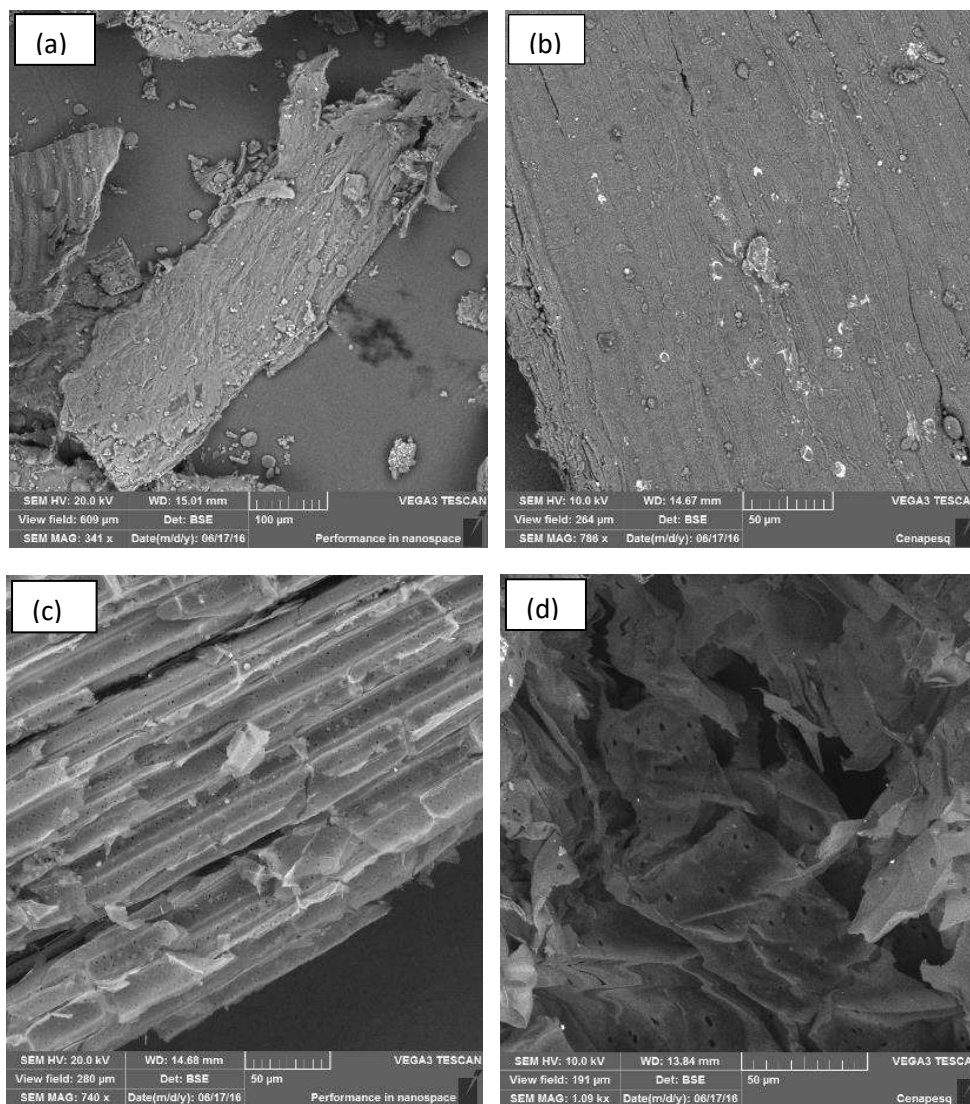
O modelo de GAB (Guggenheim-Anderson-deBoer) forneceu um bom ajuste para os dados experimentais, fato demonstrado a partir dos valores do coeficiente de correlação ( $R^2$ ), que variaram de 0,9986 – 0,9998. Já era esperado que o modelo de GAB tivesse bom desempenho com o conjunto de dados experimentais obtidos, visto que o modelo é amplamente utilizado em análises com atividade de água próxima a 0,9.

### 5.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise de Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada para demonstrar a morfologia dos substratos, bagaço de sorgo sacarino e farelo de trigo, usados durante a fermentação.

Na Figura 14 podemos observar micrografias do bagaço do sorgo sacarino (BSS) *in natura* (Figura 14c e 14d) e do farelo de trigo (Figura 14a e 14b) usado como indutor das enzimas no processo de fermentação semissólida.

Figura 14. Micrografia eletrônica de varredura dos substratos: (a) Farelo de trigo (341x); (b) Farelo de trigo (786x); (c) Sorgo sacarino – parte fibrosa (786x); (d) Sorgo sacarino – parte macia do colmo (1090x).



Observa-se na micrografia do farelo de trigo (14a e 14b), uma estrutura bem organizada com fibras lisas, compactas e sem nenhuma ruptura, característica do material *in natura*.

A micrografia do bagaço do sorgo sacarino *in natura* (14c) apresenta estrutura fibrosa (feixes vasculares), recoberta por tecido parenquimatoso, superfície pouco

rugosa, compactas e sem ruptura. Assumpção et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes trabalhando com bagaço da cana-de-açúcar, segundo o autor isso ocorre devido a presença da camada protetora formada pela lignina e hemicelulose.

A segunda micrografia do bagaço do sorgo sacarino (14d) é referente a parte mais interna e macia do colmo do bagaço do sorgo sacarino. De acordo com Scarpari e Beauclair (2008), esse tecido macio envolve os feixes vasculares (fibras) e armazenam o caldo contendo açúcar dissolvido. Dentre as micrografias percebe-se que a imagem (14d) destaca-se por apresentar desorganização física, porosidade, material estratificado e maior área superficial, sendo provável permitir uma maior acessibilidade do *T. reesei* durante os ensaios de fermentação.

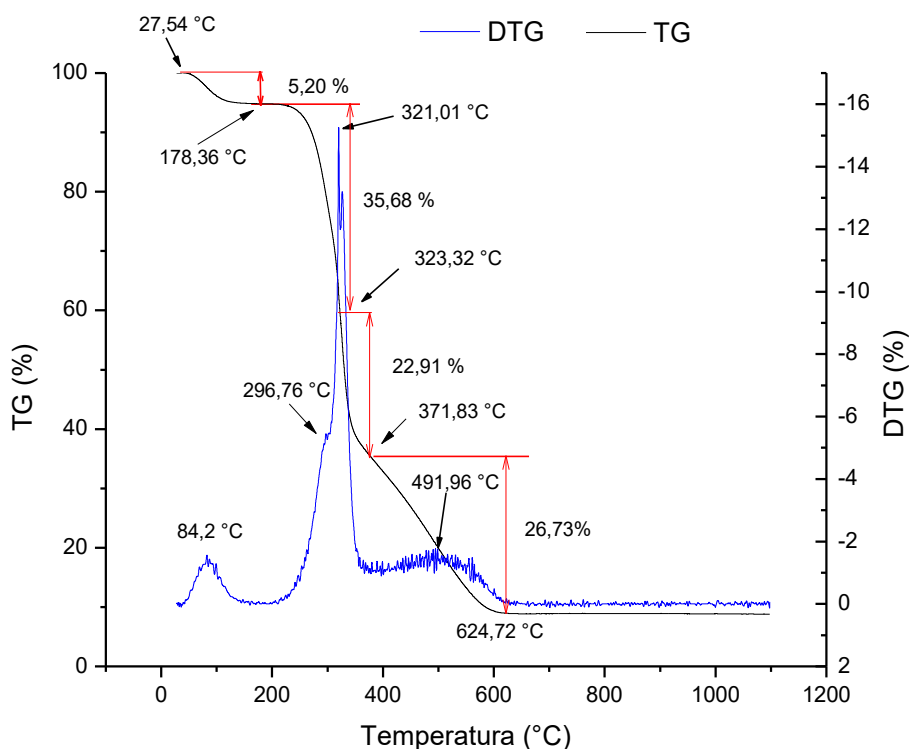
#### **5.1.4 Termogravimetria TG/DTG**

As análises termogravimétricas TG e DTG foram utilizadas para o estudo do comportamento térmico das amostras do sorgo sacarino *in natura* e da hemicelulose extraída do bagaço do sorgo sacarino.

Na Figura 15 estão as curvas termogravimétricas TG/DTG para o bagaço do sorgo sacarino. 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.

Analisando as curvas TG/DTG do bagaço do sorgo sacarino presente na Figura 15, observa-se uma primeira etapa de perda de massa ocorrendo entre 27,54 – 178,36 °C, sendo característico da desidratação do material, indicando 5,20 % de perda de massa. A segunda etapa de perda de massa ocorre entre 178,36 – 323,32 °C, caracterizando a decomposição da hemicelulose com 35,68 % de perda de massa. Na terceira etapa do gráfico ocorre a decomposição da celulose entre 323,32 – 371,83 °C, indicando 22,91 % de perda de massa. A quarta etapa ocorre entre 371,83 – 621,90 °C indicando a decomposição da celulose e lignina com 26,73 % de perda massa.

Figura 15. TG e DTG do bagaço de sorgo sacarino *in natura*



A literatura reporta o comportamento térmico de diversos resíduos lignocelulolíticos, geralmente classificando em três momentos de perda de massa, além da perda referente a desidratação. Soares (2011), afirma que no primeiro momento ocorre a perda da fração mais reativa, sendo composta por hemicelulose. No segundo momento, ocorre degradação da celulose e início da degradação da lignina, sendo todas as hemiceluloses convertidas até o final deste momento. Já no terceiro momento ocorre a finalização da conversão da celulose e continuidade da degradação da lignina.

Soares (2011) ao analisar a degradação térmica da madeira de *Eucalyptus urophylla* utilizando atmosfera não-oxidante, observou apenas duas etapas de degradação. A primeira entre 225 – 327 °C e a segunda entre 327 – 380 °C, quando a decomposição foi cessada. Viotto e Moraes (2014) ao estudar o comportamento térmico do substrato do cultivo de shitake, composto por serragem e cereais, obtiveram resultados semelhantes. Ao analisar a curva de TG em atmosfera oxidante foi possível observar perda de massa de aproximadamente 5%, até a temperatura de 160°C, associada a perda de água da amostra. Após isso duas etapas de perda de massa:

uma mais significativa (com perda de materiais mais voláteis) ocorrendo entre 150 - 340 °C, com perda de 50% e outra entre 340 – 640 °C, com 8,7% de massa restante.

Wu et al. (2016) ao estudar a pirolise da celulose comercial (Sigma-Aldrich) e celobiose, observaram apenas um pico na curva de DTG da celulose, a 351 °C com uma taxa de perda de massa de 2,22 %/°C, ocorrendo entre no intervalo de 276 – 634 °C. Já a celobiose apresentou dois estágios de perda de massa, o primeiro pico em 268 °C, sendo este bem menor, e o pico principal em 330 °C, ocorrendo ambos entre 245 – 659 °C. O autor enfatiza, que o aumento da temperatura inicial de decomposição observado é em razão do aumento do grau de polimerização da amostra, crescente de 245 °C da celobiose para 276 °C da celulose.

Santos et al. (2011), em seu trabalho de condições de estocagem do bagaço da cana-de-açúcar, estudaram o comportamento térmico de celulose microcristalina (Vetec), lignina (Dedini) e bagaço de cana por meio de análises térmicas. Nas curvas de TG e TDG para a celulose, observaram a presença de três estágios de perda de massa. O primeiro, segundo os autores, ocorreu a temperaturas inferiores a 100 °C, e está relacionado à perda de umidade. O segundo estágio, entre 200 e 350 °C, com temperatura máxima de 324 °C, podendo ser relacionado à decomposição da matéria orgânica com geração de material carbonizado, o qual é queimado na faixa de 350 a 480 °C com temperatura máxima em 470 °C. Os dois primeiros estágios representam uma perda de massa de 80% em relação à amostra inicial.

Já para a TG e DTG do bagaço da cana-de-açúcar Santos et al. (2011) reportaram resultados semelhantes aos obtidos no presente trabalho. 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.

As curvas de TG e DTG da lignina, reportadas por Santos et al. (2011), apresentaram dois estágios de perda de massa. O primeiro, entre 25 e 110 °C, com temperatura máxima de massa em 48 °C, relacionado com a perda de umidade e o segundo estágio, entre 110 e 590 °C, com temperatura máxima em 371 °C,

relacionada a degradação da lignina. Observa-se com os resultados obtidos uma longa faixa característica de decomposição lignina.

Resultados semelhantes foram reportados por Zhao et al. (2014) trabalhando com lignina do bordo e do abeto chinês. Por meio de curvas de perda de massa TG e DTG a uma taxa de aquecimento de 20 °C/min sob N<sub>2</sub>, obtiveram o principal estágio de perda de suas ligninas localizado em uma região de temperatura ampla (entre 150 – 650 ° C). Segundo os autores, a decomposição da lignina pode ser dividida em três fases: a fase de pirólise inicial antes de 180 °C, principalmente atribuída à liberação de água, a segunda fase de pirólise entre 180 – 300 °C e a terceira fase de pirólise de 300 – 650 °C.

A Tabela 8, a seguir, apresenta os dados obtidos a partir das curvas de TG e DTG (Figura 15).

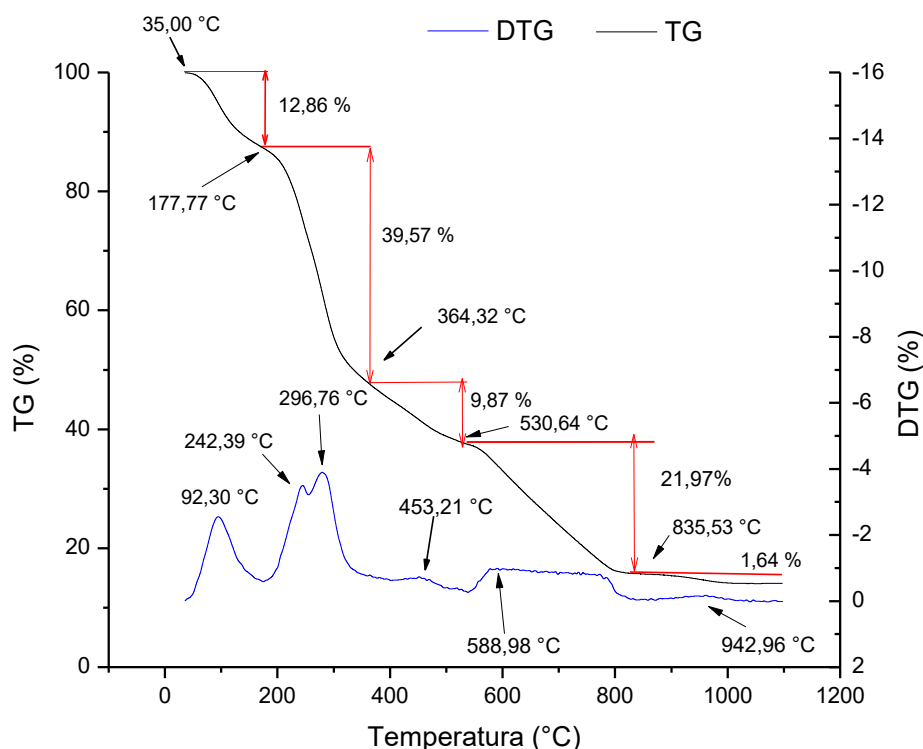
Tabela 8. Dados obtidos a partir das curvas de TG e DTG do BSS

Amostra	Etapas	Intervalo de Temperatura (°C)	Temperatura de Pico (°C)	Perda de Massa (mg)	Perda de Massa (%)	Atribuições
<b>Sorgo Sacarino <i>in natura</i></b>	1	27,54 - 178,36	84,20	1,12	5,2	Desidratação
	2	178,36 - 323,32	296,76	7,67	35,68	Decomposição da hemicelulose
	3	323,32 - 371,83	336,40	4,93	22,91	Decomposição da celulose
	4	371,83 - 621,90	491,96	5,74	26,73	Decomposição da celulose e lignina

O somatório das perdas de massas (%), apresentados na Tabela 8, revelam um total de 90,52 %, restando 9,48 % de resíduo, equivalente a 2,04 mg, % que deve ser atribuído ao resíduo característico de formação de carvão e cinzas.

