

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES JEQUITINHONHA E MUCURI

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



PATRISIA DE OLIVEIRA RODRIGUES

**Uso de coquetéis lignocelulolíticos produzidos por consórcio
fúngico na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar e produção
de etanol**

UBERLÂNDIA - MG

2020



PATRISIA DE OLIVEIRA RODRIGUES



**Uso de coquetéis lignocelulolíticos produzidos por consórcio
fúngico na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar e produção
de etanol**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, da Universidade Federal Uberlândia / Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

Orientadora: Prof^a Dr^a Milla Alves Baffi

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Pasquini

UBERLÂNDIA – MG

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R696 2020	<p>Rodrigues, Patrícia de Oliveira, 1976- Uso de coquetéis lignocelulolíticos produzidos por consórcio fúngico na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar e produção de etanol [recurso eletrônico] / Patrícia de Oliveira Rodrigues. - 2020.</p> <p>Orientadora: Milla Alves Baffi. Coorientador: Daniel Pasquini. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós- graduação em Biocombustíveis. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.392 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Biocombustível. I. Baffi, Milla Alves, 1977-, (Orient.). II. Pasquini, Daniel, 1974-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biocombustíveis. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 662.756</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biocombustíveis				
Defesa de:	Doutorado, 12, PPBIC				
Data:	19 de Fevereiro de 2020	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:30
Matrícula do Discente:	11613PGB002				
Nome do Discente:	Patrícia de Oliveira Rodrigues				
Título do Trabalho:	Produção de coquetéis lignocelulolíticos por consórcios fúngicos e efeitos na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar e produção de etanol celulósico				
Área de concentração:	Biocombustíveis				
Linha de pesquisa:	Processos Químicos e Bioquímicos				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se no Auditório Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, no andar superior do Bloco 5I, Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis, assim composta: Professores Doutores: Leandro Vinícius Alves Gurgel, Universidade Federal de Ouro Preto; Silvio Vaz Junior, da EMBRAPA Agroenergia; Líbia Diniz Santos, da Universidade Federal de Uberlândia; Vicelma Luiz Cardoso da Universidade Federal de Uberlândia e Milla Alves Baffi, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Milla Alves Baffi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Milla Alves Baffi, Membro de Comissão**, em 19/02/2020, às 17:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Vicelma Luiz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/02/2020, às 17:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539,](#)

[de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Libia Diniz Santos, Professor(a) Visitante do Magistério Superior**, em 19/02/2020, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Vinícius Alves Gurgel, Usuário Externo**, em 19/02/2020, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvio Vaz Júnior, Usuário Externo**, em 19/02/2020, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1841008** e o código CRC **42F30B56**.

Dedico esse trabalho ao meu pai Walter, a minha mãe Lindomar e a todos os professores que fizeram parte da minha jornada como estudante, contribuindo com a minha formação, mostrando o valor da educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, seu filho Jesus Cristo e à Virgem Maria por terem me permitido chegar até aqui.

Aos meus pais, que com toda dificuldade sempre apoiaram a mim e a meus irmãos nos estudos.

Agradeço à minha orientadora Prof^a Dr^a Milla Alves Baffi pela paciência em me orientar e por acreditar na minha capacidade em realizar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Pasquini (meu coorientador) pelo auxílio durante a execução do trabalho.

Ao Prof. Dr. Leandro Vinícius Gurgel pelo auxílio durante a pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Aos colegas de laboratório que contribuíram direta e indiretamente com o trabalho.

Agradeço às técnicas Beatriz e Júlia pelas diversas vezes que me ajudaram durante o trabalho, sempre com uma palavra amiga.

Agradeço também à Prof^a Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso e ao MSc Felipe Santos Moreira que gentilmente cederam e auxiliaram no uso de alguns equipamentos para a realização desse trabalho.

À Elisa da Silva Barreto, aluna de doutorado da UFOP pela contribuição na pesquisa e pelas conversas sempre produtivas.

A todos você o meu carinho e agradecimento!

RESUMO

O presente estudo avaliou a produção de coquetéis lignocelulolíticos por fermentação em estado sólido (FES), utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato e as linhagens fúngicas *Aspergillus niger* SCBM1 (Ni), *Aspergillus fumigatus* SCBM6 (Fu), *Ganoderma lucidum* 601 (Ga), *Trametes versicolor* 561 (Tr) e *Pleurotus ostreatus* PLO6 (PI), em monoculturas ou em consórcio. Os extratos brutos produzidos foram avaliados em hidrólises de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise (AH) e auto-hidrólise seguida de pré-tratamento alcalino (NaOH) (AH-Soda). Os coquetéis enzimáticos que apresentaram os melhores rendimentos em açúcares fermentescíveis foram selecionados e avaliados em novas hidrólises com altas cargas de sólidos e com adição de surfactante Triton X-100. Por último, realizou-se a fermentação alcoólica dos hidrolisados contendo as maiores concentrações de glicose. Nas FES realizadas com as linhagens isoladas, F1 (*A. niger* SCBM1 como inóculo - extrato Ni) foi a que mais se destacou na produção de enzimas, com atividades máximas para endoglucanase (82,70 U/g), exoglucanase (80,48 U/g), β -xilosidase (145,01 U/g) e manganês peroxidase (3,38 U/g). Para as FES em cocultivos, os extratos produzidos por consórcios entre Ni+Fu+PI (F9), Ni+Tr+PI (F6) e Ni+Ga+PI (F10) apresentaram as maiores produções de celulasas e hemicelulasas, principalmente β -glicosidase (104,70, 171,09 e 106,10 U/g), β -xilosidase (89,72, 139,99 e 121,02 U/g) e xilanase (2582,38, 2267,96 e 1697,74 U/g), respectivamente. O extrato bruto produzido a partir do consórcio entre Basidiomicetos (Tr+Ga+PI- F13) foi o mais eficiente na produção de lacase (25,27 U/g). Após as hidrólises, as maiores concentrações de glicose foram obtidas utilizando o extrato Ni (F1) nos hidrolisados de bagaço pré-tratado por AH e AH-Soda (10,78 e 10,32 g/L), extrato Fu+Ga+PI (F11) com 9,76 (AH) e 10,60 g/L (AH-Soda) e extrato Ni+Ga+PI (F10) com 11,92 g/L no hidrolisado de bagaço AH-Soda. Para xilose, a maior liberação foi obtida no hidrolisado F8 que utilizou o extrato Ni+Fu+Tr em bagaço AH (5,08 g/L). Após a fermentação alcóolica, uma conversão de 60,80% (em relação ao máximo teórico) foi alcançada em F1 (fermentação do hidrolisado Ni), com uma produção de 3,206 g/L de etanol e de 58,15% em F6 (3,084 g/L). Nas hidrólises realizadas com alto teor de carga de sólidos, os resultados obtidos demonstraram que a concentração de açúcares redutores totais (ART) aumentou de 15,54 para 44,84 g/L no hidrolisado Ni (F1),

quando a porcentagem de bagaço AH aumentou de 10 para 35%. No hidrolisado Ni+Tr+PI (F6), a concentração de ART aumentou de 11,38 para 31,77 g/L nas mesmas condições. A adição de surfactante não influenciou significativamente no aumento no rendimento em ART no hidrolisado F1 (45,16 g/L). Já no hidrolisado F6, a concentração de ART aumentou de 30,94 para 48,16 g/L, sugerindo que para este extrato, a utilização do surfactante favoreceu a hidrólise enzimática. A fermentação do hidrolisado F6 com surfactante produziu 1,66 g/L de etanol, com conversão de 88,03 % em relação ao máximo teórico. Os resultados obtidos são promissores e incentivam estudos adicionais utilizando os extratos enzimáticos produzidos por consórcio fúngico em novas condições de hidrólise a fim de potencializar a produção de açúcares fermentescíveis e de etanol de segunda geração (etanol 2G).

Palavras-chave: Ascomicetos, Basidiomicetos, biomassa lignocelulósica, açúcares fermentescíveis.

ABSTRACT

The present study evaluated the production of lignocellulolytic cocktails by solid-state fermentation (SSF), using sugarcane bagasse and wheat bran as substrates and the fungal strains *Aspergillus niger* SCBM1 (Ni), *Aspergillus fumigatus* SCBM6 (Fu), *Ganoderma lucidum* 601 (Ga), *Trametes versicolor* 561 (Tr) and *Pleurotus ostreatus* PLO6 (PI) in monocultures and/or in consortia. The crude extracts produced were evaluated in the hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis (AH) and by autohydrolysis followed by alkaline pretreatment (NaOH) (AH-Soda). The enzymatic cocktails that presented the best yields in terms of fermentable sugars were selected and evaluated in new hydrolyses experiments with high loads of solids and with addition of the surfactant Triton X-100. At last, alcoholic fermentations of the hydrolysates containing the highest glucose concentrations were carried out. In the SSF performed with isolated strains, the fermentation that used *A. niger* SCBM1 as inoculum (Ni – F1 extract) was the most outstanding in the production of enzymes, with maximum activities for endoglucanase (82.70 U/g), exoglucanase (80.48 U/g), β -xylosidase (145.01 U/g) and manganese peroxidase (3.38 U/g). For the SSF performed in co-culture of fungal strains, the extracts produced by consortia between Ni+Fu+PI (F9), Ni+Tr+PI (F6) and Ni+Ga+PI (F10) presented the highest productions of cellulases and hemicellulases, mainly β -glucosidase (104.70, 171.09 and 106.10 U/g), β -xylosidase (89.72, 139.99 and 121.02 U/g) and xylanase (2582.38, 2267.96 and 1697.74 U/g), respectively. The crude cocktail produced from the consortium between Basidiomycetes (Tr+Ga+PI) was the most efficient for laccase production (25.27 U/g). After the hydrolyses, the highest glucose concentrations were obtained in the hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by AH and AH-Soda using Ni extract (F1) with 10.78 and 10,32 g/L, Fu+Ga+PI extract (F11) with 9.76 g/L (AH) and 10.60 g/L (AH-Soda) and Ni+Ga+PI extract (F10) with 11.92 g/L in AH-Soda hydrolysate. For xylose, the highest release was obtained after F8 hydrolysis that used Ni+Fu+Tr extract in sugarcane bagasse pretreatment by AH (5.08 g/L). After alcoholic fermentation, 60.80 % (in relation to the theoretical maximum) of conversion was achieved in F1 (Ni hydrolysate), with a production of 3,20 g/L of ethanol and 58,15 % in F6 (3,08 g/L) of ethanol. In hydrolysis performed with high load of solids, the results obtained showed that the concentrations of total reducing sugars (TRS) increased from

15.54 to 44.84 g/L in Ni hydrolysate (F1), when the percentage of bagasse pretreatment by AH increased from 10 to 35 % . In the Ni+Tr+PI (F6) hydrolysate, TRS concentration increased from 11.38 to 31.77 g/L under the same conditions. The addition of surfactant did not significantly influenced concentration of TRS in Ni hydrolysate (45.16 g/L). In the F6 hydrolysis, the TRS concentration increased from 30.94 to 48.16 g/L, suggesting that for this extract, the use of surfactant favored the enzymatic action. The fermentation of F6 hydrolysate produced 1.66 g/L of ethanol, with 88.03 % of conversion in relation to the theoretical maximum. The obtained results are promising and encourage additional studies using enzymatic extracts produced by fungal consortium in new hydrolysis conditions in order to enhance the production of fermentable sugars and second generation ethanol (2G ethanol).

