
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA
(UNESP- RIO CLARO)**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO E
APLICAÇÃO DE ENZIMAS, EXTRAÇÃO DE AMIDO E PRODUÇÃO DE
LEVEDURAS FIBROLÍTICAS A PARTIR DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

JOYCE FARIA DE SOUZA

Fevereiro - 2020

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA
(UNESP-RIO CLARO)**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS PARA PRODUÇÃO E
APLICAÇÃO DE ENZIMAS, EXTRAÇÃO DE AMIDO E PRODUÇÃO DE
LEVEDURAS FIBROLÍTICAS A PARTIR DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

JOYCE FARIA DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Meste em Microbiologia Aplicada.

Fevereiro - 2020

S729d Souza, Joyce Faria de
Desenvolvimento de bioprocessos para produção e aplicação de enzimas, extração de amido e produção de leveduras fibrolíticas a partir de resíduos agroindustriais / Joyce Faria de Souza. -- Rio Claro, 2020
99 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Pedro de Oliva Neto

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos. 3. Leveduras. 4. Resíduos agrícolas. 5. Fermentação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de bioprocessos para produção e aplicação de enzimas, extração de amido e produção de leveduras fibrolíticas a partir de resíduos agroindustriais

AUTORA: JOYCE FARIA DE SOUZA

ORIENTADOR: PEDRO DE OLIVA NETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PEDRO DE OLIVA NETO

Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis



Prof. Dr. ADILSON ROBERTO GONÇALVES

IPBEN / Instituto de Pesquisa em Bioenergia

Prof. Dr. ADIBE LUIZ ABDALLA

Centro de Energia Nuclear na Agricultura / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 19 de fevereiro de 2020

Aos meus pais, por todo apoio, paciência e amor que me ajudam a continuar buscando ser uma pessoa melhor.

Dedico

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por me guiar e sempre estar ao meu lado, me fortalecendo e acalmando em cada etapa.

Ao professor Dr. Pedro de Oliva Neto por ter me aceitado como aluna de iniciação científica e agora como aluna de mestrado. Agradeço imensamente por ser um orientador presente, dedicado e muito paciente para me ensinar. Obrigado pelo entusiasmo, otimismo e fé que você demonstra, isso me ajuda a continuar buscando ser uma profissional melhor.

Ao programa de Microbiologia Aplicada que me deu a oportunidade de aprender um pouco mais sobre microbiologia e a todos os professores e coordenadores do programa. Gostaria de agradecer ao Felipe da Secretaria da pós-graduação de Rio Claro que me ajudou inúmeras vezes.

A CAPES pelo investimento financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Um agradecimento muito especial aos funcionários da Faculdade de Ciências e Letras – FCL – Unesp Assis, ao Sivaldo e Alessandro (portaria) que sempre me receberam com um sorriso e ao Gilberto e Alan (técnicos do Departamento de Biotecnologia) que sempre me socorreram com problemas nos equipamentos e falta de reagentes, e também pela amizade que construímos, muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório pela amizade e companhia.

Um agradecimento especial ao meu grande amigo Edson Marcelino Alves, pelos puxões de orelhas, correções de artigos/ trabalhos, risadas, paciência, companheirismo e por toda esta amizade sincera que cultivamos, MUITO OBRIGADA!

A Camila Yamashita por todo apoio, amizade e paciência. Muito obrigada Camis.

As companheiras Franciane Figueiredo e Fabiane Barros que me apoiaram nesta caminhada, por todas as conversas, risadas e ajuda muito obrigada meninas. Agradeço também a Ana Flávia Carvalho pelos altos papos, amizade e bons conselhos, a Bruna Escaramboni por todo apoio e amizade e ao Pedro Elias e Josi pelo companheirismo e amizade nestes últimos anos.

A faculdade FEMA pelo apoio na análise de algumas amostras, em especial ao professor Sergio Cortez e a professora Elaine.

Um agradecimento as melhores amigas que a faculdade me trouxe, Maristela Oliveira, Cintia Oliveira, Dafne Camargo e Amanda Piva, vocês são pessoas maravilhosas. Em especial a Maristela e Cintia que sempre me motivaram, acreditaram em mim e na caminhada que escolhi trilhar, muito obrigada por todo apoio meninas.

Aos meus primos e tios, em especial a Ana Flavia dos Santos, obrigada por todo apoio e esperança em mim.

Por fim, aos meus pais Luís Willian de Souza e Rosangela Lima Faria de Souza, à minha irmã Julia e aos meus avós Joana, José e Luzia que sempre acreditaram em mim, rezaram e me acompanharam nesta caminhada, o amor de vocês e a presença de Deus na minha vida é a base de toda minha força, muito obrigada!

Obrigada a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa jornada.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Organização do material lignocelulósico quanto à celulose, hemicelulose e lignina (Adaptação de: Wyman e Yang, 2009).20
- Figura 2.** Modelo demonstrativo da sinergia de atuação das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glucosidase em um sistema celulolítico durante a hidrólise da celulose. \star = Extremidade redutora; \bullet = extremidade redutora modificada; - = ligação β (1,4); \blacksquare = glicose modificada; \square = glicose não modificada (Saini *et al.*, 2015).21

Capítulo 2

- Figura 1a.** Otimização da produção de xilanases e β -glucosidase utilizando o *T. reesei* QM 9414 através da mistura de resíduos agroindustriais farelo de trigo (A), polpa cítrica (B) e dreche cervejeiro (C) no meio de cultura em cultivo submerso a 28°C por 15 dias.51
- Figura 1b.** Otimização da produção de exoglucanase, endoglucanase e celulase total de *T. reesei* QM 9414 através da mistura de resíduos agroindustriais farelo de trigo (A), polpa cítrica (B) e dreche cervejeiro (C) no meio de cultura em cultivo submerso a 28°C por 15 dias.52
- Figura 2.** Cultivo com diferentes concentrações de tween 80 para a atividade de celulase total (a) e xilanase (b) utilizando *T. reesei* e 3% de polpa cítrica em cultivo submerso a 28°C e 150 rpm até 15 dias.55
- Figura 3.** Cultivo submerso de *T. reesei* com sais, extrato de levedura e sacarose em diferentes tempos para produção de xilanases a 28°C e 150 rpm por até 15 dias.58
- Figura 4.** Cultivo submerso de *T. reesei* com sais, extrato de levedura e sacarose em diferentes tempos para produção de celulases a 28°C e 150 rpm por até 15 dias.59
- Figura 5.** Cultivo submerso de *T. reesei* com sais, extrato de levedura e sacarose em diferentes tempos para produção de exoglucanase a 28°C e 150 rpm por até 15 dias.59
- Figura 6.** Cultivo submerso de *T. reesei* com sais, extrato de levedura e sacarose em diferentes tempos para produção de endoglucanase a 28°C e 150 rpm por até 15 dias.59
- Figura 7.** Atividade enzimática dos cultivos com a combinação dos melhores sais para xilanase (a) e para celulase (b) utilizando o *T. reesei* e dreche cervejeiro em cultivo submerso a 28°C e 150 rpm até 15 dias.60

Capítulo 3

- Figura 1.** Resumo das etapas e análises desenvolvidas com o bagaço de mandioca, assim como resíduos gerados e enzimas utilizadas em cada etapa.73
- Figura 2.** Cinética de gelatinização do bagaço de mandioca (80°C) para extração de amido. ...80
- Figura 3.** Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca com celulases comerciais Cellic CTec2 e BIOENJ19 para extração de amido realizadas em concentrações de atividade enzimática diferentes: 15 e 7,5 FPU/g de substrato seco e tempos diferentes 2 e 12 horas de hidrólise em 50°C.83
- Figura 4.** Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca (6%) com celulases comerciais Cellic CTec2 para extração de amido realizadas até 36 horas em 50°C com 5 e 12 FPU/g seca de amostra.84

Figura 5. Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca com xilanases comerciais Celluclast da Novozymes para extração de amido realizadas até 24 horas a 50°C com 15, 30 e 60 U/g seca de amostra seca.	86
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Capítulo 2

Tabela 1. Matriz experimental e respostas observadas a partir da mistura dos resíduos agroindústrias para otimização da produção de xilanases e celulases.....	49
Tabela 2. Dados estatísticos dos modelos obtidos para cada atividade enzimática estudada (U/mL).	50
Tabela 3. Validação dos modelos obtidos por meio do delineamento experimental de misturas para as atividades enzimáticas.	53
Tabela 4. Produção de enzimas da literatura utilizando tween 80.	54
Tabela 5. Atividade enzimática produzida em cada etapa do estudo.	62

Capítulo 3

Tabela 1. Composição química do bagaço de mandioca in natura do trabalho atual comparado a literatura.	79
Tabela 2. Rendimento, eficiência e pureza (concentração) das frações obtidas após gelatinização e filtração do bagaço de mandioca.....	81
Tabela 3. Composição química do bagaço de mandioca após gelatinização - Bagaço in natura, Frações Amilácea, Fração Fibrosa 1 e da Fração Fibrosa obtida por de Leonel e Cereda (2000).	82
Tabela 4. Proporção e tipos dos açúcares redutores encontrados após a hidrólise enzimática da Fração Fibrosa 1 com o extrato BIOENJI19 e Cellic CTec2.	87
Tabela 5. Concentração (m/v) de amido e açúcar redutor liberado durante a hidrólise enzimática e Fração Fibrosa 1 utilizando o extrato BIOENJ19 e Cellic CTec2.	87
Tabela 6. Balanço de massa da hidrólise da Fração Fibrosa 1 com as enzimas Celic Ctec2 e extrato BIOENJ19 a 50°C, pH 4 e 24 horas, com 5 FPU/g de substrato.	88
Tabela 7. Caracterização química de bagaço de mandioca hidrolisado com a Fração Fibrosa 1 e Fração Fibrosa 1-1	89
Tabela 8. Características do cultivo quanto ao teor de proteínas, rendimento de biomassa de leveduras, rendimento de bagaço de mandioca não hidrolisado e açúcares redutores no material fermentado com <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> e <i>Wickerhamomyces onychis</i>	90
Tabela 9. Teor de FDA, FDN e Fibra Bruta dos materiais obtidos no atual estudo.....	91

Resumo

O estudo da utilização de resíduos agroindustriais para desenvolvimento e otimização de bioprocessos econômicos tem sido intensificado nos últimos anos. Neste trabalho foi realizada uma revisão que buscou sintetizar informações atuais sobre as condições nutricionais de cultivo que influenciam na síntese de enzimas celulolíticas e xilanolíticas produzidas por microrganismos, com destaque para os resíduos agroindustriais e alguns exemplos de linhagens probióticas e seu potencial na nutrição e saúde animal. Estudou-se também o desenvolvimento de um processo integrado de técnicas que envolveram desde a biossíntese de enzimas fíbrólíticas (celulases e xilanases), a partir de cultivo fúngicos em meios formulados com resíduos, até a aplicação de métodos físicos, bioquímicos e microbiológicos no bagaço de mandioca, a fim de se obter maior rendimento de amido na fecularias e novos co-produtos para uso como aditivos na formulação de ração animal. Os cultivos para produção enzimática foram realizados com *Trichoderma reesei* QM9414 em cultivo submerso a 28°C, 150 rpm por 15 dias utilizando-se farelo de trigo (FT), polpa cítrica (PC) e dreche cervejeiro (DC) suplementado com um conjunto de sais. O estudo da formulação do meio com a combinação destes substratos foi realizado por meio do delineamento experimental de misturas, e as melhores combinações foram com a utilização de 100% (m/v) de dreche cervejeiro (celulase total e xilanase), além das combinações de 16,67% de farelo de trigo, 16,67% de polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase). Foi realizado também um estudo quanto à demanda de minerais, sacarose e extrato de levedura na produção de celulases e xilanases, e selecionados os quatro melhores nutrientes para avaliar a produção enzimática. Os estudos demonstraram um aumento 2,38 vezes (1 FPU/g) para celulase total comparado a produção obtida com o delineamento experimental utilizando-se a melhor combinação dos nutrientes extrato de levedura, sacarose, zinco, fosfato de potássio e dreche cervejeiro. Por meio da utilização de diferentes concentrações de tween 80 para a produção enzimática observou-se uma redução substancial do tempo de cultivo para a biossíntese de celulases. Técnicas de gelatinização do amido e aplicação de enzimas fibrolíticas foram estudadas no bagaço de mandioca a fim de aumentar a extração de amido reduzindo-se assim as perdas nas fecularias. A cinética de gelatinização (80°C) seguida de filtração do bagaço de mandioca resultou em duas frações: líquida (Fração Amilácea) e fibrosa (Fração Fibrosa 1), a fração líquida apresentou grande extração de amido (eficiência de 72,4%) com pureza de 77%.

As hidrólises do bagaço de mandioca para extração amido com o extrato BIOENJ19 (obtido do cultivo de *T. reesei*), celulase comercial (Cellic CTec2) e xilanase comercial (Celluclast) não foram muito eficientes se comparadas à técnica da gelatinização. A Fração Fibrosa 1 obtida por meio da gelatinização foi submetida a uma hidrólise enzimática obtendo-se além de amido, açúcares redutores (1,27% para Celic CTec2 e 0,51% para o extrato BIOEJ19) e uma nova fração fibrosa (Fração Fibrosa 1-1). Os produtos desta hidrólise foram usados para formulação de um meio de cultivo visando a propagação das leveduras fibrolíticas *Rhodotorula mucilaginosa* e *Wickerhamomyces onychis*, realizada em batelada alimentada a 28°C, 180 rpm por 5 dias. Após o cultivo foram obtidas conversões do substrato em biomassa de 0,14 g/g (*R. mucilaginosa*) e 0,12 g/g (*W. onychis*), indicando o potencial de produção destas leveduras especiais com estes resíduos e um potencial aumento do valor agregado destes resíduos com uso destas tecnologias.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais, *Trichoderma reesei*, enzimas fibrolíticas, leveduras probióticas.

Abstract

The study of the use of agro-industrial waste for the development and optimization of economic bioprocesses has been intensified in recent years. In this work, a review was carried out that sought to synthesize current information on the nutritional conditions of cultivation that influence the synthesis of cellulolytic and xylanolic enzymes produced by microorganisms, with emphasis on agro-industrial residues and some examples of probiotic strains and their potential in animal nutrition and health. We also studied the development of an integrated process of techniques that involved since the biosynthesis of fibrolytic enzymes (cellulases and xylanases), from fungal cultures in media formulated with residues, to the application of physical, biochemical and microbiological methods in the bagasse was studied, in order to obtain higher starch yield in starchy mills and new co-products for use as additives in the formulation of animal feed. Cultivations for enzymatic production were carried out with *Trichoderma reesei* QM9414 in submerged fermentation at 28 ° C, 150 rpm for 15 days using wheat bran (FT), citrus pulp (PC) and brewery spent malt (BSM) supplemented with a set of salts. The study of the formulation of the medium with the combination of these substrates was carried out through the experimental design of mixtures, and the best combinations were with the use of 100% (w / v) of brewery spent malt (total cellulase and xylanase), beside to the combinations 16.67% wheat bran, 16.67% citrus pulp and 66.7% brewery spent malt (endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase). A study was also carried out regarding the demand for minerals, sucrose and yeast extract in the production of cellulases and xylanases, and the four best salts were selected to evaluate enzyme production. The studies showed a 2.38 fold increase (1 FPU / g) with the best combination of nutrients yeast extract, sucrose, zinc and potassium phosphate and brewery spent malt. The use of different concentrations of tween 80 was evaluated, substantially reducing the culture time for cellulases biosynthesis. Techniques of starch gelatinization and application of fibrolytic enzymes were studied in the cassava bagasse in order to increase the extraction of starch thus reducing losses in the starch mills. The gelatinization kinetics (80 ° C) followed by filtration of the cassava bagasse resulted in two fractions: liquid (starchy) and fibrous (fibrous fraction 1), resulting in a large extraction of starch (72.4% efficiency) with purity of 77%. The hydrolysis of cassava bagasse for starch extraction with the BIOENJ19 extract (obtained from the cultivation of *T. reesei*) or commercial enzyme

(Celic CTec2) was not very efficient compared to the gelatinization technique. However, after enzymatic hydrolysis of fibrous fraction 1, in addition to starch, reducing sugars (1.27% for Celic CTec2 and 0.51% for BIOEJ19 extract) were obtained, in addition to a new fibrous fraction (fibrous fraction 1- 1). The products of this hydrolysis were used to formulate a culture medium, aiming the propagation of fibrolytic yeasts *Rhodotorula mucilaginosa* and *Wickerhamomyces onychis*, carried out in batches fed at 28 ° C, 180 rpm for 5 days. After cultivation, substrate conversions were obtained in biomass of 0.14 g / g (*R. mucilaginosa*) and 0.12 g / g (*W. onychis*), indicating the potential of production of these special yeasts with these residues and potential increase of added value of these residues with the use of these technologies.

Keywords: Agro-industrial residues, *Trichoderma reesei* QM 9114, fibrolytic enzymes, probiotic yeasts.

Sumário

Introdução geral	15
Capítulo 1- REVISÃO: Biossíntese e aplicações de enzimas celulolíticas e xilanolíticas utilizando-se resíduos agroindustriais	17
1. Introdução.....	18
2. Biossíntese de enzimas celulasas e xilanases utilizando-se resíduos agroindustriais .	19
3. Aplicação de enzimas fibrolíticas celulasas e xilanases	25
3.1 Aplicação de enzimas fibrolíticas e probióticos em resíduos agroindustriais visando a nutrição animal	25
3.2 Outras aplicações de enzimas fibrolíticas em resíduos agroindústrias	30
4. Considerações finais	33
5. Referências	34
Capítulo 2: Produção de complexo celulolítico e xilanolítico a partir de resíduos agroindustriais	43
1. Introdução.....	44
2. Materiais e métodos	46
2.1 Preparação do inóculo.....	46
2.2 Delineamento experimental aplicado para otimização da mistura de resíduos agroindustriais utilizados no meio de cultivo de <i>T. reesei</i>	46
2.3 Ensaio de cultivos com <i>T. reesei</i> QM 9414.....	47
2.4 Efeito de novas formulações de nutrientes e surfactante Tween 80 na produção de xilanases e celulasas.....	47
2.5 Ensaio enzimáticos.....	48
3. Resultados.....	49
3.1. Delineamento experimental de mistura de resíduos agroindústrias para otimização da produção de enzimas.....	49
3.2. Validação dos modelos obtidos através do delineamento experimental de mistura para os diferentes resíduos agroindustriais	53
3.3. Tween 80 para otimização enzimática.....	54
3.4. Influência dos sais minerais, sacarose e extrato de levedura na formulação do meio de cultivo de <i>T. reesei</i> para produção das enzimas celulasas e xilanases	56
3.5. Estudo cinético da produção de xilanases e celulasas com a combinação dos quatro melhores nutrientes.....	60
4. Conclusão	64
5. Referências	65

Capítulo 3: Novas tecnologias aplicadas ao bagaço de mandioca para melhoria da extração de amido e geração de novos co-produtos.....	69
1. Introdução.....	71
2. Materiais e métodos	72
2.2. Extração do amido do bagaço de mandioca via Gelatinização e Hidrólise enzimática	72
2.2.1 Gelatinização do bagaço de mandioca	74
2.2.2 Estudos de hidrólise enzimática do bagaço de mandioca	74
2.3 Fermentação em batelada alimentada.....	75
2.4. Análises químicas	76
2.4.1 Análise do teor de amido.....	76
2.4.2 Análise de açúcar redutor	76
2.4.3 Determinação de proteínas	77
2.4.4 Determinação de cinzas.....	77
2.4.5 Análise de lipídios.....	77
2.4.6 Análise de fibras.....	78
2.4.7 Quantificação de carboidratos	78
2.5 Análises enzimáticas.....	78
2.5.1 Atividade celulolítica	78
2.5.2 Atividade xilanolítica	78
3. Resultados e Discussões.....	79
3.1 Caracterização química do bagaço de mandioca.....	79
3.2 Gelatinização do bagaço de mandioca.....	80
3.3 Estudo da hidrólise enzimática do bagaço de mandioca gelatinizado.....	83
3.3.1 Hidrólise enzimática da Fração fibrosa 1	86
3.4 Cultivo de leveduras fibrolíticas com a utilização dos produtos da hidrólise enzimática da Fração Fibrosa 1.....	89
4. Conclusão	93
5. Considerações finais	94
6. Referências	96

Introdução geral

A utilização de resíduos agroindustriais para desenvolvimento e otimização de bioprocessos econômicos tem sido intensificado nos últimos anos. Neste trabalho foi realizada uma revisão que buscou sintetizar informações atuais sobre as condições nutricionais de cultivo que influenciam na síntese de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, além de um estudo utilizando um delineamento experimental de misturas para otimizar a produção enzimática e aplicações de enzimas celulolíticas em resíduos agroindustriais. A pesquisa foi dividida em três capítulos. O Capítulo 1 é uma revisão bibliográfica com o título: “Biossíntese e aplicações de enzimas celulolíticas e xilanolíticas utilizando-se resíduos agroindústrias”. Esta revisão foca nos fatores que influenciam a biossíntese das enzimas, em especial sobre a fonte de nutrientes empregada, abordando de uma forma geral sobre as características dos resíduos agroindustriais, influência da adição de minerais, fonte de nitrogênio, entre outros variáveis que interferem na biossíntese enzimática. Uma abordagem sobre as características das celulases e xilanases, importância biotecnológica, e as aplicações das mesmas, com foco na aplicação em resíduos associada à nutrição animal. O Capítulo 2 intitulado “Produção do complexo celulolítico e xilanolítico a partir de resíduos agroindustriais” refere-se à produção enzimática de celulases, β -glicosidase e xilanases por meio do delineamento experimental de misturas (Design Expert) utilizando os subprodutos farelo de trigo, polpa cítrica e dreche cervejeiro em cultivo submerso a 28°C, 150 rpm por 15 dias, com o microrganismo *Trichoderma reesei* QM9414. O objetivo deste capítulo é desenvolver um bioprocessos de baixo custo, utilizando resíduos agroindustriais para a produção de celulases e xilanases. Este capítulo tem dois desdobramentos das formulações dos meios de cultivo após o delineamento experimental. O primeiro trata do uso de um surfactante (tween 80) para avaliar seu efeito na cinética de produção das celulases e xilanases. O segundo foca nos nutrientes complementares à fonte de carbono (dreche cervejeiro) do meio de cultivo de *T. reesei*. Assim foram estudados seis sais minerais, extrato de levedura e sacarose separadamente para observar a influência dos mesmos na produção de celulases e xilanases. A partir deste estudo foram selecionados e misturados os quatro sais mais eficientes com posterior análise da produção de celulases e xilanases. O Capítulo 3 “Melhoria na extração de amido e novos co-produtos na indústria de fécula através de novas tecnologias aplicadas no bagaço de mandioca” teve como objetivo

avaliar as perdas de amido pela indústria através deste resíduo sólido, e desenvolver bioprocessos capazes de aumentar o rendimento de amido das fecularias, além da produção de novos co-produtos de maior valor agregado a partir destes resíduos. Assim, a técnica de gelatinização do bagaço de mandioca e hidrólises enzimáticas, utilizando-se enzimas fibrolíticas (cultivado de *T. reesei*) e enzima comercial Cellic CTec2, foram comparadas quanto a eficiência de extração do amido contido no bagaço de mandioca. Por fim, também foram avaliados bioprocessos para propagação de leveduras fibrolíticas (*Rhodotorula mucilaginosa* e *Wicherhamomyces onychis*) utilizando-se os produtos das hidrólises enzimáticas da porção insolúvel obtida da gelatinização do bagaço (Fração Fibrosa 1) para formulação do meio de cultivo para as referidas leveduras.

Capítulo 1- REVISÃO: Biossíntese e aplicações de enzimas celulolíticas e xilanolíticas utilizando-se resíduos agroindustriais

Joyce Faria de Souza^{1*}, Edson Marcelino Alves², Pedro de Oliva Neto².

¹ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil; ² Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Assis, São Paulo, Brasil;

RESUMO

Esta revisão busca sintetizar informações sobre os fatores nutricionais que influenciam na síntese de enzimas celulolíticas e xilanolíticas produzidas por microrganismos, com destaque para os resíduos agroindustriais. A composição química do meio de cultivo, proporções e tipos de substratos, sais minerais e fatores de crescimento, bem como indutores enzimáticos e umidade podem acelerar ou inibir a produção enzimática do cultivo fúngico para produção de enzimas em geral e, especificamente para a produção de celulasas e xilanases. A aplicação dessas enzimas ocorre em diferentes setores, e nesta revisão é dada uma atenção especial para o uso delas na hidrólise de resíduos e como aditivos às rações animais. Outro exemplo de aditivo à ração animal dos ruminantes são os microrganismos probióticos que ajudam na manutenção do pH ruminal, competem com patógenos, ajudam na degradação da fibra, produzem enzimas fibrolíticas, dentre outros benéficos. Neste trabalho estão sendo discutidos alguns exemplos de linhagens probióticas e seu potencial na nutrição e saúde animal. Contudo foi observado a importância de entender as necessidades do microrganismo estudado em relação a umidade, temperatura, tempo de cultivo, pH, entre outras variáveis, até os fatores nutricionais relacionadas ao tipo de fonte de carbono e tipo de mineral, além das proporções utilizadas. O estudo também indica benefícios proporcionados pela utilização de probióticos e enzimas celulolíticas e xilanolíticas para a nutrição e saúde animal.

Palavra-chave: enzimas fibrolíticas, processos industriais, resíduos agroindustriais, leveduras probióticas.

1. Introdução

A utilização de enzimas em diferentes setores industriais é cada vez mais comum, assim como os investimentos para sua produção. A produção de enzimas é realizada com o cultivo de microrganismos em substratos nutritivos, entre as possíveis fontes de carbono os resíduos agroindustriais apresentam alto potencial bioquímico e são produzidos em grandes quantidades atuando como uma boa fonte de nutrientes para a síntese de biomoléculas (Aguiar *et al.*, 2018; Monteiro e Nascimento, 2009).

O meio de cultivo do microrganismo deve favorecer a produção da enzima de interesse por meio de boas fontes de carbono, complementação com sais minerais, umidade adequada, pH, temperatura, entre outros fatores, assim como a proporção utilizada de cada componente nutritivo. Otimizar esses fatores é essencial para aproveitar ao máximo a capacidade de biossíntese do microrganismo selecionado (Araújo e da Silva, 2018).

As enzimas são catalisadores biológicos específicos que atuam em diversas reações químicas como hidrólises, ligases, transferases, isomerases, entre outras (Fellows, 2018). As enzimas celulasas e xilanases atuam sinergicamente na hidrólise de celulose e hemicelulose, promovendo a liberação de açúcares (Catelan e Pinotti, 2019; Cunha *et al.*, 2016).

Os principais setores industriais que aplicam as enzimas fibrolíticas, celulasas e xilanases, em seus processos são as indústrias têxteis, papelreira, nutrição animal, indústria de sucos, entre outras (Monteiro e Nascimento, 2009). Neste trabalho daremos ênfase para a nutrição animal, abordando as vantagens da utilização de enzimas e microrganismos probióticos.

2. Biossíntese de enzimas celulasas e xilanases utilizando-se resíduos agroindustriais

A população aumenta em 83 milhões de pessoas por ano e deve chegar a 8,6 bilhões em 2030 agravando a produção de resíduos agroindustriais (Nações Unidas, 2017). O resíduo agroindustrial é uma biomassa lignocelulósica com alto potencial bioquímico o que permite a utilização de microrganismos para a produção de moléculas de alto valor agregado. Os principais resíduos gerados pela indústria brasileira são bagaço de cana, polpa cítrica, palha de cana, dreche cervejeiro, bagaço de mandioca, entre diversos outros (Costa, 2019).

A cana de açúcar produz para cada tonelada processada em torno de 280 quilos de bagaço de cana e palha (Morais *et al.*, 2007). O dreche cervejeiro é produzido em uma proporção de 100 litros de cerveja para 20 kg de dreche gerado (Reinold, 1997), a produção anual de cerveja chega a 14 bilhões de litros estimando uma produção de 2,8 milhões de toneladas de dreche (CervBrasil, 2016). O bagaço de mandioca é um resíduo fibroso proveniente das fecularias, produzido em torno de 928,6 kg por tonelada de raiz de mandioca processada. Para a produção de polpa cítrica estima-se 1,4 milhão de toneladas produzidas no cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro 2019/2020 (Scot Consultoria, 2019, Fundecitrus, 2019).

A biomassa lignocelulósica apresenta componentes estruturais chamados de celulose, hemicelulose e lignina. A concentração de cada componente no material lignocelulósico varia, influenciando na eficiência da hidrólise pelas enzimas (Costa, 2019).