A Figura 16 apresenta a TG e DTG da hemicelulose extraída a partir do bagaço do sorgo sacarino *in natura*.

Figura 16. TG e DTG da hemicelulose extraída do bagaço do sorgo sacarino *in natura*



Analisando os perfis da TG e DTG da hemicelulose extraída do bagaço do sorgo sacarino presente na Figura 16, observa-se uma primeira etapa de perda de massa ocorrendo entre 35,00 – 177,77 °C, característico da desidratação do material e sendo responsável por 12,86 % de perda de massa.

A segunda etapa de perda de massa ocorre entre 177,77 – 364,32 °C, caracterizando a decomposição da hemicelulose com 39,57 % de perda de massa. Nessa etapa nota-se perda de massa a baixa temperatura e em dois estágios, com taxas de perda de massa máxima a 242,39 e 296,76 °C, esses dados corroboram com Werner, Pommer e Brostöm (2014) que relataram resultados semelhantes ao analisar perfil da DTG da xilana, com taxas máximas de 243 e 292 °C.

Zanatta et al. (2013) encontraram intervalos entre 208 – 447 °C para decomposição da hemicelulose e teve a taxa de perda máxima de massa atingida na temperatura de 236 °C.

Werner, Pommer e Brostom (2014) estudaram a decomposição das hemiceluloses xilana, arabinoxilanas, arabinogalactanas, galactomanas, glucomananas e xiloglucanas. Os autores observaram perfis de DTG a partir da decomposição desses polissacarídeos durante o aquecimento em atmosfera inerte mostraram diferenças nas características da taxa de perda de massa. Em geral, a perda de massa apareceu na gama de temperaturas de 200 – 380 °C.

Na terceira etapa do gráfico ocorre entre 364,32 – 530,64 °C, indicando 9,87 % de perda de massa, a quarta etapa ocorre entre 530,64 – 835,53 °C com 21,97 % de perda massa e a quinta etapa observada entre 835,53 – 1097,99 °C com perda de massa de 1,64 %. A terceira e quarta etapa de acordo com Silva et al. (1998) é referente a decomposição da lignina, ou de seus resíduos, e de produtos estáveis da pirólise dos polissacarídeos, ocorrendo entre 400 – 850 °C em seu trabalho. Os autores obtiveram xilanas denominadas A e B, isoladas do sabugo de milho por meio de combinação de processos, extração aquosa, remoção de lipídeos, deslignificação e extração alcalina, e seus produtos foram analisados por termogravimetria. Os perfis das TG e DTG dessas xilanas obtidas corroboram com os encontrados nesse trabalho. A quinta etapa é referente a decomposição da lignina.

A Tabela 9 apresenta os dados obtidos a partir das curvas de TG e DTG da hemicelulose obtida do bagaço do sorgo sacarino.

Tabela 9. Dados obtidos a partir das curvas de TG e DTG da hemicelulose extraída do BSS

Amostra	Etapas	Intervalo de Temperatura (°C)	Temperatura de Pico (°C)	Perda de Massa (mg)	Perda de Massa (%)	Atribuições
Hemicelulose extraída do BSS	1	35,00 - 177,77	92,30	3,41	12,86	Desidratação
	2	177,77 - 364,32	242,39 e 296,76	10,49	39,57	Decomposição da hemicelulose
	3	364,32 - 530,64	453,21	2,62	9,87	Decomposição da lignina e produtos estáveis da pirólise dos polissacarídeos
	4	530,64 - 835,53	588,98	5,82	21,97	
	5	835,53 - 1097,99	942,96	0,43	1,64	Decomposição da lignina

O somatório das perdas de massas (%), revelam um total de 85,91 %, restando 14,09 % de resíduo, equivalente a 3,73 mg. Resultado semelhante foi observado por



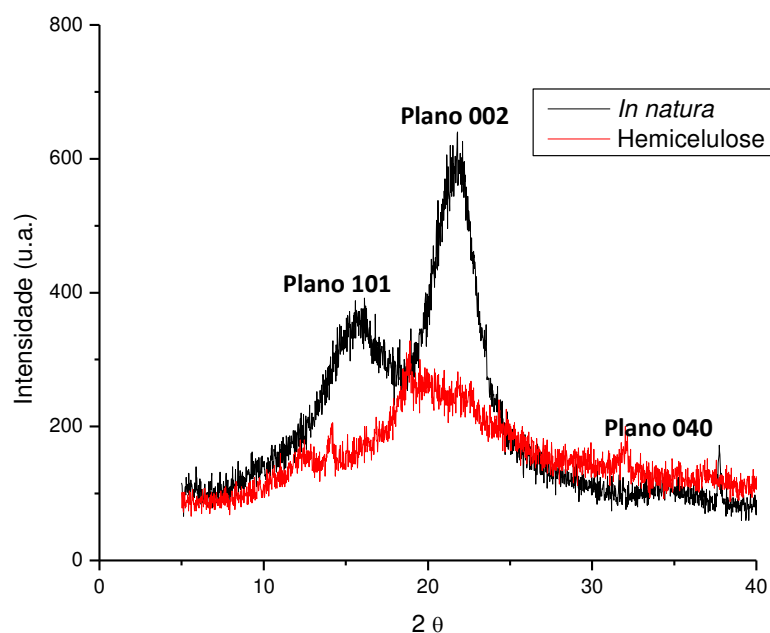
Zanatta et al. (2013) durante a decomposição da hemicelulose o resíduo foi em média de 16,26 % em relação a massa inicial da amostra.

### 5.1.2 Difractometria de Raio-X (DRX)

A Figura 17 apresenta os difratogramas do bagaço de sorgo sacarino *in natura* e da hemicelulose obtida por meio da extração com peróxido alcalino a partir do bagaço do sorgo sacarino.

Nos difratogramas observam-se as diferenças entre o bagaço do sorgo sacarino *in natura* e a hemicelulose extraída do bagaço. Na amostra do bagaço do sorgo *in natura* a intensidade dos picos cristalinos e do halo amorfo são condizentes com a celulose tipo I, de acordo com a classificação de Ford et al. (2010), a celulose tipo I apresenta difrações próximas aos seguintes ângulos  $2\theta$ ,  $14,7^\circ$  (plano 101),  $22,5^\circ$  (plano 002) e  $34,7^\circ$  (plano 040).

Figura 17. Difratomogramas de raios-x das amostras de bagaço de sorgo sacarino *in natura* e da hemicelulose do BSS



O difratograma da amostra *in natura* é característico da celulose em materiais lignocelulósicos. Soares et al (2014) ao caracterizarem o bagaço da cana-de-açúcar reportaram difratograma raios-X dessa biomassa com picos característicos da celulose localizados em  $2\theta = 15,8^\circ$ ,  $22,6^\circ$  e  $34,3^\circ$ .

No difratograma da amostra de hemicelulose extraída do bagaço do sorgo sacarino observa-se uma diminuição da intensidade das curvas, quando comparado com o bagaço *in natura*, não apresentando os picos característicos da celulose (plano 101 e 002). Costa (2014), ao caracterizar xilana por meio de difração de raios-x comercial obteve difratograma semelhante ao observado nesse trabalho, com picos de baixa intensidade sendo o pico de difração  $19^\circ$  o de maior intensidade, indicando estrutura amorfa com regiões de baixa cristalinidade.

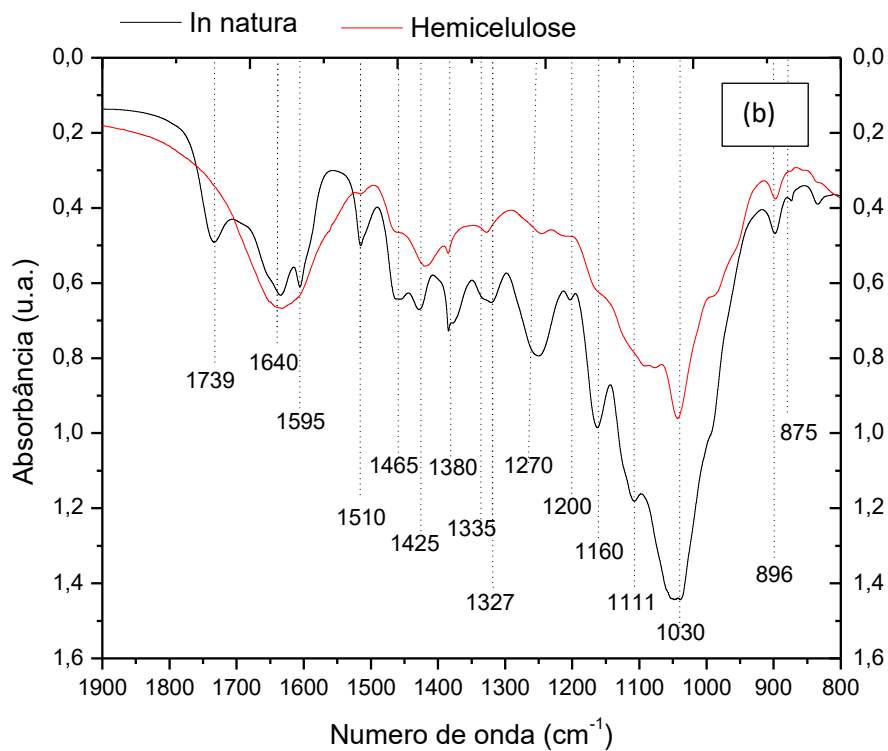
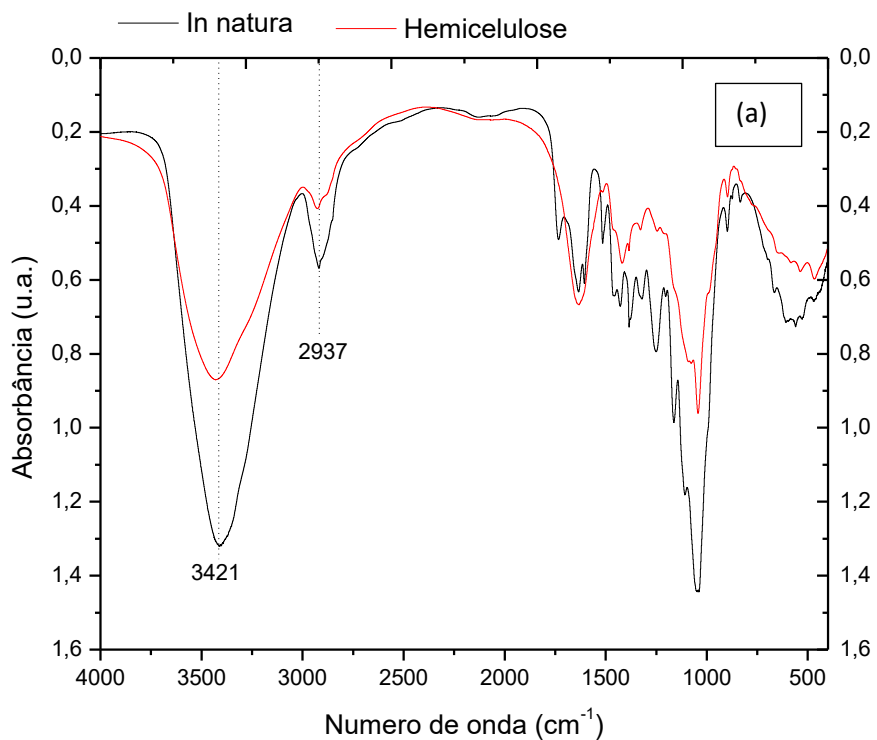
Bagrielli et al. (2000) ao caracterizarem a hemicelulose obtida a partir da madeira de álamo por meio da extração alcalina observaram em difratograma de raios-X comportamento semelhante aos encontrados nesse trabalho, com picos de maior intensidade em ângulos de difração entre  $17$  e  $21^\circ$ .

### **5.1.3 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Na Figura 18 (a e b) observa-se os espectros de FTIR do bagaço do sorgo sacarino *in natura* (BSS) e da hemicelulose obtida a partir da extração do BSS. De acordo com a literatura os espectros que apresentam bandas em  $3421\text{ cm}^{-1}$  são referentes ao estiramento O-H, em ligações de hidrogênio, e estão relacionados a presença de álcoois e fenóis. As bandas em  $2937\text{ cm}^{-1}$  são referentes ao estiramento C-H (SOLOMONS e FRYHLE, 2001).

As bandas com as principais atribuições de absorção nos espectros são características das estruturas glicosídicas, e estão relacionadas com o estiramento O-H a  $3421\text{ cm}^{-1}$  e C-O a  $1030\text{ cm}^{-1}$  (XU et al., 2006).

Figura 18. Espectro de FTIR das amostras de bagaço de sorgo sacarino *in natura* (a) 400 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ ; (b) 800 – 1900  $\text{cm}^{-1}$



De acordo com Chen et al. (2010) a área de impressão digital espectral, 800-1900  $\text{cm}^{-1}$ , é muito complexa (Figura 18b). Contém muitas bandas de assinatura dos componentes da matriz lignocelulósica. As bandas em 1739  $\text{cm}^{-1}$  e entre 1321–1317  $\text{cm}^{-1}$  são assinaturas características de deformação e estiramento diferentes grupos da celulose.

As bandas em 1270  $\text{cm}^{-1}$  (vibração do anel aromático do guaiacila), 1327  $\text{cm}^{-1}$  (vibração da ligação C-O do anel da siringila), 1465  $\text{cm}^{-1}$  (deformação C-H), 1510  $\text{cm}^{-1}$  (vibração do anel aromático) e 1595  $\text{cm}^{-1}$  (vibração do anel aromático + estiramento C=O) estão relacionados a presença de lignina, resultados semelhantes foram reportados por Xu et al. (2013). Observa-se na Figura 18b do bagaço de sorgo *in natura* que essas bandas referentes a ligninas apresentam absorvância mais fraca quando compara ao espectro da hemicelulose, essa redução das bandas pode ser explicada pela solubilização das ligninas durante a extração da hemicelulose. No entanto, nota-se a presença de pequenas quantidades de lignina associada nas hemiceluloses.

De acordo com Xu et al. (2006) os dois ombros de baixa intensidade a 987 e 1092  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos à substituição de arabinose em ligadas ao carbono C-3 das unidades de xilose, uma característica típica de arabinoxilanas substituídas. Uma banda afiada a 896  $\text{cm}^{-1}$  é característica das ligações  $\beta$ -glicosídicas entre os açúcares.

A intensidade da banda a 1640  $\text{cm}^{-1}$  atribuída a grupos C = O aumentou em intensidade na amostra de hemicelulose. De acordo com Brienzo, Siqueira e Milagres (2009) a força nesta região depende do grau de oxidação e com o processo oxidativo houve a produção de ácidos hexenurônicos. A ausência da banda em 1750  $\text{cm}^{-1}$  na amostra de hemicelulose indica que o tratamento com peróxido alcalino saponificou ligações éster.

## **5.2 Produção de enzimas**

Nos próximos itens são apresentados e discutidos os resultados provenientes das cinéticas do processo fermentativo semissólido do bagaço do sorgo e análise estatística do planejamento experimental realizado.