Keywords: Ascomycetes, Basidiomycetes, lignocellulosic biomass, fermentable sugars.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Contribuição das fontes de energia renováveis e não renováveis no Brasil e no mundo.	26
Figura 2: Rotas de conversão aplicadas a biomassas.	27
Figura 3: Estimativa da produção de cana-de-açúcar, na safra 2019/20, com comparativo entre as regiões.	28
Figura 4: Esquema da biomassa lignocelulósica.	29
Figura 5: Esquema da fibra de celulose, evidenciando a unidade repetitiva de celobiose.	30
Figura 6: Estrutura típica de uma hemicelulose.	31
Figura 7: Estrutura da lignina com ligações C-O, como as β -O-4, α -O-4, e 4-O-5, e ligações C-C como: β -5, 5-5, β -1 e β - β	32
Figura 8: Unidades monoméricas precursoras da lignina.	33
Figura 9: Etapas da bioconversão de lignocelulose a etanol 2G.	34
Figura 10: Produtos de degradação da lignocelulose como resultado do pré-tratamento em condições ácidas.	36
Figura 11: Mecanismo de ação das celulasas.	38
Figura 12: Ação sinérgica de hemicelulasas na biodegradação de xilana.	39
Figura 13: Reação catalisada por lacases.	40
Figura 14: Ciclo catalítico de oxidação da lacase. (SFO: Substrato fenólico).	40
Figura 15: Ciclo catalítico da manganês peroxidase.	41
Figura 16: Reação catalisada por lignina peroxidases. (A) clivagem de C-C da lignina; (B) Oxidação do álcool veratrílico.	42
Figura 17: Substratos potenciais e produtos de valor agregado produzidos em biorrefinarias de resíduos à base de Ascomicetos filamentosos.	45
Figura 18: Pré-inóculos em placa das espécies fúngicas: (A) – <i>A. niger</i> SCBM1; (B) – <i>A. fumigatus</i> S	
Figura 20 A, B e C: Curvas de produção das enzimas nos extratos obtidos por fermentação de Basidiomicetos separados: A – <i>Pleurotus ostreatus</i> PL06 (F3); B – <i>Ganoderma lucidum</i> 601 (F4); C – <i>Trametes versicolor</i> 561 (F5).CBM6; (C) – <i>G. lucidum</i> 601; (D) <i>P. ostreatus</i> PL06; (E) – <i>T. versicolor</i> 561.	55

Figura 19 A e B: Curvas de produção das enzimas nos extratos obtidos nas fermentações com Ascomicetos isolados: A – <i>Aspergillus niger</i> SCBM1 (F1) e B – <i>Aspergillus fumigatus</i> SCBM6 (F2).	65
Figura 20 A, B e C: Curvas de produção das enzimas nos extratos obtidos por fermentação de Basidiomicetos separados: A – <i>Pleurotus ostreatus</i> PL06 (F3); B – <i>Ganoderma lucidum</i> 601 (F4); C – <i>Trametes versicolor</i> 561 (F5)..	679
Figura 21 A a K: Curvas de produção das enzimas nos extratos: A – ni+tr+pl ((F6); B – fu+tr+pl (F7); C – ni+fu+tr (F8); D – ni+fu+pl (F9); E – ni+ga+pl (F10); F – fu+ga+pl (F11); G – ni+fu+ga (F12); H – tr+ga+pl (F13); I – ni+tr+ga (F14); J – fu+tr+ga (F15); K – ni+fu+tr+ga+pl (F16)	75
Figura 22: Projeção plana multivariada dos 16 extratos enzimáticos brutos para produção de FPase, CMCase, Avicelase, β -glicosidase, β -xilosidase, Xilanase, Lacase, MnP e LiP; O plano formado pela Componente Principal 1 (PC1) e Componente Principal 2 (PC2), reproduziram 54,6% da variância. Ni: <i>A. niger</i> SCBM1; Fu: <i>A. fumigatus</i> SCBM6; Tr: <i>T. versicolor</i> 561; Pl: <i>P. ostreatus</i> PL06; Ga: <i>G. lucidum</i> 601	90
Figura 23: Fermentação alcoólica de hidrolisados	99
Figura 24: Conversão máxima (%) de celulose e hemiceluloses em glicose e xilose após hidrólises enzimáticas de bagaço de cana com extratos brutos (ExB) e extrato comercial (ExC). Foram utilizados os seguintes hidrolisados: bagaço <i>in natura</i> : extrato Ni+Fu+Pl (F9) para celulose e Fu+Tr+Ga (F15) para hemiceluloses; bagaço AH: extrato Ni (F1) para celulose e Ni+Fu+Tr para hemiceluloses (F8); bagaço AH-Soda: extrato Ni+Ga+Pl (F10) para celulose e Fu (F2) para hemiceluloses.....	111
Figura 25: Efeito do aumento da carga de sólidos (10 a 40%) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar utilizando o extrato enzimático F1 (ART em g/L). Porcentagem de bagaço adicionado em cada ensaio: A – 10%; B – 15%; C – 20%; D – 25%; E – 30%; F – 35%; G – 40%.....	125
Figura 26: Efeito do aumento da carga de sólidos (10 a 40%) na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando o extrato enzimático F6 (ART em g/L). Porcentagem de bagaço adicionado em cada ensaio: A – 10%; B – 15%; C – 20%; D – 25%; E – 30%; F – 35%; G – 40%.....	125

Figura 27: Açúcares Redutores Totais (g/L) produzidos após hidrólises utilizando os extratos enzimáticos F1 e F6 e 30% de bagaço de cana-de-açúcar, com suplementação de Triton X-100. s/S: sem surfactante e c/S: com surfactante. 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção de enzimas do complexo lignocelulolítico por FES e seus respectivos substratos.....	49
Tabela 2: Delineamento experimental empregado nas FES para culturas puras e consórcios fúngicos. (1): presença do fungo e (zero): ausência do fungo.	56
Tabela 3: Picos das atividades (U/g) nos extratos enzimáticos produzidos em cada fermentação	87
Tabela 4: Extratos enzimáticos brutos de culturas puras e consórcios produzidos por FES utilizados no presente estudo (RODRIGUES et al. 2020).	97
Tabela 5: Composição mássica (%) de bagaço de cana-de-açúcar bruto (<i>in natura</i>), pré-tratado por auto-hidrólise (AH) e por deslignificação alcalina (AH-Soda).	101
Tabela 6: Produção de glicose e xilose após hidrólises de bagaço bruto utilizando os extratos enzimáticos produzidos por FES.	107
Tabela 7: Produção de glicose e xilose após hidrólises de bagaço pré-tratado por auto-hidrólise (AH), utilizando extratos enzimáticos produzidos por FES.	108
Tabela 8: Produção de glicose e xilose após hidrólise de bagaço pré-tratado por auto-hidrólise alcalina (AH-Soda), utilizando extratos enzimáticos produzidos por FES.	109
Tabela 9: Produção de glicose e xilose após hidrólises enzimáticas de bagaço de cana-de-açúcar com coquetel comercial, na proporção de: 85% de Cellic Ctec2 e 15% de Cellic Htec2.	110
Tabela 10: Compostos produzidos e parâmetros avaliados após fermentações de hidrolisados selecionados.	114
Tabela 11: Tempos de alimentação de biomassa na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar com carga de sólidos de 10 a 40%.....	122
Tabela 12: Parâmetros avaliados nos hidrolisados de 30% de bagaço de cana-de-açúcar utilizando os extratos enzimáticos F1 e F6, com suplementação de Triton x-100. s/S: sem surfactante e c/S: com surfactante.	131
Tabela 13: Parâmetros avaliados na fermentação alcóolica de hidrolisados com e sem adição de surfactante.	131
Tabela 14: Coeficientes de correlação de Pearson das associações entre as enzimas e os extratos enzimáticos com teste de significância.	158

Tabela 15: Coeficientes de correlação de Pearson das associações entre as enzimas com teste de Significância.....	159
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PT	Pré-tratamento
1G	1º Geração
2G	2º Geração
EG EC 3.2.1.4	Endoglicanase
CBH EC 3.2.1.91	1,4- β -Celobiohidrolase
BGL EC 3.2.1.21	β -Glicosidase
EC 3.2.1.8	Endo-1,4- β -xilanase
EC 3.2.1.37	Xilana 1,4- β -xilosidase
SCBM	Sugarcane Bagasse Mesophilic Strain
AH	Pré-tratamento hidrotérmico (Autohidrólise)
AH-Soda	Pré-tratamento hidrotérmico seguido de pré-tratamento alcalino
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalissílico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
TAPPI	Technical Association of the Pulp and Paper Industry
FES	Fermentação em Estado Sólido
ExB	Extrato enzimático bruto
ExC	Extrato enzimático comercial
PNPG	<i>p</i> -nitrofenil β -D-glicopiranosídeo
pNP	<i>p</i> -Nitrofenol
PNPX	<i>p</i> -Nitrofenil β -D-xilopiranosídeo
NREL	National Renewable Energy Laboratory
ACP	Análise de Componente Principal
PC1	Primeira Componente Principal
PC2	Segunda componente principal
Ni	<i>Aspergillus niger</i> SCBM1
Fu	<i>Aspergillus fumigatus</i> SCBM6
Tr	<i>Trametes versicolor</i> 561
Ga	<i>Ganoderma lucidum</i> 601
PI	<i>Pleurotus ostreatus</i> PLO6
FPase	Celulase de Papel de Filtro

CMCase	Carboximetilcelulase
La	Lacase
MnP	Manganês Peroxidase
Lip	Lignina Peroxidase
ART	Açúcares Redutores Totais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	22
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivo específicos	25
3.1. Matriz energética	26
3.2. <i>A produção de cana-de-açúcar e bagaço de cana no Brasil</i>	27
3.3. <i>A biomassa lignocelulósica</i>	28
3.3.1. Celulose	29
3.3.2. Hemiceluloses	30
3.3.3. Lignina	31
3.4. Produção de Etanol de 1ª e 2ª Geração	33
3.5. Enzimas Lignocelulolíticas	37
3.6. Fungos degradadores de biomassa lignocelulósica	43
3.7. O mercado de enzimas industriais	45
3.8. Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES)	47
CAPÍTULO 1	50
Produção de enzimas celulasas, hemicelulasas e ligninases por fermentação em estado sólido utilizando consórcios fúngicos	50
(Artigo publicado: RODRIGUES et al. 2020, Renewable Energy, 145: 2683-2693, https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041)	50
RESUMO	51
4. INTRODUÇÃO	52
5. MATERIAL E MÉTODOS	54
5.1. Microrganismos	54
5.2. Pré-inóculos para FES	54
5.3. Substrato e produção de enzimas por FES	55

5.4. Avaliação das atividades enzimáticas.....	57
5.4.1. <i>FPase</i> – (celulase de papel de filtro)	57
5.4.2. <i>Avicelase</i> e <i>CMCase</i>	57
5.4.3. β - <i>glicosidase</i>	58
5.4.4. β - <i>xilosidase</i>	58
5.4.5. <i>Xilanase</i>	58
5.4.6. <i>Lacase</i>	59
5.4.7. <i>Manganês peroxidase</i>	59
5.4.8. <i>Lignina peroxidase</i>	59
5.5. Análise dos dados.....	60
5.6. Análise de Componente Principal – ACP.....	60
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
6.1. Produção de enzimas por FES	61
6.1.1. Produção de enzimas por Ascomicetos isolados	61
6.1.2. Produção de enzimas por Basidiomicetos isolados	67
6.1.3. Produção de enzimas por consórcio entre Ascomicetos e Basidiomicetos ..	72
6.2. Análise de Componente Principal – ACP e Análise de Correlação.....	88
7. CONCLUSÕES	91
CAPÍTULO 2	92
Efeito de coquetéis lignocelulolíticos produzidos por consórcios fúngicos na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar e produção de etanol	92
RESUMO.....	93
8. INTRODUÇÃO	94
9. MATERIAL E MÉTODOS	96
9.1. Substrato.....	96
9.2 Pré-tratamento Hidrotérmico (AH) e Auto-hidrólise seguida de deslignificação alcalina (AH-Soda)	96