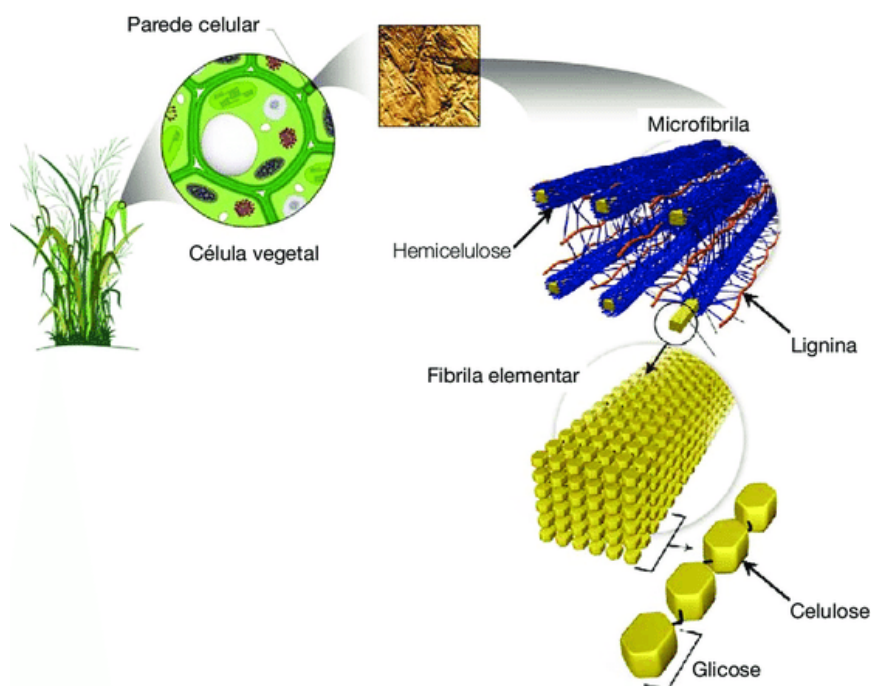
A celulose é o composto orgânico de maior ocorrência natural na terra, presente em maior parte na parede celular da fibra. Este homopolissacarídeo de cadeia longa é composto por moléculas de β -glicose (Figura 1), possui uma estrutura linear com alta interação entre as moléculas. As ligações de hidrogênio da celulose tornam propenso a formação de cristais insolúveis em água e na maioria dos solventes orgânicos, sendo uma das dificuldades para a hidrólise deste material. As enzimas que atuam sobre a celulose são chamadas de celulasas e formam um complexo enzimático atuando em sinergia para sua hidrólise (Pirota *et al.*, 2015).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por diferentes unidades de açúcares D-xiloses, L-arabinose, D-glicose, D-manose, D-galactose e ácido 4-O-metil-D-glucurônico derivados de carboidratos poliméricos de xilana, arabnagalactana,

glicomanana e galactomanana. A xilana é o principal constituinte da hemicelulose (com ligações do tipo β -1,4) (Oliveira, 2017).

A lignina é o componente mais recalcitrante dentre os três, responsável principalmente pela proteção contra microrganismos e resistência mecânica. A lignina é uma molécula tridimensional amorfa formada por fenóis, principalmente por fenilpropano que não se repete de forma regular. A resistência fornecida pelo teor de lignina no material lignocelulósico está correlacionada com as ligações físicas e covalentes da lignina e hemicelulose. Assim como a cristalinidade da celulose dificulta a hidrólise do material, a concentração de lignina também dificulta a atuação das enzimas sobre o resíduo. (Freudenberg e Neish, 1968). A figura 1 apresenta o material lignocelulósico e seus principais constituintes: celulose, hemicelulose e lignina.

Figura 1. Organização do material lignocelulósico quanto à celulose, hemicelulose e lignina (Adaptação de: Wyman e Yang, 2009).



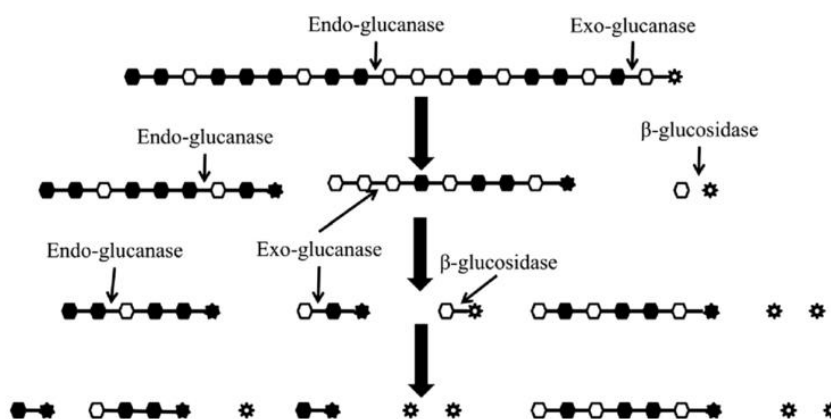
As principais enzimas que degradam o material lignocelulósico são chamadas de celulases e xilanases. As celulases são um conjunto de enzimas altamente específicas chamadas de endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, que atuam sinergicamente para degradação de celulose (Catelan e Pinotti, 2019).

As celulases são classificadas de acordo com o local de atuação sobre a celulose sendo as principais responsáveis pela hidrólise da ligação β -1,4 da celulose. Elas se

dividem em: endoglucanase (β -1,4-D-glucanohidrolase) que atua internamente a celulose hidrolisando ligações β -1,4 e liberando oligossacarídeos em diferentes graus de polimerização tornando mais disponível a atuação das celobiohidrolases, temos também a enzima exoglucanase (β -1,4-D-glucanocelobiohidrolase) que hidrolisa as extremidades da celulose tornando o polissacarídeo mais exposto e suscetível a quebras, e por fim temos as β -glicosidasas que hidrolisam celobioses e oligossacarídeos transformando-os em monômeros de glicose (Figura 2) (Castro *et al.*, 2010). A figura 2 apresenta um modelo da atuação sinérgica das celulases sobre a celulose.

Figura 2. Modelo demonstrativo da sinergia de atuação das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase em um sistema celulolítico durante a hidrólise da celulose.

⚙ = Extremidade redutora; ⚙ = extremidade redutora modificada; - = ligação β (1,4); ● = glicose modificada; ◻ = glicose não modificada (Saini *et al.*, 2015).



As enzimas xilanases atuam na hidrólise da hemicelulose. As principais enzimas deste complexo xilanolítico são chamadas de endoxilanases, exoxilanases e β -xilosidasas. As endoxilanases (β -1,4-D-xilana-hidrolase) hidrolisam ligações internas da molécula liberando xilooligossacarídeos, as exoxilanases (β -1,4-D-xilohidrolases) liberam xilose através de extremidades não redutoras das xilanas e por fim as β -xilosidasas (β -1,4-D-xilohidrolases) atuam sobre xilobiose e xilooligossacarídeos curtos liberando xilose (Gomes *et al.*, 2007).

O aumento do interesse industrial voltado para a utilização de enzimas impulsiona pesquisas que otimizem a produção enzimática. As exigências nutricionais do

microrganismo para a produção da enzima de interesse variam, alguns estudos buscam entender a influência de determinados substratos sobre a produção enzimática por meio de ferramentas como delineamentos experimentais de misturas (Cunha *et al.*, 2016). As características dos substratos do cultivo, presença de fibras, amido, proteínas, etc, podem induzir na escolha de substratos para produção enzimática, mas a complexidade nutricional dos microrganismos geralmente não permite ótimas produções apenas com um formulado simples, sendo geralmente suplementado com diferentes nutrientes (Oliveira *et al.*, 2018).

A utilização do material fibroso bagaço de cana apresenta bons resultados para a produção de celulasas em alguns estudos, porém em outros demonstra menor eficiência de produção comparado ao substrato amiláceo farelo de trigo (Maeda *et al.*, 2011). Rodríguez-Zúñiga *et al.*, (2011) ao testarem o cultivo de *A. niger* sobre bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, farelo de trigo e misturas entre os substratos, observaram melhores atividades de celulasas conforme o aumento das concentrações de farelo sobre o bagaço de cana. O uso de farelo de trigo em cultivo por 72 horas obteve as melhores atividades enzimáticas. Jatinder *et al.*, (2006) ao avaliarem a produção de enzimas fibrolíticas com o cultivo submerso de *Scytalidium thermophilum* em diferentes fontes de carbono palha de arroz, palha de trigo, farelo de trigo, palha de arroz : farelo de trigo (1:3), espiga de milho, bagaço, jornal e pó de serra observaram maiores produções enzimáticas utilizando palha de arroz e farelo de trigo (1:3) em pH 6, 45°C por 7 dias, alcançando uma melhor produção com um resíduo amiláceo presente em maiores concentrações e não com os materiais mais fibrosos testados como espiga de milho, bagaço e jornal. Desai *et al.*, (1982) observaram que a utilização de farelo de trigo no cultivo de *Scytalidium lignicola* CD-48 aumentou em 67% a produção de β -glucosidase. Aumentar o teor de substratos amiláceos como farelo de trigo, pode estimular a produção de amilases e inibir a síntese de celulasas, porém de acordo com a literatura o farelo de trigo é uma boa fonte de nutrientes para a produção de celulasas por determinados microrganismos (Sun *et al.*, 2008).

A fonte de nitrogênio para o desenvolvimento do microrganismo, assim como para a produção enzimática, são fatores importantes. A produção de endoglucanase por Sternberg e Dorval, (1979) com a utilização de sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio mostrou ser eficiente para o *T. reesei*. Reis *et al.*, (2015) utilizando *Penicillium echinulatum* S1M29 observaram melhores atividades de endoglucanase, β -glucosidase, exoglucanase, celulase e xilanase utilizando 1,4 g/L de sulfato de amônio comparado a

concentrações mais altas testadas e a concentração salina basal, 0,5 g/L de sulfato de amônio. Os mesmos autores observaram melhores resultados com concentrações mais altas de ureia para a produção de celulasas e xilanasas (0,525 g.L⁻¹). [Narasimha et al., \(2006\)](#) ao avaliarem a utilização de ureia, peptona, nitrato de sódio e extrato de levedura no cultivo de *A. niger* para produção de celulasas, também observaram melhores resultados com a utilização de ureia (0,82 U/mL). A segunda melhor fonte de nitrogênio foi peptona seguida de nitrato de sódio e extrato de levedura. Os autores [Desai et al., \(1982\)](#) analisaram a produção de celulasas e β -glicosidase em cultivo de agitação com *Scytalidium lignicola* CD-48 e perceberam sensibilidade quanto a fonte de nitrogênio utilizada. Os nutrientes peptona (0,2% m/v) e o nitrato de potássio (0,2% m/v) foram selecionados como as melhores fontes de nitrogênio.

A adição de fontes minerais no cultivo de microrganismos também é uma variável importante para o desenvolvimento do microrganismo e, conseqüentemente, para a produção enzimática estando relacionada a produção de coenzimas ([Baldrian, 2003](#)). Cada microrganismo apresenta uma tolerância específica aos minerais, em excesso pode inibir o crescimento e até selecionar a população de microrganismos resistentes e tolerantes.

Estudos indicam que o mineral zinco está relacionado à manutenção da integridade dos ribossomos, membranas biológicas, além de ser importante para o bom desenvolvimento do microrganismo ([Babich e Stortzky, 1978](#); [Ezzouhri et al., 2009](#)). Os autores [Vale et al., \(2011\)](#) ao utilizarem o fungo *A. niger* para avaliarem a influência de diferentes concentrações de cromo e zinco no cultivo observaram inibição do metabolismo do fungo em concentrações acima de 500 mg/L de zinco e 150 mg/L de cromo. Segundo estes autores, a utilização de 100 e 150 mg/L⁻¹ desses minerais já é capaz de inibir 50% do crescimento micelial do fungo.

A umidade é outro fator que interfere na eficiência do cultivo, variando conforme o tipo de substrato utilizado, necessidades dos microrganismos e da biossíntese enzimática desejada ([Ramesh e Lonsane, 1990](#)). Excesso de líquido na matriz pode dificultar a difusão de oxigênio, entretendo baixa umidade compromete o acesso aos nutrientes e oxigenação, prejudicando o crescimento do microrganismo e produção enzimática ([Pandey et al., 2000](#); [Hölker et al., 2004](#)). De acordo com [Marques et al., \(2018\)](#) testes com diferentes concentrações de umidade inicial 60, 65, 70, 75 ou 80%, sobre o substrato farelo de trigo e farelo de algodão em cultivo sólido por 14 dias para a produção de celulasas, apresentaram melhores resultados para *Botryosphaeria* sp. AM01

em 60 e 65% de umidade inicial, já para a produção de endoglucanases houve perda de atividade enzimática com 65% de umidade. Para o microrganismo *Saccharicola sp.* EJC 04 a umidade inicial de substrato não influenciou a produção de enzimas (Marques *et al.*, 2018). Um cultivo submerso utilizando *Aspergillus niger* com 10% de farelo de trigo e 90% de bagaço de cana foi realizado por Rodríguez-Zúñiga *et al.*, (2011) para avaliarem a influência de 60, 70 e 80% de umidade sobre a produção de celulases. Os melhores resultados foram obtidos com 70% e 80% de umidade. Foi observado também que 50% de umidade é insuficiente para uma completa hidratação do bagaço.

A temperatura de cultivo para biossíntese enzimática causa influência no crescimento dos microrganismos e na hidrólise dos substratos disponíveis pelas exoenzimas (Farinas *et al.*, 2010). Utilizando-se um planejamento fatorial de dois experimentos, Hamidi-Esfahani, *et al.*, (2004) estudaram o efeito simultâneo da temperatura e umidade para o crescimento de *A. niger* em cultivo sólido com farelo de trigo. Os autores observaram que concentrações de água acima de 55% nas temperaturas de 35°C e 40°C inibem o crescimento do microrganismo. Sohail *et al.*, (2009) analisaram o efeito de diferentes temperaturas (25, 30, 35 e 40°C) e pH (4,5,6 e 7) sobre a produção de *Aspergillus niger* MS82, eles observaram as maiores produções de celulase em pH 4,0 a 35°C, em condições submersas. Os mesmos autores observaram maior produção de endoglucanase na fase exponencial de crescimento, ao contrário das glucosidases que foram produzidas na fase estacionária.

Os fungos filamentosos e leveduras crescem em maior variação de pH comparado as bactérias e podem influenciar na capacidade de atuação das enzimas na degradação do substrato e, conseqüentemente, na assimilação dos nutrientes (Peñalva e Arst, 2004). Um estudo realizado por Sales *et al.*, (2010) avaliou a influência do pH inicial, tempo de cultivo, concentração do substrato, agitação, concentração do inóculo, temperatura, tipo de bagaço de cana-de-açúcar para a produção simultânea de celulases e xilanases em bagaço de cana com *Aspergillus aculeatus* URM 4953 e *Aspergillus phoenicis* URM 4924. Os autores concluíram que as variáveis pH, tempo de cultivo e tipo de bagaço de cana-de-açúcar influenciaram mais a produção enzimática simultânea para as celulases totais, endoglucanase, exoglucanase, celobiase e xilanase.

Alguns estudos avaliam a eficiência de produção de enzimas em cultivos mistos ou co-cultivos, como podem ser chamados, a fim de obter uma ação sinérgica dos microrganismos na síntese da enzima de interesse para degradação de substratos, assim como ocorre na decomposição natural da biomassa vegetal.

Os co-cultivos podem produzir um extrato enzimático mais eficiente do que as monoculturas, geralmente resultando em aumento da atividade e produção enzimática, porém para enzimas específicas (Machin-Ramírez *et al.*, 2010; Blanco-Vargas *et al.*, 2018). Gutierrez-Correa *et al.*, (1999) realizaram um co-cultivo sólido utilizando *Trichoderma reesei* LM-UC4 e o mutante *T. reesei* LM-UC4E1 associado a *Aspergillus niger* ATCC 10864 em bagaço de cana com 80% de umidade a 30°C. O substrato foi suplementado com farelo de soja ou sulfato de amônio e ureia. O cultivo misto com a cepa mutante e *A. niger* produziu melhores resultados utilizando sulfato de amônio e ureia alcançando maiores atividades enzimáticas do que a cultura única em 63% para celulase, 85% para endoglucanase e 147% para β -glucosidase. A utilização de farelo de soja induziu a produção de biomassa, mas não aumentou a produção enzimática, ao contrário da utilização da fonte inorgânica que não produziu muita biomassa e obteve aumento na produção enzimática. Hu *et al.*, (2011) ao estudarem a eficiência de co-cultivos com *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* entre si e com *Magnaporthe grisea* ou *Phanerochaete chrysosporium*, respectivamente, obtiveram maiores atividades para β -glucosidase, α -celobiohidrolase, β -galactosidase e lacase ao associar *A. oryzae* com os outros fungos, em especial com *P. Chrysosporium*.

Contudo, existe uma gama de fatores que podem interferir na biossíntese enzimática como a temperatura, pH, diferentes estratégias de cultivo, tipos de microrganismos, fontes de carbono para o cultivo, nutrientes utilizados para complementar o meio, além das diferentes concentrações de cada nutriente. O cultivo microbiano para a produção enzimática deve ser realizado com foco na biomolécula de interesse, a fim de selecionar as melhores condições de produção.

3. Aplicação de enzimas fibrolíticas celulasas e xilanases

3.1 Aplicação de enzimas fibrolíticas e probióticos em resíduos agroindustriais visando a nutrição animal

A indústria alimentícia se sobressai pela necessidade de melhorar processos de produção, a fim de acompanhar o crescimento populacional para suprir sua demanda (Nações Unidas, 2017). A pecuária se destaca por apresentar grande influência na disponibilidade de alimentos. As variações dos custos de produção na pecuária estão relacionadas à produção agrícola que varia de acordo com o rendimento de cada safra. Uma maneira de minimizar esta oscilação é investir na utilização de resíduos

agroindustriais para a nutrição animal, garantindo um destino adequado para estes resíduos e uma fonte nutritiva mais barata (Detroy, 2018; Araújo, 2000).

Na pecuária são utilizados em especial grãos como soja, milho, além de farelo de trigo, polpa cítrica paletizada, feno de alfafa, capim tifton, entre outras fontes que são disponibilizadas em proporções e tempos diferentes de acordo o tipo de animal alimentado, idade, se está no período de lactação, entre outros fatores, além destes também são utilizados resíduos agroindustriais como bagaço de mandioca, comercializado com custos reduzidos para complementar a alimentação dos animais. Alguns resíduos já são aplicados na alimentação animal, contudo existe um contínuo número de pesquisas que visam observar o potencial na nutrição de outros tipos de resíduos como frutas tropicais, bagaço de cana de açúcar, dreche cervejeiro, entre diversos outros (Godoy *et al.*, 2018; De Corato *et al.*, 2018).

Os preços de produção precisam estar equilibrados contra o preço de venda do animal, para isso é necessária uma conversão alimentar favorável que acarrete no ganho de peso. Com isso, é possível entender a importância de uma alimentação de qualidade para se obter preços que viabilizem a produção animal (Ferreira *et al.*, 2000).

A alimentação animal por meio de mudanças nutricionais pode aumentar a fixação de carbono favorecendo o ganho de peso, além de promover redução da liberação de metano, gás do efeito estufa (Vinchira-Villarraga e Moreno-Sarmiento, 2019). A qualidade da alimentação de animais está relacionada ao teor das fibras, teor de proteínas, presença de probióticos, carboidratos não estruturais (CNE), entre outras variáveis.

Os carboidratos não estruturais são um dos fatores que interferem na eficiência da digestão pois estimulam o desenvolvimento de microrganismos amilolíticos, e como consequência desta competição, inibem os microrganismos celulolíticos, alterando o pH ruminal e levando ao comprometimento do desempenho da digestão (Hoover, 1986; Marino e Medeiros, 2015).

O teor de proteína nos alimentos ofertados é outra variável importante que, em excesso, é convertida em amônia e posteriormente em ureia, aparecendo no sangue e leite, além de estar relacionada com a redução da fertilidade dos animais (Elrod e Butler, 1993). Os alimentos devem ser ofertados com no mínimo 7% de proteína bruta ou 1% de nitrogênio total, pois concentrações baixas afetam o crescimento microbiano, e com isso a eficiência da digestibilidade (Lima Jr *et al.* 2010; Guimarães, 2018). Mouro *et al.*, (2002) testaram a substituição de milho por farinha de mandioca na dieta de cabras e observaram baixo teor de proteínas na farinha de mandioca (1,9%) comparado ao milho

(9,8%), indicando a necessidade da adição de uma fonte proteica à farinha, no caso ureia, para suprir esta necessidade.

Diversos estudos buscam analisar o incremento proteico no cultivo de microrganismos em resíduos. [Pelizer et al., \(2007\)](#) utilizando *Trichoderma reesei* e *Rhizopus* em co-cultivo submerso com bagaço de cana aumentaram o teor proteico de 1,58% para 7,70%. [Monteiro et al., \(1991\)](#) com o fungo *Chaetomium cellulolyticum* em cultivo sólido com bagaço de cana aumentou a concentração de proteínas de 2% para 8,65%. [Vandenberg et al. \(2000\)](#) utilizando bagaço de mandioca em cultivo com *Aspergillus niger* observaram um acréscimo de 13,3% para 23,1% de proteínas no material.

Além da influência da proteína, carboidratos, pH, entre outras, o tipo de matéria seca utilizada na alimentação animal, assim como a composição química da mesma pode indicar a necessidade de suplementação da dieta. As suplementações da dieta de animais com probióticos e enzimas estão em evidência ([Santos et al., 2016](#)), cada uma com seus benefícios, desde aumento do teor de proteínas, melhora da taxa de degradação da fibra com a atividade celulolítica, manutenção do pH, benefícios para a saúde do hospedeiro, entre outros fatores, indicando grande potencial do uso na suplementação de ração animal associado a outras fontes de matéria seca. As enzimas e os probióticos melhoram o desempenho dos animais na digestão ao facilitar a maior assimilação de nutrientes ([Newbold, 1997; dos Santos, 2018](#)).

Os ruminantes apresentam diversos microrganismos capazes de produzir enzimas fibrolíticas para degradação da biomassa ingerida. Os probióticos são bactérias ou leveduras adicionadas à dieta animal para regular a microbiota intestinal. As leveduras podem ser comercializadas de forma inativa devido o teor de proteínas e vitaminas que possui, sendo utilizada para agregar valor nutricional à ração animal. O uso dessas leveduras ativas favorece a saúde animal em funções que vão além do teor nutritivo ([de Matos, 2019; Bajagai et al., 2016](#)).

A adição de probióticos está relacionada a efeitos benéficos como manutenção do pH ruminal, redução de diarreias, melhora a produção de leite e digestibilidade, modulação da imunidade, competição contra microrganismos indesejáveis presentes no trato gastrointestinal, entre outros fatores que favorecem a absorção de nutrientes ([Noschang et al., 2018; Vohra et al., 2016](#)). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado como suplemento probiótico, fornece diferentes nutrientes, assim como vitaminas, além de estar presente em diferentes setores industriais, como

cervejarias, panificadoras, produção de vinhos, combustíveis, entre outros, (Iwashita *et al.*, 2015; Sarangi *et al.*, 2016).

Existe uma busca por novas cepas que atuem como probióticos em animais ou nos seres humanos. Na pecuária o uso de antibióticos promotores de crescimento foi muito comum para a alimentação animal, a fim de controlar bactérias patogênicas e impedir sua disseminação ao longo da cadeia alimentar, entretanto os microrganismos desenvolveram resistência a antibióticos levando a disseminação de doenças em seres humanos (Gaggia *et al.*, 2010). Com isso, a utilização de probióticos no controle de patógenos associada ao ganho de peso dos animais é uma alternativa atraente (Bajagai *et al.*, 2016).

A digestão dos alimentos para os ruminantes ocorre no pH 6 ou mais, a fermentação leva a produção de lactato que, conseqüentemente, promove a acidificação do trato gastrointestinal e diminuição da eficiência de digestão. A utilização de aditivos com microrganismos que consomem esse lactato permite o aumento do pH ruminal (França e Rigo, 2011; Diaz e Branco, 2019).

Muitas pesquisas analisam o potencial da utilização de probióticos na alimentação animal, contudo alguns não observam relação entre o uso de probióticos e a melhora do desempenho (Markowiak e Śliżewska, 2018). Com isso, muitos estudos buscam entender o mecanismo de atuação de cada cepa de probiótico utilizada, mas lidam com um grande desafio devido à interferência de uma grande variedade de fatores (Azad *et al.*, 2018).

As leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Wickerhamomyces onychis* de acordo com o estudo de Shinya, (2017) e da patente, “Processo de obtenção de leveduras probióticas e enriquecimento nutricional de resíduos para benefício à saúde humana e animal” (Oliva Neto *et al.*, 2019), são consideradas microrganismos fibrolíticos, capazes de utilizar a fibra como substrato em cultivo. A *Rhodotorula mucilaginosa* é aplicada desde a produção de pigmentos até a biorremediação, além de ser considerada um microrganismo facultativo, já a *Wickerhamomyces onychis* é biocontroladora contra *Botrytis cinérea* e *Rhizopus stolonifer* e demonstra capacidade de desenvolvimento sem a presença de oxigênio (Brad *et al.*, 2008; Laconi e Pompei, 2007). As características observadas indicam o potencial dessas leveduras para atuar como probióticos na nutrição animal.

Os benefícios da utilização de enzimas na nutrição animal permitiram maiores investimentos neste setor. Existem preparados enzimáticos disponíveis no mercado para alimentação animal, suas culturas de bactérias ou fungos para a produção de enzimas são reguladas pela Food and Drug Administration (FDA) (Muirhead, 1996). Os produtos

comerciais não são puros, apresentando concentrações variadas de amilases, proteases, entre outras enzimas. Os tipos de enzimas produzidas podem variar de acordo com os substratos e microrganismos utilizados, assim como as condições de cultivos, com isso combinar o conjunto de enzimas produzidas para comercialização pode favorecer a atuação sobre o substrato escolhido devido à gama de enzimas no formulado enzimático (Gashe, 1992). Os ruminantes apresentam melhores desempenhos quando a alimentação é suplementada com enzimas celulolíticas e xilanolíticas o que permite com que os formulados enzimáticos sejam padronizados considerando a atividade específica dessas enzimas.

As pesquisas divergem em tipo de animal estudado, enzima, forragem, concentração dos mesmos, entre outros fatores. Diferentes estudos já demonstraram a capacidade da utilização de enzimas, El Tawab *et al.*, (2016) concluíram que a suplementação com enzimas celulase e tanase na dieta de búfalos em lactação pode melhorar o desempenho dos mesmos. Pesquisas envolvendo alimentação de tilápias associadas à suplementação enzimática demonstram a melhora na digestão, aumento da superfície de absorção intestinal, melhora no crescimento e desempenho corporal. (Adeoye *et al.*, 2016).

Arriola *et al.*, (2011) ao testarem um preparado de enzimas fibrolíticas (pulverizada a uma taxa de 3,4 mg de enzima / g de matéria seca na ração) com alta concentração e baixa concentração de matéria seca (48% e 33% da matéria seca da dieta) observaram o desempenho da produção de leite de vacas em lactação. A melhor formulação foi a dieta com baixa concentração de matéria seca e enzimas. Foi observado que a aplicação de enzimas não afetou a ingestão de matéria seca, nem a produção de leite, além de ter diminuído a produção de metano e aumentou a digestibilidade aparente total da massa seca.

As enzimas fibrolíticas podem ser produzidas por diferentes microrganismos, assim como observado e testado por Giraldo *et al.*, (2008) que estudaram os efeitos de três enzimas fibrolíticas: xilanase de *Trichoderma viride*, enzimas fibrolíticas de *Aspergillus niger* e *Trichoderma longibrachiatum*, as quais foram fornecidas em 40 e 80 U/g de substrato seco na fermentação de feno de capim. Os autores observaram uma redução da razão metano por matéria orgânica aparente fermentada para o *Trichoderma longibrachiatum*, com 80 U/g às 8 h (17,4%). Os resultados indicaram que doses inferiores de enzimas por grama de matéria seca seriam eficazes para a degradação ruminal dos substratos.

O microrganismo produtor da enzima é tão importante quanto o tipo de forragem utilizada como fonte de matéria seca para a alimentação animal. [Beauchemin et al., \(1995\)](#), ao testarem feno de alfafa, feno timothy e silagem de cevada incrementados com xilanas e celulases, observaram 30% de ganho de peso com a utilização de feno de alfafa. quando em níveis baixos e moderados e, 36% de ganho de peso para a utilização de feno timothy em níveis mais altos. A silagem de cevada não demonstrou respostas quanto à adição de enzimas e ganho de peso. Os níveis ideais de enzimas dependem do tipo de forragem utilizada.

Estes estudos, assim como muitos outros, demonstram o potencial da utilização da suplementação alimentar, em especial das enzimas e probióticos que apresentam benefícios para diferentes tipos de animais.