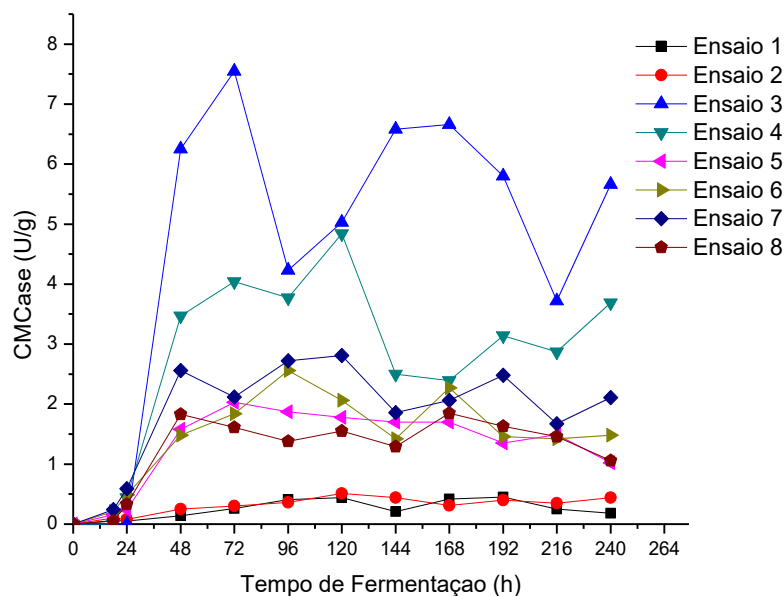
### **5.2.1 CMCase**

#### **5.2.1.1 Perfil Cinético da Produção de CMCase**

No gráfico da Figura 19 temos o esboço geral da produção de CMCase para os ensaios do planejamento experimental detalhado na Tabela 3.

O acompanhamento cinético da produção das CMCases, observado na Figura 19, demonstra que a atividade máxima dessa enzima, 7,55 U/g, foi atingida em 72 horas com o ensaio 3 no qual o substrato do bagaço de sorgo sacarino (BSS) apresenta 60 % de umidade inicial e 50 % (m/m) de incremento de farelo de trigo. Atividade de CMCase semelhante foi encontrada por Santos et al. (2015) ao trabalharem com bagaço de sabugo de milho incrementado com farelo de trigo (50%) com 60 % de umidade, obtendo 7,96 U/g CMCase em 168 horas de fermentação. No entanto, ao usar o substrato palha de milho com a mesma concentração de farelo de trigo os autores reportaram atividade máxima de 6,44 U/g de CMCase, valor esse inferior ao encontrado neste trabalho.

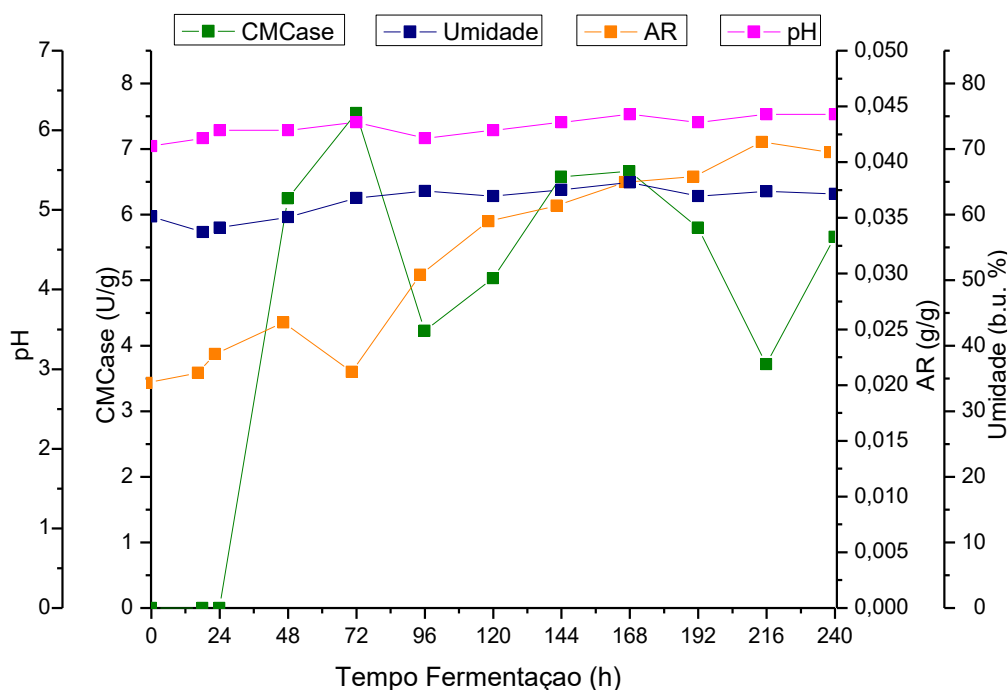
Figura 19. Cinética enzimática da CMCCase por fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino (BSS)



Os ensaios 1 e 2 (Figura 19), com 60 e 80% de umidade inicial e compostos apenas por BSS apresentaram atividade máxima de 0,45 e 0,51 U/g (0,06 e 0,07 U/mL) de CMCCase, valores semelhantes foram encontrados por Sousa trabalhando com *T. reesei* LCB 48 e fermentação semissólida do resíduo da palma forrageira lavada e sem lavar, 0,429 e 0,487 U/g respectivamente. O valor encontrado neste trabalho foi semelhante aos reportados na literatura para CMCCase obtida a partir de diversas fontes lignocelulolíticas, sem adição de substâncias indutoras. Lopes et al. (2008), estudando a produção de celulase por *Trichoderma* sp. T676 por fermentação semissólida com bagaço de cana-de-açúcar, encontraram uma atividade enzimática de 0,042 U/mL em 72 horas de fermentação.

Na Figura 20 está o acompanhamento cinético do processo de produção de CMCCase por fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de sorgo sacarino lavado, para o ensaio 03, 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 20. Perfil cinético do processo de produção de CMCase por fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de sorgo sacarino lavado (Ensaio 03, 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo)



Os parâmetros analisados durante a cinética de produção da CMCase num tempo de fermentação de 240 horas. Observa-se que o *Trichoderma reesei* LCB 48 no meio de BSS e 50 % de farelo de trigo, umidade de 60 % só apresentou atividade enzimática de CMCase após as 48 horas de fermentação (6,25 U/g). Lins e Conrado (2015), trabalhando também com *T. reesei* na fermentação do bagaço do caju lavado para produção de CMCase com umidade inicial de 65 %, encontraram valores baixos de atividade enzimática, inferiores a 0,2 U/g nas primeiras 120 horas de fermentação. A baixa atividade inicial provavelmente está associada ao começo da colonização *T. reesei* no meio, no qual o microrganismo busca fontes de carbono mais facilmente assimilável, como a glicose já disponível no meio.

Observa-se que a após as 48 horas há um aumento na produção de atividade enzimática, culminando com um pico de 7,55 U/g em 72 horas. Em 96 horas observa-se um aumento de AR devido a ação da enzima em 72 horas, por consequência do acúmulo de AR há diminuição da atividade de celulase, pois ocorre repressão da síntese enzimática.

O pH do meio apresentou um comportamento geral estável no decorrer das 240 horas, com variação de pH entre 5,8 e 6,2. Comportamento semelhante foi observado para o teor de umidade do meio. Segundo Pandey (2003) para fermentação semissólida essa umidade constante é importante para manter o crescimento do microrganismo e seu metabolismo.

### 5.2.1.2 Análise da produção de CMCase utilizando a metodologia de superfície de resposta.

Para a análise estatística do planejamento experimental, foi selecionado o tempo no qual foram observadas as atividades máximas de CMCase, como pode ser visto na Figura 19. Baseado nesse pressuposto foi montada a Tabela 10 com os dados do planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> e tendo como variável resposta as atividades de CMCase no tempo de 72 horas de fermentação.

Tabela 10. Ensaios do planejamento experimental para a produção de CMCase em Bagaço de Sorgo Sacarino (BSS) por FSS

Ensaios	Ui (b.u. %)	FT (%)	CMCase		
			U/g	U/gds	U/mL
1	60 (-1)	0 (-1)	0,26	0,65	0,03
2	80 (+1)	0 (-1)	0,30	1,50	0,04
3	60 (-1)	50 (+1)	7,55	18,88	1,01
4	80 (+1)	50 (+1)	4,04	20,20	0,54
5	70 (0)	25 (0)	2,03	6,77	0,27
6	70 (0)	25 (0)	1,84	6,13	0,25
7	70 (0)	25 (0)	2,12	7,07	0,28
8	70 (0)	25 (0)	1,61	5,37	0,21

Observa-se que a atividade em 72 horas de fermentação variou de 0,26 a 7,55 U/g de CMCase. As menores atividades foram obtidas nos ensaios compostos apenas por bagaço de sorgo sacarino e as maiores atividades a partir do BSS com o nível mais alto de incremento de farelo de trigo (50%), obtendo 7,55 U/g.

Basso, Gallo e Basso (2010) trabalhando com bagaço de cana-de-açúcar obtiveram atividade máxima de CMCase de 3,5 U/g usando o *T. reesei* sp. e de 5,7 U/g para *T. reesei* QM9414, com 360 horas.



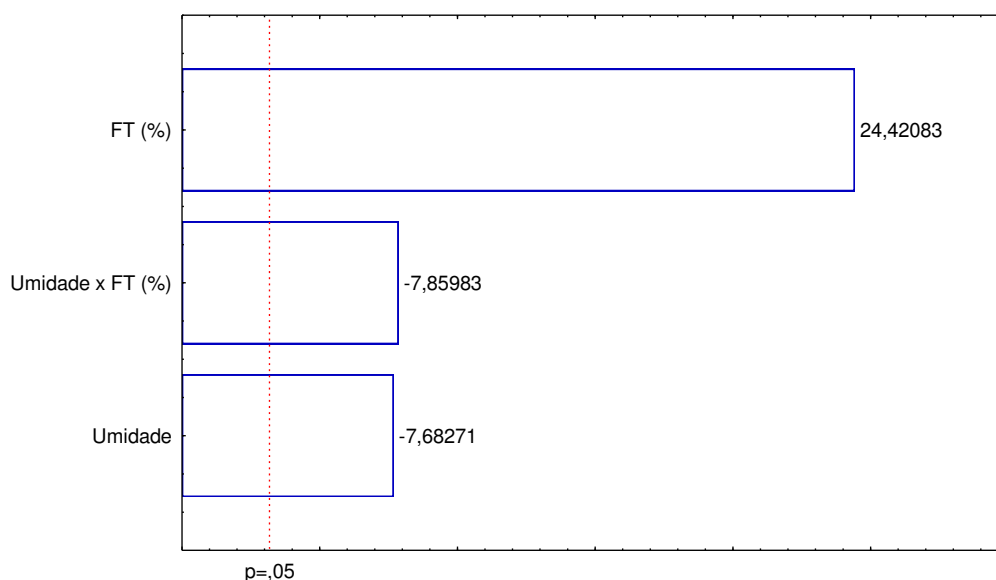
Florêncio et al. (2016) ao comparar fermentação submersa (FSM) e sequencial (FSL) (semissólida seguida de submersa), usando o fungo filamentos *Aspergillus niger* A12, obtiveram 0,6 e 0,9 (U/mL) de CMCase, para FSM e FSL, respectivamente. Valores semelhantes aos encontrados nesse trabalho.

Almeida et al. (2012) ao estudarem a influência dos substratos bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e farelo de trigo (FT) na produção de celulases por *Trichoderma reesei* RUT C-30 obtiveram maior atividade de CMCase em BCA, reportando valores de 1021,70 e 43,392 U/g em BCA e FT, respectivamente. Embora, seja um valor superior ao encontrado nesse trabalho, o *T. reesei* RUT C-30 é fungo geneticamente modificado propiciando níveis elevados de celulases.

De acordo, com Dutra (2013), a celulose presente nos resíduos agroindustriais e farelo de trigo são fontes complexas que a literatura classifica como influenciadoras de enzimas celulases, porém, ele frisa que os mesmos são polímeros de alta massa molar e que os reais indutores do processo de produção de enzimas são os produtos da hidrólise destes polissacarídeos os quais são liberados por ação de celulases produzidas de maneira basal pelos fungos.

A Figura 21 apresenta o gráfico de Pareto mostrando a influência da Umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima CMCase e o efeito interação dessas variáveis.

Figura 21. Influência da Umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima CMCase



Em análise do gráfico de Pareto observa-se que o aumento da atividade enzimática CMCase é principalmente decorrente do aumento do teor de farelo de trigo no substrato de bagaço de sorgo sacarino (BSS), e a interação e o nível de umidade do substrato mais baixo também. Segundo Pandey et al. (2003) a capacidade de se adaptar a ambientes com reduzida umidade é um dos motivos dos fungos filamentosos serem usados em fermentações semissólidas.

Com os resultados obtidos do planejamento e expostos na Tabela 10, foram calculados os coeficientes de regressão do modelo linear com estimativas de 95 % de confiança. A Equação 12 descreve o rendimento previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, Umidade inicial ( $U_i$ ) e teor de Farelo de trigo (FT). No modelo contém apenas os termos estatisticamente significativos.

$$CMCase \left( \frac{U}{g} \right) = 2,47 - 0,87 U_i + 2,76 FT - 0,89 U_i \times FT \quad (12)$$

Na Tabela 11 observa-se a análise de variância para os resultados de atividade de CMCase do planejamento experimental.

Tabela 11. Análise de variância para a atividade de CMCase

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
Regressão	36,576	3	12,192	2,7
Resíduo	2,741	4	0,685	
Total	39,317	7		
$R^2$ (%)	93,03			

$$F_{\text{tabelado}} = 6,59$$

$$F_{\text{calculado}} = 17,80$$

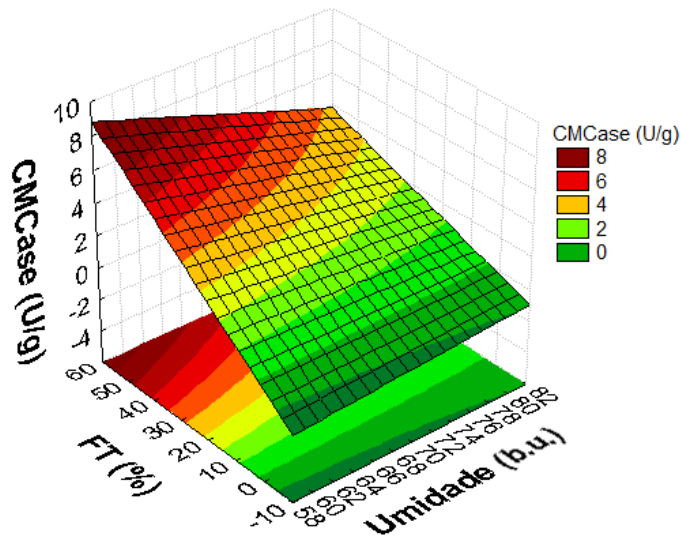
GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios ;Teste F - ( $F_{\text{calculado}} / F_{\text{tabelado}}$ ).

Analisando a Tabela para a resposta de atividade de CMCase, verifica-se que a regressão foi altamente significativa ( $p < 0,0001$ ) e a porcentagem de variação explicada, de 93,03 %.

A Figura 22 exhibe a superfície de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática de CMCase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo

adicionado ao bagaço do sorgo sacarino IPA P222, usado como substrato da fermentação semissólida.