9.3. Hidrólise enzimática com coquetéis enzimáticos brutos	97
Tabela 4: Extratos enzimáticos brutos de culturas puras e consórcios produzidos por FES utilizados no presente estudo (RODRIGUES et al. 2020).	97
9.4. Hidrólise enzimática com coquetel comercial	97
9.5. Quantificação de açúcares nos hidrolisados	98
9.6. Fermentação alcoólica dos hidrolisados	98
10. RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
10.1. Pré-tratamento hidrotérmico (AH) e por auto-hidrólise seguida de pré-tratamento alcalino (AH-Soda).	101
10.2. Hidrólise com coquetéis enzimáticos brutos	103
10.3. Hidrólise enzimática com coquetel comercial	110
10.4. Fermentação alcoólica dos hidrolisados produzidos com extratos brutos	113
11. CONCLUSÕES	116
<i>CAPÍTULO 3</i>	117
Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar com alta carga de sólidos e suplementação com surfactante utilizando coquetéis produzidos por consórcios fúngicos.....	117
RESUMO.....	118
12. INTRODUÇÃO	119
13. MATERIAL E MÉTODOS	121
13.1. Bagaço de cana-de-açúcar	121
13.2. Estratégias de hidrólise enzimática em batelada	121
13.3. Fermentação alcoólica	123
13.4. Métodos analíticos	123
13.5. Análise estatística	123
14. RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
14.1. Influência da alta carga de sólidos na hidrólise enzimática	124
14.2. Efeito da adição de surfactante na hidrólise enzimática e na fermentação alcoólica	127

15. CONCLUSÕES	132
16. CONCLUSÕES GERAIS	133
PERSPECTIVAS DE PESQUISAS FUTURAS	134
REFERÊNCIAS.....	135
APÊNDICE	158
ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO (CAPÍTULO 1)	160

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A grande dependência mundial do petróleo e de seus derivados, até o presente momento, tem sido motivo de disputas entre as principais potências econômicas internacionais na geração de energia. A possível redução na oferta de tais combustíveis e o aumento na emissão de poluentes, ocasionando graves mudanças climáticas, têm incentivado a busca por fontes de energia sustentáveis (CONAB,2018; BAËTA *et al.*, 2016a). Em contrapartida, a utilização de recursos naturais a partir de fontes limpas e renováveis para a geração de biocombustíveis passou a ser uma alternativa intensamente investigada nas últimas décadas (DIAS *et al.*, 2011).

Entre os biocombustíveis, o etanol de primeira geração (1G) é produzido a partir de açúcares na forma de dissacarídeos (sacarose) e polissacarídeos (amido) presentes em diferentes vegetais, como por exemplo: beterraba, cana-de-açúcar e milho (SOMERVILLE *et al.*, 2010). Além de etanol 1G, o etanol de segunda geração (2G) representa uma fonte adicional de energia por ser produzido a partir do reaproveitamento da lignocelulose presente na biomassa de resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, palha de milho, entre outros) (PARSONS *et al.*, 2018). Neste cenário, o Brasil ocupa uma posição privilegiada devido à produção em larga escala de culturas agrícolas com alta geração de resíduos lignocelulósicos, que podem ser reaproveitados na produção de etanol 2G, dentre as quais se destaca a cana-de-açúcar (PANDEY *et al.*, 2000). Nesse sentido, estudos têm sido desenvolvidos para se estabelecer tecnologias que permitam a obtenção de etanol 2G principalmente a partir de bagaço e de palha de cana (PARSONS *et al.*, 2018).

Apesar das vantagens ambientais do etanol 2G, a eficiente degradação da lignocelulose presente no bagaço de cana representa um gargalo à produção e comercialização em grande escala desse biocombustível (HONGZHANG CHEN; LAN WANG, 2017). A natureza altamente recalcitrante e complexa da lignina contida na biomassa dificulta sua desestruturação, devido à presença de ligações químicas complexas (CHUNG; WASHBURN, 2015; PARK *et al.*, 2018). A cristalinidade da celulose também representa um fator limitante na despolimerização e desestruturação da lignocelulose (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013). Em função disso, é necessário separar a lignina da celulose para reduzir a resistência desses materiais à ação das

enzimas hidrolíticas e promover a liberação de açúcares fermentescíveis (PARK *et al.*, 2018). Para tanto, faz-se necessária uma etapa de pré-tratamento da biomassa.

Dos diferentes tipos de pré-tratamentos, o pré-tratamento químico autohidrólise (AH) e por auto-hidrólise seguida de pré-tratamento alcalino (AH-soda) apresentam algumas vantagens sobre os demais. O pré-tratamento hidrotérmico (AH), é eficiente na remoção de hemiceluloses, promove uma baixa formação de inibidores da hidrólise enzimática, além de ser de baixo custo (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013). Já o pré-tratamento AH-Soda é interessante por remover a lignina, os grupos acetil e diferentes substituições de ácido urônico, que inibem a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à celulose. Além disso, o método alcalino, também pode ser operado em baixas temperatura e pressão, quando comparado com pré-tratamentos ácidos (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013).

Para a liberação de açúcares fermentescíveis, é necessário a aplicação de um coquetel enzimático com alto sinergismo, contendo uma mistura de enzimas hidrolíticas, em especial celulasas (endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidasas) (RAWAT *et al.*, 2014). Paralelamente, enzimas que degradam as hemiceluloses, principalmente cadeias de xilanas (como β -xilosidasas, xilanases, entre outras), são igualmente importantes para liberação de pentoses que, assim como as hexoses, também podem ser fermentadas a etanol e outros produtos de valor agregado. Contudo, atualmente, o alto custo de coquetéis enzimáticos comerciais é um dos principais entraves à sacarificação de biomassas lignocelulósicas, representando um fator limitante à produção de etanol 2G.

Já é conhecido que algumas espécies de fungos e bactérias são bons produtores de enzimas do complexo ligno(hemi)celulolítico (HANSEN *et al.*, 2015). Nesse sentido, diversos estudos têm buscado identificar novas espécies microbianas produtoras de ligninases, celulasas e hemicelulasas para potencializar a degradação da lignocelulose e melhorar os rendimentos em monossacarídeos (DE CASSIA PEREIRA *et al.*, 2015; MARQUES *et al.*, 2018; PEREIRA SCARPA *et al.*, 2019). Entretanto, grande parte desses estudos têm sido realizados por meio do cultivo de microrganismos isolados para a produção de enzimas. Como alternativa, consórcios microbianos, principalmente de fungos filamentosos, podem ser empregados para se obter extratos enzimáticos mais eficientes e com poder sinérgico superior

(COPETE-PERTUZ et al., 2019; DE OLIVEIRA RODRIGUES et al., 2020; PAN et al., 2014)

Fungos basidiomicetos, por exemplo, são excelentes na síntese de enzimas, principalmente as do complexo lignolítico, que degradam a lignina presente na biomassa vegetal (*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Ganoderma lucidum*). Assim como diferentes ascomicetos, como as espécies do gênero *Aspergillus*, também são bons produtores principalmente de celulases e hemicelulases (DOS SANTOS et al., 2019; RODRIGUES et al., 2017).

Neste cenário, este estudo avaliou a produção de extratos brutos contendo atividades mistas de celulases, hemicelulases e ligninases por Fermentação em Estado Sólido (FES), utilizando linhagens fúngicas das espécies *Aspergillus niger* SCBM1, *Aspergillus fumigatus* SCBM6, *Ganoderma lucidum* 601, *Trametes versicolor* 561 e *Pleurotus ostreatus* PLO6 em monoculturas e em consórcio a partir da elaboração de uma matriz experimental do tipo 2⁵⁻¹. Em seguida, a eficiência dos coquetéis produzidos foi avaliada na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise (AH) e auto-hidrólise seguida de pré-tratamento alcalino (AH-Soda). Os extratos mais eficientes na liberação de açúcares fermentescíveis foram selecionados e, posteriormente, avaliados em novas hidrólises utilizando altas cargas de sólidos e surfactante Triton X-100, a fim de potencializar o processo hidrolítico. Por último, a fermentação alcoólica dos hidrolisados contendo as maiores concentrações em açúcares foi realizada utilizando uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* de uso industrial. Dessa forma, este estudo objetivou melhorar a eficiência da hidrólise de bagaço de cana utilizando extratos enzimáticos de baixo custo e, assim, contribuir para a viabilização da produção de etanol 2G.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficiência de extratos enzimáticos produzidos por fermentação em estado sólido (FES) utilizando consórcios fúngicos na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado para produção de etanol 2G.

2.2. Objetivo específicos

2.2.1. Produzir coquetéis enzimáticos brutos por FES, utilizando diferentes combinações de espécies fúngicas (*Aspergillus niger* SCBM1, *Aspergillus fumigatus* SCBM6, *Trametes versicolor* 561, *Ganoderma lucidum* 601, *Pleurotus ostreatus* PLO6) isoladas e em consórcio;

2.2.2. Avaliar a eficiência dos coquetéis enzimáticos produzidos na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (AH) e auto-hidrólise seguida de pré-tratamento alcalino (AH-Soda);

2.2.3. Verificar a melhor condição de hidrólise enzimática variando a carga de sólidos (bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise) e com a adição de um surfactante (Triton X-100);

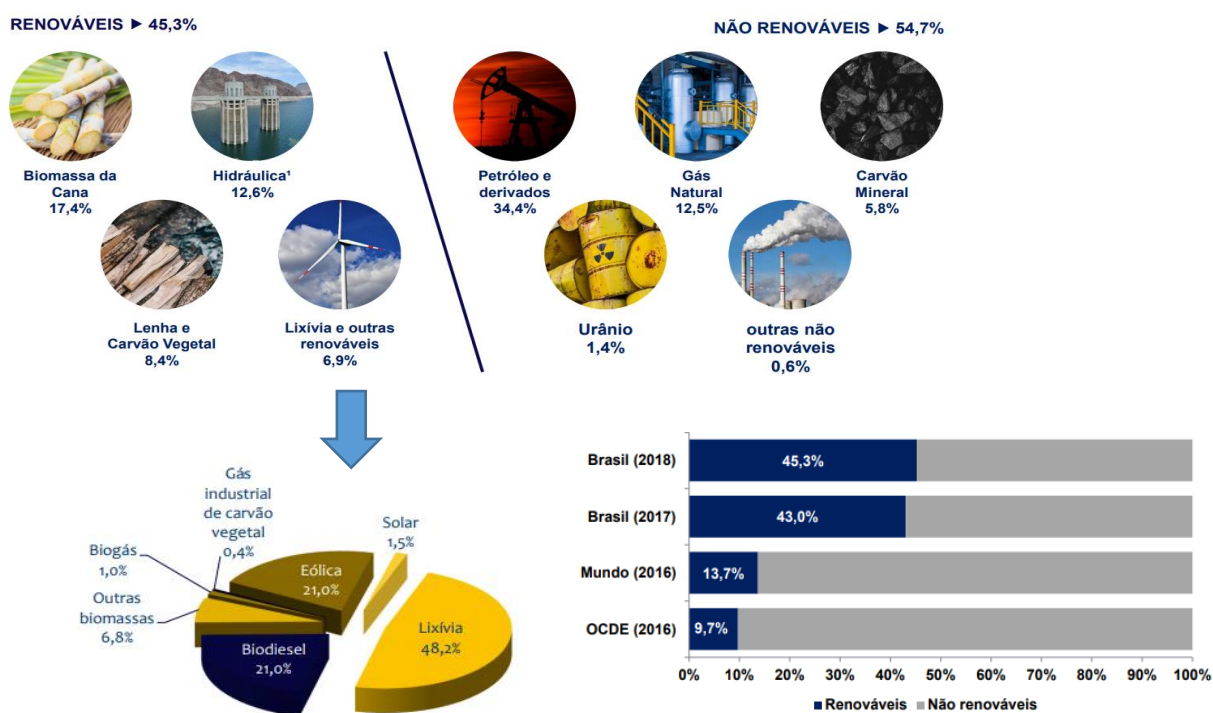
2.2.4. Produzir etanol 2G a partir dos hidrolisados selecionados contendo maiores teores de açúcares.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Matriz energética

Os combustíveis fósseis representam cerca de 86,3% da matriz energética mundial, enquanto os combustíveis de origem renovável, correspondem a apenas 13,7% (Figura 1) (EPE, 2019). Neste cenário, o Brasil vem se destacando por ser um dos países que mais utiliza energia limpa, com 46,3% de sua matriz a partir de fontes renováveis. Porém, o consumo de petróleo ainda é alto (Figura 1) (EPE, 2019).