3.2 Outras aplicações de enzimas fibrolíticas em resíduos agroindústrias

Em relação às aplicações de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, as mesmas são usadas na indústria de clarificação de sucos, na indústria têxtil para remoção de filamentos de fibra chamados *pilling* e até mesmo no desgaste de peças jeans índigo (stone wash), utilizadas também na indústria de papel, na indústria alimentícia, entre outros setores ([Dal Magro et al., 2018](#); [Sajith et al., 2016](#)) Devido aos bons resultados dessas enzimas aplicadas a indústria, diversos estudos buscam otimizar a eficiência de aplicação nos diversos setores, além de estudarem novas aplicações.

Muitas estratégias promissoras estão sendo estudadas para garantir padrões sustentáveis de produção e consumo a fim de contribuir para a redução dos problemas ambientais e seus impactos. Na indústria de papel, muitos estudos focam na biorremediação dos efluentes gerados, porém tão importante quanto o tratamento desses efluentes é a otimização do processo para reduzir a utilização dos mesmos ([Katheresan et al., 2018](#)).

O papel é composto por fibras de celulose, obtido a partir de fragmentos da madeira transformados em polpa. Durante a fabricação do papel são utilizados produtos químicos para remoção da lignina da madeira, que leva a produção de um papel mais branco. A cor, brilho e cristalinidade do papel são variáveis importantes de qualidade para esta indústria. A polpa é preparada por meio de aquecimento para remoção de lignina, seguida da utilização de um conjunto de compostos químicos como hidróxido de sódio,

sulfito de sódio, cloro (Cl₂) e dióxido de cloro (ClO₂) com objetivo de remover a lignina residual (Motta *et al.*, 2013; Sivaram *et al.*, 2018).

A partir do uso de alguns desses produtos químicos são geradas toxinas mutagênicas e bioacumulativas que levam a diversos problemas ambientais (Nimkar 2018). Estas consequências em conjunto às pressões legislativas e ambientais colaboraram para o desenvolvimento de novas tecnológicas mais ecológicas para a indústria de papel. A utilização de enzimas foi considerada por muito tempo inviável devido aos custos de produção, quantidade de enzimas produzidas, entre outros fatores, porém a descoberta de novas cepas, aprimoramento de cultivos, entre outros fatores permitiram que as enzimas se tornassem uma opção para aplicações nos processos industriais (Liu e Kokare, 2017).

A aplicação de enzimas xilanolíticas na indústria de papel e celulose permite à despolimerização da hemicelulose, tornando a fibra mais suscetível a remoção da lignina residual (Polizeli *et al.*, 2005).

Estudos já mostram a capacidade de reduzir poluentes químicos utilizando enzimas. Campioni *et al.*, (2019) ao trabalharem com a celulose Kraft associaram o biobranqueamento, utilizando enzimas xilanolíticas, ao branqueamento químico reduzindo em 10% a utilização de dióxido de cloro para obter o mesmo brilho que o controle. As xilanases removem a xilana permitindo a lixiviação da lignina reduzindo a interação lignina-carboidrato e permitindo um melhor clareamento da polpa Kraft (Colombatto, *et al.*, 2004).

Muitos estudos demonstram o potencial das xilanases no biobranqueamento, porém pesquisas voltadas para a ação sinérgica das enzimas no biobranqueamento podem reduzir ainda mais a utilização de químicos na indústria, assim como Kaur *et al.*, (2010) que ao utilizarem um conjunto de enzimas xilano-pectinolíticas de *Bacillus pumilus*, observaram redução de 8,5% no número kappa da polpa, abordagem que resultou na redução de 25% no consumo de cloro ativo nos estágios subsequentes de branqueamento, sem diminuição do brilho. O cenário atual indica um declínio da utilização de papel devido ao grande desenvolvimento tecnológico (uso de computadores, celulares, entre outros), porém sabe-se que produtos básicos como papel higiênico, papel toalha, papelão, entre outros ainda continuarão sendo utilizados e produzidos pelas indústrias.

A produção de etanol de segunda geração também é destaque das pesquisas. A utilização de fonte energética petrolífera começou a ser repensada devido a crescente liberação de gás carbono e por não se tratar de uma fonte renovável. O etanol de primeira

geração é uma fonte energética que compete com as culturas alimentares, produzido a partir de cana de açúcar, beterraba, milho, entre outros, o que nos faz pensar sobre novas alternativas para produção de energia (Khatiwada *et al.*, 2016; Balat e Balat, 2009).

O material lignocelulósico é uma fonte interessante por ser renovável e estar presente em grandes quantidades no planeta, principalmente na forma de resíduos. Estudos sobre a produção de etanol 2G utilizam diversos materiais celulósicos como bagaço de cana, palha de cana, casca de pinhão, sabugo de milho, bagaço de maçã, entre outros (Nakanishi, *et al.*, 2018; Evcan e Tari, 2015), a fim de analisar o potencial de cada um deles na conversão em etanol. A conversão biológica desses materiais lignocelulósico em substratos fermentescíveis oferece muitos benefícios, além de um destino para os resíduos lignocelulósicos gerados pela indústria, porém o processo ainda não é viável. Por exemplo, o etanol 2G precisa alcançar valores de produção mais atrativos para entrar com força no mercado e conseguir competir com o etanol de primeira geração, para isso redução de taxas, integração de novos produtos junto à fabricação dessa biomolécula, podem ser alternativas para reduzir o preço do produto, tornando-o mais atraente para o consumidor (Aditiya, *et al.*, 2016; Antunes *et al.*, 2018).

A produção de etanol 2G depende da hidrólise da celulose e hemicelulose do material lignocelulósico utilizado, produzindo assim açúcares fermentescíveis. A fermentação destes açúcares é realizada com a utilização de microrganismos fermentadores produzindo etanol, e finalmente o etanol produzido pode ser concentrado para atender as especificações dos combustíveis de mercado. A hidrólise do material lignocelulósico é uma das etapas que encarecem o processo, devido à necessidade de enzimas celulolíticas (Zabed *et al.*, 2017).

As pesquisas destringem a eficiência de pré-tratamentos sobre a fibra, seja por métodos físicos, químicos ou biológicos, além de buscar maneiras de aperfeiçoar o processo por meio de melhoramento genético de microrganismos celulolíticos, modelos de produção, inovação tecnológica, entre outras estratégias que visam reduzir custos de produção (Li *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2012).

A produção de etanol 2G traz vários benefícios ambientais, pelo fato de ser utilizado resíduos lignocelulósicos, além disso, agrega valor ao mesmo e há também a possibilidade de elaboração de novos produtos tais como a produção de xilooligossacarídeos (XOS) e produção enzimática, as quais também podem ajudar na viabilidade econômica da produção de etanol 2G (Nascimento *et al.*, 2016; Costa, 2019).

4. Considerações finais

A síntese de biomoléculas sofre influência de diferentes fatores, em especial da composição química do meio que varia de acordo com os tipos de substratos e sais minerais utilizados, suas proporções, além da umidade que varia de acordo com as características do substrato do cultivo. O tipo de microrganismo escolhido para o cultivo é muito importante para se obter valores altos de atividade enzimática, visto que existem uma gama de microrganismos conhecidos por sua alta especificidade na produção de enzimas, além de diversas cepas mutantes disponíveis. A aplicação dessas enzimas ocorre em diferentes setores, em especial a utilização na alimentação animal leva a melhora na taxa de digestibilidade e maior fixação de carbono pelo animal. As características da alimentação animal estão relacionadas principalmente ao tipo de fonte de carbono utilizada, concentração de proteínas ingeridas, pH ruminal, entre outros fatores. Os probióticos os quais também podem ser produzidos por resíduos agroindustriais, ajudam na manutenção do pH ruminal, competem com patógenos, ajudam na degradação da fibra, diminuem diarreias, entre outros benefícios, demonstrando sua importância na dieta dos animais. A utilização de enzimas na nutrição animal também apresenta benefícios na digestão e conseqüente aumento do ganho de peso animal. A produção de enzimas pode ser também realizada em cultivos com resíduos agroindustriais, permitindo uma produção ecológica e sustentável, assim como sua aplicação em processos industriais.

5. Referências

- Adeoye, A. A.; Yomla, R.; Jaramillo-Torres, A.; Rodiles, A.; Merrifield, D. L., & Davies, S. J. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture*, v.463, n.1, p. 61-70, 2016.
- Aditiya, H. B.; Mahlia, T. M. I.; Chong, W. T.; Nur, H.; & Sebayang, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 66, n.1, p. 631-653, 2016.
- Aguiar, G. P. S.; Martins, V. G.; Martins, P. C. C.; Boschero, R. A.; & Prentice-Hernández, C. Produção de lipase microbiana a partir de resíduos de corvina. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, n.10, v.1, p.118- 129, 2018.
- Antunes, F. A. F.; Chandel, A. K.; Brumano, L. P., Hilares, R. T.; Peres, G. F.; Ayabe, L. E.; ... & Da Silva, S. S. A novel process intensification strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse in fluidized bed reactor. *Renewable Energy*, v.124, p. 189-196, 2018.
- Araújo, A. S.; & da Silva Martins, E. Produção de α -amilases por *Rhizomucor miehei* e *Syncephalastrum racemosum* em diferentes condições fermentativas. *Nucleus*, v.15, n.2, p. 583-592, 2018.
- Araújo, M. J. Fundamentos de agronegócios. 2. ed. São Paulo: *Editora Atlas AS*, 2000.
- Arriola, K. G.; Kim, S. C.; Staples, C. R.; & Adesogan, A. T. Effect of fibrolytic enzyme application to low-and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n.2, p. 832-841, 2011.
- Azad, M.; Kalam, A.; Sarker, M.; Li, T.; & Yin, J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *BioMed Research International*, p. 1-9, 2018.
- Babich, H.; & Stotzky, G. Toxicity of zinc to fungi, bacteria, and coliphages: influence of chloride ions. *Applied Environmental Microbiology*, v.36, n.6, p. 906-914, 1978.
- Bajagai, Y. S.; Klieve, A. V.; Dart, P. J.; & Bryden, W. L. Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation. *FAO*, n.179, 2016.
- Balat, M.; & Balat, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied Energy*, v.86, n.11, p.2273-2282, 2009.
- Baldrian, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, v.32, n.1, p.78-91, 2003.
- Beauchemin, K. A.; Rode, L. M.; & Sewalt, V. J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. *Canadian Journal of Animal Science*, v.75, n.4, p.641-644, 1995.

Blanco-Vargas, A.; Ramírez-Sierra, C. F.; Duarte-Castañeda, M.; Beltrán-Villarraga, M.; Medina-Córdoba, L. K.; Florido-Cuellar, A. E.; ... & Pedroza-Rodríguez, A. M. A novel textile wastewater treatment using ligninolytic co-culture and photocatalysis with TiO₂. *Universitas Scientiarum*, v.23, n.3, p.437-464, 2018.

Brad, T.; Braster, M.; van Breukelen, B. M.; van Straalen, N. M.; & Röling, W. F. Eukaryotic diversity in an anaerobic aquifer polluted with landfill leachate. *Applied Environment Microbiology*, v.74, n.13, p.3959-3968, 2008.

Campioni, T. S.; de Jesus Moreira, L.; Moretto, E.; Nunes, N. S. S.; & de Oliva Neto, P. Biobleaching of Kraft pulp using fungal xylanases produced from sugarcane straw and the subsequent decrease of chlorine consumption. *Biomass and Bioenergy*, v.121, p.22-27, 2019.

Castro, A. M.; Pedro, K. C. N. R.; da Cruz, J. C.; Ferreira, M. C.; Leite, S. G. F.; & Pereira, N. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.162, n.7, p.2111-2122, 2010.

Cervbrasil, A. (2016). Associação Brasileira da Indústria da Cerveja - Anuário 2016. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf. Acesso em dezembro de 2019.

Catelan, T. C.; & Pinotti, L. M. Avanço das pesquisas envolvendo *Aspergillus niger* e bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono visando à produção de celulases: Uma análise bibliométrica. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v.24, n.2, p. 1-14, 2019.

Colombatto, Dario, *et al.* In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays L.*) silage: I. Effects of ensiling temperature, enzyme source and addition level. *Animal Feed Science and Technology*, v.111.n.1-4, p.111-128, 2004.

Costa, L. F. M. Degradação lignocelulósica por hidrólise enzimática visando a produção de Etanol. *Revista Técnico Científica do IFSC*, v.2, n.7, p.52-61, 2019.

Cunha, J. R. B.; Santos, F. C. P. D.; Assis, F. G. D. V. D.; & Leal, P. L. Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. *Revista Ceres*, v.63, n.5, p. 597-604, 2016.

Dal Magro, L.; Silveira, V. C.; de Menezes, E. W.; Benvenuto, E. V.; Nicolodi, S.; Hertz, P. F.; ... & Rodrigues, R. C. Magnetic biocatalysts of pectinase and cellulase: synthesis and characterization of two preparations for application in grape juice clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.115, p.35-44, 2018.

De Corato, U.; De Bari, I.; Viola, E.; & Pugliese, M. Assessing the main opportunities of integrated biorefining from agro-bioenergy co/by-products and agroindustrial residues into high-value added products associated to some emerging markets: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 88, p.326-346, 2018.

de Matos, B. D. C. Uso de aditivos na pecuária leiteira: revisão. *PUBVET*, v.2, n.9, p. 0159-0164, 2019.

Desai, J. D.; Desai, A. J.; & Patel, N. P. Production of cellulases and beta-glucosidase by shake culture of *Scytalidium lignicola*. *Journal Fermentation Technology*, v.60, n.2, p.117-124, 1982.

Detroy, R. W. Bioconversion of agricultural biomass to organic chemicals. *In Organic Chemicals from Biomass*, p. 19-43, 2018.

Diaz, T. G.; & Branco, A. F. Leveduras vivas e mananoligossacarídeos para prevenção de acidose ruminal subaguda. *Archivos de Zootecnia*, v.68, n.263, p.456-462, 2019.

dos Santos, S. A. Efeito do uso de aditivo probiótico na suplementação de bovinos em regime extensivo a pasto. *Revista Alomorfia*, v.2, n.1, p.53-62, 2018.

Elrod, C. C.; & Butler, W. R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *Journal of Animal Science*, v.71, n.3, p. 694-701, 1993.

El Tawab, A. A.; Khattab, M. S. A.; El-Zaiat, H. M.; Matloup, O. H.; Hassan, A. A.; Abdou, M. M.; ... & Yacout, M. H. Effect of cellulase and tannase enzymes supplementation on the productive performance of lactating buffaloes fed diets contain date palm fronds. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, v.10, p. 307-312, 2016.

Evcan, E.; & Tari, C. Production of bioethanol from apple pomace by using cocultures: Conversion of agro-industrial waste to value added product. *Energy*, v.88, p. 775-782, 2015.

Ezzouhri, L.; Castro, E.; Moya, M.; Espinola, F.; & Lairini, K. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. *African Journal of Microbiology Research*, v.3, n.2, p.35-48, 2009.

Farinas, C. S.; Loyo, M. M.; Junior, A. B.; Tardioli, P. W.; Neto, V. B.; & Couri, S. Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. *New Biotechnology*, v.27, n.6, p. 810-815, 2010.

Fellows, P. J. *Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática*. 4. ed. São Paulo, Artmed Editora, 2018.

Ferreira, M. D. A.; Valadares Filho, S. D. C.; Silva, J. F. C. D.; Paulino, M. F.; Valadares, R. F. D., Cecon, P. R., & Muniz, E. B. Consumo, conversão alimentar, ganho de peso e características da carcaça de bovinos F1 Simental x Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.28, n.2, p.343-351, 1999.

França, R.A.; & Rigo, E.J. Utilization of alive yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) in ruminant nutrition – A review. *FAZU*, v.8, p.187-195, 2011.

Freudenberg, K.; & Neish, A. C. Constitution and biosynthesis of lignin. *Constitution and Biosynthesis of Lignin*, p.129, 1968.

Fundecitrus (2019). Cinturão citrícola de SP e MG produzirá 388,89 milhões de caixas de laranja na safra 2019/2020. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/cinturao-citricola-de-sp-e-mg-produzira-38889-milhoes-de-caixas-de-laranja-na-safra-201920/797>. Acesso em fevereiro de 2020.

Gaggia, F.; Mattarelli, P.; & Biavati, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, v.141, p.15-28, 2010.

Gashe, B. A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. *Journal of Applied Bacteriology*, v.73, n.1, p.79-82, 1992.

Godoy, M. G.; Amorim, G. M.; Barreto, M. S.; & Freire, D. M. Agricultural Residues as Animal Feed: Protein Enrichment and Detoxification Using Solid-State Fermentation. *In Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, p. 235-256, 2018.

Gomes, E.; Guez, M. A. U.; Martin, N.; & Silva, R. da. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química Nova*, v.30, n.1, p.136-145, 2007.

Giraldo, L. A.; Tejido, M. L.; Ranilla, M. J.; & Carro, M. D. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on in vitro ruminal fermentation of substrates with different forage: concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology*, v.141, p.306-325, 2008.

Guimarães, T. P. Exigências Proteicas para bovinos de corte. *Multi-Science Journal*, v.1, n.1, p.90-99, 2018.

Gutierrez-Correa, M.; Portal, L.; Moreno, P.; & Tengerdy, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, v.68, n.2, p.173-178, 1999.

Hamidi-Esfahani, Z.; Shojaosadati, S. A.; & Rinzema, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.21, n.3, p.265-272, 2004.

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

Hoover, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of Dairy Science*, v.69, n.10, p.2755-2766, 1986.

Hu, H. L.; Van den Brink, J.; Gruben, B. S.; Wösten, H. A. B.; Gu, J. D.; & De Vries, R. P. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.65, n.1, p.248-252, 2011.

Iwashita, M. K. P.; Nakandakare, I. B.; Terhune, J. S.; Wood, T.; & Ranzani-Paiva, M. J. T. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas*

hydrophila and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, v.43, n.1, p.60-66, 2015.

Jatinder, K.; Chadha, B. S.; & Saini, H. S. Optimization of culture conditions for production of cellulases and xylanases by *Scytalidium thermophilum* using Response Surface Methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.22, n.2, p.169–176, 2006.

Katheresan, V.; Kansedo, J.; & Lau, S. Y. Efficiency of various recent wastewater dye removal methods: a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v.6, n.4, p.4676-4697, 2018.

Kaur, A.; Mahajan, R.; Singh, A.; Garg, G.; & Sharma, J. Application of cellulase-free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. *Bioresource Technology*, v.101, n.23, p.9150-9155, 2010.

Khatiwada, D.; Leduc, S.; Silveira, S.; & McCallum, I. Optimizing ethanol and bioelectricity production in sugarcane biorefineries in Brazil. *Renewable Energy*, v.85, p.371-386, 2016.

Laconi, S.; & Pompei, R. Study and characterization of intestinal yeasts of mullet (*Mugil spp.*) for potential probiotic use. *Journal of Food Agriculture and Environment*, v.5, n.3-4, p.475, 2007.

Lima Jr, D.M.; Monteiro, P.B.S.; Rangel, A.H.N.; Maciel, M.V.; Oliveira, S.E.O. Sugarcane bagasse in ruminants nutrition. *Revista Verde*, v.5, n.2, p.13 – 20, 2010.

Li, P.; Cai, D.; Luo, Z.; Qin, P.; Chen, C.; Wang, Y.; ... & Tan, T. Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production. *Bioresource Technology*, v.206, p.86-92, 2016.

Liu, X.; & Kokare, C. Microbial enzymes of use in industry. *In Biotechnology of Microbial Enzymes*, p.267-298, 2017.

Machín-Ramírez, C.; Morales, D.; Martínez-Morales, F.; Okoh, A. I.; & Trejo-Hernández, M. R. Benzo [a] pyrene removal by axenic-and co-cultures of some bacterial and fungal strains. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.64, n.7, p.538-544, 2010.

Maeda, R. N.; Serpa, V. I.; Rocha, V. A. L.; Mesquita, R. A. A.; Santa Anna, L. M. M.; De Castro, A. M.; ... & Polikarpov, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. *Process Biochemistry*, v.46, n.5, p.196-1201, 2011.

Marino, C. T.; & de Medeiros, S. R. Aditivos alimentares na nutrição de bovinos de corte. *In Embrapa Gado de Corte-Capítulo em livro científico*, p.97-106, 2015.

Markowiak, P.; & Śliżewska, K. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathogens*, v.10, n.1, p.21, 2018.

Marques, N. P.; de Cassia Pereira, J.; Gomes, E., da Silva, R.; Araújo, A. R.; Ferreira, H.; ... & Bocchini, D. A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, v.122, p.66-75, 2018.

Monteiro, J. B. R.; Silva, D. O.; & De Moraes, C. A. *Trichoderma reesei* and *Rhizopus oligosporus* growth in sugar cane bagasse for protein production. *Revista de Microbiologia*. v.22, n.2, p.164-169, 1991.

Monteiro, V. N.; & do Nascimento Silva, R. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*, v.3, n.5, p.9-23, 2009.

Morais, V. L. M.; Alsina, O. L. S.; & Gomes, W. C. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v.2, n.1, p.27-32, 2007.

Motta, F. L.; Andrade, C. C. P.; & Santana, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass- Techniques, Applications and Commercialization*, v.1, n.10, p.251- 275, 2013.

Mouro, G. F.; Branco, A. F.; Macedo, F. A. F. D.; Guimarães, K. C.; Alcalde, C. R.; Ferreira, R. A.; & Prohmann, P. E. F. Substituição do milho pela farinha de mandioca de varredura em dietas de cabras em lactação: fermentação ruminal e concentrações de ureia plasmática e no leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, n.4, p.1840-1848, 2002.

Muirhead, S. Direct-fed Microbial, Enzyme & Forage Additive *Compendium*. Miller Publishing Company, v.391, p.1- 143, 1998.

Nakanishi, S. C.; Nascimento, V. M.; Rabelo, S. C.; Sampaio, I. L. M.; Junqueira, T. L.; & Rocha, G. J. M. Comparative material balances and preliminary technical analysis of the pilot scale sugarcane bagasse alkaline pretreatment to 2G ethanol production. *Industrial Crops and Products*, v.120, p.187-197, 2018.

Narasimha, G.; Sridevi, A.; Buddolla, V.; Subhosh, C. M.; & Rajasekhar, R. B. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*, v.5, n.5, p.472-476, 2006.

Nascimento, V. M.; Manrich, A.; Tardioli, P. W.; de Campos Giordano, R.; de Moraes Rocha, G. J.; & Giordano, R. D. L. C. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. *Bioethanol*, v.2, n,1, p.112-125, 2016.

Nações Unidas, Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais, Divisão de População (2017). Perspectivas da População Mundial: Revisão de 2017, Principais Conclusões e Tabelas Avançadas. ESA / P / WP / 248.

Newbold, J. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. *In Florida Ruminant Nutrition Symposium* v.16, p.3-17, 1997.

Nimkar, U. Sustainable chemistry: a solution to the textile industry in a developing world. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v.9, p.3-17, 2018.

Noschang, J. P.; Schmidt, A. P.; & Brauner, C. C. *Saccharomyces cerevisiae* na nutrição de ruminantes: *Revisão. PUBVET*, v.13, n.2, p.1-8, 2018.

Oliva-Neto, Pedro de; Shinya, T. Y.; Núñez, E. G. F.; Pagnocca, F.C.; Escaramboni, B. (2019), Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR102019023, título: "Processo de obtenção de leveduras probióticas e enriquecimento nutricional de resíduos para benefício à saúde humana e animal.", Instituição de registro: INPI - *Instituto Nacional da Propriedade Industrial*. Depósito: 01/11/2019

Oliveira, M. R. D. Hemicelulose de fibras de curauá (*Ananas erectifolius*): obtenção e caracterização de películas poliméricas. Mestrado em Integridade de Materiais da Engenharia - Universidade de Brasília, Brasília, p.1-67, 2017.

Oliveira, S. D.; de Araújo Padilha, C. E.; Asevedo, E. A.; Pimentel, V. C.; de Araújo, F. R.; de Macedo, G. R.; & dos Santos, E. S. Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v.6, n.1, p.937-944, 2018.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; & Soccol, V. T. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v.74, n.1, p.69-80, 2000.

Pelizer, L. H.; Pontieri, M. H.; & de Oliveira Moraes, I. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*, v.2, n.1, p.118-127, 2007.

Peñalva, M. A.; & Arst, Jr, H. N. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annual Review Microbiology*, v.58, p.425-451, 2004.

Polizeli, M. L. T. M.; Rizzatti, A. C. S.; Monti, R.; Terenzi, H. F.; Jorge, J. A.; & Amorim, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.67, n.5, p.577-591, 2005.

Pirota, R. D. P. B.; Tonelotto, M.; da Silva Delabona, P.; Tremacoldi, C. R.; & Farinas, C. S. Characterization of fungi isolated from the Amazon region for the potential of biomass-degrading enzymes production. *Ciência Rural*, v.45, n.9, p.1606-1613, 2015.

Ramesh, M. V.; & Lonsane, B. K. Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid-state fermentation system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.33, n.5, p.501-505, 1990.

Reinold, M. R. Manual prático de cervejaria. 1. ed, São Paulo: Aden, p. 21, 1997.

Reis, L. D.; Ritter, C. E. T.; Fontana, R. C.; Camassola, M.; & Dillon, A. J. P. Statistical optimization of mineral salt and urea concentration for cellulase and xylanase production

by *Penicillium echinulatum* in submerged fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.32, n.1, p.13-22, 2015.

Rodríguez-Zúñiga, U. F.; Farinas, C. S.; Bertucci Neto, V.; Couri, S.; & Crestana, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, n.8, p.912-919, 2011.

Saini, J. K.; Saini, R.; & Tewari, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. *3 Biotech*, v.5, n.4, p.337-353, 2015.

Sajith, S.; Priji, P.; Sreedevi, S.; & Benjamin, S. An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *Journal of Nutrition and Food Science*, v.6, n.1, p.461, 2016.

Sales, M. R.; Moura, R. B. D.; Porto, T. S.; Macedo, G. R. D.; & Porto, A. L. F. Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.45, n.11, p.1290-1296, 2010.

Santos, A. V.; Fialho, E. T.; Zangerônimo, M. G.; de Souza Cantarelli, V.; da Silva Teofilo, T.; & Molino, J. P. Aditivos antibiótico, probiótico e prebiótico em rações para leitões desmamados precocemente. *Ciência Animal Brasileira*, v.17, n.1, p.1-10, 2016.

Santos, F. A.; Queiróz, J. D.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M.; & Rezende, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, v.35, n.5, p.1004-1010, 2012.

Sarang, N. R.; Babu, L. K.; Kumar, A.; Pradhan, C. R.; Pati, P. K.; & Mishra, J. P. Effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic, and synbiotic on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Veterinary World*, v.9, n.3, p.313, 2016.

Scot Consultoria. (2019). Carta Insumos - O mercado de polpa cítrica em 2019. Disponível em: <https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/cartas/50825/carta-insumos---o-mercado-de-polpa-citrica-em-2019.htm>. Acesso em fevereiro de 2020.

Shinya, T. Y. (2017). Bioprocessos para produção de biomassa de levedura e enriquecimento nutricional de resíduos agroindustriais. *Tese de doutorado*. Pós-graduação em Microbiologia Aplicada -Universidade Estadual Paulista -UNESP, Assis. p.13-207.

Sivaram, N. M.; Gopal, P. M.; & Barik, D. Toxic waste from textile industries. *Energy from Toxic Organic Waste Heat for Power Generation*, p.43-54, 2018.

Sohail, M.; Siddiqi, R.; Ahmad, A.; & Khan, S. A. Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, v.25, n.6, p.437-441, 2009.

Sternberg, D.; & Dorval, S. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, v.21, n.2, p.181-191, 1979.

Sun, X.; Liu, Z.; Qu, Y.; & Li, X. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* 239-248,146, 119-128, 2007.

Vale, M. D. S.; Abreu, K. D. V.; Gouveia, S. T.; Leitão, R. C.; & Santaella, S. T. Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentosso *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.16, n.3, p.237-244, 2011.

Vandenbergh, L. P.; Soccol, C. R.; Pandey, A.; & Lebeault, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v.74, n.2, p.175-178, 2000.

Vinchira-Villarraga, D. M.; & Moreno-Sarmiento, N. Biological control: Path to modern agriculture. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v.21, n.1, p.2-5, 2019.

Vohra, A.; Syal, P.; & Madan, A. Probiotic yeasts in livestock sector. *Animal Feed Science and Technology*, v.219, p.31-47, 2016.

Wyman, C.; & Yang, B. Cellulosic biomass could help meet California's transportation fuel needs. *California Agriculture*, v.63, n.4, p.185-190, 2009.

Zabed, H.; Sahu, J. N.; Suely, A.; Boyce, A. N.; & Faruq, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.71, p.475-501, 2017.

Capítulo 2: Produção de complexo celulolítico e xilanolítico a partir de resíduos agroindustriais

Joyce Faria de Souza^{1*}, Edson Marcelino Alves², Pedro Oliva Neto² Pedro Elias².