Figura 22. Superfície de resposta para a produção de CMCCase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo



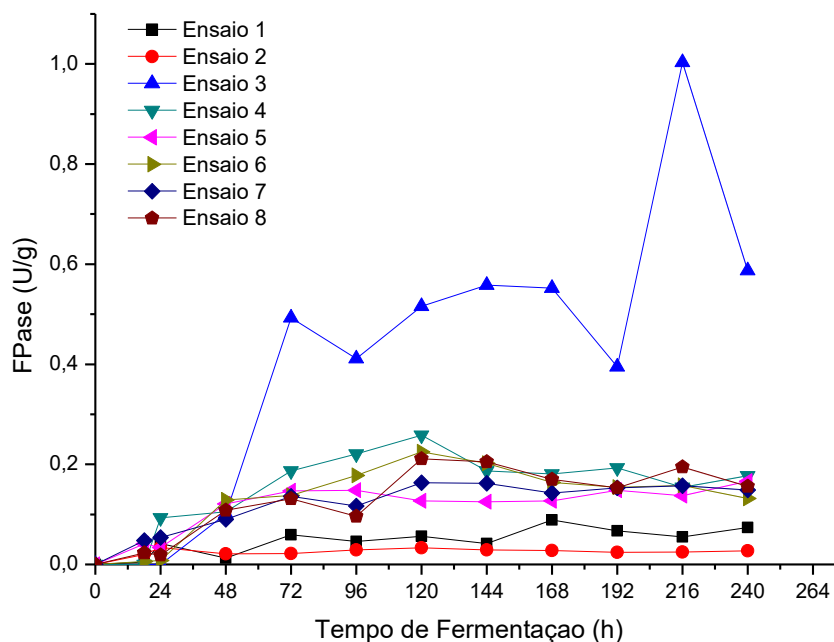
Embora a umidade tenha sido reportada como um parâmetro estatisticamente significativo no processo fermentativo de produção da CMCCase, por meio da superfície de resposta mostrada na Figura 22, podemos inferir que a influência dessa variável é pouco expressiva quando comparada a influência do teor de farelo de trigo.

## 5.2.2 FPase

### 5.2.2.1 Perfil Cinético da produção de FPase

O acompanhamento da cinética de produção de FPase dos ensaios do planejamento experimental, detalhado na Tabela 3, está disposto na Figura 23.

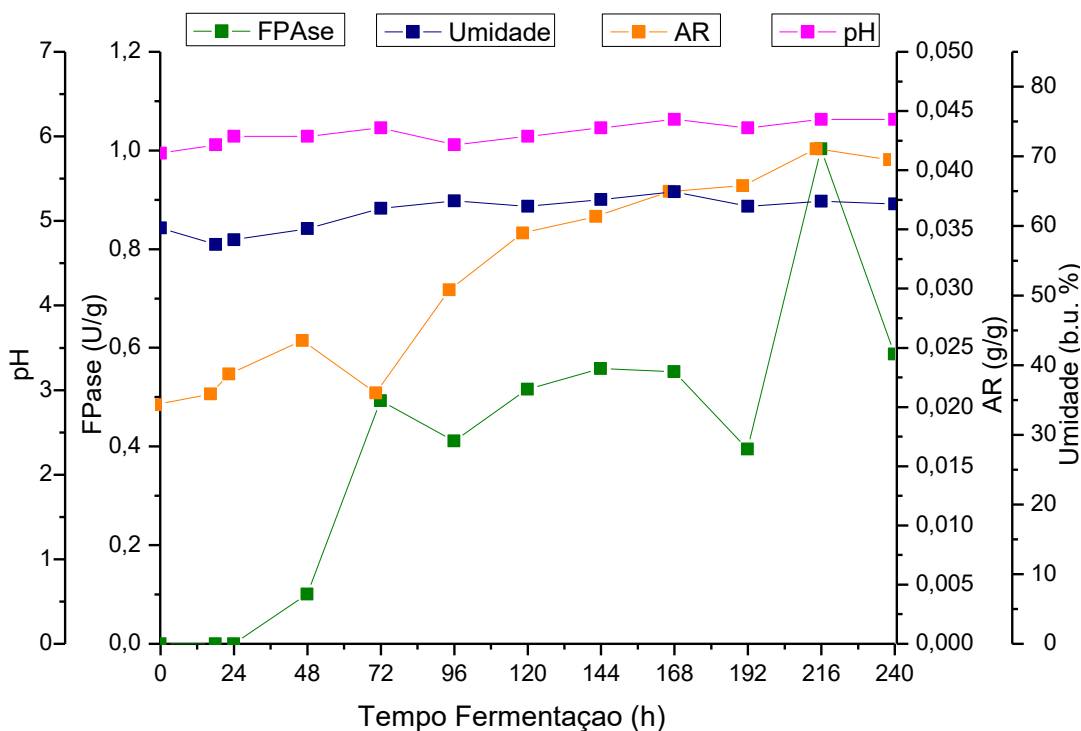
Figura 23. Cinética enzimática da FPase por fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino (BSS)



Na Figura 23 temos o perfil cinético da produção de FPase, nota-se que o ensaio 03 composto por bagaço de sorgo sacarino e 50 % de farelo de trigo, com 60 % umidade, se destacou frente aos demais ensaios do planejamento. Mesmo contendo teor de farelo de trigo igual ao ensaio 3, o ensaio 4 não demonstrou níveis consideráveis de atividade. Os demais ensaios apresentaram atividade máxima de FPase inferiores a 0,3 U/g.

O perfil cinético do ensaio 03 está disposto na Figura 24, detalhando os parâmetros avaliados durante a fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em BSS e 50 % de farelo de trigo, com 60 % de umidade.

Figura 24. Perfil cinético do processo de produção de FPase por fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de sorgo sacarino lavado (Ensaio 03, 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo)



A FPase semelhante a CMase, apresentou atividade após as 48 horas. Observa-se o pico de atividade em 216 horas com 1,0 U/g (2,51 U/gds e 0,13 U/mL).

Silva et al. (2013) ao estudarem fermentação submersa do bagaço da cana-de-açúcar em meio nutritivo usando uma seleção de microrganismos celulolíticos dentre eles o *Trichoderma reesei*, obtiveram atividades máximas inferiores aos encontrados neste trabalho. Sendo reportados os valores de 0,69 U/g de FPase ao utilizarem meio nutritivo, pH 5,5, 35 °C e *T. reesei*. Os demais fungos filamentosos de linhagens selvagens apresentaram atividades de 0,87; 0,72 e 0,76 U/g de FPase, nas mesmas condições.

Florêncio, Badino e Farinas (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*. Nas mesmas condições usando o *Trichoderma reesei* RUT C30 os autores

obtiveram 0,02 (FSS) e 0,01 U/mL (FSM) de FPase. Resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho.

A atividade máxima de FPase foi obtida com 60 % de umidade, a qual corresponde a 0,985 de atividade de água (aw). Santos et al. (2011), ao estudar três níveis de atividade de água (0,943, 0,971 e 0,985) no resíduo agroindustrial da seriguela submetido a fermentação semissólida, obtiveram seu maior índice de atividade enzimática de FPase com atividade de 0,971 e umidade de 50 %, os autores observaram que o nível de aw do substrato está relacionado a inibição do fungo, influenciando o metabolismo responsável pela produção da enzima.

Durante todo o processo de fermentação a umidade e pH mantiveram-se praticamente constante. Santos et al. (2011) chamaram a atenção para a importância da umidade, a qual está relacionada a atividade de água, no crescimento do fungo em fermentação semissólida. O controle do nível de umidade é essencial para a otimização do processo em estado sólido. O teor de umidade deve ser adequado para facilitar a dissolução e transferência de nutrientes e difusão do oxigênio no substrato.

#### **5.2.2.2 Análise da produção de FPase utilizando a metodologia de superfície de resposta.**

As análises estatísticas foram feitas a partir do tempo no qual o *T. reesei* produziu o nível máximo de atividade enzimática FPase, 216 horas. Na Tabela 12 observa-se o planejamento experimental  $2^2$  com 4 pontos centrais e a variável resposta, atividade enzimática FPase.

Tabela 12. Ensaios do planejamento experimental para a produção de FPase em bagaço de sorgo sacarino (BSS) por FSS

Ensaios	Ui (b.u. %)	FT (%)	Fpase		
			U/g	U/gds	U/mL
1	60 (-1)	0 (-1)	0,06	0,14	0,01
2	80 (+1)	0 (-1)	0,03	0,13	0,00
3	60 (-1)	50 (+1)	1,00	2,51	0,13
4	80 (+1)	50 (+1)	0,15	0,77	0,02
5	70 (0)	25 (0)	0,14	0,46	0,02
6	70 (0)	25 (0)	0,16	0,53	0,02
7	70 (0)	25 (0)	0,16	0,52	0,02
8	70 (0)	25 (0)	0,20	0,65	0,03

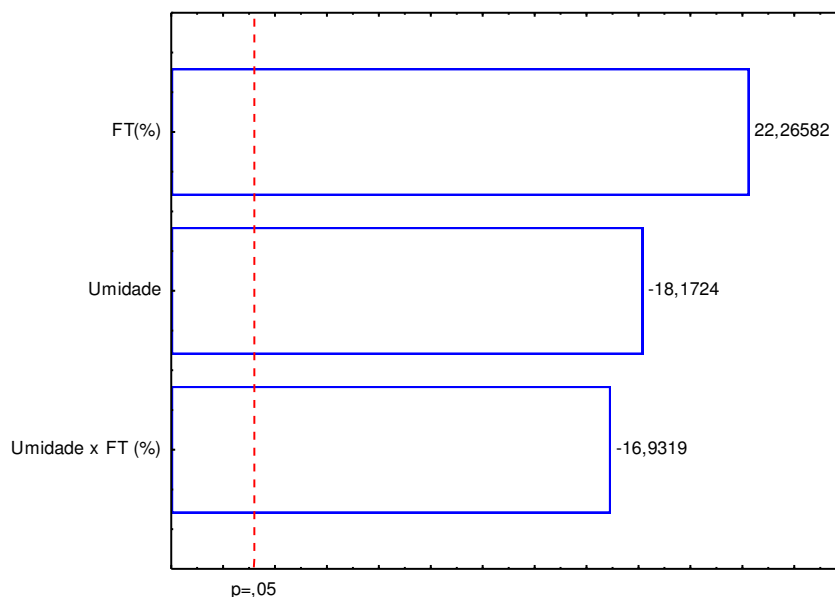
Analisando a Tabela 12, observa-se que a atividade de FPase, resultante da ação sinérgica das enzimas do complexo celulolítico, apresentou uma variação entre 0,03 e 1,00 U/g. Os menores valores de atividade foram encontrados nos ensaios sem fonte indutora de farelo trigo e o maior valor de atividade no ensaio 03 contendo o maior teor de farelo de trigo e menor nível de umidade do planejamento (60 %).

Estudos de produção de enzimas celulases por meio de fermentação semissólida do bagaço da cana-de-açúcar realizados por Langaro et al. (2015), avaliaram a indução dessas enzimas por lactose presente no soro de queijo, alcançando o nível mais alto de atividade enzimática, 0,45 U/mL para FPase, com 24 horas usando o *T. reesei* M3.

A Figura 25 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.

As variáveis umidade inicial (Ui) e teor de farelo de trigo (FT %) e sua interação (Ui x FT %) mostraram-se significativas a nível de 95 % de confiança (Figura 25).

Figura 25. Influência da Umidade inicial e do teor de farelo de trigo da produção da enzima FPase



Por meio dos resultados obtidos do planejamento experimental fatorial, foram calculados os coeficientes de regressão do modelo linear com estimativas de 95 % de confiança. A Equação 13 descreve o rendimento previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, Umidade inicial ( $U_i$ ) e teor de Farelo de trigo (FT), no modelo contém apenas os termos estatisticamente significativos.

$$FPase \left( \frac{U}{g} \right) = 0,24 - 0,22 U_i + 0,270 FT - 0,20 U_i \times FT \quad (13)$$

A análise de variância para os dados de produção de FPase do planejamento experimental estão expostos na Tabela 13.

Tabela 13. Análise de variância para a atividade de FPase

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
<b>Regressão</b>	0,650	3	0,217	2,99
<b>Resíduo</b>	0,045	4	0,011	
<b>Total</b>	0,696	7		
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	93,5			

$$F_{\text{tabelado}} = 6,59$$

$$F_{\text{calculado}} = 19,73$$

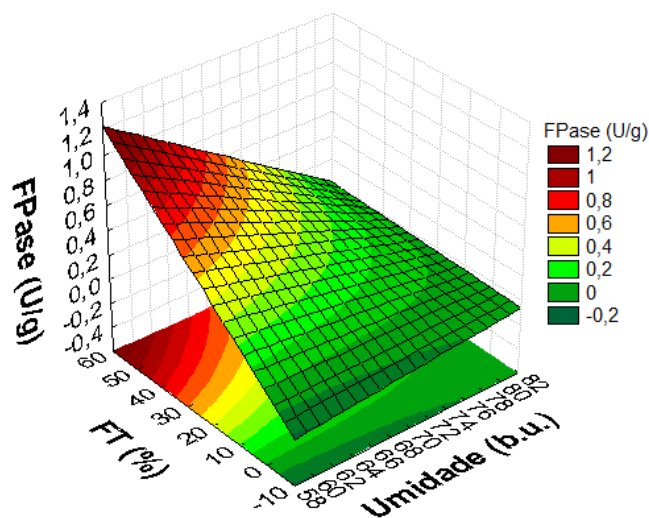
GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios ;Teste F - (Fcalculado / FTabelado).



O teste F observado na Tabela 13, mostra que a regressão foi significativa e preditiva, indicando que há relação entre as variáveis independentes e dependentes do planejamento. A porcentagem de variação explicada foi de 93,5 %.

A Figura 26 exibe a superfície de resposta e curvas de contorno da atividade enzimática de FPase em função dessas variáveis umidade e teor de farelo de trigo.

Figura 26. Superfície de resposta para a produção de FPase em função da umidade inicial e do teor de farelo de trigo



Analisando a superfície de resposta observa-se que, o aumento da atividade enzimática FPase é principalmente decorrente do aumento do teor de farelo de trigo no substrato de Bagaço de sorgo sacarino (BSS).

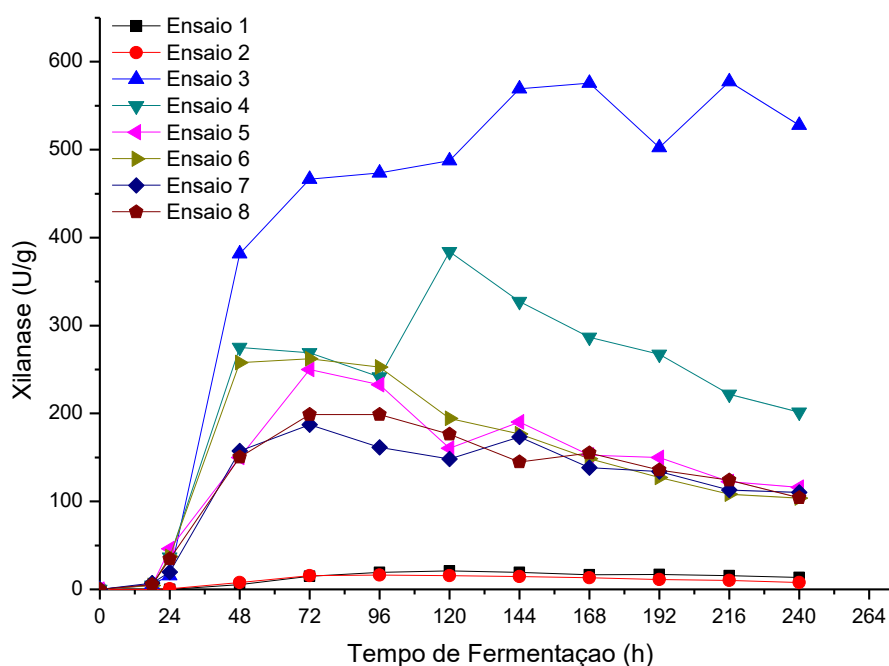
### 5.2.3 Xilanase

O acompanhamento da cinética de produção de Xilanase dos ensaios do planejamento experimental, assim como o monitoramento dos parâmetros pH, umidade e AR durante o período de 240 horas do processo, estão apresentados nos próximos tópicos.