Figura 1: Contribuição das fontes de energia renováveis e não renováveis no Brasil e no mundo.



Fonte: EPE - Empresa de Pesquisa e Energia (2019, p. 16, 18 e 19)

O uso excessivo do petróleo se tornou tema de discussão devido às ameaças ambientais decorrentes da sua exploração indiscriminada, desde grandes acidentes como derramamentos em bacias hidrográficas à emissão de altos níveis de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera. Somada a essas questões ambientais, a alta instabilidade no mercado de petróleo e a incerteza sobre o seu real volume de suas

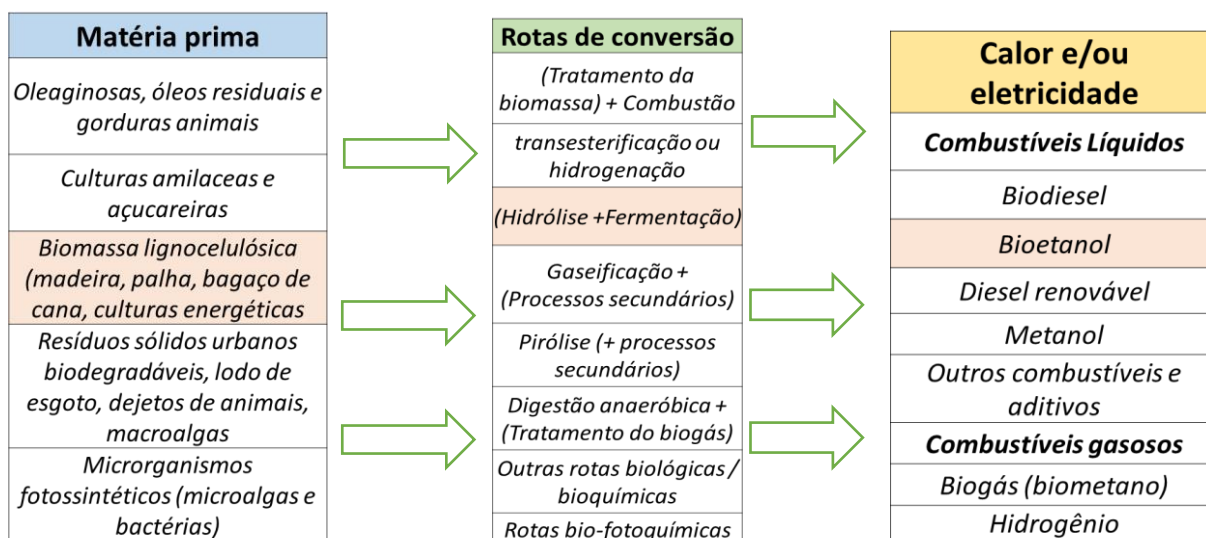
reservas para atender gerações futuras têm contribuído para a crescente busca por fontes de energia limpas e renováveis (CONAB,2018).

3.2. A produção de cana-de-açúcar e bagaço de cana no Brasil

Grande parte da economia brasileira é baseada na agricultura, com uma alta produção de café, soja, mandioca, frutas, diversos cereais (como o arroz, milho, sorgo e trigo), cana-de-açúcar, entre outros. Uma produção que gera diariamente grande quantidade de resíduos com alto valor em energia renovável. Uma das maiores questões envolvendo a agroindústria é a quantidade de resíduos gerados no processamento da matéria-prima e o acúmulo desses resíduos no ambiente. A aglomeração de toda essa biomassa na natureza traz prejuízo ao ambiente com potencial risco de contaminação dos solos e cursos d'água. Além disso, a economia do país perde por não aproveitar o potencial econômico dessas matérias-primas, principalmente em processos biotecnológicos.

Estes resíduos biológicos, podem ter várias destinações, com diferentes rotas de conversão, que vão desde sua combustão para gerar energia térmica, a processos físico-químicos e bioquímicos complexos para se obter biocombustíveis líquidos e gasosos, como biodiesel, metanol, aditivos, biogás, bioetanol, entre outros, conforme Figura 2 (TOLMASQUIM *et al*, 2014).

Figura 2: Rotas de conversão aplicadas a biomassas.

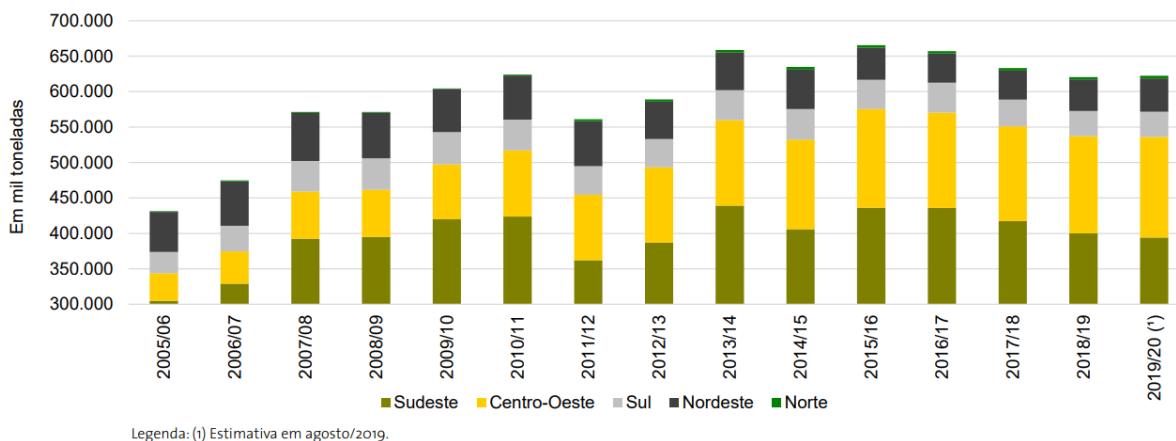


(Fonte: Elaborado a partir de IEA Bioenergy , 2009).

Entre os vários resíduos agroindustriais gerados anualmente no Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é o que recebe maior destaque, com disponibilidade em larga escala. Segundo dados da CONAB (2019) a safra de cana-de-açúcar 2019/20, que iniciou em 1º de abril de 2019, está estimada em 622.268,2 milhões de toneladas (Figura 3). Considerando que a cada tonelada de cana moída, são obtidos aproximadamente de 250 a 280 kg de bagaço contendo 50% (m/m) de umidade (ROCHA *et al.*, 2015), a previsão é que sejam gerados de 155 a 174 milhões de toneladas de resíduo de cana pela indústria sucroalcooleira.

Aliado à crise do petróleo e aos problemas de abastecimento que o Brasil vem sofrendo, o bagaço da cana-de-açúcar se destaca como uma fonte de energia alternativa e promissora para aumentar a produção de biocombustíveis e reduzir a dependência em relação aos combustíveis fósseis.

Figura 3: Estimativa da produção de cana-de-açúcar, na safra 2019/20, com comparativo entre as regiões.

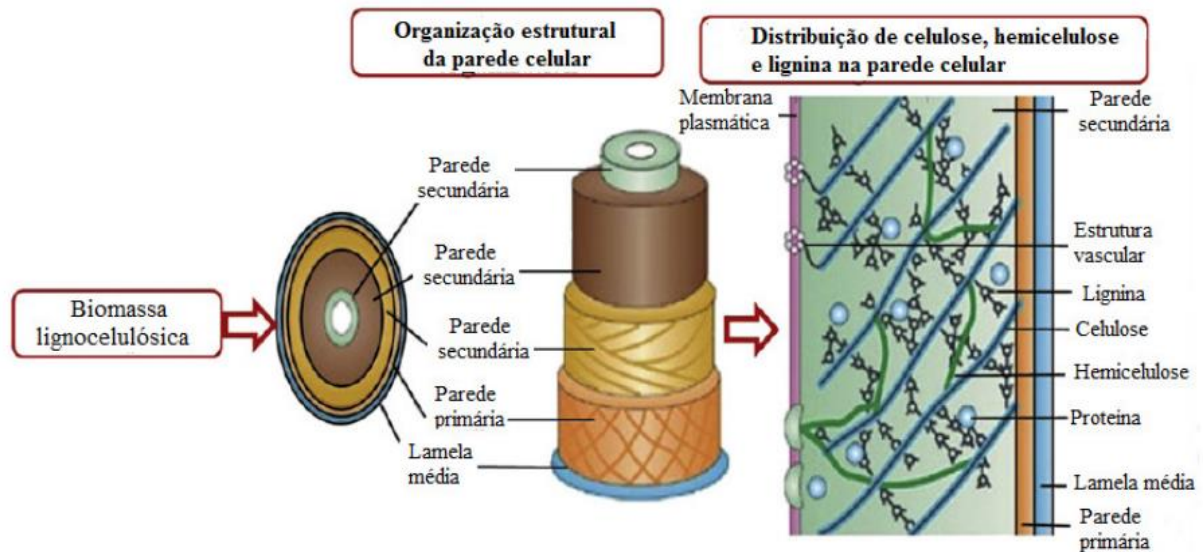


Fonte: CONAB (2019, p. 16)

3.3. A biomassa lignocelulósica

A lignocelulose é o principal componente da biomassa vegetal e diversas pesquisas destacam sua utilização como uma fonte alternativa e renovável de energia e bioprodutos (BAÊTA *et al.*, 2016b; CABRAL *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2017). Essa biomassa tem como principais componentes a lignina, as hemiceluloses e a celulose, seguindo um arranjo estrutural característico (Figura 4).

Figura 4: Esquema da biomassa lignocelulósica.

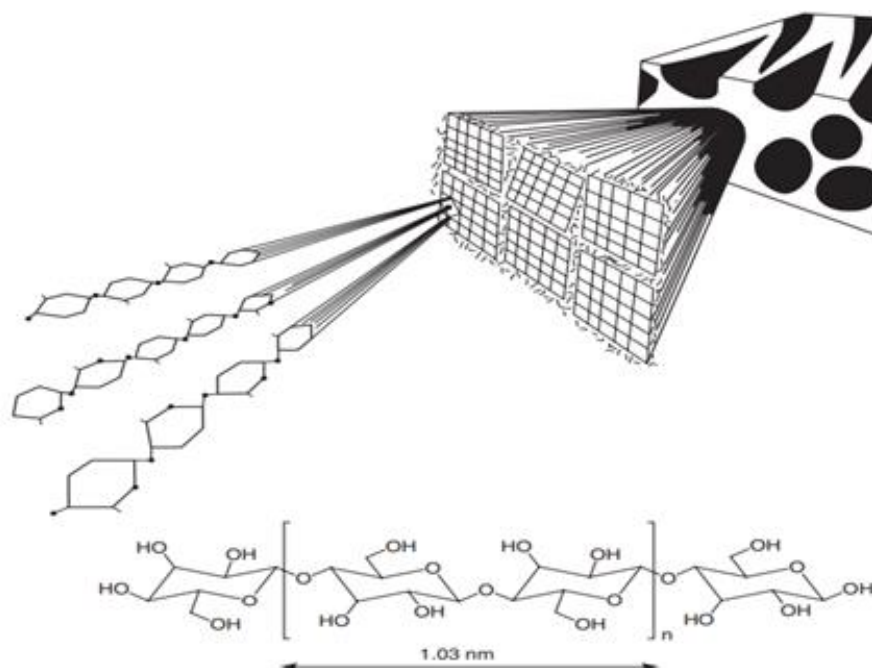


Fonte: Menon; Rao (2012, p. 525) - adaptado.