¹ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil; ² Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Assis, São Paulo, Brasil;

RESUMO

A utilização da técnica de delineamento de mistura I-Optimal dos resíduos agroindustriais em cultivo submerso com *Trichoderma reesei* QM 9414, complementada com sais, sacarose e extrato de levedura, foi utilizada para a produção de enzimas fibrolíticas à 28°C por 15 dias visando a otimização da mistura de diferentes resíduos para a produção enzimática. Os resultados demonstraram que a utilização de 100% (m/v) de dreche cervejeiro foi promissora para a produção de celulases totais (0,42 FPU/mL) e para xilanase (39,60 U/mL), assim como a utilização de 33,3% de polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro, a qual foi efetiva para a produção de xilanase (40,2 U/mL). A combinação de 16,67% de farelo de trigo, 16,67% de polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro foi a mais promissora para a produção de endoglucanase (2,03 U/mL), exoglucanase (3,20 U/mL) e β - glicosidase (0,12 U/mL). O estudo quanto à demanda dos minerais, sacarose e extrato de levedura (como fonte vitamínica e aminoacídica) revelaram que 0,1% de extrato de levedura, 0,11% de fosfato de potássio dibásico, 0,0028% de zinco e 1% de sacarose em 12 dias de cultivo foram suficientes para maximizar a produção de celulases, pois nestas condições foi possível aumentar a produção de celulase em 2,38 vezes (1,0 FPU/mL) comparado ao cultivo inicial (0,42 FPU/mL). Por outro lado, para maximizar a produção fúngica de xilanases necessita-se de maior riqueza dos nutrientes, no caso a composição dos seis sais, sacarose (1%) e extrato de levedura (0,1%), além da combinação dos resíduos 33,3% de polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro (40,2 U/mL). A utilização de 0,01% de tween 80 com polpa cítrica no meio de cultivo manteve a mesma produção de celulase total (0,40 FPU/mL) comparado ao obtido no delineamento com dreche cervejeiro sem tween 80, contudo reduziu substancialmente (de 15 para 9 dias) o tempo de cultivo. No entanto, a utilização de tween 80 no meio de cultivo inibiu drasticamente a produção fúngica de xilanases (2,96 U/mL).

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais, cultivo submersa, *Trichoderma reesei* QM 9414, celulases e xilanase.

1. Introdução

De acordo com os dados das [Nações Unidas \(2017\)](#), estima-se que a população mundial alcançará 8,5 bilhões até 2030. Esse crescimento populacional induz a um aumento no consumo de recursos naturais e, por sua vez, um aumento também da produção de resíduos agroindustriais. A reutilização dos resíduos é uma opção para reduzir a poluição do meio ambiente e agregar valor ao material.

Os principais resíduos agroindustriais no Brasil são farelo de trigo, palha de cana de açúcar, bagaço de mandioca, polpa cítrica, dreche cervejeiro, entre diversos outros. O dreche cervejeiro é conhecido também por bagaço de malte, bagaço cervejeiro ou dreche cervejeiro. Para cada 100 litros de cerveja produzida, 20 kg de dreche cervejeiro são gerados ([Reinold, 1997](#)). Considerando a produção anual de 14 bilhões de litros de cerveja, pode-se estimar uma geração de 2,8 milhões de toneladas de dreche anualmente ([CervBrasil, 2016](#)). O dreche é considerado um material proteico por apresentar cerca de 20% de proteína e 18% de fibras brutas. A composição nutricional varia conforme o processo utilizado pela fábrica e origem dos produtos adicionados ([Velasco *et al.*, 2009](#)).

O bagaço de laranja é um resíduo fibroso chamado também de polpa cítrica, representa cerca de 50% da fruta processada, composta por casca, semente e polpa. A utilização desses resíduos é uma alternativa para agregar valor ao material rico em fibras, tornando o bioprocessamento mais viável quanto aos custos de produção ([Tasic *et al.*, 2017](#)).

Os resíduos lignocelulósicos possuem uma rica composição bioquímica, alto potencial para geração de energia, além de não interferir na produção de alimentos ([Limayem e Ricke, 2012](#); [Reddy e Yang, 2005](#)). Tais resíduos são uma opção para a produção de etanol de segunda geração.

A utilização do bagaço de laranja se mostrou promissora para a produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas ([Cypriano *et al.*, 2017](#)). Os resíduos dreche cervejeiro e polpa cítrica também são utilizados como alimento para gado de leite por apresentarem alto valor nutricional boa digestibilidade e degradabilidade ([Velasco *et al.*, 2009](#); [Porcionato *et al.*, 2004](#)).

O Brasil em conjunto com os Estados Unidos representa os países que mais investem na produção de bioetanol, ambos somam 70% da produção mundial ([Dufey, e Grieg-Gran, 2006](#); [Spyridon *et al.*, 2016](#)). Os investimentos em etanol de segunda geração crescem assim como os estudos para a otimização do processo.

No entanto, mesmo sendo muito promissora a produção de etanol de segunda geração, ela ainda é limitada pelo alto custo da produção de enzimas celulolíticas. Estas consistem num complexo enzimático que englobam as exoglucanases, endoglucanases e β -glicosidases. A atuação sinérgica das celulases degrada polímeros de celulose presente no material de origem vegetal para a liberação de açúcares fermentescíveis que podem ser convertidos em etanol (Devi e Kumar, 2012)

Diversas empresas estão investindo neste seguimento, assim como as empresas Danisco/DuPont (Dinamarca), Basf (Alemanha), Genecor (EUA), Roche (Suíça), Novozymes, entre outras. Em especial, as celulases devido ao seu amplo espectro de aplicação englobam o segundo lugar quanto ao interesse industrial, estando diretamente relacionada a viabilidade da produção de etanol de segunda geração. O custo da enzima pode alcançar 48% do preço mínimo de venda do etanol celulósico (Liu *et al.*, 2016). A redução dos custos de produção é uma alternativa para apoiar o desenvolvimento futuro das biorrefinarias e produção viável de etanol de segunda geração, que depende não apenas das grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos gerados anualmente, mas também dos custos de produção das enzimas celulolíticas (Reddy e Yang, 2005).

Assim, este trabalho busca desenvolver um bioprocesso de baixo custo, através do uso de resíduos, o que poderá implicar na produção de enzimas fibrolíticas com custos mais baixos, fornecendo avanços para as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de etanol de segunda geração e outros mercados importantes para o Brasil, tais como a produção animal.

2. Materiais e métodos

De modo a otimizar um bioprocesso para produção de enzimas celulases e xilanases, estudos foram realizados em cinco etapas: preparação do inóculo do microrganismo, preparação de um delineamento experimental para estudo das fermentações, etapa de fermentação, etapa de extração e análises enzimáticas. Foram realizados dois estudos adicionais: relacionados a influência de diferentes concentrações de Tween 80 para a produção enzimática e um estudo sobre a influência dos sais minerais, sacarose e extrato de levedura para a produção de celulases e xilanases, seguida de um teste de cultivo com os quatro nutrientes mais promissores.

2.1 Preparação do inóculo

O inóculo para os cultivos foram preparados utilizando o fungo da linhagem *Trichoderma reesei* QM 9414 em placas de petri contendo 30 mL de meio BDA (39 g/L – Batata Dextrose Ágar - Difco, Detroit, EUA) incubados por cinco dias (120 horas) a 28°C de modo a produzir esporos. O inóculo consistiu na transferência de um círculo de 10 mm de diâmetro de BDA contendo o fungo *T. reesei* QM 9414. A cultura foi mantida em óleo mineral e em meio BDA para preservação. Antes de cada fermentação foi realizado dois repiques em meio BDA para ativação do fungo.

2.2 Delineamento experimental aplicado para otimização da mistura de resíduos agroindustriais utilizados no meio de cultivo de *T. reesei*

Os resíduos agrícolas polpa cítrica (Citrovita Agroindústria, Catanduva-SP), farelo de trigo (Moinho Nacional, Assis - SP) e dreche cervejeiro (Cervejaria Malta, Assis - SP) foram utilizados de modo a selecionar a combinação de substratos mais adequada para a produção de celulases e xilanases. Os resíduos foram triturados previamente em triturador industrial (SPL-048, Spolu, Itajobi, Brasil) e, em seguida, peneirados de modo que a granulometria das partículas selecionadas para o experimento fosse inferior a 1 mm reduzindo as variações causadas por falta de homogeneidade dos substratos e facilitando o acesso dos microrganismos aos nutrientes. Em seguida, realizou-se um delineamento de misturas do tipo I-Optimal com número de combinações experimentais suficientes para ajustar um modelo para determinação da influência das proporções de três substratos na produção das enzimas. A modelagem e a otimização estatística foram executadas no software Design-Expert versão 10 (Design-Expert®, StatEase Inc. Minneapolis, EUA)

com 5% de significância, tendo como variáveis de resposta as atividades enzimáticas de xilanases (U/mL), celulase total (FPU/mL), endoglucanase (U/mL), exoglucanase (U/mL) e β -glicosidase (U/mL).

2.3 Ensaio de cultivos com *T. reesei* QM 9414

Os meios fermentativos foram preparados em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de água e combinações de substratos de acordo com delineamento experimental do item 2.2. Um conjunto de sais, sacarose e extrato de levedura, previamente estudados no laboratório, foram utilizados para suplementar o meio de fermentação submersa (Formulação básica de sais: 0,11% de K_2HPO_4 , 0,1% de $(NH_4)SO_4$, 0,0017% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0028% de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% $NH_4H_2PO_4$, 0,06 % KCl e suplementado com 1% de sacarose e 0,1% de extrato de levedura). Em seguida, os meios foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos com posteriormente inoculação do microrganismo de acordo com o item 2.1. Os cultivos ocorreram em shaker a 28 °C, 150 rpm por 360h (15 dias). Após o período de fermentação, o extrato enzimático foi obtido através de filtração em papel filtro para retirada de substratos não fermentados e micélio do fungo. O extrato foi centrifugado a 5000 rpm (956xG) por 10 minutos (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Osterode am Harz, Germany) e armazenado em freezer a -18 °C durante o processo de análise. Um volume de 60 a 70 mL foi extraído.

2.4 Efeito de novas formulações de nutrientes e surfactante Tween 80 na produção de xilanases e celulasas

Estudos adicionais ao delineamento experimental de misturas foram realizados com tween 80 e com os nutrientes (sais, sacarose e extrato de levedura), com intuito de observar a influência na produção enzimática.

Foi utilizado tween 80 nas concentrações de 0,01%, 0,05% e 0,1% para o cultivo realizado com 10% de dreche cervejeiro, sais, sacarose e extrato de levedura de acordo com a formulação básica. Testes com o tween 80 também foram realizados com 3% de polpa cítrica. Os cultivos foram realizados a 28°C, 150 rpm em 15 dias, com retiradas de amostras durante este período. Análises de atividade enzimática foram realizadas após o cultivo.

O estudo sobre a influência dos sais, sacarose e extrato de levedura sobre a produção de celulasas e xilanases foram realizados em cultivos individuais, com cada nutriente específico em conjunto ao dreche cervejeiro para realização do cultivo em 28°C,

150 rpm por 15 dias. Amostras foram retiradas ao longo do cultivo. Os oito nutrientes foram testados nesta etapa.

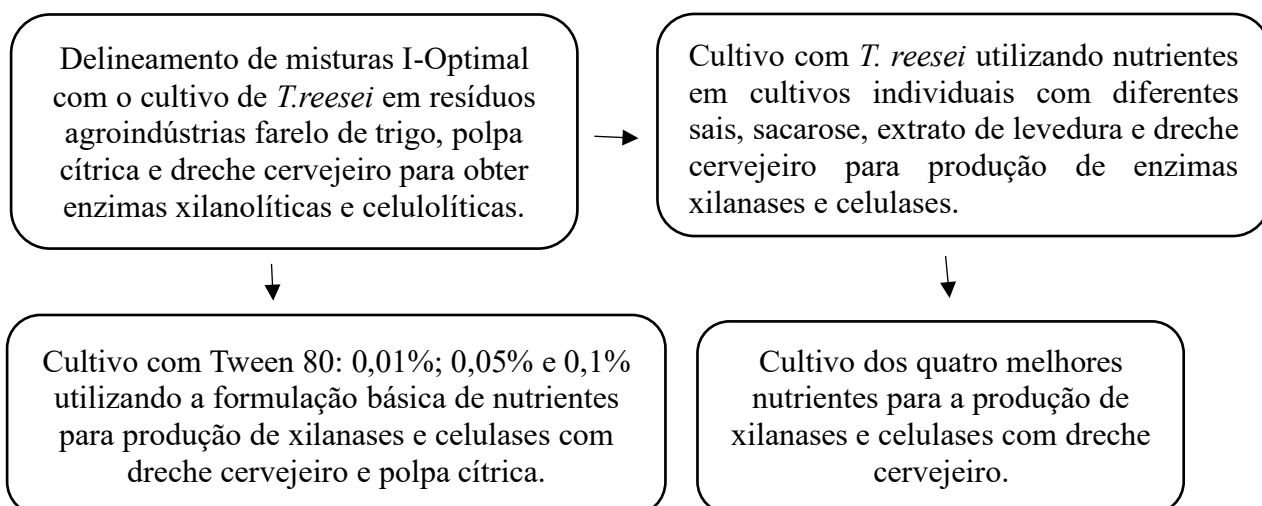
2.5 Ensaios enzimáticos

As atividades de celulase total, endoglucanase e exoglucanase dos extratos obtidos foram determinadas pela medida de absorbância a 540 nm para a estimativa de açúcares redutores (especialmente glicose) liberados na hidrólise de celulose, carboximetilcelulose (CMC) e avicel (celulose microcristalina) respectivamente pelas citadas enzimas, conforme descrito por Ghose (1987). O açúcar redutor liberado foi quantificado pelo método de Miller (1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de glicose.

A atividade xilanolítica foi realizada com substrato xilana Birchwood 0,5% (Sigma Aldrich) em tampão acetato pH 5,0 conforme descrito por Bailey *et al.*, (1992). O método de ácido-3,5-dinitrossalicílico (Miller, 1959) foi utilizado para quantificação de açúcar redutor liberado a partir da xilana. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzimas necessárias para liberar 1 μmol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de xilose.

A atividade de β -glicosidase foi realizada utilizando p-nitrofenil β -D-glucopironosideo (PNPG) como substrato, o qual é hidrolisado pela enzima em p-nitrofenil e D-glicose conforme descrito por Grover *et al.*, (1977). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para formar um micromol de p-nitrofenil por minuto nas condições descritas.

As atividades desenvolvidas nesta pesquisa estão representadas no esquema abaixo.



3. Resultados

3.1. Delineamento experimental de mistura de resíduos agroindústrias para otimização da produção de enzimas

A Tabela 1 apresenta a matriz experimental de composição dos meios fermentativos bem como os resultados das variáveis de saída para cada enzima estudada.

Tabela 1. Matriz experimental e respostas observadas a partir da mistura dos resíduos agroindústrias para otimização da produção de xilanases e celulasas.

Amostras	Fatores variáveis			Xilanase	Endo-glucanase	Exo-glucanase	β -glicosidase	Celulase Total
	A %	B %	C %	U/mL	U/mL	U/mL	U/mL	FPU/ml
1	0,00	66,67	33,33	14,22	0,050	2,381	0,0490	0,230
2	0,00	100,0	0,00	1,79	0,025	0,900	0,0135	0,096
3	66,67	33,33	0,00	12,71	0,030	1,777	0,0362	0,235
4	66,67	0,00	33,33	28,69	0,377	2,218	0,0785	0,360
5	0,00	0,00	100	39,60	1,127	2,634	0,077	0,427
6	16,67	16,67	66,70	30,70	2,030	3,202	0,1266	0,395
7	33,33	66,67	0,00	7,41	0,010	1,294	0,0160	0,000
8	66,67	16,67	16,7	20,32	0,438	2,452	0,0708	0,234
9	100,0	0,00	0,00	19,69	0,701	2,888	0,0595	0,271
10	33,33	0,00	66,7	36,31	1,092	2,381	0,1008	0,400
11	16,67	66,67	16,7	10,42	0,060	1,275	0,0347	0,133
12	100,0	0,00	0,00	21,67	1,432	2,599	0,0635	0,315
13	0,00	33,33	66,7	40,20	1,412	2,563	0,1061	0,387
14	0,00	100,00	0,00	2,66	0,025	1,346	0,0144	0,070
15	66,67	33,33	0,00	7,43	0,035	1,701	0,0238	0,205
16	0,00	0,00	100	33,21	0,955	2,523	0,0687	0,341
17	33,33	33,33	33,33	23,27	0,742	2,340	0,0766	0,334

A – Farelo de trigo; B – Polpa cítrica; C – Dreche cervejeiro. As replicadas estão presentes no próprio delineamento.

Como observado na Tabela 1, as respostas para as atividades enzimáticas variaram em diferentes intervalos numéricos. Geralmente, quando a razão entre o valor máximo e o valor mínimo é maior que 10, uma transformação dos dados de respostas é necessária para melhores ajustes do modelo. Transformações nesses dados foram realizadas de acordo com a necessidade e a modelagem matemática para cada enzima foi realizada priorizando os modelos que maximizavam os valores de "R² Ajustado" e o "R² Predito". A Tabela 2 apresenta um resumo das transformações utilizadas, o modelo ajustado que melhor se adequou a cada respostas bem como os dados estatísticos de R² e análise de precisão dos modelos modificados, que considera apenas os termos significativos. As

equações finais em termos dos fatores reais apenas para os termos significativos de cada modelo modificado também são apresentadas (Eq. 1, 2, 3, 4 e 5).

Tabela 2. Dados estatísticos dos modelos obtidos para cada atividade enzimática estudada (U/mL).

Enzima (U/mL)	Transformação	Modelo Ajustado	R ²	Precisão	Valor-F	p-valor
Xilanase	raiz quadrada	quadrático	0,9689	31,04	118,78	<0,0001
Endoglucanase	raiz cúbica	cúbico	0,9758	16,30	31,30	<0,0001
Exoglucanase	raiz quadrada	especial quártico	0,9580	17,13	29,36	<0,0001
β-glicosidase	raiz cúbica	cúbico	0,9527	20,29	44,36	<0,0001
Celulase total	raiz cúbica	cúbico	0,9622	14,10	16,93	<0,0002

S: Significativo; NS: Não significativo.

A transformação cúbica para endoglucanase alcança o valor de R² de 0,9758, caso o modelo quadrático fosse escolhido teríamos R² de 0,7689. A exoglucanase em modelo quadrático apresenta R² de 0,8533. A β-glicosidase apresenta R² de 0,9316 para o modelo quadrático e a celulase total R² de 0,8395.

A análise de precisão mede a relação sinal-ruído, ou seja, compara o intervalo dos valores previstos nos pontos de design com o erro médio de previsão. Razões maiores que 4 são desejadas, indicam precisão adequada do modelo e permitem que a equação encontrada seja utilizada para navegar no espaço de design, todos os modelos apresentaram razões adequadas. Valores de p inferiores a 0,050 indicam que os termos do modelo são significativos.

$$\sqrt{Xilanase \left(\frac{U}{mL} \right)} = 4,51116A + 1,40070B + 6,39100C + 5,03588BC \quad (\text{Eq. 1})$$

$$3\sqrt{Endoglucanase \left(\frac{U}{mL} \right)} = 1,01730A + 0,161040B + 1,02167C - 2,03860AB - 0,796406AC + 0,493926BC + 11,52664ABC - 2,59356AC(A - C) - 4,74440BC(B - C) \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Exoglucanase \left(\frac{U}{mL} \right) = 2,74A + 1,15B + 2,56C - 1,85AB - 1,38AC + 2,77BC - 52,57AB^2C + 74,99ABC^2 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\beta - glicosidase \left(\frac{U}{mL} \right) = 0,231732A + 0,106556B + 0,267023C + 0,257889AC + 0,420367BC - 0,439037 BC(B - C) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$Celulase total \left(\frac{U}{mL} \right) = 0,2336A + 0,0768B + 0,2941C + 0,0473AB + 0,5781AC + 0,4859BC + 0,7427AB(A - B) - 0,7983AC(A - C) \quad (\text{Eq. 5})$$

Nesse caso, a equação em termos de fatores reais pode ser usada para fazer previsões sobre a resposta para determinados níveis de cada fator. Como observado, o componente C (dreche cervejeiro) e a combinação BC (polpa cítrica / dreche cervejeiro) apresentam o maior impacto na produção da enzima xilanase.

Os gráficos de traços e de superfície 3D foram utilizados para comparar os efeitos de todos os componentes no espaço de design (Figuras 1a e Figura 1b). Por meio deles é possível visualizar o quão sensível é a resposta ao desvio da formulação próxima da mistura de referência para cada modelagem.

Figura 1a. Otimização da produção de xilanases e β -glicosidase utilizando o *T. reesei* QM 9414 através da mistura de resíduos agroindustriais farelo de trigo (A), polpa cítrica (B) e dreche cervejeiro (C) no meio de cultura em cultivo submerso a 28°C por 15 dias.

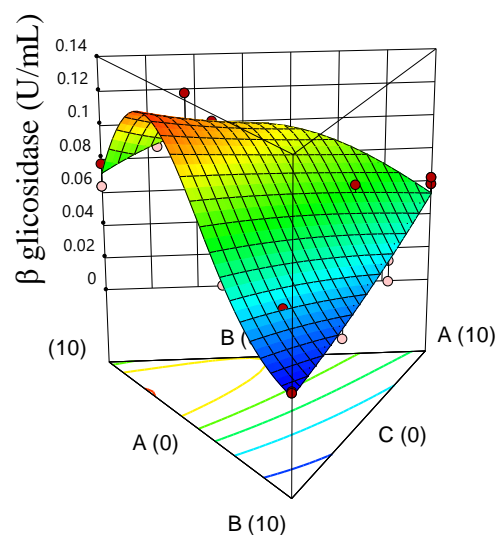
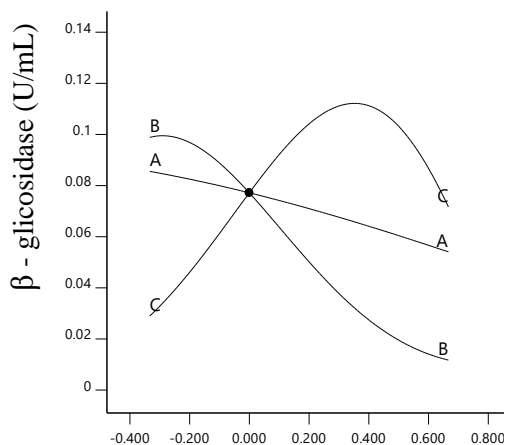
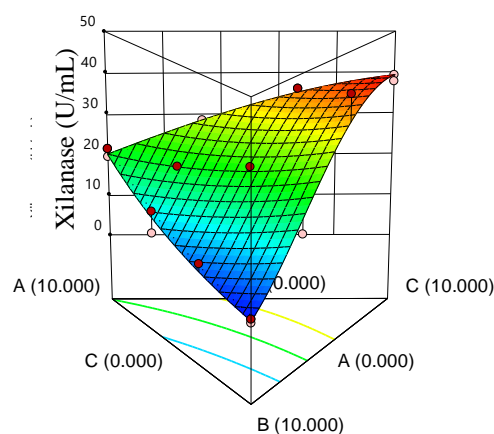
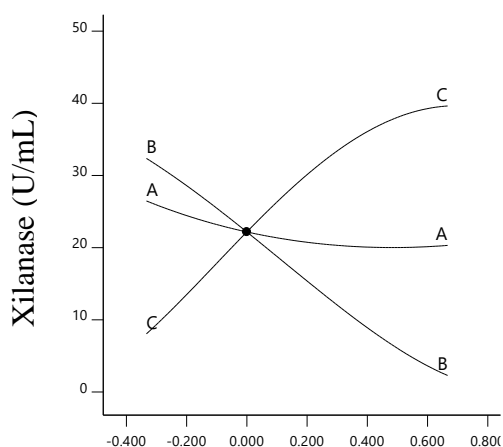
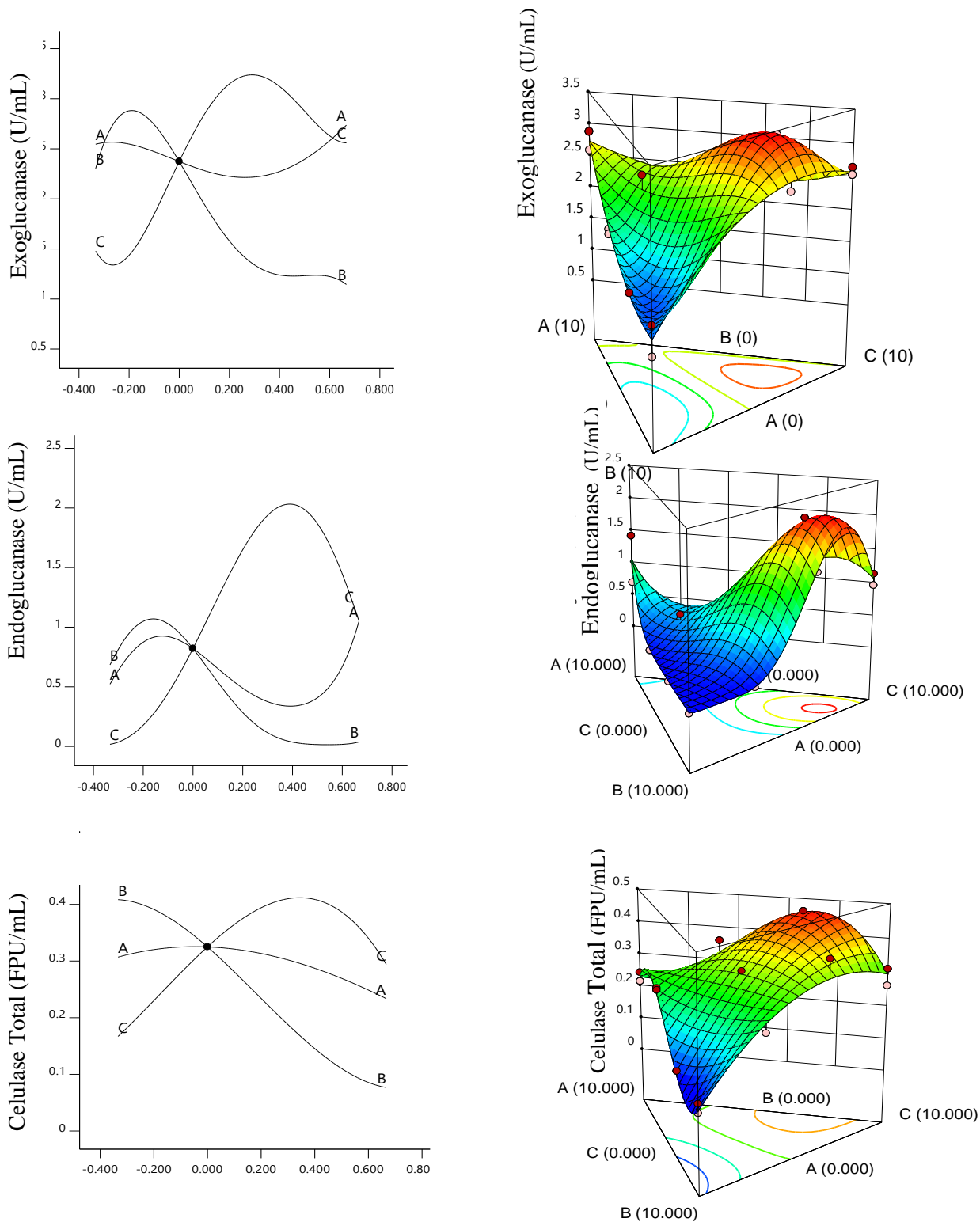


Figura 1b. Otimização da produção de exoglucanase, endoglucanase e celulase total de *T. reesei* QM 9414 através da mistura de resíduos agroindustriais farelo de trigo (A), polpa cítrica (B) e dreche cervejeiro (C) no meio de cultura em cultivo submerso a 28°C por 15 dias.



O eixo x da plotagem é em unidades codificada e mostra a posição relativa à escala codificada (0 a 1 para misturas) e Superfície 3D localizada ao lado direito para a produção de xilanase, endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase e celulase total.

A partir da Figura 1a e 1b é possível observar que o dreche cervejeiro, representado pela letra C no gráfico de traços, é bom para a produção enzimática, demonstrando que possui uma concentração ótima do resíduo para a maior produção enzimática, apresentando uma pequena inibição da produção de endoglucanase, exoglucanase, β -glicosidase e celulase total quando em grandes quantidades (gráfico de traços e 3D). A polpa cítrica representada no gráfico de traços pela letra B, é um bom resíduo para produção de todas as enzimas quando utilizada em pequenas quantidades, havendo inibição da produção enzimática com o aumento da concentração de polpa cítrica. O farelo de trigo, representado pela letra A, foi o resíduo que menos influenciou a produção enzimática, demonstrando estabilidade na produção independente da concentração desse resíduo para as enzimas: xilanase, β -glicosidase exoglucanase e celulase total, demonstrando maior oscilação apenas na produção de endoglucanase.