### 5.2.3.1 Perfil Cinético da produção de Xilanase

A Figura 27 apresenta o acompanhamento da cinética de produção de Xilanase dos ensaios do planejamento experimental, detalhado na Tabela 3.

Figura 27. Cinética de produção de Xilanase por fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino (BSS) de todos os ensaios do planejamento experimental.



Na Figura 27 observa-se que ensaio 03, composto por BSS e 50 % FT, 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 577,41 U/g em 216 horas (2,67 U/g.h), no entanto, um outro ponto de maior produtividade foi encontrado com 144 horas de fermentação, com valor de 569,40 U/g de xilanase e 3,95 U/g.h.

Nota-se pela Figura 27 que os ensaios contendo farelo de trigo nas proporções 25 e 50 % apresentaram melhores resultados que os ensaios 01 e 02 contendo apenas BSS. Evidenciando o farelo de trigo como uma importante fonte indutora da produção de xilanase.

Almeida et al. (2012) ao estudarem a influência do farelo de trigo como fonte indutora de xilanases na fermentação semissólida do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) usando o *Trichoderma reesei* RUT C-30, observaram que o uso do farelo de trigo associado ao BCA melhorou os níveis de atividade enzimática, quando comparado a fermentação apenas do farelo de trigo ou BCA, separadamente. Segundo os autores o farelo de trigo associado a biomassa lignocelulósica demonstrou capacidade de ser um melhor substrato indutor para xilanases.

Gottschalk et al. (2013) ao compararem o farelo de trigo e resíduo do leite de soja (Okara) como indutor de xilanase, observaram que o farelo de trigo proporcionou maior atividade enzimática e produtividade (U/g.h) que o Okara. Sendo 99,00 U/g de xilanase em 48 horas de fermentação, com o farelo de trigo e 28 U/g de xilanase em 72 horas, com o resíduo de leite de soja (Okara).

Os maiores níveis de atividade enzimática encontrados foram encontrados no ensaio 03 com o nível mais baixo de umidade estudado no planejamento, 60 %. O teor de umidade do substrato é um dos fatores que mais afetam o crescimento microbiano e a formação de produtos (MURTHY, KARANTH e RAO, 1993). Os fungos filamentosos têm a capacidade de se adaptar e crescer nesses ambientes com baixa umidade, o que teria influenciado os resultados de produção das enzimas (PANDEY, 2003).

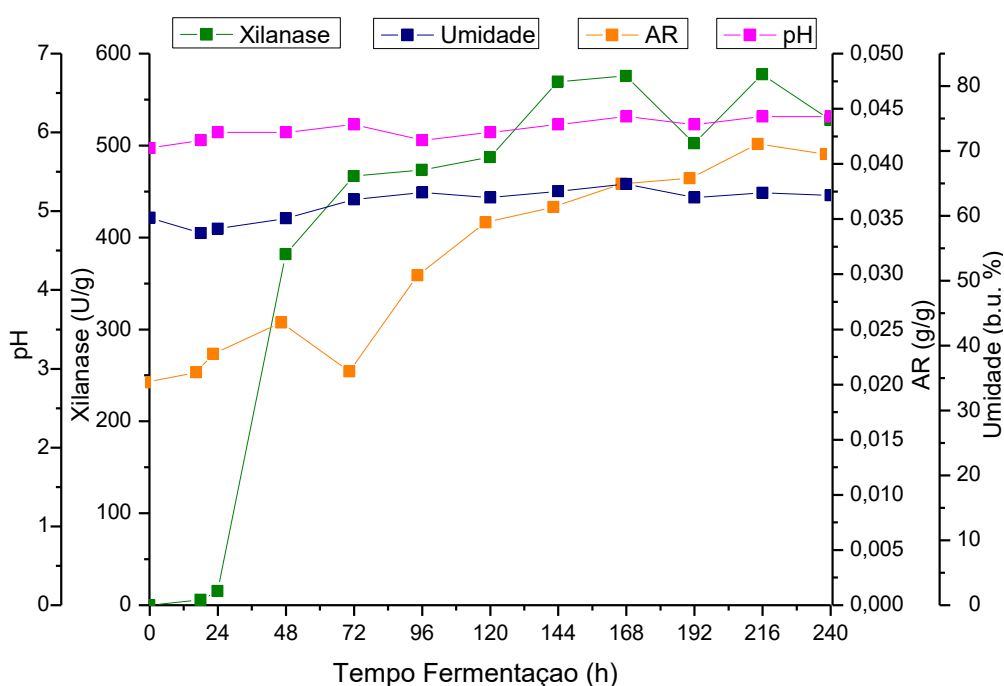
Vários autores trabalhando com fungos filamentosos obtiveram seus maiores níveis de atividade próximos aos reportados nesse trabalho.

Terrasan e Carmona (2015), ao estudarem a influência da umidade (20, 30, 40 e 50 %) do substrato indutor bagaço de cevada na produção das xilanases por fermentação semissólida e *Penicillium janczewskii* observaram a atividade enzimática máxima de 370,00 U/g ao trabalhar com 50 % de umidade. Para os valores a baixo de 50 % de umidade os autores obtiveram forte redução nos rendimentos enzimáticos.

Xiros et al. (2008) avaliaram a influência da umidade na produção da xilanase a partir da fermentação semissólida do bagaço de cevada utilizando o *Fusarium oxysporum* obtendo o maior nível de atividade enzimática com 120 horas e umidade de 66 %.

O perfil cinético do ensaio 03 para a produção de xilanase, está disposto na Figura 28, detalhando os parâmetros, pH, umidade e AR avaliados durante a fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em BSS e 50 % de farelo de trigo, com 60 % de umidade.

Figura 28. Perfil cinético do processo de produção de Xilanase por fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de sorgo sacarino lavado (Ensaio 03, 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo)



O pico de atividade para xilanase foi obtido, com 144 horas, com pH de 6,1. Observa-se que durante todo processo de produção das enzimas o pH variou sensivelmente entre 5,8 e 6,2. A máxima atividade de xilanase reportada por Brienzo (2010), em fermentação semissólida usando o *Trichoderma reesei* foi em pH próximo de 6,5. Valor semelhante ao observado nesse trabalho. A literatura mostra que geralmente, o *T. reesei* produz a xilanase em maior quantidade em pH próximo a neutralidade, enquanto pH próximo de 4 favorece a produção das celulasas (BAILEY, BUCHERT e VIKARI, 1993).

### 5.2.3.2 Análise da produção de Xilanase utilizando a metodologia de superfície de resposta.

A variável resposta, Xilanase, da Tabela 14 foi obtida a partir do tempo no qual o *T. reesei* produziu o nível máximo de atividade enzimática de Xilanase com maior produtividade, 144 horas.

Tabela 14. Ensaio do planejamento experimental para a produção de Xilanase em bagaço de sorgo sacarino (BSS) por FSS

Ensaio	Ui (b.u. %)	FT (%)	Xilanase		
			U/g	U/gds	U/mL
1	60 (-1)	0 (-1)	19,33	48,32	2,58
2	80 (+1)	0 (-1)	14,42	72,10	1,92
3	60 (-1)	50 (+1)	569,40	1423,50	75,92
4	80 (+1)	50 (+1)	327,46	1637,30	43,66
5	70 (0)	25 (0)	190,47	634,90	25,40
6	70 (0)	25 (0)	176,77	589,23	23,57
7	70 (0)	25 (0)	173,35	577,83	23,11
8	70 (0)	25 (0)	144,83	482,76	19,31

A atividade de xilanase variou entre 19,33 e 569,40 U/g, sendo este o maior nível obtido com 144 horas de fermentação.

As atividades encontradas, foram superiores as reportadas por Florencio et al. (2016), trabalhando com fermentação submersa e semissólida com fonte de carbono indutora, a cana-de-açúcar explodida a vapor. Os autores obtiveram atividade enzimática de xilanase equivalente a 29,5 (FSS) e 4,2 U/mL (FSM) ao utilizar o *Aspergillus Niger* A12 e 10,7 (FSS) e 3,8 U/mL (FSM) com o *T. reesei* Rut C30.

Observa-se na Tabela 14 que ao incrementar o substrato de bagaço de sorgo sacarino IPA P222 com a fonte indutora farelo de trigo em 25 e 50 % a atividade da xilanase teve um aumento substancial.

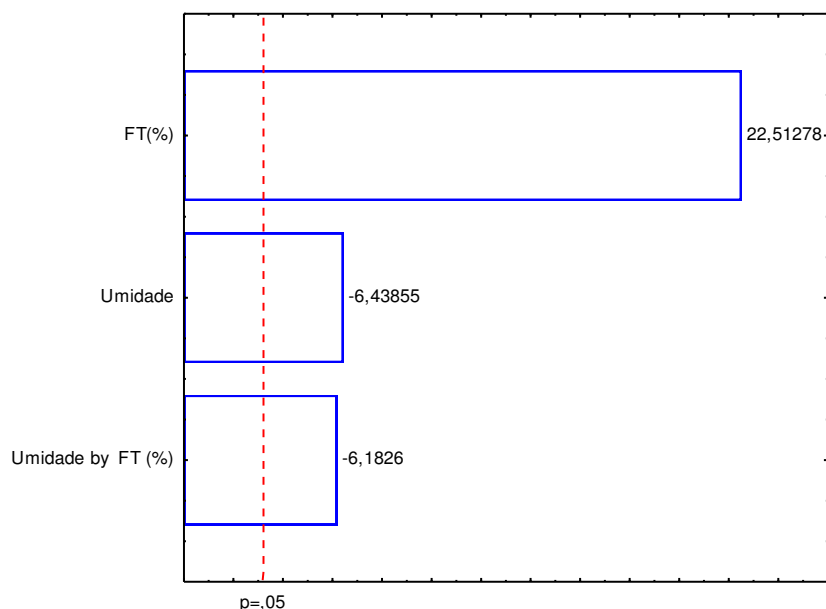
Gomes et al. (2012), observaram resultados semelhantes ao estudar a produção de xilanases em diferentes substratos usando fungos filamentosos do cerrado. Os autores reportaram resultados maiores de atividade de xilanase para o fungo filamentoso selvagem AF22 ao inserir farelo de trigo ao bagaço da cana-de-

açúcar. A atividade enzimática foi de 66,96 U/g usando o substrato de bagaço de cana-de-açúcar, 106,9 U/g usando apenas farelo de trigo e 788,81 U/g usando substrato composto por farelo de trigo e BCA.

Langaro et al. (2015), utilizando a lactose como fonte indutora, realizaram estudos a fim de avaliar a capacidade de produção de enzimas hemicelulases por meio de fermentação semissólida em bagaço da cana-de-açúcar. Ao compararem a utilização de *A. niger* e *T. reesei* nessas condições, os autores obtiveram atividade máxima 2,38 U/mL de xilanase com 48 horas de processo fermentativo usando o *T. reesei*.

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

Figura 29. Influência da Umidade inicial e do teor de farelo de trigo da produção da enzima Xilanase



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. De acordo com os estudos realizados, conclui-se que o farelo de trigo é uma fonte potencial para a produção de enzimas xilanases e a umidade é um parâmetro importante para síntese enzimática da xilanase.

A Equação 14 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 14. O modelo foi obtido a partir dos coeficientes da regressão linear com 95 % de confiança.

$$Xilanase (U/g) = 202,00 - 61,71 U_i + 215,78 FT - 59,26 U_i \times FT \quad (14)$$

A análise de variância para os dados de produção de Xilanase do planejamento experimental estão expostos na Tabela 15.

Tabela 15. Análise de variância para a atividade de Xilanase

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
<b>Regressão</b>	215520,80	3	71840,27	5,06
<b>Resíduo</b>	8617,10	4	2154,28	
<b>Total</b>	224137,90	7		
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	96,16			

$$F_{\text{tabelado}} = 6,59$$

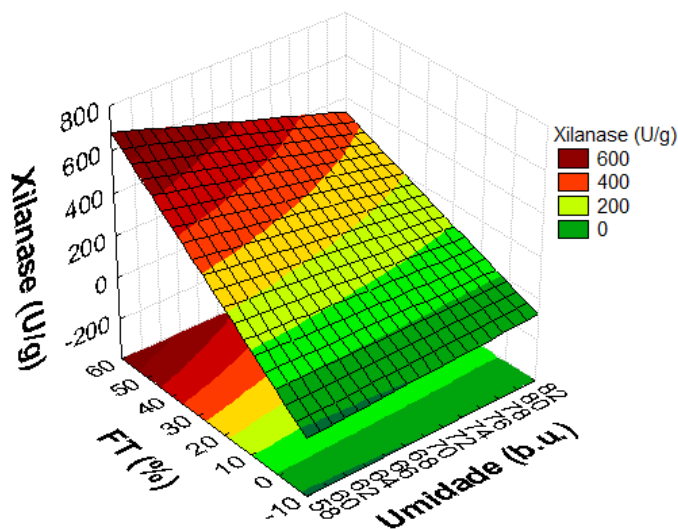
$$F_{\text{calculado}} = 33,35$$

GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios ;Teste F - (Fcalculado / FTabelado).

De acordo com Barros Neto et al. (1995) o teste F apresenta a razão entre o F calculado e o F tabelado, quando a relação é maior que 1 a regressão é significativa estatisticamente e a regressão é preditiva quando esse valor for maior ou igual a 4. De acordo com a Tabela 15, observa-se que a análise de variância da produção da xilanase além de ser significativa, também tem fins preditivo. A porcentagem de variação explicada foi de 96,16 %.

A Figura 30 mostra a superfície de resposta da atividade enzimática da xilanase em função das variáveis umidade inicial e do teor de farelo de trigo.

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, principalmente, e para os menores níveis de umidade.

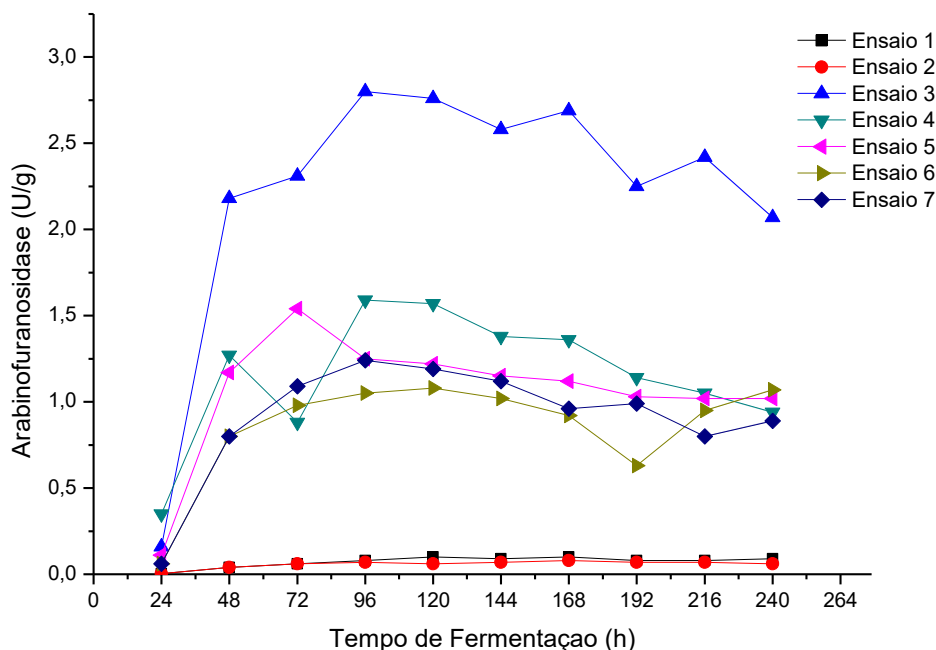
## 5.2.4 $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase

### 5.2.4.1 Perfil Cinético da produção de Arabinofuranosidase

A cinética da produção da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por meio da fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino IPA P222 dos ensaios estudados no planejamento experimental detalhado na Tabela 3, está exposta na Figura 31.