3.3.1. Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo linear presente na parede celular vegetal na forma de fibras semicristalinas, representando 34 % a 45% da biomassa lignocelulósica (KAI et al., 2016). Este polímero de cadeia longa é composto por monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1 \rightarrow 4 (BUNTERNGSOOK *et al.*, 2018; UTO *et al.*, 2018). As subunidades de cada fibra individual são classificadas como microfibrilas que, por sua vez, são constituídas por cordões macromoleculares altamente regulares contendo a unidade repetitiva de celobiose (Figura 5). As grandes cadeias de celulose se relacionam por múltiplas ligações de hidrogênio entre os grupos, formando cadeias com alinhamento paralelo, justapostas e compactadas de glicose (ALQUS; EICHHORN; BRYCE, 2015; UTO *et al.*, 2018).

Figura 5: Esquema da fibra de celulose, evidenciando a unidade repetitiva de celobiose.

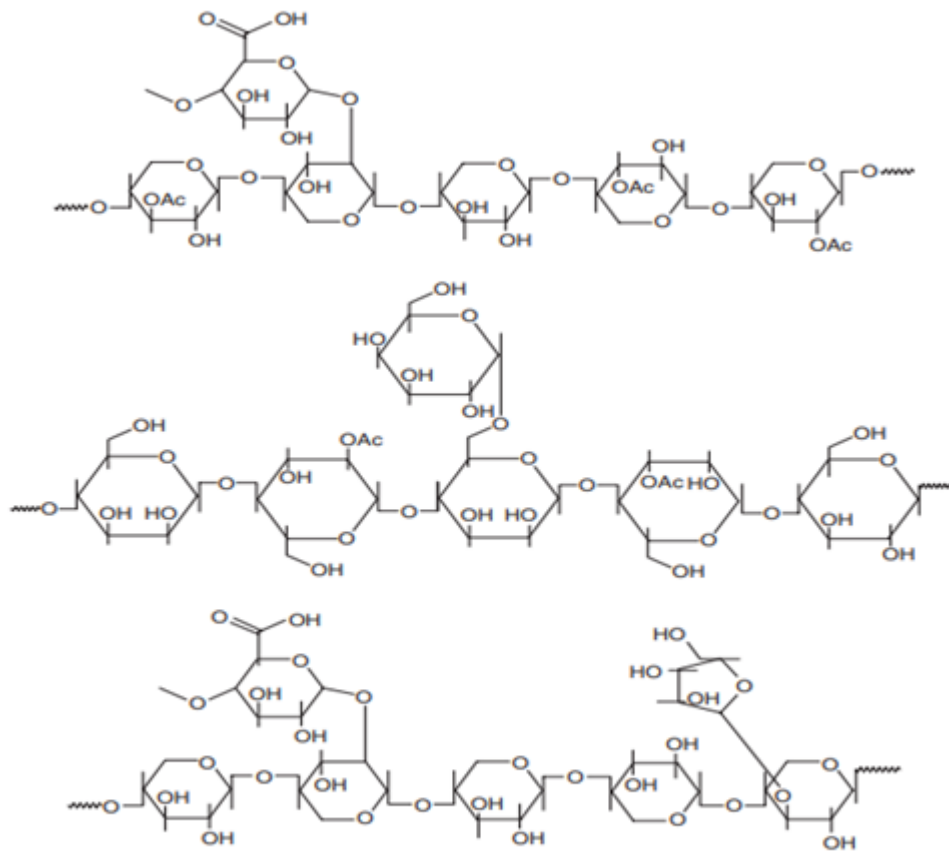


Fonte: Belgacem e Gandini (2008, p. 05)

3.3.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são uma classe de heteropolissacarídeos ramificados e complexos, que, associados à celulose e a lignina, auxiliam na formação de ligações cruzadas nas fibras vegetais (Figura 6) (TERRONE *et al.*, 2018). Elas representam cerca de 26 a 36% da biomassa lignocelulósica (CHANDEL *et al.*, 2012; KAI *et al.*, 2016). Estes heteropolissacarídeos, com dimensões oligoméricas, possuem uma variedade de açúcares nas cadeias, como por exemplo: pentoses (β -D-xilose; α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose; β -D-glicose; α -D-galactose) e ácidos (4-ácido metil glucurônico; α -D-galacturônico). Em espécies de madeira dura, gramíneas e subprodutos agroindustriais (palhas de milho, bagaço de cana, palha de cereais), as hemiceluloses são compostas predominantemente por monômeros de β -D-xilopiranosídeos unidos por ligações glicosídicas do tipo β -1 \rightarrow 4 são chamadas de xilanas (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

Figura 6: Estrutura típica de uma hemicelulose.



Fonte: Gandini e Belgacem (2008, p.7)

Dentre as várias hemiceluloses presentes na biomassa lignocelulósica, a xilana é a mais abundante, representando até 50% dos tecidos de monocotiledôneas, gramíneas e cereais (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012). Ela é composta por uma espinha dorsal de resíduos β -1,4-D-xilanopiranosil unidos, com substituintes como os grupos glucuronasila, arabinosila, acetila, entre outros (SUN *et al.*, 2016). A xilana e outras hemiceluloses (glucomananas, arabinogalactanas), estão intimamente associadas às fibrilas da celulose e lignina, conferindo rigidez ao tecido vegetal (DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012).

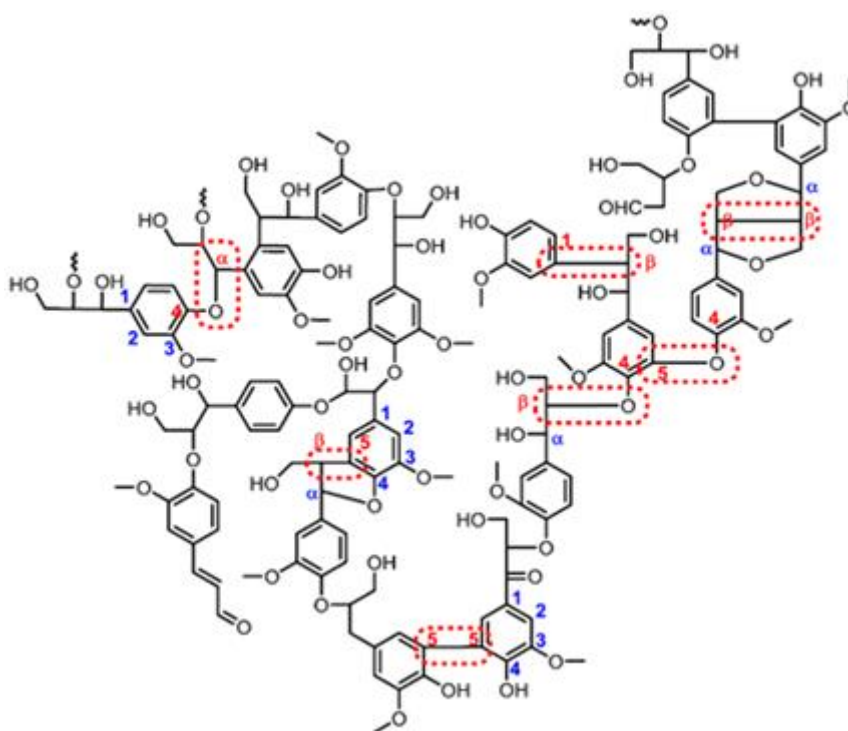
3.3.3. Lignina

A lignina é a segunda macromolécula mais abundante na parede celular vegetal, representando cerca de 20 a 30% da biomassa lignocelulósica (Figura 7) (CHUNG; WASHBURN, 2015; KAI *et al.*, 2016). Tem uma função importante no

desenvolvimento das plantas, conferindo força e rigidez e protegendo contra-ataques de insetos e microrganismos.

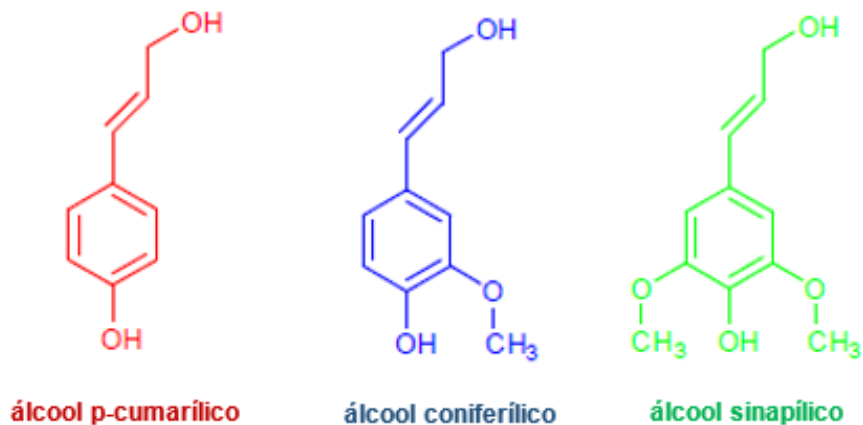
A lignina pode ser considerada como uma “cola natural” que une a celulose e as hemiceluloses na fibrila, estando diretamente ligada à baixa digestibilidade da biomassa devido à sua natureza altamente recalcitrante e complexa (KAI *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2018). Dessa forma, a lignina pode adsorver de maneira irreversível as enzimas hidrolíticas e bloquear o ataque à celulose por celulases (PALONEN *et al.*, 2004). Essa macromolécula amorfa e tridimensional é formada pela polimerização de três unidades monoméricas estruturais básicas de álcoois aromáticos: *p*-coumaril, coniferil e sinapil (Figura 8) (KAI *et al.*, 2016; MELRO *et al.*, 2018). Por ser o resultado de uma combinação desses álcoois aromáticos, a lignina não pode ser descrita por um simples arranjo de poucas unidades monoméricas ligadas de forma repetitiva, pelo contrário, suas unidades de fenilpropano estão organizadas de forma não regular, em uma rede complexa e não repetitiva, sem um padrão único, ou seja, sofrendo variações de acordo com a espécie vegetal, clima, cultivo e processo de extração (CHUNG; WASHBURN, 2015).

Figura 7: Estrutura da lignina com ligações C-O, como as β -O-4, α -O-4, e 4-O-5, e ligações C-C como: β -5, 5-5, β -1 e β - β .



Fonte: Chung; Washburn (2015, p.14)

Figura 8: Unidades monoméricas precursoras da lignina.