3.2. Validação dos modelos obtidos através do delineamento experimental de mistura para os diferentes resíduos agroindustriais

A validação dos modelos estudados foi realizada utilizando 6,0% de farelo 13,30% de polpa cítrica e 79,70% de dreche cervejeiro conforme sugerido pelo programa. A verificação mostrou que o modelo apresenta um ajuste adequado quanto a produção de xilanase e exoglucanase que ficam dentro do intervalo de confiança, as demais enzimas apresentaram erro significativo quanto ao previsto no modelo. A Tabela 3 apresenta os resultados da validação dos modelos obtidos pelo programa.

Tabela 3. Validação dos modelos obtidos por meio do delineamento experimental de misturas para as atividades enzimáticas.

Respostas (U/mL)	Média predita	Mediana predita	Observado	Desvio Padrão	95% baixo	95% alto
Xilanase	37,712	37,6022	38,012	4,06688	28,648	47,7721
Endoglucanase	2,01526	2,00288	0,12	0,315473	1,22659	2,96853
Exoglucanase	2,97196	2,97196	2,548	0,176524	2,51809	3,42583
β - glicosidase	0,111474	0,111474	0	0,00977	0,0798	0,147154
Celulase	0,0376447	0,0376447	0,26	0,003977	0,2763	0,476549

Observou-se por meio dos gráficos de traços, o grande potencial da polpa cítrica quando utilizado em poucas quantidades e do dreche cervejeiro quando em maior proporção. A partir desses resultados buscou-se utilizar estratégias diferentes, tais como a utilização de surfactante Tween 80, e destrinchar a influência dos sais minerais, sacarose e extrato de levedura para o resíduo com maior potencial de produção (dreche cervejeiro), com o intuito de aumentar a produção enzimática e reduzir o tempo de cultivo.

3.3. Tween 80 para otimização enzimática

A busca por aumento da produção enzimática visa em sua maioria favorecer as melhores condições de desenvolvimento do microrganismo como o fornecimento de substratos, umidade, pH, suplementação do meio com sais, extrato de levedura entre outras condições. O tween 80 é um surfactante sintético não iônico que está se mostrando relevante ao auxiliar na maior secreção enzimática por microrganismos. A Tabela 4 apresenta autores que utilizaram o surfactante tween 80, assim como suas respectivas concentrações e enzimas otimizadas.

Tabela 4. Produção de enzimas da literatura utilizando tween 80.

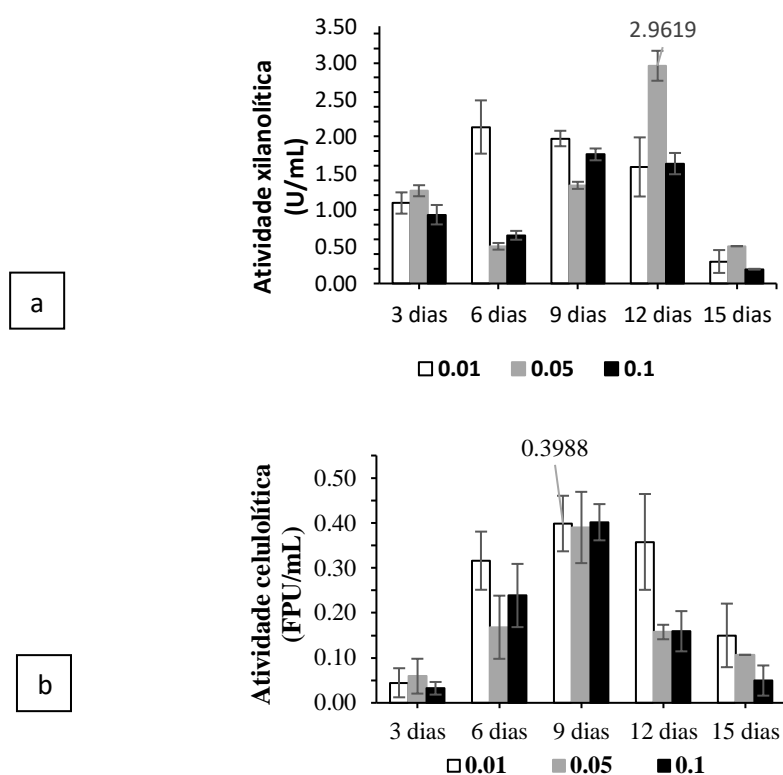
Referências	Concentração de tween 80 estudada	Microrganismo	Enzima estudada	Melhor
Giese <i>et al.</i> , (2004)	0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 g/L	<i>Botryosphaeria sp</i>	Lacases	1,5 e 0,25g/L
Reese e Maguire, (1969)	0,05 a 0,2%	<i>Trichoderma viride QM6a, T. viride QM2940</i>	Celulase, β -glicosidase	0,1%
Asther <i>et al.</i> , (1987)	0,05% (p / v)	<i>Phanerochaete chrysosporium INA-12</i>	Ligninase	0,04%
Long e Knapp, (1991)	0,06 g/L	<i>Coprinus cinereus</i>	Celulases e xilanase	0,06 g/L
Domingues <i>et al.</i> , (2000)	0,5 g / L	<i>Trichoderma reesei Rut C-30</i>	Celulases	0,5 g /L
Zeng <i>et al.</i> , (2006)	0,05% e 0,15%	<i>Penicillium simplicissimum</i>	CMCase e xilanase	0,15% e 0,05%
Liu <i>et al.</i> , (2006)	0,05% e 0,15%	<i>Trichoderma viride</i>	Celulase e xilanase	0,15%

O mecanismo metabólico envolvido ainda não é completamente conhecido. Estudos demonstraram maior efetividade do tween 80 em relação aos outros tipos de tween 60, 40 e 20 (Giese *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Reese e Maguire, 1969). Os surfactantes foram estudados em diferentes concentrações demonstrando inibição em

grandes quantidades. As concentrações selecionadas para o estudo foram 0,1%, 0,05% e 0,01% (Reese e Maguire, 1969).

A Figura 2 apresenta a influência da utilização de tween 80 para os cultivos com polpa cítrica durante 15 dias.

Figura 2. Cultivo com diferentes concentrações de tween 80 para a atividade de celulase total (a) e xilanase (b) utilizando *T. reesei* e 3% de polpa cítrica em cultivo submerso a 28°C e 150 rpm até 15 dias.



O cultivo com o surfactante em 0,01% demonstrou uma aceleração na produção enzimática levando 9 dias para alcançar valores de 0,4 FPU/mL \pm 0,06 (2,4 FPU/g) para celulase. A produção de xilanase alcançou seu máximo de 2,9 U/ mL (17,4 U/g) em 12 dias com tween 80 a 0,05%. A produção xilanolítica foi baixa comparada a otimização anterior realizada sem tween 80 (40,2 U/mL), indicando que o tween 80 não foi favorável para as enzimas xilanolíticas. Esperava-se um aumento da mobilidade enzimática, mas alguma dinâmica deve estar sendo inibida.

Long e Knapp (1991) utilizando 0,006 % de tween não observaram efeito sobre as xilanases quando comparado ao controle, estratégia que não se mostrou eficaz para otimização de xilanases também no presente trabalho.

Os autores Liu *et al.*, (2006) utilizaram 0,05% e 0,15% de tween 80 e ramnolipídeos. As porcentagens de degradação via enzimática entre eles foram similares, considerando apenas o tween 80, a melhor concentração foi 0,15%, apresentando uma taxa de degradação de 14,4% para celulose e 7,3% para hemicelulose, maior do que o controle sem surfactante, justificando o aumento da produção de celulases.

O cultivo com tween 80 utilizando dreche cervejeiro inibiu a produção de celulases e xilanases, apresentando todos os resultados muito próximos de zero.

3.4. Influência dos sais minerais, sacarose e extrato de levedura na formulação do meio de cultivo de *T. reesei* para produção das enzimas celulases e xilanases

Com intuito de melhorar a produção e a produtividade da biossíntese das enzimas pelo fungo *T. reesei* e reduzir a quantidade de nutrientes utilizados, foram realizados estudos com os sais, extrato de levedura e sacarose formulados no meio de cultivo de forma individual.

A produção de xilanase utilizando cultivos com cada sal mineral, extrato de levedura e sacarose além do resíduo dreche cervejeiro está representada na Figura 3. Os cultivos com estes nutrientes demonstraram a importância de cada um para a produção enzimática. As xilanases alcançaram maior produção quando em contato com zinco 21,8 U/mL (0,0028% de ZnSO₄), extrato de levedura 21,4 U/mL (0,1%), magnésio 20,4 U/mL (0,0017% de MgSO₄) e sulfato de amônio 20,1 U/mL (0,1% de NH₄SO₄) com 12 dias de cultivo. Os resultados foram três vezes superiores ao controle sem sal (Sem sal), quando comparados com zinco e magnésio.

A Figura 4 apresenta a influência dos nutrientes nos cultivos para a produção de celulase total. Os nutrientes que apresentaram maior influência sobre a produção de celulases totais foram extrato de levedura com 0,27 FPU/mL (0,1%), fosfato de potássio dibásico (0,11% de K₂HPO₄) com 0,25 FPU/mL, zinco com 0,22 FPU/mL (0,0028% de ZnSO₄) e 1% de sacarose 0,20 FPU/mL.

A influência dos nutrientes não se mostrou significativa para as exoglucanases quando comparada ao controle com 12 e 15 dias. As endoglucanases apresentaram maior

atividade quando fermentadas com sulfato de amônio 0,85 U/mL, fosfato de potássio 1,0 U/mL, magnésio 0,87 U/mL, fosfato de amônio monobásico 0,85 U/mL e extrato de levedura 0,78 U/mL. A produção de exoglucanase e endoglucanase estão representadas na Figura 5 e Figura 6. [Narasimha et al., \(2006\)](#) observaram 0,52 U/mL para endoglucanase utilizando extrato de levedura, resultado inferior ao obtido no atual estudo. Os autores encontraram maiores resultados com a utilização de ureia 0,82 U/mL como fonte de nitrogênio para endoglucanase ([Narasimha et al., 2006](#)).

Relatos da literatura indicam aumento da produção enzimática quando os meios são suplementados com carboidratos simples, como sacarose ([Delabona et al., 2012](#)). A sacarose exibe potencial na otimização da produção de celulases, demonstrando ser um indutor da expressão do gene das celulases ([Seiboth et al., 1997](#); [Silva et al., 2018](#)). [Chandra et al., \(2007\)](#) observaram aumento rápido da biomassa devido a adição de sacarose, açúcar de fácil absorção em conjunto a maior secreção enzimática pela presença de celulose. [Silva et al., \(2018\)](#) utilizando polpa cítrica e sacarose alcançaram $0,85 \pm 0,07$ FPU/mL de celulase total em 10 dias de cultivo submerso, aumentando em 48,1 % a produção de celulases devido a presença de sacarose em comparação com a cultura sem este açúcar. Os autores também encontraram valores superiores durante a utilização em biorreator do tipo tanque com $1,76 \pm 0,00$ FPU/mL utilizando-se *T. reesei* ([Silva et al., 2018](#)). [Delabona et al., \(2012\)](#) com *Trichoderma harzianum* obtiveram 1,21 FPU/mL usando bagaço pré-tratado, deslignificado com NaOH e sacarose em biorreator de tanque agitado. [Narasimha et al., \(2006\)](#) para otimizar a produção de celulase total, estudaram cultivos com os açúcares: glicose (0,154 FPU/mL), celulose (1,63 FPU/mL), carboximetilcelulose (1,64 FPU/mL) e celobiose (1,02 FPU/mL), encontrando valores interessantes para glicose, celulose e carboximetilcelulose. Pesquisas também relatam que uma concentração elevada de açúcares pode inibir o metabolismo fúngico e, conseqüentemente, a produção enzimática ([Rodríguez-Zúñiga et al., 2011](#); [Seiboth et al., 1997](#)).

O extrato de levedura surge como uma fonte de nitrogênio e vitaminas para o cultivo. [Narasimha et al., \(2006\)](#) demonstraram as diferenças da adição de ureia (1,68 FPU/mL), peptona (1,21 FPU/mL), nitrato de sódio (1,12 FPU/mL) e extrato de levedura (0,52 FPU/mL) na produção de enzimas celulolíticas por *A. niger*, sendo o extrato de levedura um dos menos eficientes. O sulfato de amônio também se mostrou promissor quanto a produção de xilanases na atual pesquisa.

A utilização de íons metálicos essenciais como magnésio, zinco, ferro, manganês, dentre outros, está relacionada a ativação do metabolismo fúngico, se mostrando essencial para otimização da produção enzimática (Vale *et al.*, 2011). Os microrganismos requerem concentrações diferentes dos minerais exibindo toxicidade, quando estão em quantidades superiores as toleradas, inibindo seu crescimento (Fomina e Karl, 2003; Duruibe *et al.*, 2007). O zinco, de acordo com Babich e Stotzky, (1978) está ligado a integridade dos ribossomos, membranas biológicas e crescimento fúngico. A produção de celulases se mostrou eficiente quanto a utilização do mineral zinco, mas não de magnésio, ao contrário da xilanase que aproveitou os dois minerais para a produção enzimática.

Rodríguez-Zúñiga *et al.* (2011) compararam quatro meios fermentativos diferentes e constataram que o melhor indutor de atividade enzimática foi o meio de Mandels & Weber modificado, com acréscimo de carboximetilcelulose obtendo-se 0,4 U/g para celulase total e 13 U/g para endoglucanase. O meio Mandels & Weber possui ureia, peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio e outros minerais. O cultivo utilizando a sacarose não se mostrou eficiente, assim como o meio Czapeck Dox composto por carboximetilcelulose, nitrato de sódio, sacarose e outros minerais (Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2011). Dentre as fontes de nitrogênio estudadas, o trabalho atual encontrou o extrato de levedura como mais promissor para a otimização de celulase total, além de sacarose, nas concentrações utilizadas às quais se mostraram favoráveis.

Figura 3. Cultivo submerso de *T. reesei* com sais, extrato de levedura e sacarose em diferentes tempos para produção de xilanases a 28°C e 150 rpm por até 15 dias.

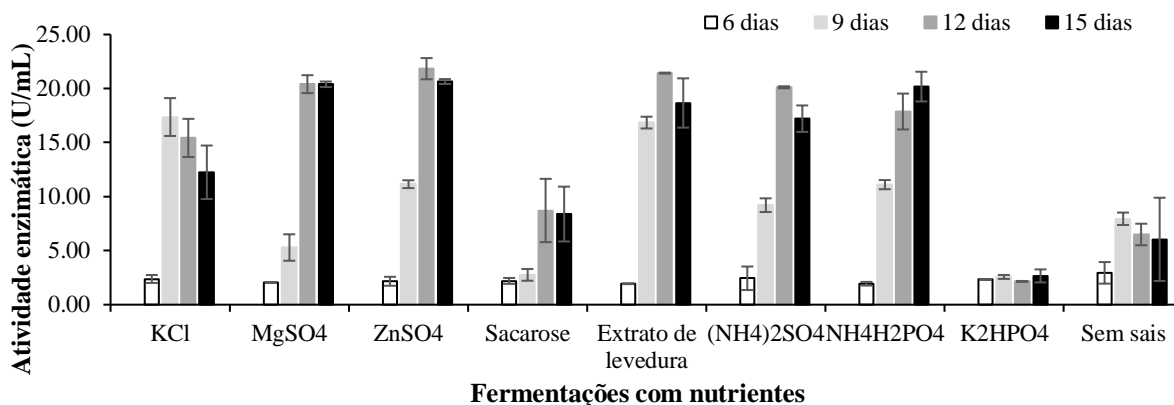


Figura 4. Cultivo submerso de *T. reesei* com sais, extrato de levedura e sacarose em diferentes tempos para produção de celulasas a 28°C e 150 rpm por até 15 dias.

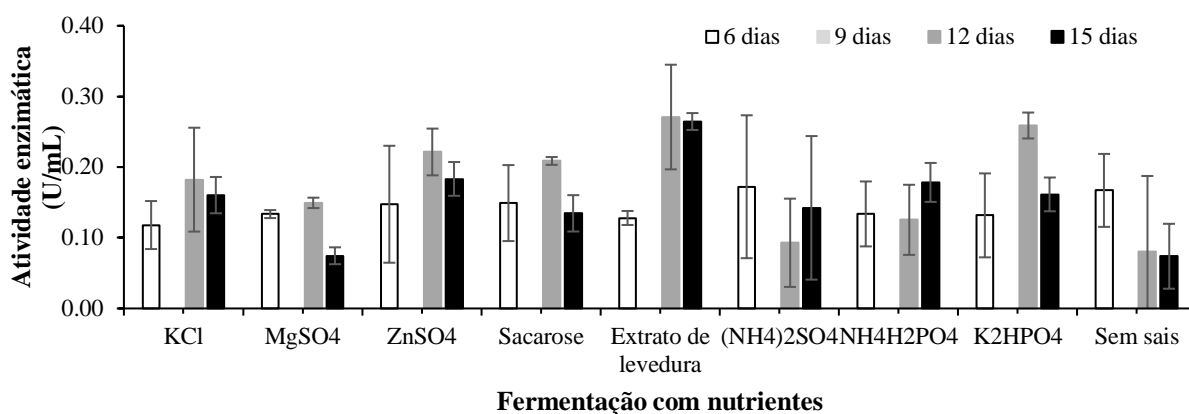


Figura 5. Cultivo submerso de *T. reesei* com sais, extrato de levedura e sacarose em diferentes tempos para produção de exoglucanase a 28°C e 150 rpm por até 15 dias.

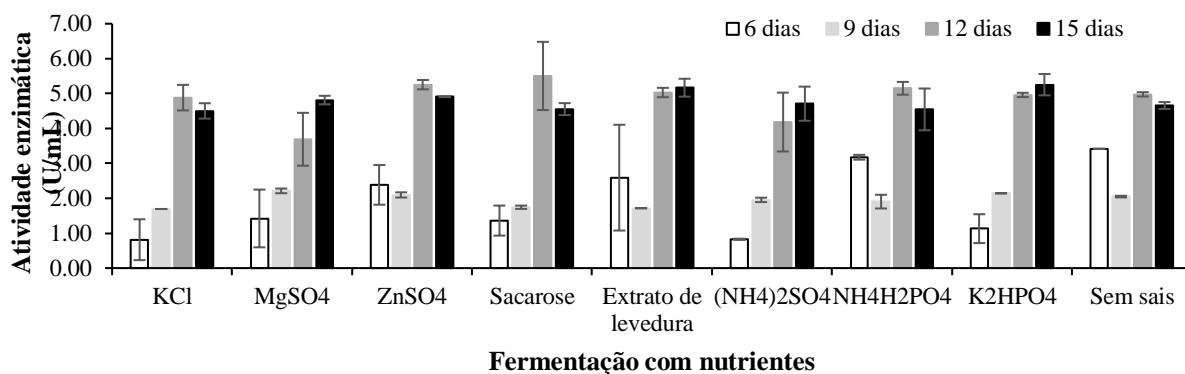
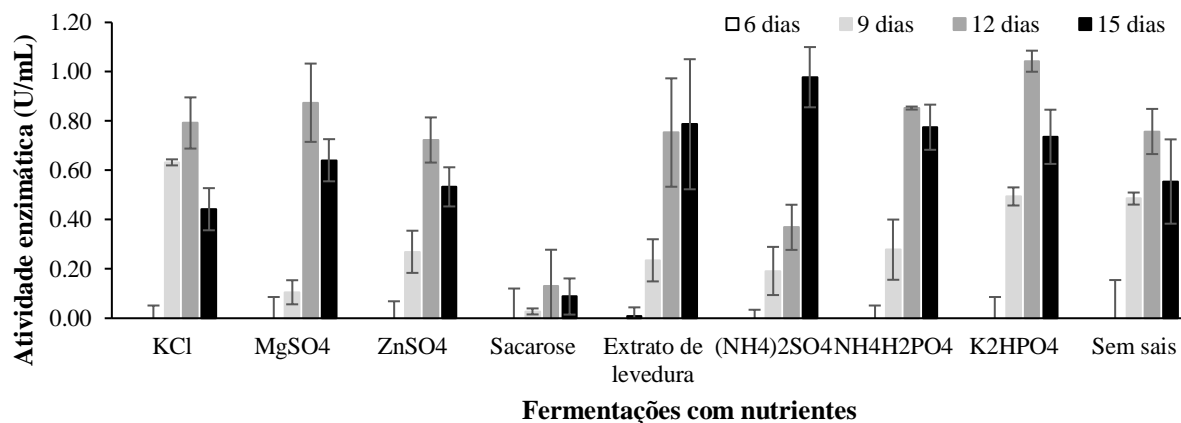


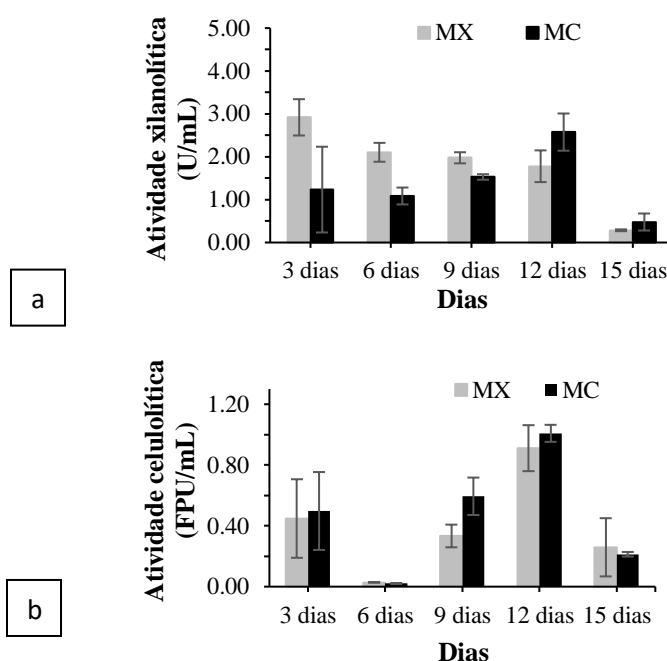
Figura 6. Cultivo submerso de *T. reesei* com sais, extrato de levedura e sacarose em diferentes tempos para produção de endoglucanase a 28°C e 150 rpm por até 15 dias.



3.5. Estudo cinético da produção de xilanases e celulases com a combinação dos quatro melhores nutrientes

O estudo com os nutrientes permitiu selecionar os de maior influência sobre a atividade das enzimas estudadas. A partir disso foram selecionados os quatro melhores nutrientes para a produção de xilanases (MX) que foram zinco (0,0028% de $ZnSO_4$), magnésio (0,0017% de $MgSO_4$), sulfato de amônio (0,1% de $NH_4(SO_4)$) e extrato de levedura (0,1%); e os melhores para a produção de celulases (MC), que foram extrato de levedura (0,1%), fosfato de potássio (0,11% de K_2HPO_4), zinco (0,0028% de $ZnSO_4$) e sacarose (1%). Estes foram os nutrientes que mais influenciaram a biossíntese das celulases e xilanases na etapa anterior da pesquisa. O novo cultivo com os melhores nutrientes forneceu resultados promissores, quanto a maior produção enzimática em um menor tempo de cultivo. A Figura 7 apresenta a produção de xilanase (a) e celulase total (b) para cada conjunto de complementos escolhidos.

Figura 7. Atividade enzimática dos cultivos com a combinação dos melhores sais para xilanase (a) e para celulase (b) utilizando o *T. reesei* e dreche cervejeiro em cultivo submerso a 28°C e 150 rpm até 15 dias.



MX: melhores nutrientes para xilanase: zinco ($ZnSO_4$: 0,0028%), magnésio ($MgSO_4$: 0,0017%), Sulfato de amônio (NH_4SO_4 : 0,1%) e extrato de levedura (0,1%); MC: Melhores nutrientes para celulase: extrato de levedura (0,1%), fosfato de potássio (K_2HPO_4 : 0,11%), zinco ($ZnSO_4$: 0,0028%) e sacarose (1%).

As celulasas alcançaram 1 FPU/mL (6 FPU/g) com os melhores nutrientes para celulase (MC), quanto aos melhores nutrientes para xilanase (MX) a produção de celulasas também foi otimizada alcançando valores próximos ao MC, porém com maior erro padrão (0,91 U/mL \pm 0,15). As enzimas xilanolíticas alcançaram valores máximos de 2,9 U/mL (17,4 U/g) em apenas 3 dias com MX. Os cultivos com MX não se mostraram eficientes comparada ao cultivo padrão, com todos os componentes (40,2 U/mL).

O estudo individual dos nutrientes fornece uma base sobre as necessidades do microrganismo, mas não permite observar interações entre os nutrientes para o metabolismo do fungo, com isso pode-se dizer que os resultados foram promissores. Outras combinações podem ser estudadas futuramente e até mesmo suas proporções para otimizar a produção.

Um resumo dos melhores resultados encontrados em cada atividade desenvolvida está representado na Tabela 5. Ressalta-se a importância de entender as necessidades do microrganismo utilizado, assim como o potencial da fonte de carbono escolhida, a fim de seguir caminhos mais otimistas quanto a otimização da produção enzimática.

Considerando a matriz fornecida pelo delineamento, a maior produção celulolítica foi encontrada utilizando-se uma proporção de 10 g dreche cervejeiro, 0 g de polpa cítrica e 0 g de farelo de trigo para 100mL de volume final complementado com água mais a adição de nutrientes obtendo-se um valor de 0,42 FPU/ml (2,52 FPU/g, considerando-se 60 mL de extrato extraído). Esta produção foi otimizada durante o estudo com tween 80 que atingiu 0,4 FPU/mL de atividade celulolítica em 9 dias de fermentação, 6 dias a menos comparado ao cultivo realizado para o delineamento. A terceira etapa visando a melhor combinação de nutrientes para produção de xilanases e celulasas superou os resultados obtidos anteriormente, atingindo 1 FPU/mL de atividade celulolítica.

O estudo de [Rodríguez-Zúñiga et al., \(2011\)](#) utilizando *Aspergillus niger* obteve o máximo de 0,4 U/g de celulase com farelo de trigo em cultivo em estado sólido após 72 horas, estudo que utilizou fonte de carbono amiláceo, pouco tempo de cultivo e cultivo em estado sólido chegando a um valor abaixo do encontrado no trabalho atual. [Campioni et al., \(2019\)](#) obtiveram 0,3 FPU/mL de celulase total em 6 dias de cultivo submerso com palha de cana de açúcar utilizando *T. reesei* QM 9414, valor também inferior se comparado ao presente estudo, porém trabalhou com um tempo de cultivo menor. Por outro lado, [Saini et al., \(2015\)](#) com uma linhagem isolada no país reconhecida como *Penicillium oxalicum*, obtiveram 1,2 FPU/mL em 8 dias de cultivo submerso com farelo

de trigo, alcançando valor três vezes maior do que aquele encontrado nesta etapa do trabalho e quatro vezes maior do que [Campioni et al., \(2019\)](#) que também utilizaram farelo de trigo, demonstrando maior potencial do *Penicillium oxalicum* comparado ao *T. reesei* em farelo de trigo. [Florêncio et al., \(2016\)](#) obtiveram com bagaço de cana em cultivo sólido por 24 horas, posteriormente alterado para cultivo líquido (48h) atividade de 0,7 FPU/g com o fungo *T. reesei*, demonstrando uma estratégia interessante devido a associação entre o tempo reduzido de cultivo e alta atividade enzimática, mas não superando o trabalho atual.

Tabela 5. Atividade enzimática produzida em cada etapa do estudo.

	Dias FE	CT (FPU/mL)	Endo (U/mL)	Exo (U/mL)	β -glico (U/mL)	Xilan(U/mL)
1) Delineamento com mistura de resíduos	15	0,42	2,03	3,202	0,126	40,20
2) Melhor combinação de sais, sacarose e extrato de levedura	12	1	-	-	-	-
3) presença de Tween 0,01%	9	0.40	-	-	-	-

Dias FE: Dias de Fermentação/Cultivo. **CT:** Celulase Total. **Endo:** Endoglucanase. **Exo:** Exoglucanase. **β - glico:** β glicosidase. Xilanase: **Xilan. 1-Delineamento:** para CT: 100% de dreche cervejeiro; para Endo, Exo e β -glico: 16,67% de farelo e polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro; para Xilan: 33,33% de polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro. A composição descrita para o delineamento foi complementada com um conjunto de sais, extrato de levedura e sacarose. **2- Melhores combinação de sais para celulase:** 0,1% de extrato de levedura, 0,11% de fosfato de potássio dibásico, 0,0028% de zinco e 1% de sacarose + 100% de dreche cervejeiro. **3- Presença de Tween 0,01%:** 33% de dreche cervejeiro + 0,01% de tween, sais, extrato de levedura e sacarose.