Figura 31. Cinética de produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino (BSS) de todos os ensaios do planejamento experimental

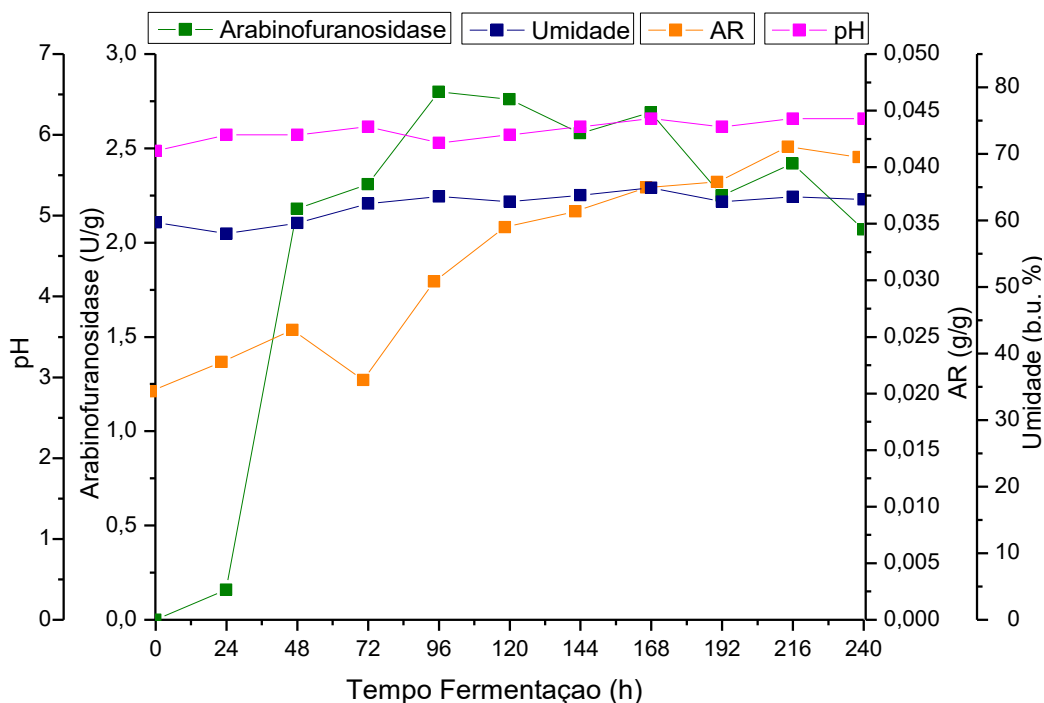


O ensaio 03 apresenta os maiores valores de atividade de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, com teor de farelo de trigo de 50 % com 60 % de umidade. O ensaio 04, também com o mesmo teor de farelo de trigo e 80 % de umidade não apresenta valores muito a cima dos reportados para os ensaios do ponto central com 25 % de farelo de trigo e umidade de 70 %. Percebe-se que há um grande aumento de atividade nos ensaios contendo o farelo de trigo em relação aos ensaios 01 e 02 com substrato composto apenas de bagaço do sorgo sacarino.

Os ensaios 01 e e 02 apresentam comportamento bastante semelhante, independente do teor de umidade, variando entre 0,004 a 0,1 U/g e 0,004 a 0,08 U/g de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, respectivamente.

O perfil cinético do ensaio 03 para a produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase está disposto na Figura 32, detalhando os parâmetros, pH, umidade e AR avaliados durante a fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em BSS e 50 % de farelo de trigo, com 60 % de umidade.

Figura 32. Perfil cinético do processo de produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase por fermentação semissólida com *Trichoderma reesei* LCB 48 em bagaço de sorgo sacarino lavado (Ensaio 03, 60 % de umidade e 50 % de farelo de trigo)



Na Figura 32 observa-se o comportamento cinético da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase no decorrer das 240 horas. A enzima apresenta uma atividade crescente a partir de 24 horas, chegando a um pico de atividade de 2,8 U/g em 96 horas e um decaimento em 240 horas com 2,07 U/g. No período de 48 a 216 horas a atividade enzimática mantém-se praticamente constante variando entre 2,18 e 2,8 U/g de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

Resultados inferiores foram reportados por Terrasan e Carmona (2015), trabalhando com o fungo filamentoso *Penicillium janczewskii* em fermentação semissólida do bagaço de cevada. Os autores obtiveram 0,67 U/g de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase com 7 dias (168 h) de cultivo à 28 °C.

Xiros et al. (2008), observaram ao estudar a fermentação do bagaço da cevada com o fungo filamentoso *F. oxysporum* em diferentes umidades (55 a 79 %), que a atividade  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase foi de 2,4 U/g, sem diferenças significativas entre as condições testadas.

#### 5.2.4.2 Análise da produção de $\alpha$ -L-arabinofuranosidase utilizando a metodologia de superfície de resposta.

Para a análise estatística dos dados foram utilizadas as atividades enzimáticas de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase obtidas com 96 horas, para todos os ensaios do planejamento fatorial  $2^2$  com 3 pontos centrais, apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Ensaios do planejamento experimental para a produção de  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase em Bagaço de Sorgo Sacarino (BSS) por FSS

Ensaio	U <sub>i</sub> (b.u. %)	FT (%)	Arabinofuranosidase		
			U/g	U/gds	U/mL
1	60 (-1)	0 (-1)	0,08	0,20	0,01
2	80 (+1)	0 (-1)	0,07	0,35	0,01
3	60 (-1)	50 (+1)	2,80	7,00	0,37
4	80 (+1)	50 (+1)	1,59	7,95	0,21
5	70 (0)	25 (0)	1,25	4,17	0,17
6	70 (0)	25 (0)	1,05	3,50	0,14
7	70 (0)	25 (0)	1,24	4,13	0,17

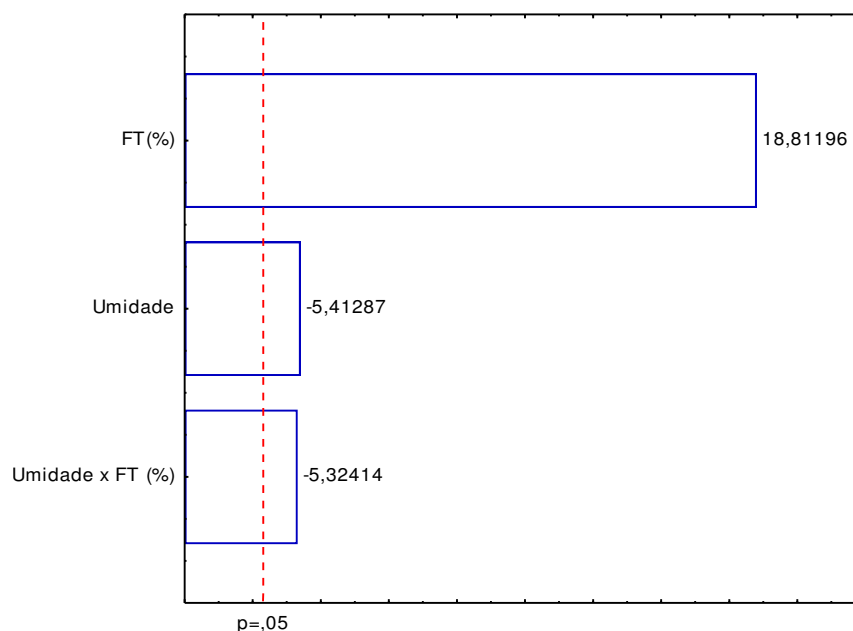
Na Tabela 16, observa-se a atividade de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, com 96 horas de fermentação, dos ensaios do planejamento. A atividade enzimática variou entre 0,07 a 2,80 U/g (0,01 e 0,37 U/mL). O pico de atividade de 2,80 U/g foi obtido com um pH de 5,9, umidade de 60 % e teor de 50 % de farelo de trigo adicionado ao bagaço do sorgo sacarino IPA P222.

Terrasan et al. (2010) estudaram diferentes fontes de carbono indutor na produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase a partir da fermentação submersa em meio Vogel usando o fungo filamentoso *Penicillium janczewskii* por 7 dias à 28 °C. Os maiores níveis de atividade foram obtidos usando o bagaço do malte (0,19 U/mL), bagaço de laranja (0,21 U/mL), xilana de aveia (0,80 U/mL) e arabinose (0,73 U/mL). Os níveis intermediários de atividade foram obtidos usando o farelo de trigo (0,10 U/mL), xilose (0,13 U/mL), e pectina de citrus (0,09 U/mL). Níveis mais baixos foram obtidos usando o bagaço da cana-de-açúcar (0,02 U/mL), sabugo de milho (0,03 U/mL) e farelo de aveia (0,04 U/mL). Os valores obtidos para o substrato composto por apenas bagaço do sorgo sacarino IPA P222 (BSS), apresentados nesse trabalho (ensaios 01 e 02), estão próximos dos reportados para o bagaço da cana-de-açúcar. Embora, o farelo de trigo seja uma boa fonte indutora de hemiceluloses, no trabalho do Terrasan et al. (2010) não apresentou valores altos de atividade de  $\alpha$ -L-

arabinofuranosidase quando comparado as demais fontes indutoras. A atividade máxima obtida com o substrato formado por BSS e 50 % de farelo de trigo (ensaio 03), apresentou maior atividade que as fermentações submersas incrementadas com fontes indutoras de resíduos agroindustriais (Bagaço do malte, da laranja e bagaço da cana-de-açúcar).

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  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e o efeito das variáveis.

Figura 33. Influência da Umidade inicial e do teor de farelo de trigo na produção da enzima  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase



Observa-se que, as variáveis estudadas no planejamento ( $U_i$  e FT) e sua interação são significativas com 95 % de confiança. No entanto, a variável teor de farelo de trigo se destaca como maior influenciadora na produção da enzima  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

A Equação 15 descreve o modelo de primeira ordem previsto para atividade de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase em função das variáveis codificadas, Umidade inicial ( $U_i$ ) e teor de Farelo de trigo (FT), de acordo com o planejamento experimental da Tabela 15. O modelo foi obtido a partir dos coeficientes da regressão linear com 95 % de confiança.

$$\text{Arabinofuranosidase} = (U/g) = 1,15 - 0,31 U_i + 1,06 FT - 0,30 U_i \times FT \quad (15)$$

A análise de variância para os dados de produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase do planejamento experimental estão expostos na Tabela 17.

Tabela 17. Análise de variância para a atividade de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	Teste F
<b>Regressão</b>	5,226	3	1,742	18,77
<b>Resíduo</b>	0,029	3	0,01	
<b>Total</b>	5,255	6		
<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	99,45			

$$F_{\text{tabelado}} = 9,28$$

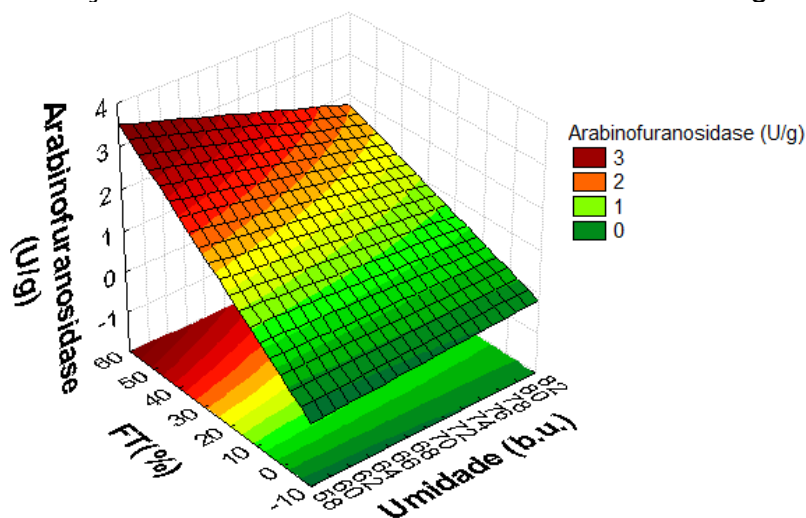
$$F_{\text{calculado}} = 174,20$$

GL – grau de liberdade; SQ – soma dos quadrados; MQ – média quadrática dos desvios ; Teste F - (Fcalculado / FTabelado).

De acordo com a Tabela 17, observa-se que a análise de variância da produção da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase além de ser significativa, também tem fins preditivo. A porcentagem de variação explicada foi de 99,45 %.

A Figura 34, mostra a superfície de resposta da atividade enzimática da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase em função das variáveis umidade inicial e do teor de farelo de trigo.

Figura 34. Superfície de resposta para a produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase 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  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase ocorreram para os teores mais altos de farelo de trigo, principalmente, e para os menores níveis de umidade.

### 5.3 Hidrólise enzimática

O extrato enzimático obtido da fermentação semissólida do bagaço do sorgo sacarino foi aplicado na hidrólise enzimática do bagaço do sorgo e na hemicelulose obtida por meio da extração usando peróxido alcalino.

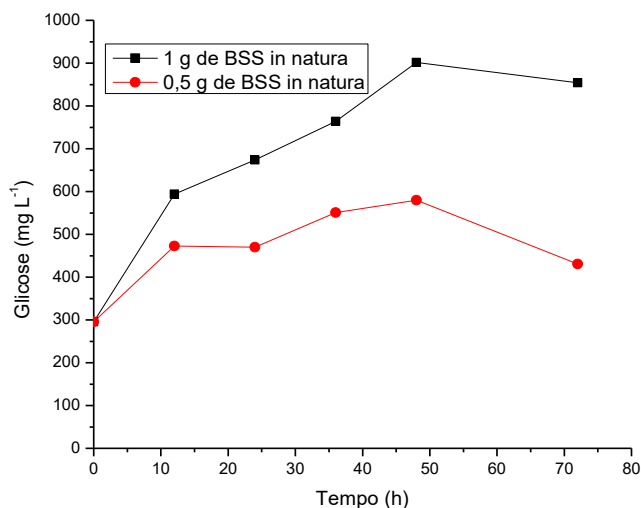
A aplicação do extrato bruto durante a hidrólise foi realizada para avaliar o potencial dessas enzimas no pré-tratamento enzimático da biomassa lignocelulósica *in natura* e na hemicelulose proporcionando açúcares fermentescíveis. As condições do extrato bruto aplicado nas hidrólises estão descritas na Tabela 18.

Tabela 18. Atividades das enzimas do extrato bruto utilizado nas hidrólises

Enzima	Atividade (U/mL)
Xilanase	77,06
CMCase	0,81
FPase	0,09

Na Figura 35 observa-se o acompanhamento da concentração da glicose durante a hidrólise enzimática de 0,5 e 1,0 g de bagaço do sorgo sacarino *in natura*.