Fonte: KAI *et al* (2016, p. 6)

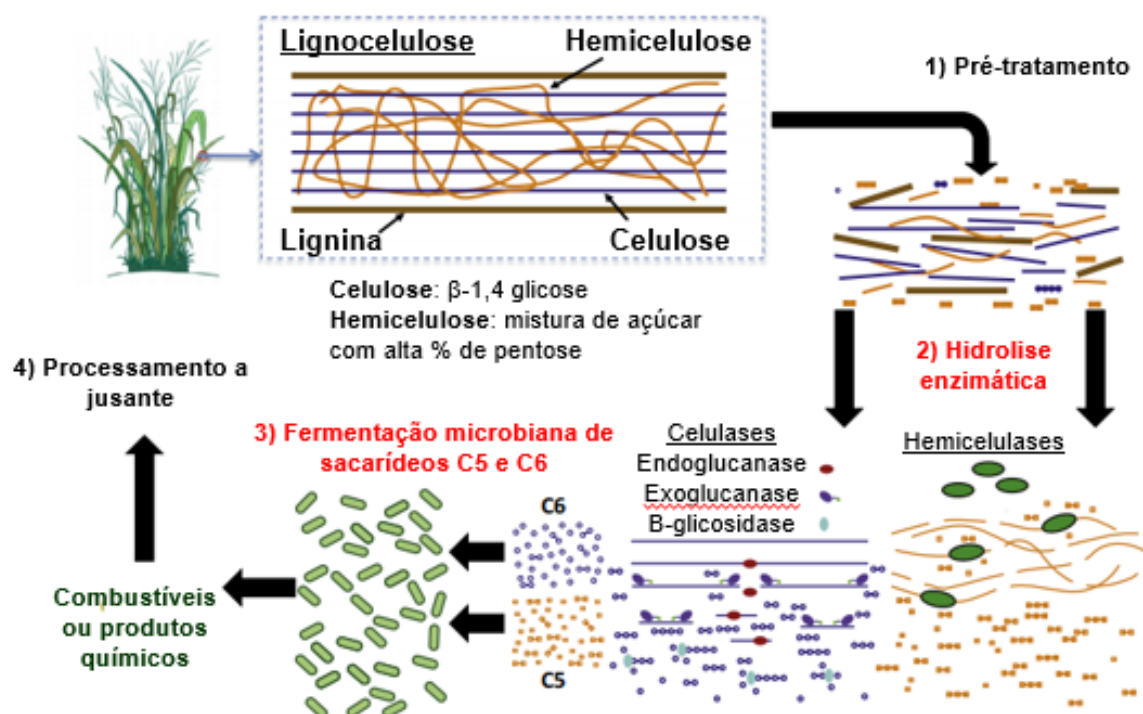
3.4. Produção de Etanol de 1^a e 2^a Geração

O etanol é considerado uma excelente alternativa como combustível, por ser uma fonte de energia limpa e renovável, além de contribuir com a manutenção do ambiente. Atualmente, a maior parte da produção deste biocombustível tem se concentrado nos Estados Unidos e no Brasil. O Brasil hoje encontra-se em uma posição de destaque com cerca de 30% da produção mundial, por apresentar vantagens na tecnologia de produção, sem ampliar área desmatada ou reduzir a área destinada à produção de alimentos (PARSONS *et al.*, 2018). Além disso, a matriz energética brasileira é um exemplo de sustentabilidade, com cerca de 45,3% da energia renovável, enquanto a média mundial é de apenas 13,7% (EPE, 2019). O etanol de primeira geração (etanol 1G) é produzido a partir da fermentação dos açúcares presentes em diferentes vegetais, principalmente a beterraba, milho e cana-de-açúcar. No Brasil, a produção de etanol combustível ocorre em larga escala a partir da sacarose presente no caldo de cana-de-açúcar, obedecendo as etapas de: moagem da cana, obtenção do caldo, fermentação do mosto, e por último, a destilação do vinho fermentado (SOCCOL *et al.*, 2011).

O etanol de segunda geração (etanol 2G), também conhecido como etanol celulósico, pode ser produzido a partir de diferentes resíduos lignocelulósicos como:

bagaço de milho, palha de arroz e de milho, sorgo, capim, bagaço de cana, entre outros (SOMERVILLE *et al.*, 2010). No Brasil, este biocombustível é gerado a partir de coprodutos da cana-de-açúcar (palha e bagaço) após a moagem da cana para a produção de etanol 1 G pelo processo tradicional. A produção de etanol 2G ou etanol celulósico tem diferentes vantagens: aproveitamento dos subprodutos da cana, a utilização desses insumos disponíveis nas usinas, aumento na produção do etanol sem aumentar a área de cultivo, produção do biocombustível durante a entressafra e redução da emissão de carbono durante a produção, tornando-o um combustível mais limpo (PARSONS *et al.*, 2018). Porém, a grande barreira para a reutilização eficiente da biomassa lignocelulósica residual se deve à presença da lignina recalcitrante que requer um tratamento eficiente para tornar a fração polissacarídica composta por hemiceluloses e celulose mais acessíveis. Para a geração do etanol 2G, é necessário a despolimerização das fibras da lignocelulose e liberação dos açúcares na forma de monossacarídeos, processo este que pode ser realizado em três etapas de bioconversão: pré-tratamento, hidrólise e fermentação alcoólica (Figura 9).

Figura 9: Etapas da bioconversão de lignocelulose a etanol 2G.



Fonte: Minty; Lin, (2015, p.366)

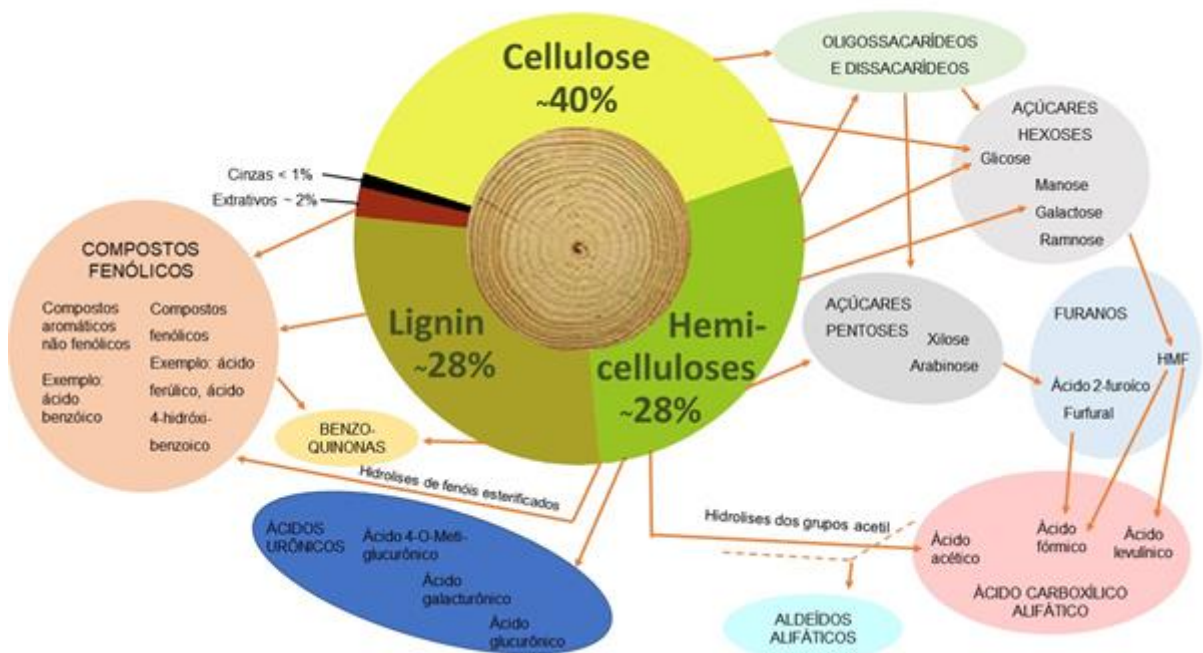
O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica deve ser empregado para aumentar a liberação de açúcares simples (oligossacarídeos e monossacarídeos) para posterior hidrólise e reduzir a formação de inibidores das etapas seguintes. A sua função é alterar as interações entre a lignina, as hemiceluloses e celulose, reduzindo a ação protetora da lignina, aumentando a porosidade da parede celular, diminuindo a cristalinidade da celulose, de forma a tornar a celulose mais acessível para a etapa de hidrólise enzimática (Figura 9) (CHANDRA; TAKEUCHI; HASEGAWA, 2012; KARP *et al.*, 2013). A biomassa vegetal pode receber diferentes tipos de pré-tratamentos: físico-mecânicos, biológicos, químicos ou a associação desses.

Entre os pré-tratamentos (PT) físico-mecânicos, o mais comum é a moagem ou trituração da biomassa que reduz o tamanho das partículas, tendo como principais vantagens a redução das regiões cristalinas da celulose e o aumento da área superficial do substrato (RAMOS *et al.*, 2015; WANDERLEY *et al.*, 2013). Sua desvantagem seria o gasto de energia para realizar o processo. O pré-tratamento biológico consiste em degradar a matéria lignocelulósica utilizando fungos e bactérias. Esse pré-tratamento é ambientalmente correto por requerer baixa quantidade de energia, não ser quimicamente intenso, além de ser de baixo custo e realizado em faixas amenas de temperatura (CHANDRA; TAKEUCHI; HASEGAWA, 2012; LIGUORI, R., FARACO, 2016). No entanto, este tipo de PT requer muito tempo para se obter um resultado satisfatório, uma vez que o processo gera perda de matéria prima, pois os microrganismos consomem parte dos açúcares que são liberados durante o crescimento, ocasionando, portanto, em uma baixa conversão e eficiência (LIGUORI, R., FARACO, 2016).

Nos últimos anos, os pré-tratamentos químicos (ácido e alcalino) têm sido os mais utilizados (DE CASSIA PEREIRA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017). O pré-tratamento com ácidos tem a vantagem de hidrolisar os polissacarídeos, principalmente as hemiceluloses, aumentando o acesso à celulose (MOOD *et al.*, 2013). Porém, o uso de ácidos pode causar toxicidade, corrosão de equipamentos e formação de inibidores (compostos furânicos e ácidos orgânicos de cadeia curta), fragmentos de lignina, além da degradação de monossacarídeos, o que exige um maior controle do método (SILVEIRA; VANELLI; CHANDEL, 2018) (Figura 10). O pré-tratamento alcalino, por sua vez, é eficiente principalmente na remoção da lignina, promovendo um aumento da porosidade das fibras, reduzindo a cristalinidade

da celulose, apresentando baixa formação de inibidores, permitindo um melhor acesso enzimático ao substrato (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Figura 10: Produtos de degradação da lignocelulose como resultado do pré-tratamento em condições ácidas.



Fonte: Jönsson; Martín (2016, p. 2)

Atualmente, os pré-tratamentos empregando métodos oxidativos e hidrotérmico, têm-se destacado. Os métodos oxidantes são eficientes na redução da cristalinidade da celulose, além de interromper a associação entre carboidratos e lignina (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Os métodos mais utilizados são: peróxido de hidrogênio em meio alcalino, ozonólise e oxidativos. Durante esses processos, as hemiceluloses são amplamente solubilizadas e recuperadas como oligossacarídeos, enquanto que a lignina é fragmentada e oxidada em ácidos carboxílicos alifáticos e compostos fenólicos (MARTÍN *et al.*, 2007). No método hidrotérmico, a água na fase líquida ou na fase de vapor é utilizada para pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, que sob alta pressão, faz com que a água penetre na biomassa, hidratando a celulose, removendo a maioria das hemiceluloses e uma parte menor da lignina (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). É um método muito utilizado e eficiente, principalmente por não requerer o uso de catalisadores e, com o controle da concentração de H⁺, com valor neutro de pH, minimiza a formação de inibidores, além

de ser eficaz em melhorar a acessibilidade aos sítios de ligação, na área superficial da celulose, aumentando, portanto, a conversão enzimática (BAËTA et al., 2016b)

Na etapa de hidrólise, ocorre a liberação dos monossacarídeos que, posteriormente serão fermentados a etanol. A liberação desses açúcares pode ser obtida pela ação sinérgica de enzimas (hemi)celulolíticas ou quimicamente pelo uso de ácidos (ZHANG; LIU; ZHAO, 2012). A hidrólise ácida é o mais antigo dos métodos e emprega ácidos como catalisadores homogêneos. Contudo, a hidrólise enzimática tem sido vista como mais vantajosa, pois requer menos energia e condições de reação amenas e não gera inibidores se a desacetilação da biomassa for realizada previamente (BRUMMER *et al.*, 2014). Na hidrólise enzimática, enzimas do complexo lignocelulolítico hidrolisam a celulose à glicose, enquanto que da cadeia de xilana é liberada, principalmente, xilose (SHUDDHODANA *et al.*, 2016).