As enzimas xilanolíticas apresentaram maior capacidade de produção para o delineamento experimental utilizando 6,66 g de dreche cervejeiro, 3,33 g de polpa cítrica e 0 g de farelo de trigo chegando a 40,2 U/mL ou 241,23 U/g (402 U/L). A produção com 10g de dreche para xilanase também foi elevada (39,6 U/mL). Os resultados do cultivo com tween 80 não superaram o controle (sem tween) quanto à biossíntese de xilanases pelo fungo, ao contrário, eles comprovaram inibição desta biossíntese na presença deste surfactante durante o cultivo. O melhor resultado com tween 80 para xilanase foi de 2,96 U/mL utilizando tween 80 a 0,05%, muito inferior ao obtido no delineamento. A

combinação de nutrientes selecionadas como MX e MC não favoreceram a produção de xilanases.

Em relação a produção de xilanases, [Gottschalk et al., \(2010\)](#) produziram 0,15 U/mL com *T. reesei* em 5 dias de cultivo, já com o fungo *Aspergillus awamori* em 7 dias de cultivo obtiveram 0,025 U/mL, menor capacidade que a otimização do atual estudo. [Campioni et al., \(2019\)](#) alcançaram 60 U/mL de xilanase utilizando *T. reesei* em 6 dias de fermentação submersa com palha de cana de açúcar. [Gottschalk et al., \(2010\)](#) utilizaram menos tempo de cultivo obtiveram valores abaixo do atual trabalho, ao contrário de [Campioni et al., \(2019\)](#) que superaram os resultados da pesquisa atual em produtividade e rendimento.

A máxima produção de endoglucanase no delineamento de misturas foi encontrada nas proporções de 6,67 g de dreche cervejeiro, 1,66 g de polpa cítrica e 1,66 g de farelo de trigo, obtendo-se 2,03 U/mL (12,1 U/g). [Rodríguez-Zúñiga et al., \(2011\)](#) encontraram 21,0 U/g para endoglucanase utilizando farelo de trigo em cultivo sólida por 72 horas, valores próximos da otimização atual, já [Florêncio et al. \(2016\)](#) obtiveram uma produção de 1,6 U/mL para endoglucanase com *T. reesei* em cultivo submerso com bagaço de cana, mas não superou o rendimento estudado neste trabalho. [Castro et al., \(2010\)](#) obtiveram 0,55 U/mL de endoglucanase após 97 horas de cultivo em complexo piruvato desidrogenase com *Trichoderma harzianum* 30 °C a 200 rpm, valor inferior ao obtido neste trabalho.

A produção de exoglucanase no delineamento foi maior utilizando 6,67 g de dreche cervejeiro, 1,66 g de polpa cítrica e 1,66 g de farelo de trigo alcançando 3,20 U/mL (19,2 U/g). [Silva et al., \(2018\)](#) alcançaram valores de 3,14 U/mL para endoglucanase, 1,25 U/mL para exoglucanase (substrato polpa cítrica) e 93,08 U/mL para xilanase (bagaço de cana com pré-tratamento alcalino), demonstrando valor inferior quando comparado a produção de exoglucanase, mas superiores quanto produção de endoglucanase e xilanase.

A produção de β -glicosidase no delineamento de misturas foi maior com proporções de 6,67 g de dreche cervejeiro, 1,66 g de polpa cítrica e 1,66 g de farelo de trigo alcançando 0,12 U/mL (0,72 U/g). [Gottschalk et al., \(2010\)](#) chegaram a 0,15 U/mL com o fungo *T. reesei* em 5 dias e com o *A. awamori* 0,018 U/mL em 7 dias de cultivo. Os autores demonstraram o potencial do *T. reesei* na produção de β -glicosidase, e encontraram valor próximo ao do atual trabalho.

A partir da otimização realizada foi possível concluir que o fungo *T. reesei* pode ser usado para a produção de enzimas fibrolíticas com os resíduos estudados, porém outras cepas e outros resíduos também estão se destacando, principalmente quanto a produção de celulase total (FPU) e xilanase, além de indicar a capacidade do tween 80 para a produção de celulase total e a importância dos sais para otimização da produção enzimática, como foi possível observar com o aumento da atividade de celulase total.

4. Conclusão

A utilização da técnica de delineamento de mistura I-Optimal dos resíduos agroindustriais em cultivos submersos com *T. reesei* QM 9414, complementada com uma mistura de nutrientes é efetiva para a otimização da produção de enzimas celulases e xilanases em 15 dias de cultivo. A utilização de 100% (massa seca/volume) de dreche cervejeiro é promissora para a produção de celulases totais e xilanase, assim como a utilização de 33,3% de polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro também são eficazes para a produção de xilanase. A combinação de 16,67% de farelo de trigo, 16,67% de polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro é mais promissora para a produção de endoglucanase exoglucanase e β - glicosidase. O estudo quanto à demanda dos minerais sacarose e extrato de levedura revelam que o extrato de levedura, fosfato de potássio dibásico, zinco e sacarose em 12 dias de cultivo são suficientes para maximizar a produção de celulases, e nestas condições é possível atingir uma produção de celulases 2,38 vezes superior à produção obtida por meio do delineamento inicial. Por outro lado, para maximizar a produção fúngica de xilanases necessita-se maior riqueza de nutrientes. A utilização de 0,01% de tween 80 no meio de cultivo mantém a mesma produção de celulase total comparado ao delineamento sem tween 80, contudo reduz substancialmente o tempo de cultivo. No entanto, a utilização de tween 80 no meio de cultivo inibe drasticamente a produção fúngica de xilanases.

5. Referências

- Asther, M.; Corrieu, G.; Drapron, R.; & Odier, E. Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme and Microbial Technology*, v.9, n.4, p.245-249, 1987.
- Babich, H.; & Stotzky, G. Toxicity of zinc to fungi, bacteria, and coliphages: influence of chloride ions. *Applied Environmental Microbiology*, v.36, n.6, p.906-914, 1978.
- Bailey, M. J.; Biely, P., & Poutanen, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v.23, n.3, p.257-270, 1992.
- Campioni, T. S.; de Jesus Moreira, L.; Moretto, E.; Nunes, N. S. S.; & de Oliva Neto, P. Biobleaching of Kraft pulp using fungal xylanases produced from sugarcane straw and the subsequent decrease of chlorine consumption. *Biomass and Bioenergy*, v.121, p.22-27, 2019.
- Castro, A. M.; Pedro, K. C. N. R.; da Cruz, J. C.; Ferreira, M. C.; Leite, S. G. F.; & Pereira, N. *Trichoderma harzianum* IOC-4038: a promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β -glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.162, n.7, p.2111-2122, 2010.
- Cervbrasil, A. (2016). Associação Brasileira da Indústria da Cerveja - Anuário 2016. disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf. Acesso em dezembro de 2019,
- Chandra, M. S.; Viswanath, B.; & Reddy, B. R. Cellulolytic enzymes on lignocellulosic substrates in solid state fermentation by *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Microbiology*, v.47, n.4, p.323-328, 2007.
- Cypriano, D. Z.; da Silva, L. L.; Mariño, M. A; Tasic, L. A Biomassa da Laranja e seus Subprodutos. *Revista Virtual de Química*, v.9, n.1, p. 176-191, 2017.
- Delabona, P. S.; Farinas, C. S.; da Silva, M. R.; Azzoni, S. F.; & da Cruz Pradella, J. G. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technology*, v.107, p.517-521, 2012.
- Devi, M. C.; & Kumar, M. S. Production, optimization and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, v.2, n.1, p.120-128, 2012.
- Domingues, F. C.; Queiroz, J. A.; Cabral, J. M. S.; & Fonseca, L. P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, n.5-6, p.394-401, 2000.
- Dufey, A.; and Grieg-Gran, M. (Eds.) Biofuels production, trade and sustainable development. *International Institute for Environment and Development*; London, v.2, p.3-129, 2006.

- Duruibe, J. O.; Ogwuegbu, M. O. C.; & Egwurugwu, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, v.2, n.5, p.112-118, 2007.
- Florêncio, C.; Cunha, F. M.; Badino, A. C.; Farinas, C. S.; Ximenes, E.; & Ladisch, M. R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, v.90, p.53-60, 2016.
- Fomina, M.; & Karl, R. I. T. Z. Nutritional influence on the ability of fungal mycelia to penetrate toxic metal-containing domains. *Mycological Research*, v.107, n.7, p.861-871, 2003.
- Ghose, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v.59, n.2, p.257-268, 1987.
- Giese, E. C.; Covizzi, L. G.; Dekker, R. F. H.; & de Melo Barbosa, A. Influência de Tween na produção de lacases constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria* sp. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v.26, n.4, p.463-470, 2004.
- Gottschalk, L. M. F.; Oliveira, R. A.; & da Silva Bon, E. P. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, v.51, n.1-2, p.72-78, 2010.
- Grover, A. K.; MacMurchie, D. D.; & Cushley, R. J. Studies on almond emulsin β -glucosidase I. Isolation and characterization of a bifunctional isozyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Enzymology*, v.482, n.1, p.98-108, 1977.
- Limayem, A.; & Ricke, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, v.38, n.4, p.449-467, 2012.
- Liu, G.; Zhang, J.; & Bao, J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.39, n.1, p.133-140, 2016.
- Liu, J.; Yuan, X.; Zeng, G., Shi, J.; & Chen, S. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, v.41, n.11, p.2347-2351, 2006.
- Long, K.; & Knapp, J. S. The effect of Junlon PW110 and Tween 80 on the production of cellulolytic enzymes by *Coprinus cinereus*. *Mycological Research*, v.95, n.9, p.1077-1081, 1991.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

Narasimha, G.; Sridevi, A.; Buddolla, V.; Subhosh, C. M.; & Rajasekhar, R. B. Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *African Journal of Biotechnology*, v.5, n.5, p.472-476, 2006.

Nações Unidas, Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais, Divisão de População. Perspectivas da População Mundial: Revisão de 2017, Principais Conclusões e Tabelas Avançadas. ESA / P / WP / 248, 2017.

Porcionato, M. A. D. F.; Berchielli, T. T.; Franco, G. L.; Andrade, P. D.; Silveira, R. N. D.; & Soares, W. V. B. Digestibilidade, degradabilidade e concentração amoniacal no rúmen de bovinos alimentados com polpa cítrica peletizada normal ou queimada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n.1, p.258-266, 2004.

Reddy, N.; & Yang, Y. Biofibers from agricultural byproducts for industrial applications. *TRENDS in Biotechnology*, v.23, n.1, p.22-27, 2005.

Reese, E. T.; & Maguire, A. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*, v.17, n.2, p.242-245, 1969.

Reinold, M. R. Manual prático de cervejaria. 1.ed, São Paulo: Aden Editora e Comunicações Ltda, p.213, 1997.

Rodríguez-Zúñiga, U. F.; Farinas, C. S.; Neto, V. B.; Couri, S.; & Crestana, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.46, n.8, p.912-919, 2011.

Saini, R.; Saini, J. K.; Adsul, M., Patel, A. K.; Mathur, A.; Tuli, D.; & Singhanian, R. R. Enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* for bio-ethanol application. *Bioresource Technology*, v.188, p.240-246, 2015.

Seiboth, B.; Hakola, S.; Mach, R. L.; Suominen, P. L.; & Kubicek, C. P. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. *Journal of Bacteriology*, v.179, n.17, p.5318-5320, 1997.

Silva, D. F.; Hergesel, L. M.; Campioni, T. S.; Carvalho, A. F. A.; & Oliva-Neto, P. Evaluation of different biological and chemical treatments in agroindustrial residues for the production of fungal glucanases and xylanases. *Process Biochemistry*, v. 67, p.29-37, 2018.

Spyridon, A.; Euverink, W.; & Jan, G. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.19, n.5, p.44-53, 2016.

Tasic, L. Cypriano, D. Z.; da Silva, L. L.; Mariño, M. A. A Biomassa da Laranja e seus Subprodutos. *Revista Virtual de Química*, v.9, n.1, p. 176-191, 2017.

Velasco, F. O.; Gonçalves, L. C.; de Matos Teixeira, A.; de Faria Jr, W. G.; & Magalhães, F. A. Resíduo de cervejaria para gado leiteiro. *Gado de Leite*, v.9, p.139 – 568, 2009.

Vale, M. D. S.; Abreu, K. D. V.; Gouveia, S. T.; Leitão, R. C.; & Santaella, S. T. Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial. *Embrapa Agroindústria Tropical*. v.16, n.3, p.237-244, 2011.

Zeng, G. M.; Shi, J. G.; Yuan, X. Z.; Liu, J.; Zhang, Z. B.; Huang, G. H.; ... & Liu, H. L. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, n.7, p.1451-1456, 2006.

Capítulo 3: Novas tecnologias aplicadas ao bagaço de mandioca para melhoria da extração de amido e geração de novos co-produtos.

Joyce Faria de Souza^{1*}, Edson Marcelino Alves², Josiane Pereira Mendonça², Franciane Cristina de Figueiredo¹, Pedro de Oliva Neto².

¹ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil; ² Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Ciências e Letras - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Assis, São Paulo, Brasil;

RESUMO

A extração de amido do bagaço de mandioca por meio da gelatinização do bagaço de mandioca e aplicação de enzimas xilanases e celulases demonstrou potencial para desenvolvimento de novos co-produtos para a indústria de fécula de mandioca. Por meio da gelatinização e filtração foi obtida uma Fração Amilácea (rendimento de 42,4%, eficiência de extração de amido de 72,4% e concentração de amido de 77%); e a Fração Fibrosa 1 (rendimento de 46%, eficiência de recuperação da fibra de 84,05% e concentração de fibra de 35,1 % com 3,65% de proteínas e 19% de amido). A aplicação das celulases comerciais, além do extrato BIOENJ19 (produzido pelo cultivo otimizado de *T. reesei*) no bagaço de mandioca gelatinizado foi realizada para verificar a extração de amido, a qual foi similar entre os dois extratos enzimáticos, BIOENJ19 e a celulase Cellic CTec2 (12% a 13% de extração de amido), porém ao comparar com o controle não foi observada melhora na extração. As xilanases demonstraram resultados inferiores às celulases (8% a 10% de extração de amido). Uma hidrólise enzimática de 6% (m/v) da Fração Fibrosa 1 (porção insolúvel obtida da gelatinização do amido e filtração) com o extrato BIOENJ19 produziu 1,51% (m/v) de açúcar redutor, 0,165% (m/v) de amido e 2,25% (m/v) na fração insolúvel após filtração, denominada Fração Fibrosa FF1-1. Para a hidrólise com a Celic CTec2 foram obtidos: 1,27% (m/v) de açúcar redutor, 0,415% (m/v) de amido e 1,47% (m/v) na fração fibrosa 1-1. A fração líquida obtida desta hidrólise correspondeu em massa a 35,97% (m/m) (Celic CTec2) e 28,75% (m/m) (Extrato BIOEN19) da Fração Fibrosa 1, enquanto que Fração Fibrosa 1-1 foi de 10,03% (m/m) (Celic CTec2) e 17,25% (BIOENJ19). O cultivo em batelada alimentada foi realizado com as leveduras fibrolíticas, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Wickerhamomyces onychis* utilizando-se a Fração Fibrosa 1-1 e a fração líquida, a fim de produzir uma biomassa probiótica, obtendo-se uma conversão do substrato inicial em biomassa ($Y_{x/so}$) de 0,140 g/g (*R. mucilaginosa*) e 0,122 g/g (*W. onychis*), contendo 34% e 33,3% de

proteínas na biomassa, respectivamente. A produção desta biomassa probiótica pode agregar valor a este resíduo tendo em vista que estas leveduras podem melhorar a atividade ruminal dos animais de criação.

Palavras-chave: Bagaço de mandioca, celulases, xilanases, extração de amido, leveduras fibrolíticas.

1. Introdução

A produção mundial de raiz de mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) chegou a 277,1 milhões de toneladas em 2016 (FAO, 2016). O Brasil se destaca por ser o quarto maior produtor de mandioca, alcançando uma produção de 20,2 milhões de toneladas de raiz ao ano, correspondendo a uma receita em média de 2,9 bilhões de dólares (IBGE, 2019). A alta produção está associada a tolerância da mandioca quanto a pragas, disponibilidade de nutrientes e água, o que garante cultivo em grande parte do território brasileiro, regiões tropicais e subtropicais (Tewe e Litaladio, 2004).

Os principais produtos gerados a partir do processamento da raiz de mandioca são fécula (polvilho) e farinha de mandioca, os principais subprodutos englobam bagaço de mandioca conhecido também como farelo ou massa, a manipueira gerado pela prensagem da raiz, entre outros (Cereda, 2001; Li *et al.*, 2017).

A cada tonelada de raiz processada são gerados cerca de 928,6 kg de bagaço de mandioca com uma média de 85% de umidade na indústria de fécula. O bagaço é um material fibroso com uma quantidade significativa de amido aderido, levando a uma perda de 33% da extração total do amido da raiz de mandioca (Leonel *et al.* 1998). A composição química do bagaço apresenta pequenas variações de acordo com a espécie e condições do processo, geralmente ele exhibe cerca de 45% a 51% de amido e 20% a 40% de fibras. O material tem alto potencial bioquímico o que reflete nas possibilidades para valorização deste subproduto (Fiorda *et al.*, 2013; Jasko *et al.*, 2011).

O amido não extraído do bagaço de mandioca leva a perdas econômicas para as fecularias, sendo geralmente comercializado com preço reduzido para alimentação animal (Dourado *et al.*, 2017), além de outras aplicações que vem sendo estudadas como enriquecimento proteico, fibras dietéticas, etanol de segunda geração (Martinez, 2017), bioembalagens, bolachas (de Carvalho *et al.*, 2017) entre outros (Li *et al.*, 2017).

As enzimas, catalisadores biológicos com alta especificidade, já vem sendo aplicadas em diversos setores industriais devido a eficiência em melhorar a qualidade de produtos, reduzir a utilização de reagentes químicos poluentes, entre outros fatores (Monteiro e Nascimento, 2009). O complexo enzimático celulolítico consiste em um conjunto de enzimas atuando em sinergia para degradar a fibra (Campioni *et al.* 2019). De acordo com Saito *et al.*, (2006), o bagaço de mandioca apresenta 16,71% de celulose, 4,53% de hemicelulose e 8,7% de lignina.

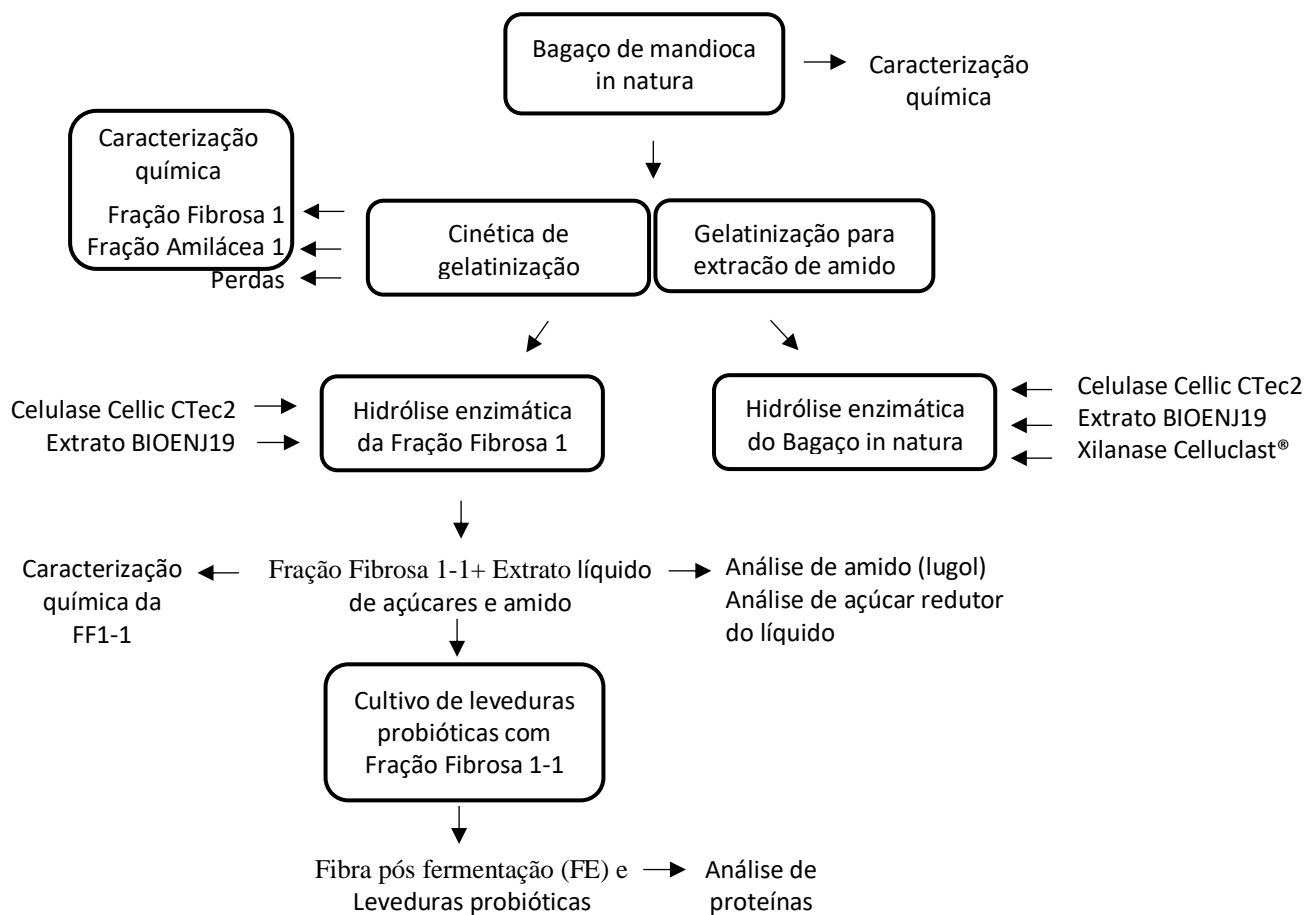
Pensando nisso, o presente trabalho tem como objetivo responder as seguintes perguntas: É possível desenvolver uma metodologia de extração de amido para aumentar o rendimento das fecularias por meio de hidrólises enzimáticas? Se sim, o complexo enzimático produzido a partir de dreche cervejeiro com *Trichoderma reesei*, celulases e xilanases comerciais da Novozymes é eficiente para este objetivo? E por fim, as frações obtidas pós tratamento do bagaço de mandioca são atraentes para o desenvolvimento de novos produtos, tais como o cultivo de leveduras probióticas, o qual agregaria valor ao resíduo final para aplicação na nutrição animal?

2. Materiais e métodos

2.2. Extração do amido do bagaço de mandioca via Gelatinização e Hidrólise enzimática

O bagaço de mandioca foi inicialmente seco a 50°C e triturado em triturador industrial (SPL-048, Spolu, Itajobi, Brasil), a fim de selecionar a granulometria do material, menor que 7 mesh (Peneira Tamis mesh de 7-20, Bertel, Caieras, Brasil), procedimento adotado para todos os ensaios. As amostras de bagaço de mandioca in natura, Fração Fibrosa 1, Fração Amilácea 1 e Fração Fibrosa 1-1 foram submetidas a uma caracterização quanto ao teor de amido, cinzas, proteínas, fibras, carboidratos totais e lipídios, de acordo com o fluxograma da Figura 1, o qual também apresenta as etapas da pesquisa de extração do amido contido no bagaço de mandioca pelas técnicas de gelatinização e hidrólise enzimática por celulases (Cellic CTec2) e xilanases (Celluclast) comerciais da Novozymes (Paraná/Brasil) e pelo extrato fibrolítico produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* QM 9414, denominado BIOENJ19.

Figura 1. Resumo das etapas e análises desenvolvidas com o bagaço de mandioca, assim como resíduos gerados e enzimas utilizadas em cada etapa.



2.2.1 Gelatinização do bagaço de mandioca

A técnica de gelatinização do amido contido no bagaço de mandioca foi utilizada para a extração e solubilização dele na fração líquida. O bagaço de mandioca seco foi então diluído em água a 6% (massa/volume) e gelatinizado em biorreator de 1 L a 80°C em banho termostatizado (banho maria: MA127, Marconi, Piracicaba, Brasil). Um estudo cinético da gelatinização do bagaço de mandioca foi realizado com retirada de amostras em diferentes tempos, num intervalo de 0 a 68 horas. As amostras foram prensadas em peneiras de 50 mesh obtendo-se duas frações, Fração Amilácea (líquido) e Fração Fibrosa 1 (sólido), sendo que o líquido foi analisado quanto ao teor de amido (2.4.1). A quantidade de bagaço de mandioca utilizada foi de 6% em todos os ensaios devido ao poder de inchamento do material, concentração máxima possível para manter uma viscosidade que não dificultasse os procedimentos de extração do amido (48g de bagaço de mandioca seco em 800 mL de água).

De forma complementar, estudos de cinética da hidrólise enzimática foram realizados com o bagaço integral (bagaço in natura) pós gelatinização a 80°C por 20 min em banho termostatizado (banho maria: MA127, Marconi, Piracicaba, Brasil), resfriado a 25°C com posterior aplicação enzimática e filtração em peneiras de 50 mesh. Foram realizadas análises para quantificação de amido liberado (2.4.1).

2.2.2 Estudos de hidrólise enzimática do bagaço de mandioca

2.2.2.1 Produção do extrato enzimático BIOENJ19

O extrato enzimático foi produzido com o fungo *Trichoderma reesei* QM 9414 obtido da coleção de culturas da Fundação André Tosello, Campinas, SP, Brasil. O cultivo foi realizado em processo submerso com 10% de dreche cervejeiro suplementado com um conjunto de nutrientes (0,11% de K₂HPO₄, 0,1% de (NH₄)SO₄, 0,0017% de MgSO₄.7H₂O, 0,0028% de ZnSO₄.7H₂O, 0,1% de NH₄H₂PO₄, 0,06% KCl, 1% de sacarose e 0,1% de extrato de levedura) em 100mL de água (Campioni *et al.*, 2019). O cultivo foi realizado por 15 dias a 150 rpm a 28°C.

2.2.2.2 Hidrólise enzimática

O bagaço integral gelatinizado (80°C por 20 minutos) foi submetido à hidrólise enzimática com celulasas Cellic CTec2 da Novozymes, xilanases Celluclast da Novozymes e, comparativamente, por um complexo enzimático produzido no laboratório

chamado de BIOENJ19 (ver item 2.2.2.1). O ensaio inicial foi realizado com 2,12 % (m/v) de bagaço de mandioca. O segundo e terceiro ensaios foram realizados com 6% (m/v) de bagaço de mandioca seco e diluído em água destilada.

O primeiro ensaio foi realizado com a celulase Cellic CTec2 e o extrato BIOENJ19, contendo 7,5 e 15 FPU/g de substrato seco para cada uma das enzimas, e com tempos de reação de hidrólise de 2 e 12 horas, a fim de se observar a capacidade do extrato BIOENJ19 comparado ao Cellic CTec2 na extração de amido.

O segundo ensaio foi realizado com a celulase Cellic CTec2 com 5 e 12 FPU/ g de substrato seco, além de um controle Branco sem enzimas. As hidrólises foram realizadas em 0, 12, 24 e 36 horas para investigar a cinética enzimática na extração de amido. A terceira hidrólise foi realizada com xilanase Celluclast da Novozymes em 0, 12 e 24 horas com 15, 30 e 60 U/ g de substrato seco além de um controle Branco sem enzimas. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Após o tempo de hidrólise as amostras foram submetidas à 80°C por 20 minutos com intuito de desnaturar as enzimas presentes.

A amostra com menos amido, Fração Fibrosa 1, do melhor tempo do estudo cinético de gelatinização (58 horas), foi submetida a uma hidrólise enzimática de 24 horas a 50°C (banho maria: MA127, Marconi, Piracicaba, Brasil) com o extrato BIOENJ19 e a celulase comercial Cellic CTec2 (5 FPU/ g de substrato seco). A etapa de gelatinização foi realizada novamente para se obter mais Fração Fibrosa 1. A hidrólise contou com dois controles, Fração fibrosa 1 em mistura apenas com água e Fração fibrosa 1 em mistura com o extrato BIOENJ19 desnaturado, além de ensaios com a Cellic CTec2 e o extrato BIOENJ19. Todos os testes foram realizados em triplicata. Análises de quantificação de amido (item 2.4.1) foram realizadas pós- hidrólise.

2.3 Fermentação em batelada alimentada

A Fração Fibrosa 1-1 e o líquido repleto de açúcares redutores obtida pós-hidrólise enzimática com BIOENJ19 foram submetidos a uma fermentação em batelada alimentada com as leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Wickerhamomyces onychis* a 180 rpm, 28°C por 5 dias. O cultivo inicial consistiu em 5% de Fração Fibrosa 1-1, 0,75% de água de maceração de milho completando o volume para 100mL de água (em torno de 94,2%). O pH do cultivo foi ajustado para 5,5 antes da autoclavagem (121 °C por 20 minutos).