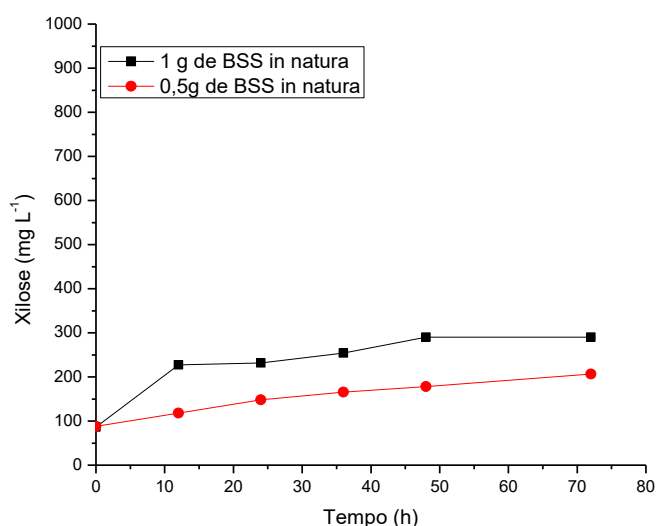
Figura 35. Cinética da concentração de glicose durante hidrólise enzimática do bagaço de sorgo sacarino *in natura*



A concentração da glicose inicialmente no meio contendo 1,0 e 0,5 g de bagaço *in natura* e o extrato enzimático foi de cerca de 88 mg L<sup>-1</sup>, essa quantidade de xilose já existente é fruto do extrato enzimático bruto usado na hidrólise. Durante a hidrólise há um aumento dessa concentração chegando ao seu máximo em 48 horas com um teor de 901,65 e 579,89 mg L<sup>-1</sup>, para os meios com 1,0 e 0,5 g, respectivamente. Observa-se uma queda na concentração da glicose a partir de 48 horas, para a hidrólise realizada com 0,5 g, já para a realizada com 1,0g em 48h de hidrólise a concentração de glicose permanece constante, sendo assim considerado, para as condições de processo estudado, 48h o tempo ótimo do processo. Na Figura 35 é possível observar que ao utilizar 1,0 grama de bagaço a concentração de glicose é praticamente o dobro da concentração obtida utilizando 0,5 gramas. Logo, dentro dos testes realizados, pode-se inferir que o extrato enzimático bruto, tem a tendência de hidrolisar o substrato de forma linear.

A Figura 36 dispõe os dados da concentração da xilose durante a hidrólise enzimática do bagaço do sorgo sacarino *in natura* estudada por 72 horas.

Figura 36. Cinética da concentração de xilose durante hidrólise enzimática do bagaço de sorgo sacarino *in natura*



A concentração da xilose inicialmente no meio contendo 1,0 e 0,5 g de bagaço *in natura* é de cerca de 88 mg/L. Durante a hidrólise há um aumento dessa

concentração chegando ao seu máximo em 48 horas com um teor de 290,39 mg/L para 1,0 g de bagaço e 206,76 mg/L de xilose com 72 horas para o meio com 0,5 g.

O extrato enzimático mostrou-se capaz de hidrolisar tanto a hemicelulose quanto a celulose do bagaço do sorgo *in natura*, embora, seja uma quantidade baixa de açúcares quando comparada a outros processos que utilizam enzimas comerciais ou que realizaram pré-tratamentos antes de usá-las.

Campos (2015) estudou a hidrólise enzimática do bagaço de sorgo sacarino *in natura* e pré-tratado utilizando enzimas comerciais endoglucanase (Novozyme) e a beta-glicosidase (Proenzyme). Ao usar o bagaço *in natura* durante a hidrólise o autor reportou teor máximo de 16713,7 mg L<sup>-1</sup> de glicose em 48 horas e 31639,3 mg L<sup>-1</sup> de glicose ao usar bagaço do sorgo sacarino pós pré-tratamento com hidróxido de sódio.

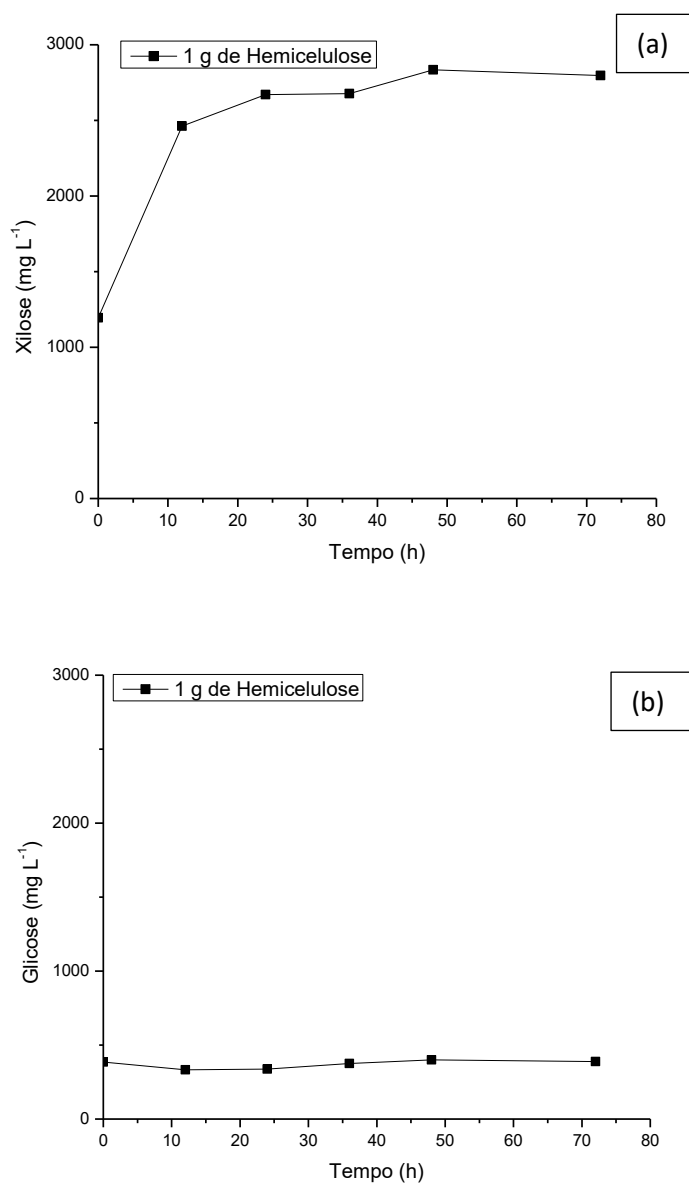
Santos, Souto-Maior e Gouveia (2010) ao realizar hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado, utilizando preparações comerciais de celulasas e  $\beta$ -glucosidasas (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca), obtiveram teor máximo de 50000 mg L<sup>-1</sup> de glicose após 48 horas de hidrólise.

Deve-se ressaltar que o extrato usado para hidrólise na presente pesquisa foi utilizado sem nenhum tratamento prévio. A purificação de enzimas, quando devidamente realizadas, aumentam as suas atividades. O resultado mais relevante com os testes acima realizados é que se pode afirmar que a enzima é seletiva, tanto para celulose quanto para hemicelulose.

A Figura 37 contém a cinética da concentração de xilose e glicose durante a hidrólise enzimática da hemicelulose extraída do bagaço do sorgo *in natura*. Durante essa hidrólise foi avaliada o potencial que o extrato enzimático bruto tem em hidrolisar a hemicelulose obtida por pré-tratamento com peróxido alcalino.



Figura 37. Cinética da concentração de xilose (a) e glicose (b) durante hidrólise enzimática da hemicelulose



Na Figura 37 (a) observa-se aumento da concentração da xilose durante as primeiras 12 horas de hidrólise, a partir de 24 horas manteve uma constância e chegando a concentração máxima de 2834,78 mg L<sup>-1</sup> de xilose em 48 horas. Durante a hidrólise enzimática a concentração de glicose se manteve praticamente constante, mostrando a especificidade do extrato enzimático a hemicelulose. Embora o extrato contenha um complexo enzimático celulolítico, além das hemicelulases, como o substrato da hidrólise é a hemicelulose apenas enzimas hemicelulolíticas agem sacarificando e liberando xilose.

## 6. CONCLUSÕES

- A caracterização do resíduo do bagaço do sorgo sacarino (BSS) demonstrou que é um substrato com potencial para ser utilizado na fermentação para produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, por apresentar alto teor de hemicelulose e celulose satisfatório, já que esses componentes são conhecidamente fontes de carbono indutor dessas enzimas;

- A caracterização do farelo de trigo (FT) demonstrou que ele é uma fonte de nitrogênio importante para a indução das enzimas;

- As análises de termogravimetria (TG e DTG) e difração de raios-x (DRX) demonstraram que a hemicelulose obtida apresenta características amorfa e fases características da hemicelulose de acordo com a literatura.

- As isotermas de dessecção dos substratos apresentaram correlação entre a atividade de água e umidade de equilíbrio para os substratos. O modelo de GAB forneceu um bom ajuste para os dados experimentais dos substratos estudados, coeficiente de correlação ( $R^2$ ), que variaram de 0,9986 – 0,9998;

- As variáveis umidade inicial e teor de farelo de trigo influenciaram a atividade enzimática das celulases (CMCase e FPase) e hemicelulases (Endo- $\beta$ -1,4-xilanase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase). As maiores atividades de FPase, CMCase, xilanase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase foram obtidas quando aplicado o maior teor de farelo de trigo (50 %) ao bagaço do sorgo sacarino IPA P222, porém, em tempos diferentes fato esse que facilita em um único processo a obtenção das diferentes enzimas;

- A xilanase apresentou maior atividade enzimática se comparada as demais, evidenciando que a IPA P222 com elevado teor de hemicelulose é potencialmente mais indutora para essa enzima;

- O extrato enzimático apresentou capacidade de hidrolisar o bagaço de sorgo *in natura*, liberando glicose e xilose, mesmo usando a maior carga de biomassa 1 grama;

- O extrato enzimático demonstrou especificidade ao hidrolisar a hemicelulose liberando xilose e mantendo o teor de glicose no meio praticamente o mesmo durante toda a hidrólise.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, M. C. O. et al. **Determinação da umidade em fermentação semi-sólida para produção de enzimas celulolíticas pelo *Trichoderma reesei* RUT C-30**. ENZITEC 2012 - Brazilian Seminar on Enzyme Technology. Blumenau: [s.n.]. 2012.

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

AOAC. ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists.** , Washington, n. 12, p. 1094, 1975.

ARAUJO, J. J. S. et al. **Teores de celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de sorgo**. Fórum Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão - VIII FEPEG. Montes Claros: [s.n.]. 2014.

ASSUMPÇÃO, S. M. N. et al. Pré-Tratamento Combinado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH para Obtenção das Frações Lignocelulósicas do Bagaço da Cana-de-Açúcar. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 803-822, Abril 2016. ISSN 1984-6835.

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

BAILEY, M. J.; BUCHERT, J.; VIKARI, L. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 224-229, 1993.

BAJPAI, P. **Xylanolytic Enzymes**. 1<sup>a</sup>. ed. [S.l.]: Elsevier, 2014.

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

BARCELOS, C. A. et al. Sweet sorghum as a whole-crop feedstock for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, n. 94, p. 46-56, 2016.

BARRETO, L.; DELFINO, J. Campos inova com plantio de sorgo sacarino. **Prefeitura Municipal de Campos dos Goytacazes.**, Campos, 2012. Disponível em: <[http://www.campos.rj.gov.br/exibirNoticia.php?id\\_noticia=14342](http://www.campos.rj.gov.br/exibirNoticia.php?id_noticia=14342)>. Acesso em: 10 Outubro 2015.

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

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, nov 2010.

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

BERNARDINO, K. C. et al. **Caracterização de Cultivares de Sorgo Sacarino Visando a Produção de Etanol de Primeira e Segunda Geração**. XXIX Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Águas de Lindóia: [s.n.]. 2012. p. 3169-3175.

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

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.

BIELY, P. et al. Differentiation of feruloyl esterases on synthetic substrates in  $\alpha$ -arabinofuranosidase-coupled and ultraviolet-spectrophotometric assays. **Analytical Biochemistry**, n. 311, p. 68-75, 2002.

BLAHOVEC, J. Sorption isotherms in materials of biological origin mathematical and physical approach. **Journal of Food Engineering**, v. 65, p. 489-495, 2004.

BONNER, I. J.; KENNEY, K. L. Moisture sorption characteristics and modeling of energy sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Journal of Stored Products Research**, n. 52, p. 128-136, 2013.

BRIENZO, M. Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos. **Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo**, Lorena, 2010. 137p.

BRIENZO, M. Extração da hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos. **Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo**, Lorena, 2010. 137p.

BRIENZO, M. et al. Relationship between physicochemical properties and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse varieties for bioethanol production. **New Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 253-262, 2015.

BRIENZO, M.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. A. Xylooligosaccharides production from Alkali-pretreated sugarcane bagasse using xylanases from *Thermoascus aurantiacus*. **Appl Biochem Biotechnol**, n. 162, p. 1195-1205, 2010.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, n. 46, p. 199-204, 2009.

BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, n. 46, p. 199-204, 2009.

CAMPOS, D. B. C. Hidrólise enzimática do Sorgo Sacarino (*Sorghum bicolor* L. Moench) para produção de açúcares fermentescíveis. **TESE (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande**, Campina Grande, 2015. 118p.

CANAL RURAL. Ceres e Raízen produzem etanol de sorgo sacarino, 2015. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/ceres-raizen-produziram-etanol-sorgo-sacarino-55753>>. Acesso em: 27 setembro 2015.

CAO, W. et al. Comparison of the effects of five pretreatment methods on enhancing the enzymatic digestibility and ethanol production from sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, n. 111, p. 215-221, 2012.

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

CARDOSO, W. S. et al. Pré-tratamentos de biomassa para produção de etanol de segunda geração. **Revista Analytica**, n. 56, p. 64-76, Janeiro 2012.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **J. Trop. Med. Hyg.**, p. 225-226, 1939.

CASTRO, G. H. F. et al. Características produtivas, agrônomicas e nutricionais do capim-tanzânia em cinco diferentes idades ao corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 654-666, 2010.

CHEN, H. et al. Qualitative and quantitative analysis of wood samples by Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Carbohydrate Polymers**, n. 82, p. 772-778, 2010.

COELHO, G. D. **Produção e caracterização do sistema xilanolítico excretado por *Aspergillus giganteus***. Rio Claro, São Paulo: Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", 2002.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2014/2015. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 2, n. 9, p. 1-104, junho 2015.

COSTA, S. C. Desenvolvimento de micropartículas de xilana utilizando reticulante não tóxico visando a liberação cólon-específica. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual da Paraíba**, Campina Grande, p. 76p, 2014.

COURI, S. Efeito de cátions na morfologia do agregado e na produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* mutante 3T5B8. **Tese (Doutorado em Ciências)**, Rio de Janeiro, p. 198f, 1993.

CRUZ, J. M. et al. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food biotechnology.**, New York, v. 14, p. 79-97, 2000.

DEESUTH, O. et al. Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: Effects of nutrient supplement and aeration. **Industrial Crops and Products.**, 2015. 95-102.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALDO, D. M. F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHIMIDELL, W., et al. **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher, v. 2, 2014. Cap. 13, p. 247-276.

DOGARIS, I. et al. Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6543-6549, 2009.

DRAPON, R. Modalities of enzyme activities in low moisture media. In: MATHLOUTHI, M. **Food packaging and preservation**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. p. 181-198.