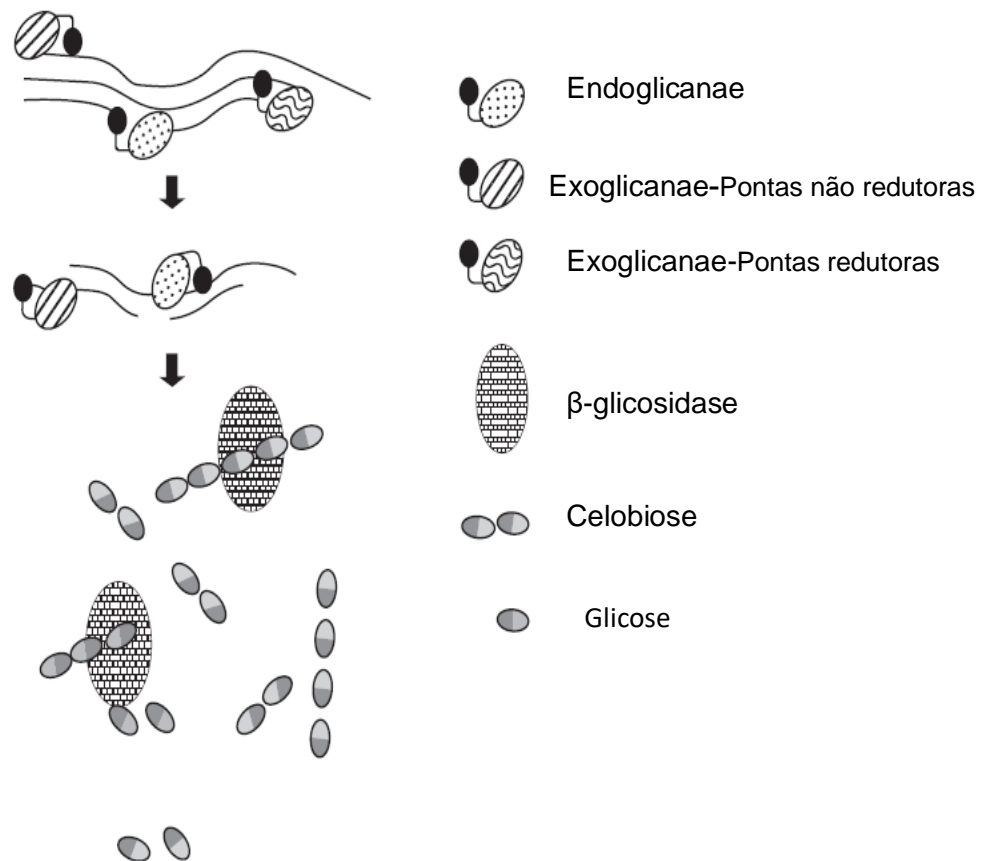
A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual as hexoses, isto é, açúcares de seis carbonos - C6 (glicose, frutose, manose) e as pentoses, açúcares de cinco carbonos do tipo C5 (principalmente xilose, arabinose) são fermentados por leveduras, a etanol. Linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são capazes de fermentar glicose em altas concentrações. Contudo, as pentoses, açúcares liberados na fração hemicelulósica, não são fermentados por *Saccharomyces*, requerendo outras espécies de leveduras para aumentar a eficiência do processo de conversão (LEE, 1997).

3.5. Enzimas Lignocelulolíticas

A degradação da lignocelulose requer a ação sinérgica de um conjunto de enzimas que atuam em regiões específicas da fibra vegetal. No sistema celulolítico, três grupos de enzimas são responsáveis por fragmentar a cadeia de celulose e liberar monômeros fermentescíveis: as endo- β -1,4-D-glucanohidrolases ou endoglucanase (EG; EC 3.2.1.4), as exo- β -1,4-D-glicanaes ou exoglucanase ou celobiohidrolases (CBH; EC 3.2.1.91) e as β -glucosidases ou celobiasas (BGL; EC 3.2.1.21) (RAWAT *et al.*, 2014). As atividades das endo e exoglucanase são também denominadas como carboximetil celulase (CMCase) e avicelase, respectivamente. As endoglucanases clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4, em regiões da cadeia de celulose com baixa cristalinidade, expondo extremidades redutoras e não redutoras à ação de celobiohidrolases, que agem em sequência ligando-se às regiões cristalinas,

resultando na produção de dímeros de celobiose (Figura 11) (BUSSAMRA *et al.*, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Com as moléculas de celobiose livres no meio, entram em ação as β -glicosidases, que clivam esses dímeros liberando os monômeros de glicose durante a hidrólise (SRIVASTAVA *et al.*, 2018).

Figura 11: Mecanismo de ação das celulases.

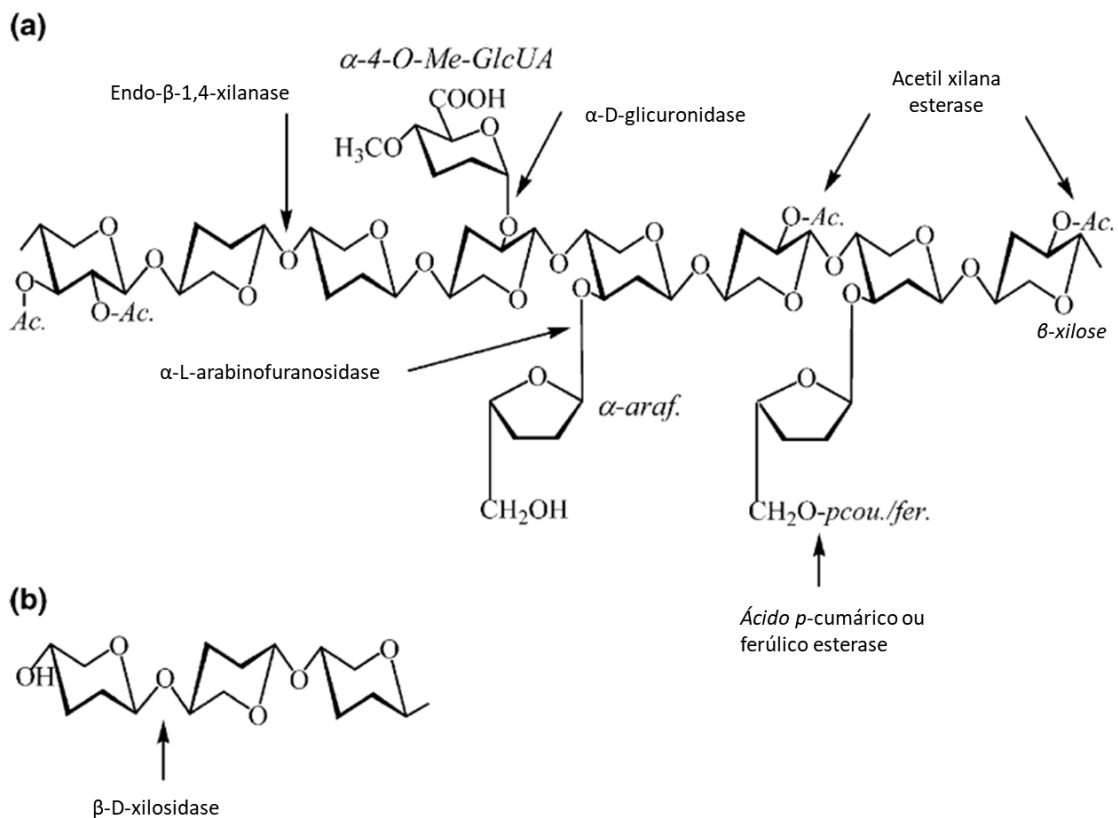


Fonte: Maurice (2019, p. 131)

Para as hemiceluloses, devido à heterogeneidade estrutural, sua completa degradação requer a ação cooperativa de um repertório de hemicelulases, que atuam principalmente na biodegradação da xilana, liberando diferentes compostos e açúcares (Figura 12) (UDAY *et al.*, 2016). As endo-xilanases (endo-1,4- β -xilanase, EC3.2.1.8) clivam aleatoriamente o esqueleto homopolimérico da β -1,4-D-xilopiranosose, reduzindo o grau de polimerização do substrato da xilana, enquanto que as β -xilosidases (xilano-1,4- β -D-xilosidase, EC3.2.1.37) clivam monômeros de xilose

da extremidade não redutora de xilo-oligossacarídeos e xilobiose, liberando xilose no meio (KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010; TERRONE *et al.*, 2018; UDAY *et al.*, 2016). A remoção dos grupos laterais é catalisada por α -glicuronidasas (EC 3.2.1.139), α -L-arabinofuranosidas (EC3.2.1.55), acetilxilano esterases (EC3.1.1.72), esterases do ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) e as esterases do ácido *p*-cumárico (EC 3.1.1.-), sendo que as endoxilanases e β -xilosidasas (coletivamente xilanases) são as principais enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana (UDAY *et al.*, 2016).

Figura 12: Ação sinérgica de hemicelulases na biodegradação de xilana.



Fonte: Collins; Gerday; Feller (2005, p. 5)

Enquanto os processos de degradação da celulose e hemiceluloses ocorrem de maneira mais simples, por via hidrolíticas, moléculas complexas como a lignina são resistentes à degradação enzimática, ocorrendo por um processo oxidativo complexo e não específico (PERALTA *et al.*, 2017). A decomposição da lignina ocorre por um sistema de enzimas lignolíticas, sendo necessários diferentes arranjos nos sistemas

de óxido-redução para promover a degradação (PERALTA *et al.*, 2017). As ligninases são denominadas: oxidases e peroxidases que compreendem respectivamente: lacases – Lc (fenoloxidase, Ec 1.10.3.2), lignina peroxidases (LiP, EC 1.11.1.14) e manganês peroxidases (MnP, EC 1.11.1.13) (PERALTA *et al.*, 2017; SHERPA; GHANGREKAR; BANERJEE, 2018). As lacases (EC 1.10.3.2) oxidam grupos fenólicos, quebrando cadeias laterais e anéis aromáticos da macromolécula de lignina (TIEN; KENT KIRK, 1983; ZOUARI-MECHICHI *et al.*, 2006). As lacases são oxidases de cobre, extracelulares, que catalisam a oxidação de um único elétron em substratos fenólicos e aminas aromáticas, com uma redução concomitante de O₂ para H₂O (Figura 13) (BENTO *et al.*, 2010; PERALTA *et al.*, 2017; SHERPA; GHANGREKAR; BANERJEE, 2018). Essas enzimas têm quatro átomos de cobre distribuídos em três sítios ativos denominados: T1, T2 e T3 (PERALTA *et al.*, 2017). A atuação de lacases ocorre com a subtração de um elétron do fenol, a partir da redução de Cu²⁺ a Cu⁺ no sítio T1 e transferência do elétron para o O₂ que é reduzido a H₂O nos sítios T2 e T3 (Figura 14) (AGUIAR, A.; FERRAZ, 2011).

Figura 13: Reação catalisada por lacases.