O inóculo foi realizado com 10^7 células/mL pós ativação das leveduras. A ativação das leveduras foi realizada em meio com: 1% de sacarose, 0,2% de extrato de levedura, 0,13% de fosfato de potássio, 0,031% de sulfato de potássio, 0,0028 de sulfato de zinco, 0,0012% de sulfato de manganês, 0,1% de sulfato de amônio e 0,024% de sulfato de manganês.

Após 48 horas de fermentação foram adicionados um conjunto de materiais já previamente esterilizados e com o pH ajustado para 5,5. Foram adicionados 2,5% de Fração Fibrosa 1-1, 0,75% de água de maceração de milho e metade do líquido com açúcares foram colocados inicialmente ($X1\text{mL}/2$). Após 72 horas foram adicionados mais 2,5% de Fração Fibrosa 1-1. O cultivo foi retirado após 120 horas, por meio de uma filtração (papel filtro) foi separado o líquido da Fração Fibrosa pós fermentação. O líquido foi centrifugado para separação das células e quantificação. A quantidade de células no cultivo foi feita em câmara de Neubauer (células/mL). Uma análise de proteínas foi realizada na Fração Fibrosa pós fermentação e nas leveduras obtidas pós centrifugação, assim como umidade de cada material.

2.4. Análises químicas

2.4.1 Análise do teor de amido

A quantificação de amido foi realizada de acordo com [Freitas et al., \(2014\)](#) pelo teste colorimétrico com iodo. As amostras foram homogeneizadas em 80°C a 20 minutos antes da análise. A análise foi realizada em tubos de reação contendo 4,8 mL de HCl 0,1 M e 0,1 mL da amostra com posterior adição de 0,15 mL da solução de iodo (0,5 g/L de iodeto sublimado e 1 g/L de KI). Em seguida foi realizada leitura em espectrofotometria 620 nm (UV-1600PC, VWR, Radnor, Estados Unidos da América). A quantificação de amido foi realizada por meio de uma curva padrão preparada com uma solução de amido (Sigma) gelatinizado de 0 a 8 mg/mL.

A análise de amido apresentada nas tabelas de caracterizações químicas das frações, foi realizada utilizando o protocolo de [AOAC \(1995\)](#) 996.11* Determinação de Amido Disponível e Resistente (modificado).

2.4.2 Análise de açúcar redutor

A quantificação de açúcar redutor liberado foi realizada pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) conforme descrito por [Miller \(1959\)](#). Foi adicionado 1 mL da

amostra em tubos de reação, diluída previamente caso necessário. A amostra foi colocada em banho maria a 100°C por 5 minutos, diluída e lida em espectrofotômetro a 540 nm. Uma curva padrão de glicose foi utilizada para calcular a concentração de açúcar da amostra.

2.4.3 Determinação de proteínas

A análise de proteínas foi realizada de acordo com [AOAC \(2000\)](#). O procedimento foi realizado com 0,1 g de amostra seca digerida em tubos de digestão com 1 g de catalisador e 3 mL de ácido sulfúrico a 350 °C. Pós digestão os tubos foram resfriados, adicionado 5 gotas de fenolftaleína e conectados ao aparelho de destilação (TE-036/1, TECNAL, Piracicaba, Brasil). Foi adicionado NaOH 40% (m/v) aos tubos de digestão até o aparecimento da coloração rosada para posterior destilação em Erlenmeyer de 125 mL contendo uma solução de 10 mL de H₃BO₃ com 2 gotas de vermelho de metila e de verde de bromocresol. O destilado foi titulado com solução de HCl a 0,02 M. A análise foi realizada em triplicata.

2.4.4 Determinação de cinzas

A determinação de cinzas foi realizada com cadinhos previamente pesados com posterior adição de até 1g de amostra seca mantidos em mufla (Sppencer, Iperó, Brasil) a 550°C por 5 horas. As amostras foram mantidas em dessecador para chegarem à temperatura ambiente seguido de pesagem em balança analítica ([Lutz, 1985](#)). A análise foi realizada em triplicata.

2.4.5 Análise de lipídios

A análise de lipídios foi realizada em aparelho extrator soxhlet. O balão soxhlet foi seco a 105°C, pesado em balança analítica e acoplado ao extrator com éter de petróleo. Foi adicionado 3 gramas de amostras em papel de filtro dobrado e posteriormente colocado no extrator. A aparelho foi resfriado com banho maria a 20°C para condensação e o balão foi aquecido com manta térmica. As amostras ficaram por 10 horas em lavagens com éter. O balão foi seco a 105° C mantido em dessecador e pesado em balança analítica. O peso do balão vazio subtraído ao balão com lipídios levou a quantidade de lipídios pela quantidade de amostra inicial. A análise foi realizada em triplicata ([AOAC, 1990](#)).

2.4.6 Análise de fibras

A análise de fibras brutas, FDA e FDN foi realizada de acordo com [AOAC \(1990\)](#).

2.4.7 Quantificação de carboidratos

O teor de carboidratos foi calculado pelo método da diferença, subtraindo-se de cem os valores de umidade, cinzas, proteínas e lipídios.

2.5 Análises enzimáticas.

2.5.1 Atividade celulolítica

A atividade de celulase total foi realizada de acordo com a metodologia de [Ghose \(1987\)](#). Papel filtro Whatman nº1 cortado em tiras de 1x6 cm foi utilizado como substrato para celulase em 1,5 mL de tampão citrato 0,05 mol (pH 4,8). A reação enzimática foi realizada em banho maria a 50°C por 1 hora (MA-093, Marconi, Piracicaba, Brasil) com 0,5 mL de solução de enzimática. Após incubação, foi adicionado 3,0 mL de DNS ([Miller, 1959](#)) e levado ao banho de ebulição por 5 min seguido de banho de gelo. As amostras foram agitadas em vórtex e lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática será definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de glicose.

2.5.2 Atividade xilanolítica

A atividade de xilanase foi realizada conforme descrito por [Bailey et al., \(1992\)](#). Foi adicionado 0,9 mL do substrato xilana Birchwood 0,5% (Sigma Aldrich) em tampão acetato pH 5,0 em conjunto de 0,1 mL de enzimas. A solução foi mantida em banho maria a 50°C por 10 min com posterior adição de 0,5 mL de DNS ([Miller, 1959](#)) e banho de ebulição por 5 min. As amostras foram diluídas e posteriormente lidas em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzimas necessárias para liberar 1 µmol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de ensaio, utilizando curva padrão de xilose.

3. Resultados e Discussões

3.1 Caracterização química do bagaço de mandioca

A composição química do bagaço está apresentada na Tabela 1, assim como a composição encontrada na literatura. Os teores de cinzas e proteínas do bagaço in natura foram semelhantes, e foi possível observar uma pequena variação quanto ao teor de umidade e lipídios ao comparar com os três autores apresentados. Contudo, a variação observada para amido e fibras é significativamente maior. *Jasko et al.*, (2011) obtiveram valores similares de fibras 18,8%, comparado ao atual trabalho 21,69%. A concentração de amido nesta pesquisa (51%) foi inferior ao encontrado por *Leonel e Cereda*, (2000) (83,03%). *Jasko et al.*, (2011) obtiveram os valores de carboidratos totais sem considerar os carboidratos estruturais (fibras), alcançando 72,5%, valor superior ao encontrado no estudo atual de 66,95%. *Fiorda et al.*, (2013) obtiveram 84,85% de amido, similar ao encontrado neste trabalho 88,64%. Estes mesmos autores, encontraram valores elevados de fibras no material analisado 60,35%. Os autores também analisaram a concentração de Fibra em Detergente Ácido (FDA) e Fibra em Detergente Neutro (FDN), porém ambos divergiram dos valores encontrados no presente trabalho.

Tabela 1. Composição química do bagaço de mandioca in natura do trabalho atual comparado a literatura.

%	ATUAL	<i>Jasko et al.</i> , 2011	<i>Leonel e Cereda</i> , 2000	<i>Fiorda et al.</i> , 2013
Umidade	6,52±1,82	4,8±0,2	-	9,02±0,07
Cinzas	1,93±0,26	2,1±0,0	1,31±0,01	1,81±0,17
Fibra bruta	21,69±1,65	18,8±0,0	11,79±0,35	60,35±2,54
Proteína	2,4±0,05	1,7±0,0	1,59±0,06	1,97±0,03
Amido	51,05±5,03	-	83,03±0,35	-
Lipídios	0,51±0,014	0,11±0,0	0,47±0,04	2,35±0,03
Carboidratos	88,64*	72,5	-	84,85±0,26*
FDN	47,91±3,4	-	-	56,84 a ± 2,78
FDA	34,34±2,3	-	-	3,51 a ± 0,51

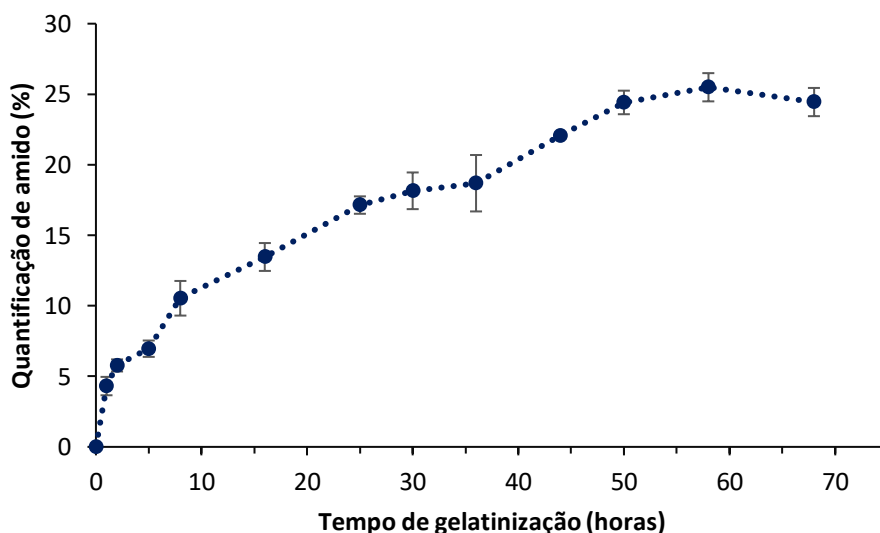
Carboidratos*: O teor de carboidratos está considerando os carboidratos estruturais, fibras.

3.2 Gelatinização do bagaço de mandioca

Devido a capacidade de turgência do material a gelatinização foi realizada a 80°C, assim como observado por Nunes *et al.*, (2009) que analisaram o potencial de inchamento e solubilização de três variedades da fécula de mandioca e observaram respostas significativas em 60°C até 80°C.

As amostras foram retiradas até 68 horas devido à estabilização da extração de amido, e o tempo 58 horas foi escolhido para as análises subsequentes. A Figura 2 apresenta a cinética de gelatinização do amido com água e bagaço de mandioca (6%) a 80°C.

Figura 3. Cinética de gelatinização do bagaço de mandioca (80°C) para extração de amido.



Leonel e Cereda (2000) também concluíram que a água pura foi um bom veículo de extração do amido da fécula retida no bagaço onde os autores estudaram diferentes condições: água, NaOH 0,2% (m/v), álcool 10% (v/v) e Tween 80 a 0,002% (v/v). Neste estudo não houve diferença significativa no uso das soluções auxiliares comparando-se à utilização da água. Uma nova extração com água levaria a 20% de amido extraído.

A extração feita em 58 horas correspondeu a um rendimento de 42,4% de amido removido, 72,4% de eficiência e 77% de pureza, considerando a presença de 51% de amido no bagaço inicial, superior ao obtido por Leonel e Cereda (2000), 20% de extração.

A gelatinização do amido resultou em duas frações: Fração Amilácea e Fração Fibrosa 1, além de perdas. O grau de pureza das Frações Fibrosa 1 e Fração Amilácea influenciam diretamente nas possibilidades de aplicação deste subproduto.

O rendimento da Fração Fibrosa 1 foi de 46% com 84,05% de eficiência de fibras e concentração de 35,1%. Na Fração Amilácea obteve-se 42,4% de rendimento, 72,4 de eficiência de amido e concentração de 77% de amido. Os processos de gelatinização e filtração resultaram em 11,7% de perdas. A extração dessas frações em massa quase se equivale, correspondendo a 459,8 kg para a Fração Fibrosa 1 e 423kg para a Fração Amilácea por tonelada de bagaço de mandioca (BM) seco. O bagaço pós gelatinização (Fração Fibrosa 1 e Fração Amilácea) fornece frações mais puras em relação ao teor de amido e fibras, o que abrange as possibilidades de aplicações relacionadas ao bagaço.

Os resultados obtidos durante a gelatinização assim como as respectivas frações estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Rendimento, eficiência e pureza (concentração) das frações obtidas após gelatinização e filtração do bagaço de mandioca.

Parâmetros de extração do amido	BM		Fração Fibrosa 1		Fração Amilácea		Perdas		BM sem perdas	
	massa (g)	%	massa	% (m/m)	massa	% (m/m)	Massa (g)	%	Massa (g)	%
Rendimento das frações	48	100	22,07 g	46	20,34 g	42,4	5,6	11,7	42,4	88,3
Eficiência de extração	-	-	7,73 g (fibra)	84,05 (fibra)	15,66 g	72,4 (amido)	-	-	-	-
Pureza	-	-	-	35,1 (fibras)	-	77 (amido)	-	-	-	-
Produção por tonelada de BM seco			459,8 kg		423,7 kg					

Obs. BM- Bagaço de mandioca. A dificuldade de extração de todo o conteúdo do frasco da gelatinização foi definido como perdas. Teor de fibras do BM é 21,69% portanto 9,197 g de fibra em 48-5,6 (perdas) g de massa total, teor de amido é de 51,05% portanto em 48-5,6 g (perdas) o teor de amido total é de 21,64 gramas.

O desenvolvimento de novas tecnologias para a utilização de bagaço de mandioca foi estudado para criação de novos produtos. De acordo com [Dias e Leonel, \(2006\)](#) a composição química de farinhas de mandioca de diferentes regiões, quanto ao teor de amido e de fibras varia de 81,9% a 92% e de 0,57% a 2,75%, respectivamente. [Matsui et al., \(2015\)](#) pesquisaram matérias primas que associadas ao bagaço de mandioca fornecessem o desenvolvimento de bandejas resistentes, eles observaram que adicionar

10% de polpa Kraft favorece o desenvolvimento de uma bandeja com características adequadas. Considerando a maior pureza da Fração Fibrosa 1, a bandeja pode ter maior durabilidade e resistência comparada a utilização do bagaço in natura. Outras aplicações estão relacionadas ao desenvolvimento de rações para melhorar a digestibilidade animal e com isso aumentar o ganho de peso. [Amorin et al., \(2015\)](#) ao analisar o efeito da adição de 0, 10, 20 e 30% de bagaço de mandioca na ração de frangos, observaram alterações químicas na carne, recomendando-se a adição de 20% de bagaço de mandioca na ração de acordo com as características químicas. [Amorin et al. \(2015\)](#) não observaram efeitos negativos em relação as características físicas da carne.

A Tabela 3 apresenta a caracterização química das frações obtidas durante o processo de gelatinização. É possível observar um aumento no teor de proteínas ao comparar com o bagaço in natura (2,4%) e Fração Amilácea (2,46%) com a Fração Fibrosa 1 (3,65%). A concentração de fibras nos materiais também variou bastante, passando de 21% de fibras no bagaço in natura e 16,7% na Fração Amilácea para 35% de fibras na Fração Fibrosa 1. Houve pequena variação no teor de cinzas entre os materiais. O teor de lipídios manteve-se próximo de 0,50%. O teor de amido aumentou pós-gelatinização e separação da Fração Amilácea de 51% para 77%, tornando o resíduo mais puro. A Fração Fibrosa 1 apresentou baixo teor de amido (19,7%) comparado ao bagaço in natura e Fração Amilácea.

Tabela 3. Composição química do bagaço de mandioca após gelatinização - Bagaço in natura, Frações Amilácea, Fração Fibrosa 1 e da Fração Fibrosa obtida por de Leonel e Cereda (2000).

Composição (%)	BM in natura	Fração Amilácea após gelatinização	Fração Fibrosa 1 após gelatinização	Fração Fibrosa obtida por Leonel e Cereda (2000)
Umidade	6,52±1,82	0,50 ± 0,79	10,40± 2,79	2,26±0,79
Cinzas	1,93±0,26	2,32 ± 0,41	3,34 ± 0,15	0,57±28,8
Lipídeos	0,51±0,014	0,54 ± 0,04	0,49 ± 0,18	0,45±13,59
Proteína	2,4±0,05	2,46 ± 0,1	3,65 ± 0,78	1,31±8,50
Fibra Bruta	21,69±1,65	16,7 ± 2,64	35,14 ± 3,12	13,2±0,48
Amido	51,05±5,03	77,39 ± 3,05	19,75 ± 2,8	82,2±5,16
Carboidratos	66,95	77,48	46,98	-

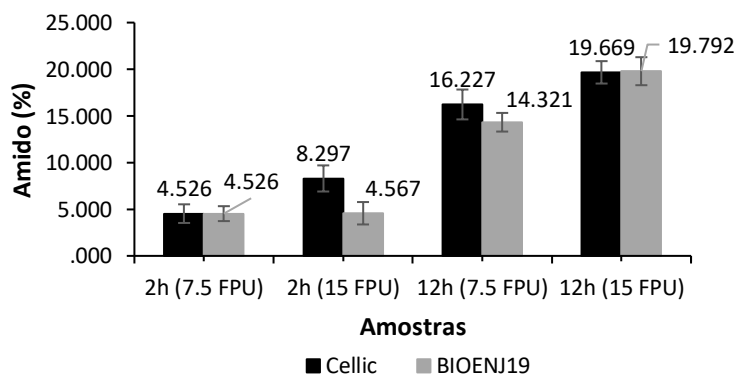
Obs. A Fração Amilácea e Fração Fibrosa 1 estão expressas em base seca, a **umidade original foi de 89,66% e 86,64** respectivamente. A caracterização de [Leonel e Cereda \(2000\)](#) está relacionada ao resíduo fibroso obtido pós-tratamento do bagaço de mandioca diluído em água, sem gelatinização do amido (cálculos em base seca). Carboidratos*: O teor de carboidratos não está considerando os carboidratos estruturais, fibras.

De acordo com Leonel e Cereda (2000) que realizaram uma extração do amido do bagaço de mandioca utilizando água, NaOH, álcool e Tween 80, estes pesquisadores observaram que a melhor extração foi com água e NaOH. Contudo, as amostras foram submetidas a 5 minutos de trituração em liquidificador industrial, misturados em cada solução específica estudada, com posterior filtração em peneiras de 60 mesh. Não foi mencionado a quantidade de líquido utilizado para diluir o bagaço de mandioca antes da filtração, nem processos de gelatinizações. O teor de amido para a Fração Fibrosa de Leonel e Cereda (82,2%) foi muito superior ao encontrado no atual estudo (19,75%), indicando baixa eficiência de extração de amido da Fração Fibrosa, provavelmente pela falta do processo de gelatinização.

3.3 Estudo da hidrólise enzimática do bagaço de mandioca gelatinizado

Após a caracterização bromatológica do material e o estudo da gelatinização foram realizados testes preliminares com enzimas celulolíticas para investigar o poder de atuação sobre o bagaço de mandioca integral gelatinizado (80°C por 20 minutos). A ideia aqui era avaliar se com uma etapa adicional à gelatinização, utilizando-se uma hidrólise com enzimas fibrolíticas, poderiam ser obtidos maiores extrações de amido. Os testes iniciais estão apresentados na Figura 3.

Figura 4. Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca com celulasas comerciais Cellic CTec2 e BIOENJ19 para extração de amido realizadas em concentrações de atividade enzimática diferentes: 15 e 7,5 FPU/g de substrato seco e tempos diferentes 2 e 12 horas de hidrólise em 50°C.

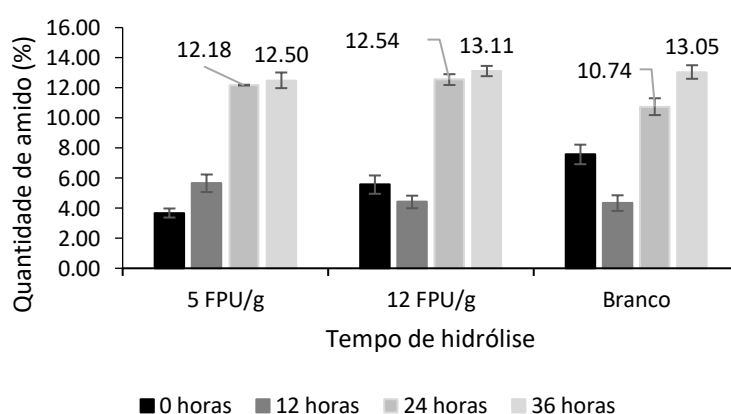


Os ensaios indicaram o potencial da enzima Cellic CTec2 e do extrato BIOENJ19 em extrair amido em concentrações similares. O tempo 12 horas se mostrou mais eficiente para extração de amido e também demonstrou o potencial da enzima BIOENJ19 ao alcançar a extração obtida pela Cellic CTec2 (Figura 3). Os testes preliminares foram realizados com diluição superior aos testes subsequentes (2,12 % m/v), o que possibilita maior mobilidade das enzimas celulolíticas explicando assim a maior extração de amido comparado as análises subsequentes. O controle não foi feito no teste preliminar.

Os testes de [Arantes e Saddler, \(2011\)](#) com resíduos lignocelulósicos pré-tratados, destacam a importância do alcance das enzimas às cadeias de celulose dentro da matriz do substrato a ser hidrolisado, ressaltando a importância de pré-tratamentos como: tratamentos alcalinos, ácidos, granulometria, entre outros ([Kim et al., 2016](#); [Loow et al., 2016](#)). A atuação limitada das enzimas sobre o material pode ser reduzida com um teor maior de líquido para melhor circulação enzimática, porém deve ser comparada ao rendimento obtido durante o processo, pois trabalhar com concentrações de substrato abaixo de 10% pode não ser economicamente viável ([John et al., 2007](#)).

A Figura 4 apresenta os resultados encontrados para a extração de amido pela quantidade de enzima Cellic CTec2 utilizada de 0 a 36 horas.

Figura 5. Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca (6%) com celulasas comerciais Cellic CTec2 para extração de amido realizadas até 36 horas em 50°C com 5 e 12 FPU/g seca de amostra.



Além dos pré-tratamentos outras variáveis são importantes para uma hidrólise enzimática eficiente como: temperatura, tempo, tipo de material a ser hidrolisado, quantidade de enzima utilizada, pH, entre outros pontos. [Arantes e Saddler \(2011\)](#) constataram um efeito linear do tempo de hidrólise e liberação dos produtos da hidrólise

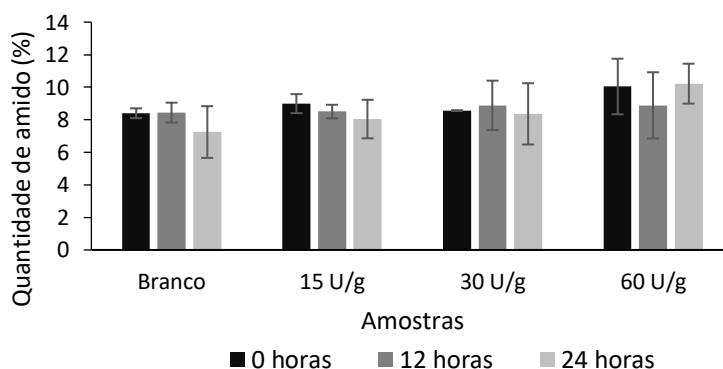
para os substratos pré-tratados, assim como observado no ensaio preliminar. *Li et al., (2014)* estudaram a ação de um conjunto de enzimas celulase, xilanase e pectinase em variadas proporções sobre o bagaço de cana com diferentes pré-tratamentos. Eles constataram uma relação positiva quanto ao sinergismo de celulase e xilanase, melhorando o rendimento na produção de glicose. O mesmo foi observado por *Gonçalves et al., (2015)* que ao utilizarem as duas enzimas aumentaram duas vezes mais a concentração de açúcares redutores liberados. Os resultados encontrados por *Li et al., (2014)* e *Gonçalves et al., (2015)* demonstram o potencial do complexo BIOENJ19 comparado a um extrato puro em celulases e β -glicosidases na hidrólise do bagaço de mandioca.

Foi observada pouca variação na extração de amido das amostras com enzima Cellic CTec2 comparado ao controle sem enzimas, apenas gelatinização (Branco). De acordo com o encontrado, aumentar a quantidade de enzima não se mostrou eficaz na extração de amido, especialmente em 36 horas de hidrólise. Tal fato demonstra a capacidade da gelatinização observada pelo controle (Branco). Se considerarmos um tempo menor de hidrólise (24 horas) há uma vantagem para o uso da gelatinização associada à hidrólise enzimática, de 10,7% para 12,5% de amido extraído (com uso de 12 FPU/g de substrato), porém a diferença parece não justificar o emprego de enzima neste caso. *Arantes e Saddler (2011)* concluíram que aumentar o tempo de hidrólise de 24,48 até 72 horas não resulta em rendimentos de hidrólise estatisticamente mais elevados para os substratos testados, desta forma 24 horas de hidrólise alcançam resultados satisfatórios. No atual trabalho talvez a aposta apenas na gelatinização focando melhor na cinética de liberação do amido pode ser mais viável economicamente devido a simplicidade do processo, ainda que com um tempo mais prolongado de gelatinização ou um tempo menor de gelatinização que reduza o rendimento de extração do amido mas aumente a produtividade do processo.

De acordo com a caracterização realizada (Tabela 1), o bagaço de mandioca apresenta concentrações relevantes de fibras, que por sua vez são compostas em sua maioria por celulose, hemicelulose e lignina. Para concentrações de bagaço de mandioca *Saito et al., (2006)* encontraram 16,7%, 4,53% e 8,7% de celulose, hemicelulose e lignina respectivamente. No presente trabalho não foi feita a caracterização completa, mas considerando-se os valores de FDA e FDN obtidos (Tabela 1), pode-se estimar um teor de 13,5% de hemicelulose, valor superior ao encontrado por *Saito et al., (2006)*.

A hidrólise enzimática também foi realizada com enzimas xilanolíticas Celluclast da Novozymes com intuito de degradar hemicelulose do bagaço de mandioca. As amostras não apresentaram diferença significativa entre si, além de demonstrar menor capacidade de extração, 8 a 10% comparado a utilização de enzima celulolítica que alcançou de 12 a 13% de amido extraído (Figura 4). A Figura 5 apresenta a porcentagem de amido obtida com a utilização de diferentes concentrações de xilanases. Porém ficou evidente que os dois tipos de enzimas não favorecem a extração de amido aderido à fibra do bagaço de mandioca, ressaltando-se que apenas com a gelatinização (Branco) alcançou-se resultados similares, sendo a maior parte da extração feita via gelatinização, técnica mais econômica pois não envolve insumos caros como enzimas.

Figura 6. Hidrólise enzimática do bagaço de mandioca com xilanases comerciais Celluclast da Novozymes para extração de amido realizadas até 24 horas a 50°C com 15, 30 e 60 U/g seca de amostra seca.



3.3.1 Hidrólise enzimática da Fração fibrosa 1

A Fração fibrosa 1 foi submetida a hidrólise enzimática comparativa com a celulase Cellic CTec2 e o extrato BIOENJ19 com objetivo de extrair maior quantidade de amido do bagaço de mandioca. Em ambos foi utilizada uma dosagem de 5 FPU/g de substrato seco e 6% (m/v) da Fração Fibrosa 1 como substrato, a hidrólise foi realizada a 50°C, pH 4,0 em 24 horas. Após filtração do hidrolisado, a parte sólida foi denominada Fração Fibrosa 1-1 e a parte líquida consistiu em uma solução contendo amido e açúcares redutores solúveis, predominantemente glicose conforme análise em HPLC para Celic CTec2 e uma

mistura com maiores quantidades de glicose e xilose para o extrato BIOENJ19 (Tabela 4).

O extrato BIOENJ19 produzido por meio do cultivo com o fungo celulolítico *T. reesei*, apresenta maiores concentrações de celulasas e xilanases, o que explica a maior concentração de xilose na hidrólise comparado ao hidrolisado com Cellic CTec2, que representa um concentrado mais puro de celulasas.

Tabela 4. Proporção e tipos dos açúcares redutores encontrados após a hidrólise enzimática da Fração Fibrosa 1 com o extrato BIOENJ19 e Cellic CTec2.