DURRANT, A. J.; WOOD, D. A.; CAIN, R. B. Lignocellulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid substrate fermentation. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 751-755, 1991.

DUTRA, T. R. **Influência das fontes de carbono na indução de celulasas e hemicelulasas em *Chrysosporthe cubensis* cultivado em meio líquido**. Viçosa: Dissertação (mestrado em bioquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 2013.

EMBRAPA. Grão em Grão. **Jornal Eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo.**, 2012. Disponível em: <<http://grao.cnpms.embrapa.br/noticia.php?ed=OQ==&id=MzQ=>>>. Acesso em: 10 Outubro 2015.



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

EMBRAPA. Sorgo Granífero: estenda sua safrinha com segurança. **Ministério da Agricultura**, 2015. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/camaras\\_setoriais/Milho\\_e\\_sorgo/22RO/SG.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Milho_e_sorgo/22RO/SG.pdf)>. Acesso em: 10 Outubro 2015.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W. C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, n. 19, p. 1-13, 2007.

FLORENCIO, C. et al. 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.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. bagasse, Soybean protein as a cost-effective lignin-blocking additive for the saccharification of sugarcane. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 172-180, 2016.

FORD, E. N. J. et al. X-ray diffraction of cotton treated with neutralized vegetable oil-based macromolecular crosslinkers. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 5, n. 1, p. 10-20, 2010.

GABRIELLI, I. et al. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 367-374, 2000.

GAO, J. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7623-7629, 2008.

GARCÍA, A.; ALRIOLS, M. G.; LABIDI, J. Evaluation of different lignocellulosic raw materials as potential alternative feedstocks in biorefinery process. **Industrial Crops and Products**, v. 53, p. 102-110, 2014.

GASPAR, A. et al. Study on the production of a xylanolytic complex from *Penicillium canescens* 10-10c. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 67, p. 45-58, 1997.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY - IUPAC**, New Delhi, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOLUGURI, B. R. et al. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC 1467): Purification and Kinetic characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2015.

GOMES, A. C. S. et al. **Produção de xilanase por fungos filamentosos isolados em região de Cerrado**. X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática - Enzitec. Blumenau: [s.n.]. 2012.

GOTTSCHALK, L. M. F. et al. **Comparação da produção das enzimas xilanase e feruloil esterase em fermentação em estado sólido e submersa pela cepa mutante *Aspergillus niger* 3T5B8**. XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, X Simpósio de hidrólise enzimática de biomassa. Foz do Iguaçu: [s.n.]. 2013.

GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. D. S. Cellulases, xylanases, beta-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, n. 51, p. 72-78, 2010.

GOUVEIA, J. P. G. et al. Modelos matemáticos para ajuste das isotermas de dessorção da polpa da banana da variedade prata. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 799-806, set./dez. 2004.

GUPTA, P. K.; AGRAWAL, P.; HEGDE, P. A review on xylooligosaccharides. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 8, n. 3, p. 71-74, 2012.

HARMAN, G. E. Trichoderma species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nat. Rev. Microbiol.** , v. 2, p. 43-56, 2004.

HENDRIKS, A. T. W.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 10-18, 2008.

HERCULANO, P. N. et al. Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from Castor Bean (*Ricinus Communis* L.) under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 1057-1067, 2011.

HERCULANO, P. N. et al. Isolation of cellulolytic fungi from waste of Castor (*Ricinus communis* L.). **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1416-1422, 2011.

HERRERA, A. et al. 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.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 8, p. 301-306, 2005.

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

ITA. Folhetos Explicativos. **Instituto Agrônomo de Pernambuco**, 2015. Disponível em: <<http://www.ipa.br/resp3.php>>. Acesso em: 20 Setembro 2015.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 33, p. 188-203, 2014.

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

KEEY, R. B. **Drying of loose and particulate materials**. New York: Hemisphere, 1991. 57 p.

KEMPKA, A. P. et al. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosystem Eng.**, n. 31, p. 119-125, 2008.

KIRK, T. K. Effects of Microorganisms on lignin. **Annual Review of Phytopathology**, n. 9, p. 185-210, 1971.

KLEIN, D.; EVELEIGH, D. E. Ecology of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. **Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications**. London: Taylor & Francis LTd., 1998. p. 57-74.

KLOCK, U. **Química da Madeira - Manual didático**. 3. ed. Curitiba: [s.n.], 2005. 86 p.

KUBICEK, C. P.; PENTTLILÄ, 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., 1998. p. 49-72.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 377-391, 2008.

LANGARO, C. et al. **Produção das enzimas celulase, xilanase e endoglucanase por fermentação em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar**. I Encontro Anual de Iniciação Científica, Tecnológica e Inovação. Cascavel: [s.n.]. 2015.

LAUREANO-PEREZ, L. et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 1081-1100, 2005.

LE POIDEVIN, N.; ROBINSON, L. A. **Métodos de diagnóstico foliar utilizados nas plantações do grupo booker na Guiana Inglesa: Amostragem e técnica de análise**. 21. ed. Paris: Fertilité, 1964. 3-11 p.

LI, P.-J. et al. Optimization of solid fermentation of cellulase from *Trichoderma koningii*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 16, n. 5, p. 816-820, 2004.

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.

LOPES, D. O. et al. **Produção de celulase por *Trichoderma* da Amazônia T676 em fermentação em estado sólido de bagaço de cana**. Enzitec - SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Rio de Janeiro: [s.n.]. 2008. p. 168-169.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2001.

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

MAO, Y. et al. The mass transfer of sugar in sweet soghum stalks for solid-state fermentation process. **Fuel**, n. 144, p. 90-95, 2015.

MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum*. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, p. 121p, 2005.

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

MARX, S. et al. Fuel ethanol production form sweet sorghum bagasse using microwave irradiation. **Biomass and Bioenergy**, v. 54, p. 145-150, 2014.

MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xylooligosaccharides: production, applications and effects on human health. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 587-592, 2008.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 68-78, jan/abr 2009. ISSN 18087310.

MILAGRES, A. M. F.; BORGES, L.; AGUIAR, C. L. Degomagem de rami para fins têxteis utilizando extratos enzimáticos. **Anais do SHEB**, n. 4, p. 261-269, 1994.

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

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

MORAES, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. Documentos 236: Procedimentos para Análise Lignocelulósica. **Embrapa**, Campina Grande, p. 1-58, 2010.

MORAES, R. R. Refratometria, 2011. Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/ciencia/documentos/REFRAT%D4METRO.PDF>>. Acesso em: 12 março 2011.

MURTHY, M.; KARANTH, N.; RAO, K. Biochemical Engineering aspects of solid state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 38, p. 99-147, 1993.

NAKANISHI, E. Y. et al. Tratamentos térmicos e químico para remoção de óxidos alcalinos de cinzas de campim elefante. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 766-769, 2014.

NÓBILE, F. O. D.; NUNES, H. D. Avaliação da produção de etanol e cogeração de energia pela cultura do sorgo sacarino. **Revista Uniara**, v. 17, p. 89-98, julho 2014.

NUMAN, M. T.; BHOSLE, N. B.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **J Ind Microbial Biotechnol**, n. 33, p. 247-260, 2005.

OLIVEIRA, I. K. C. P. et al. **Caracterização físico-químico do bagaço do sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*) para hidrólise ácida do material**

**lignocelulósico**. VIII COBEQ - Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Uberlândia: [s.n.]. 2009.

PAGLARINI, C. S. Histerese das isotermas de sorção da polpa de manga (*Mangifera indica* L.) variedade manteiga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 3, 2013.

PAGLARINI, C. S. et al. Histerese das isotermas de sorção da polpa de manga (*Mangifera indica* L.) variedade manteira. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 3, p. 299-305, 2013.

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

PARKIN, K. L. Enzimas. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Fennema**. 4<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 6, p. 263-342.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. **Carbohydrate Polymers**, n. 112, p. 701-720, 2014.

PENGILLY, C. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combination of cellulase and endo-xylanase. **Fuel**, n. 154, p. 352-360, 2015.

PERRET, B. A. M. et al. Uso de substratos lignocelulósicos para cultivo de *Cryptococcus laurentii* visando a produção de endoxilanase. **XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Campinas, julho 2015.

POUTANEN, K. et al. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. **Journal of Biotechnology**, n. 6, p. 49-60, 1987.

PRATHYUSHA, N. et al. Modelling of pretreatment and saccharification with different feedstocks and kinetic modeling of sorghum saccharification. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 550-559, 2016.

PULS, J.; POUTANEN, K. **Mechanisms of enzymatic hydrolysis of hemicelluloses xylans and procedures for determination of the enzyme**

**activities involved.** 3rd International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper. Stockholm: STFI. 1989. p. 93-95.

PURCINO, A. Á. C. Sorgo sacarino na Embrapa: histórico, importância e usos. **Agroenergia em Revista**, v. II, n. 3, 2011.

QUEIROZ, V. A. V. et al. Potencial do sorgo para uso na alimentação humana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 35, n. 278, p. 7-12, Jan./Fev. 2014.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p. 180. 2007.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal** , n. 13, p. 127-135, 2003.

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

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude B-xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, n. 65, p. 237-245, 2016.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude B-xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237-245, 2016.

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<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 25-74.

RIFAI, R. W. A revision of the genus *Trichoderma*. **C. M. I. - Mycological Papers**, v. 116, p. 1-56, 1969.



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

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, ago. 2011.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, n. 454, p. 841-845, 2008.

SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas como agentes biotecnológicos. In: SAID, S.; PIETRO, R. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 1, p. 1-7.

SAIDUR, R. et al. A review on biomass as a fuel for boilers. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 2262-2289, 2011.

SAMUELS, G. J. Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus. **Mycol. Res.**, v. 100, n. 8, p. 923-935, 1996.

SANTOS, F. A. et al. **Utilização de resíduos provenientes do milho na produção de celulases pelo fungo FSDE16 em cultivo semissólido**. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Campinas: [s.n.]. 2015.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SANTOS, M. L. et al. Estudos das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 507-511, 2011.

SANTOS, T. C. et al. Determinação da atividade de CMCase e FPase da estirpe fúngica *Rhizopus* sp. através da bioconversão do resíduo de seriguela (*Spondias purpurea* L.). **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, p. 145-149, 2011.

SANTOS, T. C. et al. *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir do farelo de cacau (*Theobroma Cacao*). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 1, p. 65-71, jan/mar 2013.

SCARPARI, M. S.; BEAUCLAIR, E. G. F. Anatomia e Botânica. In: DINARDO-MIRANDA, M. L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agronômico, 2008. p. 47-65.

SENE, L. et al. Evaluation of Sorghum straw hemicelulosic hydrolysate for biotechnological production xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 42, p. 1141-1146, 2011.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SHIBATA, T. M.  
<http://www.aqualab.com/assets/Seminario%20Decagon%20Fundamentos%20A w.pdf>. **Aqualab**, 2016. Acesso em: 25 agosto 2016.

SILVA, D. F. et al. Seleção de microorganismos celulolíticos, comparados com o *Trichoderma reesei* CCT2768. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina, v. 2, n. 3, p. 281-284, 2013. ISSN 2316-5200.

SILVA, P. J. **Estudo cinético da deslignificação etanol-água da casca de arroz derivação da casca e polpa celulósica**. Tese (Doutorado) - Instituto de Física e Química de São Carlos - USP. São Carlos. 1997.

SILVA, R. D. et al. Production of Xylanase and CMCCase on Solid State Fermentation in Different Residues by *Thermoascus aurantiacus* Mies.. **Brazilian Journal of Microbiology**., v. 36, p. 235-241, 2005.

SILVA, S. S. et al. Extração e caracterização de xilanas de sabugo de milho. **Ciência e Tecnologia**, p. 25-33, 1998.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. A highly alkaline CMCCase produced by a newly isolated *Bacillus* sp. VG1. **World Journal of Microbiology & Biotechnonology**., v. 17, p. 761-765, 2001.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, n. 5, p. 19-30, 2015.

SJOSTROM, E. **Wood chemistry fundamentals and applications**. 2. ed. Boca Raton: Academic Press, 1992.

SOARES, L. A. et al. **Caracterização do bagaço da cana-de-açúcar visando a produção de carvão ativado**. 54º Congresso Brasileiro de Química. Rio Grande do Norte: [s.n.]. 2014.

SOARES, V. C. Comportamento térmico, químico e físico da madeira e do carvão de *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis* em diferentes idades. **Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira) - Universidade Federal de Lavras**, Lavras, p. 109p, 2011.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica I**. 7ª. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. I, 2001.

SOUZA FILHO, M. S. M. et al. Aspectos da colheita, pós-colheita e transformação industrial do pendúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Embrapa - CEINFO**, 2012.

SOUZA, R. S. A. et al. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 9, p. 987-992, sept. 2010.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Elsevier: Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

TABOSA, J. N. et al. Programa de Melhoramento de Sorgo e Milheto em Pernambuco. In: QUEIRÓZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R.

**Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro.**

Petrolina: Embrapa, 1999. Cap. 2.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation.

**Bioresource Technology**, n. 101, p. 4744-4753, 2010.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantacus*.

**Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 689-692, 1987.

TAPPI - TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Official Test Methods (OM), Provisional Test Methods (PM) and Useful Test Methods (UM)**. Atlanta: One Dunwoody Parky, 2010.

TARDIN, F. D. Lavoura de sorgo forrageiro, BRS 601, na Embrapa Milho e Sorgo. **Embrapa Milho e Sorgo**, 2014. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1228001/sorgo-forrageiro>>.

Acesso em: 10 Outubro 2015.

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.

TIMMERMANN, E. O.; CHIRIFE, J.; IGLESIAS, H. A. Water sorption isotherm of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters? **Journal of Food Engineering**, v. 48, p. 19-31, 2001.

UMAGILIYAGE, A. L. et al. Laboratory scale optimization of alkali pretreatment for improving enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. **Industrial Crops and Products**, n. 74, p. 977-986, 2015.

VÁSQUEZ, M. P. et al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 141-153, 2007.

VASSILEV, S. V. et al. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. **Fuel**, n. 94, p. 1-33, 2012.

VIOTTO, R. S.; MORAIS, L. C. **Estudo do comportamento térmico do substrato de cultivo do shitake - Lentinula edodes**. IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria. Serra Negra: [s.n.]. 2014.

WERNER, K.; POMMER, L.; BROSTÖM, M. Thermal decomposition of hemicelluloses. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, n. 110, p. 130-137, 2014.

WU, S. et al. Role of B-O-4 glycosidic bond on thermal degradation of cellulose. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, n. 119, p. 147-156, 2016.

XIROS, C. et al. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 213-224, 2008.

XU, F. et al. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulose polysaccharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, n. 341, p. 253-261, 2006.

XU, F. et al. Comparative study of alkali- and acidic organic solvent-soluble hemicellulosic polysaccharides from sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, n. 341, p. 253-261, 2006.

XU, F. et al. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied Energy**, n. 104, p. 801-809, 2013.

YAN, Z. et al. Lignin relocation contributed to the alkaline pretreatment efficiency of sweet sorghum bagasse. **Fuel**, n. 158, p. 152-158, 2015.

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751-774, 2016.

ZANATTA, E. R. et al. Estudo cinético de decomposição térmica da hemicelulose. **Cultivando o saber**, v. 6, n. 3, p. 91-97, 2013.

ZHAO, J. et al. Thermal degradation of softwood lignin and hardwood lignin by TG-FTIR and PY-CG/MS. **Polymer Degradation and Stability**, n. 108, p. 133-138, 2014.

ZHETING, B. et al. Biocrude from pretreated sorghum bagasse through catalytic hydrothermal liquefaction. **Fuel**, v. 188, p. 112-120, 2017.