	Extrato BIOENJ19 (%)	Cellic CTec2 (%)
Glicose	64,66	77,04
Xilose	35,17	20,06
Arabnose	0,17	2,90

A Tabela 5 apresenta a concentração de amido e açúcares redutores (contidos na fração líquida) e a concentração de Fração Fibrosa 1 residual (porção insolúvel retida na filtração) baseado no volume total da hidrólise. Assim foram obtidas as concentrações de 0,165% (m/v) e 0,415% (m/v) de amido liberado respectivamente para BIOENJ19 e Cellic CTec. Também foram obtidos 1,51% (m/v) e 1,27% de açúcares redutores (fração líquida) e 2,25% (m/v) e 1,47% (m/v) de Fração Fibrosa 1 respectivamente para as hidrólises com o extrato BIOENJ19 e Cellic CTec.

Tabela 56. Concentração (m/v) de amido e açúcar redutor liberado durante a hidrólise enzimática e Fração Fibrosa 1 utilizando o extrato BIOENJ19 e Cellic CTec2.

	Concentração	
	BIOENJ19 (m/v)	Cellic CTec2 (m/v)
Amido	0,165%	0,415%
Açúcar redutor	1,51%	1,27%
Fração Fibrosa 1	2,25%	1,47%

A Tabela 6 apresenta o balanço de massa da hidrólise enzimática da Fração Fibrosa 1 em duas novas frações, uma insolúvel (Fração Fibrosa 1-1) contendo mais fibras, amido e proteínas, e a outra, fração líquida, contendo amido e açúcares redutores.

Em relação as frações sólidas, foi obtido 46g de Fração Fibrosa 1 para cada 100 g de bagaço de mandioca a partir da gelatinização do bagaço inicial. A Fração Fibrosa 1-1 obtida da hidrólise da Fração Fibrosa 1, correspondeu a 10,04g e 17,25g pra 100g de

bagaço de mandioca para a hidrólise com Cellic CTec2 e com o extrato BIOENJ19, alcançando um rendimento de 21,8% e 37,5% para a Cellic CTec2 e BIOENJ19.

A fração líquida da hidrólise apresentou um rendimento em massa de 78,2% (m/m) e 62,5% (m/m) respectivamente, para a enzima Celic CTec2 e extrato BIOENJ19, ambos com 5 FPU/g de substrato seco ou 6% (m/v) da Fração Fibrosa 1. A fração líquida apresentou também uma significativa presença de açúcares redutores que corresponderam, respectivamente, a uma concentração de 9,05% (m/m) e 13,4% (m/m) para Cellic e BIOENJ19, além de também apresentar uma porção de amido solúvel correspondente a 2,95% (m/m) para a enzima Cellic CTec2 e apenas 1,47% (m/m) para a hidrólise com o extrato BIEONJ19

Tabela 67. Balanço de massa da hidrólise da Fração Fibrosa 1 com as enzimas Celic Ctec2 e extrato BIOENJ19 a 50°C, pH 4 e 24 horas, com 5 FPU/g de substrato.

Balanço de massa da Hidrólise Enzimática								
Frações (base seca)	Percentual (base seca)	Percentual (base seca)	Rendimento das frações (% m/m)		Eficiência de hidrólise da FF1 (% m/m)		Concentração (% m/m) (base seca)	
	Celic CTec2	BIOENJ19	Cel	Bienj	Cel	Bioenj	Cel	Bioenj
FF1	46 g/ 100 g BM	46g/ 100 g BM					35,1 (fibra)	35,1
							19,7 (amido)	19,7
FF 1-1	10,03 g/ 100 g BM	17,25 g/ 100 g BM	21,8	37,5	76,5	55,2	37,9 (fibra)	41,6
					(desfibrou da fibra original de FF1)		39,8 (amido)	36,61
Fração Líquida	35,97 g/ 100 g BM	28,75 g/ 100 g BM	78,2	62,5	35,0 13,9 (eficiência extração amido)		2,95 (amido)	1,47
					-	-	9,05 (AR)	13,4
Total AR+Amido							12,0	14,9

FF1: Fração Fibrosa 1. **FF1-1:** Fração Fibrosa 1-1. **Cel:** Cellic CTec2. **Bioenj:** BIOENJ19. **AR:** Açúcar redutor.

A caracterização química das duas frações, Fração Fibrosa 1 e Fração Fibrosa 1-1 (Tabela 7) indicaram que houve ganho de proteínas na fração insolúvel, passando de 3,65% para 7,56%. A concentração de fibras passou de 35% da Fração Fibrosa 1 para 41% na Fração Fibrosa 1-1, enriquecendo assim esta fração fibrosa. O amido também ficou preso à fibra residual, portanto também aumentando sua proporção em massa. O teor de cinzas apresentou pouca variação, assim como a concentração de lipídios (0,5%).

Tabela 78. caracterização química de bagaço de mandioca hidrolisado com a Fração Fibrosa 1 e Fração Fibrosa 1-1

Composição (%)	Fração Fibrosa 1 após gelatinização e separação	Fração Fibrosa 1-1 após hidrólise com BIOENJ19
Umidade	10,40 ± 2,79	6,26 ± 1,23
Cinzas	3,34 ± 0,15	4,32 ± 0,34
Lipídeos	0,49 ± 0,18	0,58 ± 0,2
Proteína	3,65 ± 0,78	7,56 ± 0,54
Fibra Bruta	35,14 ± 3,12	41,6 ± 1,66
Amido	19,75 ± 2,8	36,61 ± 1,42
Carboidratos*	46,98	39,68

Carboidratos*: O teor de carboidratos não está considerando os carboidratos estruturais, fibras.

3.4 Cultivo de leveduras fibrolíticas com a utilização dos produtos da hidrólise enzimática da Fração Fibrosa 1.

As leveduras probióticas são utilizadas em rações para diferentes animais contribuindo para uma melhor digestibilidade dos alimentos, competindo com patógenos, alterando pH, modulando respostas imunológicas, entre outros benefícios que acabam por favorecer o desenvolvimento de uma microbiota mais saudável (Brito *et al.*, 2014). O incremento de leveduras probióticas em resíduos valoriza o material e propicia o desenvolvimento de um co-produto nutritivo com adicional efeito probiótico, agregando valor assim ao comércio de resíduos.

Assim o intuito deste trabalho foi avaliar o resíduo sólido das fecularias de mandioca, aqui denominado bagaço de mandioca, após alguns tratamentos para extração do amido. Tal produto ainda não existe, sendo hoje o bagaço de mandioca comercializado a preços muito baixos para a ração animal. Para avaliar o potencial de crescimento destas

leveduras utilizou-se as duas frações (FF1-1 e fração líquida) obtidas da hidrólise da Fração Fibrosa 1 como fonte de carbono e energia para a formulação do meio de cultivo das leveduras probióticas, lembrando que a maior parte do amido já foi previamente extraída do bagaço de mandioca.

Para tanto foi utilizado os produtos da hidrólise via extrato BIOENJ19, aquele que produziu maior quantidade de açúcares redutores. Os cultivos realizados pelo processo de batelada alimentada com as leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* e *Wickerhamomyces onychis* apresentaram bons resultados quanto ao desenvolvimento das duas leveduras probióticas, atingindo crescimentos semelhantes de $4,97 \cdot 10^8$ células/mL para *Rhodotorula mucilaginosa* e $4,8 \cdot 10^8$ células/mL para a *Wickerhamomyces onychis* em 5 dias de cultivo à 28°C e 180 rpm, em incubadora orbital com controle de temperatura. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos após o cultivo quanto à concentração de biomassa, rendimento em biomassa e proteína obtida.

Tabela 89. Características do cultivo quanto ao teor de proteínas, rendimento de biomassa de leveduras, rendimento de bagaço de mandioca não hidrolisado e açúcares redutores no material fermentado com *Rhodotorula mucilaginosa* e *Wickerhamomyces onychis*.

Parâmetros do Cultivo	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			<i>Wickerhamomyces onychis</i>		
	% nutrientes	% bagaço residual	g biomassa/ g das fontes de Carbono.	%	% bagaço residual	g biomassa/g das fontes de Carbono
Rendimento de conversão das fontes de carbono em Biomassa de Leveduras	-	-	0,140	-	-	0,122
Porcentagem de BM não hidrolisado no processo	-	69	-	-	66	-
Proteína da Fibra após Fermentação	10,87	-	-	11,98	-	-
Proteína na biomassa de Leveduras	34,66	-	-	33,33	-	-

BM: Bagaço de mandioca Cálculo do Y_{x/so} foi baseado na mistura da oferta de fonte de carbono AR (1,51%), amido (0,165%), FF1-1 (10%) e AMM (0,16% AR). as 32,07 gramas equivalem aos 22,07 g da F.Fibrosa 1 que corresponde a $22,07/42 \text{ gramas} \times 100 = 52,54\%$ do bagaço de mandioca sem considerar as perdas. AMM: água de maceração de milho.

Os probióticos são considerados pelo FDA (Food and Drug Administration) como seguros facilitando a inserção do mesmo no mercado. Os probióticos podem ajudar na manutenção do pH ruminal, competindo com bactérias patogênicas e se multiplicando no rúmen. De acordo com [Huaynate et al., \(2006\)](#) adicionar 200 e 300 ppm de probióticos (Bacsol-vt®) reduz a incidência de diarreias em suínos com 22 a 44 dias de idade, uma das principais causas de morte de animais jovens. Ele também observou maior consumo de ração suplementada com probióticos pelos animais com idade de 22 a 68 dias. A utilização de probióticos favorece a redução do uso de antibióticos, reduzindo os riscos de gerar microrganismos resistentes ([Marino e Medeiros, 2015](#)).

O teor de proteínas da biomassa de leveduras obtidas pelo cultivo em batelada alimentada e da fibra residual pós cultivo correspondeu a uma média de 33,9% e 11,42%, respectivamente. As duas leveduras apresentaram resultados similares quanto ao teor de proteínas. Considerando que a concentração de proteína indicada para satisfazer a dieta dos ruminantes é em torno de 7% ou mais, o fermentado com leveduras obtido em apenas cinco dias se mostra atraente ([NRC, 2001](#); [Guimarães, 2018](#); [Moraes et al., 2010](#)). O excesso de proteínas não é recomendado, pois resulta na produção de amônia que é convertida em ureia e eliminada pela urina. A ureia aparece no sangue e no leite dos animais estando relacionada à redução da fertilidade ([Elrod e Butler, 1993](#)). O rendimento da conversão das fontes de carbono em biomassa de levedura é de 0,140g e de 0,122g, assim como o bagaço residual que é de 69% e 66% respectivamente para *R. mucilaginosa* e *W. onychis*.

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos quanto ao teor de fibras: Fibra bruta, FDA e FDN dos materiais durante o processo, além de comparar com dois autores da literatura.

Tabela 910. Teor de FDA, FDN e Fibra Bruta dos materiais obtidos no atual estudo.

	BM in natura	Fração Amilácea 1	Fração Fibrosa 1	Fração Fibrosa1-1	Fibra pós FE	Dourado <i>et al.</i>, 2017	Saito <i>et al.</i>, 2006
FDA	34,34±1,5	25,69±2,1	40,11±1,3	57,10±2,3	61,97	38,20	38,26
FDN	47,91±1,8	64,96±1,9	61,31±1,4	68,37±2,7	79,02	63,50	33,73
FB	21,69±1,65	13,45±1,95	35,14±2,12	41,60±2,4	35,14	26,00	-

GE: Gelatinização; FB: Fibra Bruta; FDA: Fibra Detergente ácido; FDN: Fibra detergente Neutro; FE: fermentação enzimática;

Os métodos da Tabela 9 apresentam determinadas limitações: A fibra em detergente neutro (FDN) não solubiliza parte da pectina, enquanto a Fibra em detergente ácido (FDA) solubiliza e a Fibra bruta (FB) apresenta contaminação por polissacarídeos não celulósicos (Jung, 1997). Apesar das limitações dos métodos, analisar a quantidade de fibras assim como caracterizações químicas ajuda a prever se o material será bom para a nutrição animal (Alves *et al.*, 2016).

O FDN está relacionado aos carboidratos estruturais como celulose, hemicelulose e pectinas, podendo interferir na dieta dos animais. Aumentar a quantidade de FDN na dieta diminui a ingestão de alimento (Kozloski *et al.* 2006), devido a presença de FDN indigestível. Durante a degradação da fibra o FDN total e o FDN digestível diminuem de forma similar, o mesmo não ocorre com o FDN indigestível que se acumula no rúmen devido a lenta digestibilidade. O acúmulo de FDN indigestível pode se tornar um problema em períodos em que o tamanho do rúmen é limitado, como no início da lactação (Júnior, *et al.*, 2007).

A taxa de carboidratos não estruturais (CNE) como amido, pectina e açúcares também está diretamente relacionada a eficiência da digestibilidade das fibras. A presença de CNE pode favorecer a atuação de microrganismos amilolíticos sobre os celulolíticos e influenciar na redução do pH ruminal, devido a maior produção de ácidos orgânicos (Hoover, 1986; Marino e Medeiros, 2015).

Considerando a concentração de FDN ao longo do processo (Tabela 9) temos um aumento de 31,11% do bagaço inicial até o bagaço obtido pós fermentação (Fibra residual pós fermentação). De acordo com Silva *et al.*, (2007) que analisou a eficiência da adição de 5; 10; 15 e 20% de bagaço de mandioca junto a capim elefante na dieta de novilhos, há boa digestibilidade com a adição de 5% de bagaço. O mesmo autor também observou que os teores de FDN (36,79 a 48,97%), não influenciaram o consumo de matéria seca pelos animais, assim como o coeficiente de digestibilidade de FDA que não diferiu entre os tratamentos.

Santos, (2018) estudou a influência da adição de probióticos na suplementação de bovinos com idade média de 15 meses e peso vivo médio de 265,85 kg em regime extensivo e pasto por 90 dias, com suplementação fornecida à vontade. Concluiu-se que os animais que receberam suplementação com ativo probiótico ganharam peso vivo comparado aos que receberam suplementação sem ativo probiótico.

A fibra pós gelatinização (Fração fibrosa 1) apresenta uma concentração reduzida de FDN, além de muito menos amido do que o bagaço inicial. Considerando o

bioprocesso para obter cada fração estudada, a Fração fibrosa 1 devido a menor quantidade de processos para obtenção de boas características químicas, se mostra um material atraente. No entanto, se o objetivo é utilizar leveduras probióticas, a etapa de cultivo ainda é interessante devido ao bom desenvolvimento das leveduras no processo utilizado.

4. Conclusão

A extração de amido do bagaço de mandioca realizada por meio da gelatinização e filtração forneceu duas frações, a Fração Amilácea com bons rendimentos e alta concentração de amido e a Fração Fibrosa 1 com bons rendimentos, maior concentração de fibras e menor quantidade de carboidratos totais comparado a Fração Amilácea e ao bagaço in natura. A hidrólise enzimática realizada por meio da aplicação das celulases comerciais, do extrato BIOENJ19 e das xilanases comerciais ao bagaço in natura não apresentaram melhores resultados de extração de amido quando comparado ao controle. As hidrólises enzimáticas da Fração Fibrosa 1 utilizando o extrato BIOENJ19 e a celulase comercial Cellic Ctec2 demonstraram maior liberação de açúcares redutores com a utilização do extrato BIOENJ19, já para a Cellic Ctec2 foi observado maior teor de amido liberado e menor teor da fibra residual denominada de Fração Fibrosa 1-1. Os produtos da hidrólise enzimática (Fração líquida e Fração Fibrosa 1-1) foram utilizados para um cultivo em batelada alimentada com as leveduras fibrolíticas, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Wickerhamomyces onychis*. Por meio do cultivo foi produzido uma biomassa probiótica obtendo-se uma conversão do substrato inicial em biomassa ($Y_{x/so}$) de 0,140 g/g (*R. mucilaginosa*) e 0,122 g/g (*W. onychis*), contendo 34% e 33,3% de proteínas na biomassa, respectivamente. A biomassa probiótica pode agregar valor a este resíduo tendo em vista os benefícios na atividade ruminal dos animais de criação, além de possíveis co-produtos obtido pelas diferentes frações do bagaço de mandioca com suas características próprias.

5. Considerações finais

A pesquisa atual buscou estratégias para otimizar a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas, além de estudar técnicas voltada para o desenvolvimento de novos co-produtos para a indústria de fécula de mandioca. O primeiro capítulo buscou sintetizar informações relacionadas as variáveis que influenciam a produção enzimática, com enfoque para as enzimas celulolíticas e xilanolíticas demonstrando a relevância de se entender as necessidades do microrganismo selecionado para melhor aproveitar a capacidade de biossíntese do mesmo. O substrato selecionado, as características químicas deste substrato, concentração de cada substrato e sal mineral, umidade, pH, temperatura, tipo de sal mineral, fonte de nitrogênio, entre outros apresentam grande relevância para a produção de biomoléculas de interesse pelo microrganismo. A expansão da utilização de enzimas na indústria tornou muitos processos mais ecológicos. A aplicação na nutrição animal permitiu melhorar a digestibilidade animal sendo um destaque neste setor, assim como a utilização de probióticos que agregam em nutrientes, aumentam a imunidade, competem contra patógenos, diminuem diarreias, regulam o pH ruminal, além de melhorar a digestibilidade e como consequência aumentar o ganho de peso. Outras aplicações foram discutidas mais rapidamente como na indústria têxtil, etanol 2G, entre outros.

A utilização da técnica de delineamento de mistura I-Optimal dos resíduos agroindustriais em cultivos submersos com *Trichoderma reesei* QM 9414, complementada com uma mistura de nutrientes alcançou ótimos resultados com 16,67% de farelo de trigo, 16,67% de polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro para a produção de endoglucanase, exoglucanase e β - glicosidase. Para a produção de celulase total (0,42 FPU/mL) e xilanase (39,60 U/mL) 100% de dreche cervejeiro se mostrou promissor, assim como a utilização de 33,3% de polpa cítrica e 66,7% de dreche cervejeiro também foram efetivas para a produção de xilanase (40,2 U/mL). A produção de celulase total foi otimizada com uma combinação de: 0,1% de extrato de levedura, 0,11% de fosfato de potássio dibásico, 0,0028% de zinco e 1% de sacarose em 12 dias de cultivo, maximizando a produção de celulases em 2,38 vezes mais (1,0 FPU/mL) comparado ao cultivo inicial (0,42 FPU/mL). A utilização de 0,01% de tween 80 com polpa cítrica no meio de cultivo mantém a mesma produção de celulase total (0,40 FPU/mL) comparado

ao obtido no delineamento com dreche cervejeiro sem tween 80, porém reduziu o tempo de cultivo de 15 para 9 dias.

O interesse das fecularias em reduzir perdas associadas ao amido aderido ao bagaço de mandioca, aumentou o enfoque para o desenvolvimento de novas técnicas para a extração de amido. O estudo buscou por meio da gelatinização do bagaço de mandioca e aplicações enzimáticas de xilanases e celulases demonstrar o potencial para o desenvolvimento de novos co-produtos para a indústria de fécula de mandioca. Por meio da gelatinização e filtração foi obtida uma Fração Amilácea (rendimento de 42,4%, eficiência de extração de amido de 72,4% e concentração de amido de 77%) e a Fração Fibrosa 1 (rendimento de 46%, eficiência de recuperação da fibra de 84,5% e concentração de fibra de 35,1 % com 3,65% de proteínas e 19% de amido). A aplicação de enzimas celulolíticas e xilanolíticas não se mostraram eficientes para a extração de amido (10% a 13%). A hidrólise enzimática da Fração Fibrosa 1 com o extrato celulolítico produzido com *T. reesei* (BIOENJ19) apresentou 1,51% de açúcar redutor, 0,165% de amido e 2,25% da fração sólida residual, denominada de Fração Fibrosa 1-1. O cultivo em batelada alimentada realizado com as leveduras fibrolíticas, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Wickerhamomyces onychis* apresentou uma conversão do substrato inicial em biomassa ($Y_{x/so}$) de 0,140 g/g (*R. mucilaginosa*) e 0,122 g/g (*W. onychis*), contendo 34% e 33,3% de proteínas na biomassa, respectivamente. A produção desta biomassa probiótica pode agregar valor a este resíduo tendo em vista que estas leveduras podem melhorar a atividade ruminal dos animais de criação.

A pesquisa demonstrou a importância de estudos com sais minerais e outros nutrientes, assim como a combinação de resíduos agroindustriais para a produção enzimática, além de obter ótimos resultados e otimiza-los ao longo do estudo. A aplicação das enzimas no bagaço de mandioca, permitiu entender a capacidade enzimática para a extração de amido e liberação de açúcares redutores o que tornou possível dar ênfase para a técnica de gelatinização que foi promissora para a extração de amido. O cultivo com leveduras demonstrou boa conversão de substrato em biomassa indicando um potencial co-produto para a nutrição animal.

6. Referências

Alves, A. R.; Pascoal, L. A. F.; Cambuí, G. B.; da Silva Trajano, J.; da Silva, C. M.; & Gois, G. C. Fibra para ruminantes: Aspecto nutricional, metodológico e funcional. *Pubvet*, v.10, p.513-579, 2016.

Amorim, A. F.; de Siqueira, J. C.; Rodrigues, K. F.; Vaz, R. G. M. V.; Barbosa, S. M.; Santos, H. D.; ... & Parente, I. P. Níveis de inclusão do bagaço de mandioca na ração de frangos de crescimento lento: características físico-químicas da carne. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, n.3, p.1685-1700, 2015.

AOAC. Official methods of analysis of AOAC. 15 ed., *In International*. Washington, DC: *Association of Official Analytical Chemist International*, 1990.

AOAC. Official of analysis. 16 ed., *In Washington: Association of Oficial Analytical Chemist*, 1995.

AOAC. Official Methods of Analysis. 17 ed., *In Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists*, 2000.

Arantes, V.; & Saddler, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*, v.4, n.1, p.3, 2011.

Bailey, M. J.; Biely, P.; & Poutanen, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v.23, n.3, p.257-270, 1992.

Brito, J. M.; Ferreira, A. H. C.; Junior, A.; Araripe, M.; Lopes, J.; Duarte, A.; ... & Rodrigues, V. Probióticos, prebióticos e simbióticos na alimentação de não-ruminantes—revisão. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.11, n.1, p.3070-3084, 2014.

Campioni, T. S.; de Jesus Moreira, L.; Moretto, E.; Nunes, N. S. S.; & de Oliva Neto, P. Biobleaching of Kraft pulp using fungal xylanases produced from sugarcane straw and the subsequent decrease of chlorine consumption. *Biomass and Bioenergy*, v.121, p.22-27, 2019.

Cereda, M. P. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca. São Paulo: *Fundação Cargill*, v.4, p.210-217, 2001.

de Carvalho, J. V. C., Jorge, L. M., de Freitas, J. D., & Terhaag, M. M. Desenvolvimento e aceitabilidade de cookies formulados a partir de bagaço de mandioca. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v.21, n.3, p.193-199, 2017.

Dias, L. T.; & Leonel, M. Caracterização físico-química de farinhas de mandioca de diferentes localidades do Brasil. *Ciência e Agrotecnologia*, v.30, n.4, p.692-700, 2006.

Dourado, D. P.; Macêdo, D. A.; Tonani, F. L.; & Muraishi, C. T. Caracterização bromatológica e classificação da casca da mandioca como fonte para alimentação animal. *Revista Integralização Universitária*, v.12, n.16, p.22-30, 2017.

Elrod, C. C.; & Butler, W. R. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *Journal of Animal Science*, v.71, n.3, p.694-701, 1993.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016). Agricultural production: crops primary. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 30 dezembro 2019.

Fiorda, F. A.; Soares Júnior, M. S.; Silva, F. A. D.; Souto, L. R. F.; & Grossmann, M. V. E. Farinha de bagaço de mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.43, n.4, p.408-416, 2013.

Freitas, A.; Escaramboni, B.; Carvalho, A.; Lima, V.; & Oliva-Neto, P. Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. *Chemical Papers*, v.68, n.4, p.442-450, 2014.

Ghose, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v.59, n.2, p.257-268, 1987.

Gonçalves, G. A.; Takasugi, Y., Jia, L.; Mori, Y., Noda, S.; Tanaka, T.; ... & Kamiya, N. Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v.72, p.16-24, 2015.

Guimarães, T. P. Exigências Proteicas para bovinos de corte. *Multi-Science Journal*, v.1, n.1, p.90-99, 2018.

Hoover, W. H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of Dairy Science*, v.69, n.10, p.2755-2766, 1986.

Huaynate, R. A. R.; Thomaz, M. C.; Kronka, R. N.; Fraga, A. L.; Scandolera, A. J.; & Budiño, F. E. L. Uso de probiótico em dietas de suínos: incidência de diarreia, desempenho zootécnico e digestibilidade de rações. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.43, n.5, p.664-673, 2006.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2019). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola Estatística da Produção Agrícola. Disponível em: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2019_jan.pdf. Acesso dezembro de 2019.

Jasko, A. C.; Andrade, J. D.; Campos, P. F. D.; Padilha, L., Pauli, R. B. D.; Quast, L. B.; ... & Demiate, I. M. Caracterização físico-química de bagaço de mandioca in natura e após tratamento hidrolítico. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. v.5, p.427-441, 2011.

John, R. P.; Sukumaran, R. K.; Nampoothiri, K. M.; & Pandey, A. Statistical optimization of simultaneous saccharification and L (+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v.36, n.3, p.262-267, 2007.

Jung, H. J. G. Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. *The Journal of Nutrition*, v.127, n.5, p.810-813, 1997.

Júnior, G. L.; Zanine, A. M.; Borges, I.; & Pérez, J. R. O. Qualidade da fibra para a dieta de ruminantes. *Ciência Animal*, v.17, n.7, p.7-17, 2007.

Kim, J. S.; Lee, Y. Y.; & Kim, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.199, p.42-48, 2016.

Kozloski, G. V.; Trevisan, L. M.; Bonnacarrère, L. M.; Härter, C. J.; Fiorentini, G.; Galvani, D. B.; & Pires, C. C. Níveis de fibra em detergente neutro na dieta de cordeiros: consumo, digestibilidade e fermentação ruminal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.5, p.893-900, 2006.

Leonel, M.; & Cereda, M. P. Extração da fécula retida no resíduo fibroso do processo de produção de fécula de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.20, n.1, p.1-9, 2000.

Leonel, M.; Jackey, S.; & Cereda, M. P. Processamento industrial de fécula de mandioca e batata doce-um estudo de caso. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n.3, p.343-345, 1998.

Li, J.; Zhou, P.; Liu, H.; Xiong, C.; Lin, J.; Xiao, W.; ... & Liu, Z. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v.155, p.258-265, 2014.

Li, S.; Cui, Y.; Zhou, Y.; Luo, Z.; Liu, J.; & Zhao, M. The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.97, n.8, p.2282-2290, 2017.

Loow, Y. L.; Wu, T. Y.; Jahim, J. M.; Mohammad, A. W.; & Teoh, W. H. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose*, v.23, n.3, p.1491-1520, 2016.

Lutz, A. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, v.2, p.1-1000, 1985.

Marino, C. T.; & de Medeiros, S. R. Aditivos alimentares na nutrição de bovinos de corte. *Embrapa Gado de Corte-Capítulo em livro científico*, v.7, p.97-106, 2015.

Martinez, D. G. Potencial do resíduo do processamento da mandioca para produção de etanol de segunda geração. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v.6, n.2, p.141-148, 2017.

Matsui, K. N.; Larotonda, F. D. S.; Luiz, D. D. B.; Pires, A. T. N.; & Laurindo, J. B. Utilização do resíduo de mandioca na produção de bandejas descartáveis. *Ceres*, v.50, n.292, p.727-736, 2015.

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

Monteiro, V. N.; & do Nascimento Silva, R. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos*, v.3, n.5, p.9-23, 2009.

Moraes, E. H. B. K.; Paulino, M. F.; Andreatta, K.; de Moraes, K.; Filho, S. D. C. V.; de Figueiredo, D. M.; & Couto, V. R. M. Exigências de proteína de bovinos anelados em pastejo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.3, p.601-607, 2010.

NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, *National Academies Press*, v.7, p.1-408, 2001.

Nunes, L. B.; Santos, W. D. J.; & Cruz, R. S. Rendimento de extração e caracterização química e funcional de féculas de mandioca da região do semi-árido baiano. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.20, n.1, p.129-134, 2009.

Saito, I. M.; Cabello, C.; & Fukushima, R. S. Análise da fibra residual do farelo de mandioca após tratamento hidrotérmico. *Revista Raízes e Amidos Tropicais*, v.2, n.1, p.1-11, 2006.

Santos, S. A. Efeito do uso de aditivo probiótico na suplementação de bovinos em regime extensivo a pasto. *Revista Alomorfia*, v.2, n.1, p.53-62, 2018.

Silva, F. F. D., Aguiar, M. S. M. A., Veloso, C. M., Pires, A. J. V., Bonomo, P., Dutra, G. S., ... & Ítavo, L. C. V. Bagaço de mandioca na ensilagem do capim-elefante: qualidade das silagens e digestibilidade dos nutrientes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.3, p.719-729, 2007.

Tewe, O. O.; & Lutaladio, N. B. The global cassava development strategy: Cassava for livestock feed in sub-Saharan Africa. *IFAD/FAO*, p.1-75, 2004.