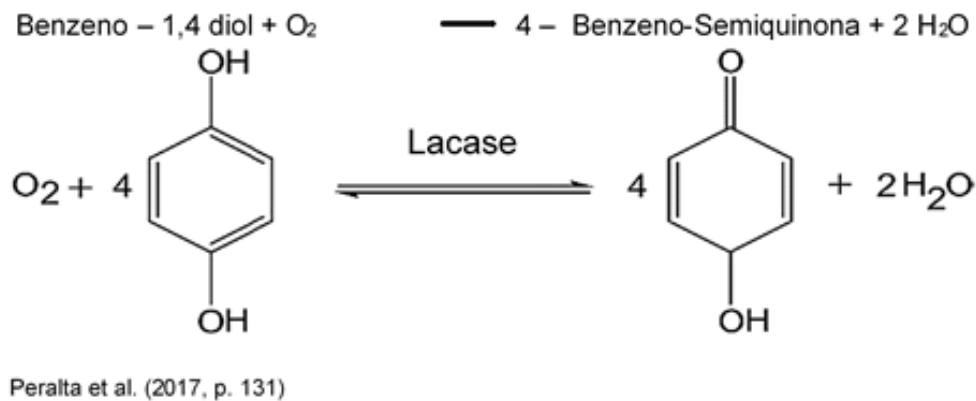
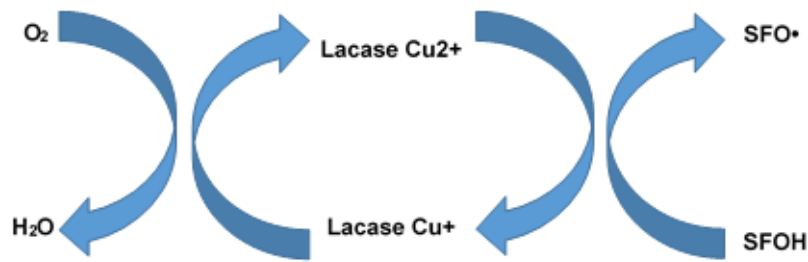


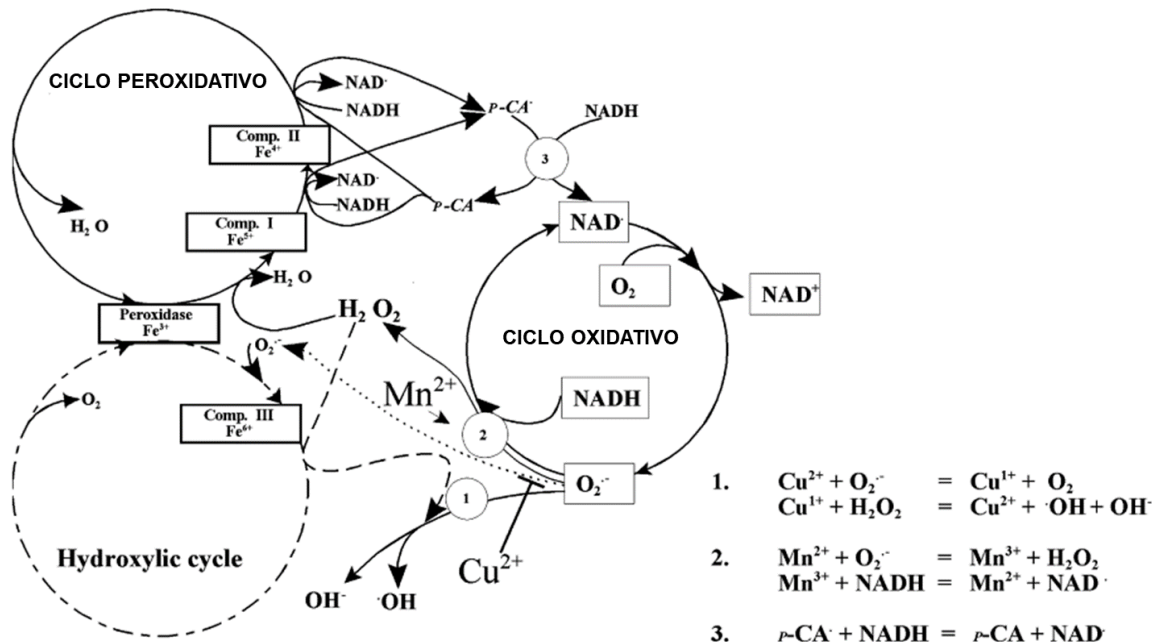
Figura 14: Ciclo catalítico de oxidação da lacase. (SFO: Substrato fenólico).



Fonte: A autora

As manganês peroxidases - MnP (EC 1.11.1.13) são peroxidases modificadoras de lignina produzidas por quase todos os Basidiomicetos, especificamente os fungos de podridão branca (PERALTA *et al.*, 2017). As MnP são dependentes do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na oxidação de Mn²⁺ para Mn³⁺, podendo oxidar vários compostos fenólicos (YEE *et al.*, 2018). Assim, o Mn³⁺ é estabilizado por ácido orgânico para formar o complexo “Mn³⁺ ácido orgânico”, que age como um poderoso mediador redox, permitindo a quebra de fenóis simples e anéis aromáticos de lignina (Figura 15) (HAAS *et al.*, 2004; HILDÉN *et al.*, 2000).

Figura 15: Ciclo catalítico da manganês peroxidase.



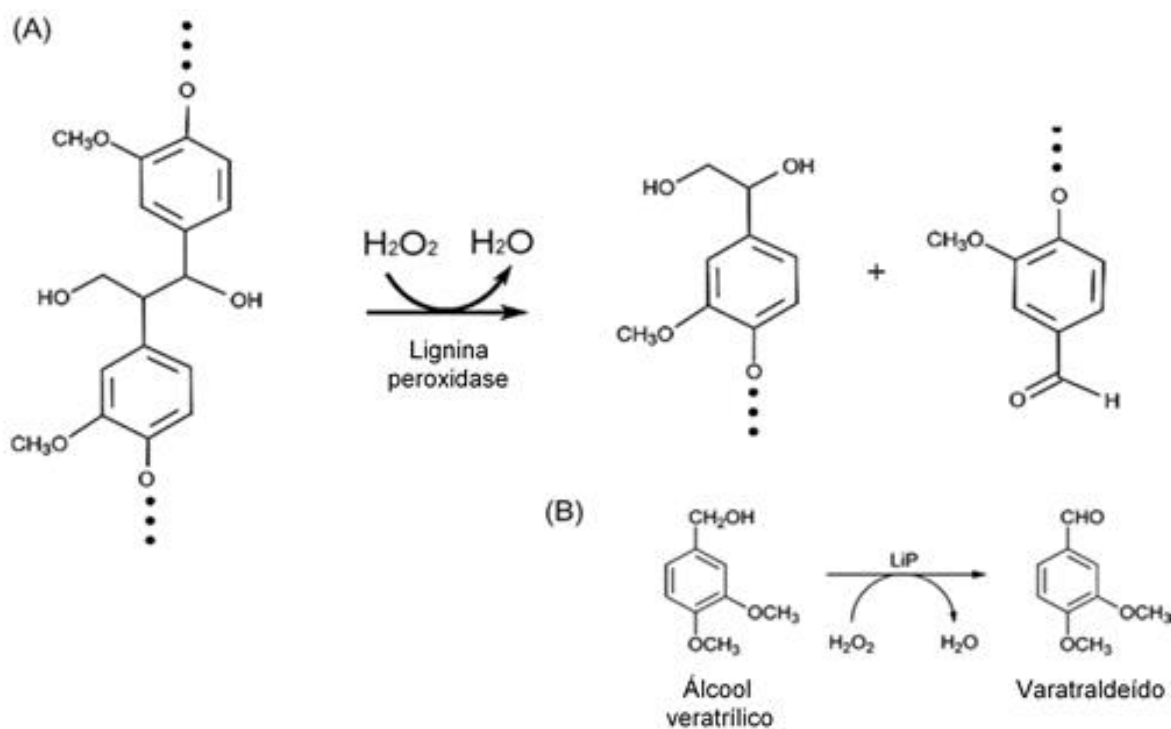
Fonte: Hadži-Taskovic Sukalovic et al. (2010, p.1555)

Devido a sua capacidade de degradação, essas enzimas têm sido estudadas para várias aplicações biotecnológicas, como bioprospecção, biobranqueamento e

polpação de celulose e biorremediação de poluentes (BERMEK; LI; ERIKSSON, 2002; JANUSZ *et al.*, 2013; QIN *et al.*, 2014). Yee *et al.* (2018) demonstraram que MnP também podem degradar compostos inibidores da fermentação alcoólica, como o 2-furfuraldeído e 5-hidroximetil-2-furfuraldeído – HMF.

As lignina peroxidases (LiP; EC 1.11.1.14) também são peroxidases extracelulares produzidas por Basidiomicetos de podridão branca (MIKI; ICHINOSE; WARIISHI, 2010). Este grupo de enzimas degradam compostos aromáticos não fenólicos e compostos fenólicos de alto potencial redox, como o álcool veratrílico (Figura 16) (PERALTA *et al.*, 2017; RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009). Os fungos mais comuns que produzem LiP são *Bjerkandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes cervina*, *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* (MIKI; ICHINOSE; WARIISHI, 2010; OZCIRAK ERGUN; OZTURK UREK, 2017; ZHAO *et al.*, 2015).

Figura 16: Reação catalisada por lignina peroxidases. (A) clivagem de C-C da lignina; (B) Oxidação do álcool veratrílico.



A oxidação dos compostos aromáticos por LiP forma radicais que, de acordo com sua composição química, podem dar origem a clivagens intra e intermoleculares

de C-C e de ligações de éter (KUREK; MONTIES, 1994). Na presença de H₂O₂, as LiP também apresentam capacidade de oxidar vários compostos fenólicos de lignina como as ligações do tipo β-O-4 (LEE, 1997). Essas enzimas catalisam várias oxidações nas cadeias laterais da lignina e compostos relacionados, por meio da abstração de um elétron para formar radicais reativos (KUREK; MONTIES, 1994; LEE, 1997). O papel das LiP pode estar associado à transformação dos fragmentos de lignina que são inicialmente liberados pelas MnP (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003).

3.6. Fungos degradadores de biomassa lignocelulósica

Fungos são organismos eucariotos unicelulares ou pluricelulares, heterotróficos, que vivem da decomposição de matéria orgânica. Eles produzem enzimas extracelulares para utilizar os substratos orgânicos presentes no ambiente como fontes de energia e nutrientes (OSONO, 2007). Os substratos lignocelulósicos são degradados por fungos Ascomycetos e Basidiomicetos, que têm um papel crucial no balanço energético do ecossistema (PERALTA *et al.*, 2017). Normalmente, são encontrados na serapilheira (camada superficial do solo), na madeira, em pilhas de resíduos agroindustriais, entre outros. Com relação à decomposição de madeira, esses microrganismos são classificados em: podridão mole, parda e branca. Os de podridão mole atuam na desestruturação da celulose, como *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* (GOODELL; QIAN; JELLISON, 2008). Os fungos de podridão parda decompõem parcialmente a celulose e a hemicelulose, enquanto os de podridão branca atuam na degradação da lignina, como por exemplo *Trametes versicolor* (BANZANELLA *et al.*, 2013). Os fungos mais eficientes na degradação da lignina são os de podridão-branca, pertencentes ao filo Basidiomycota, que utilizam mecanismos extracelulares oxidativos para degradar a macromolécula da lignina (WONG, 2009). Esses basidiomicetos são fundamentais para a decomposição da lignocelulose recalcitrante e, portanto, para o ciclo do carbono global (HISCOX, J.; O'LEARY, J.; BODDY, 2018).

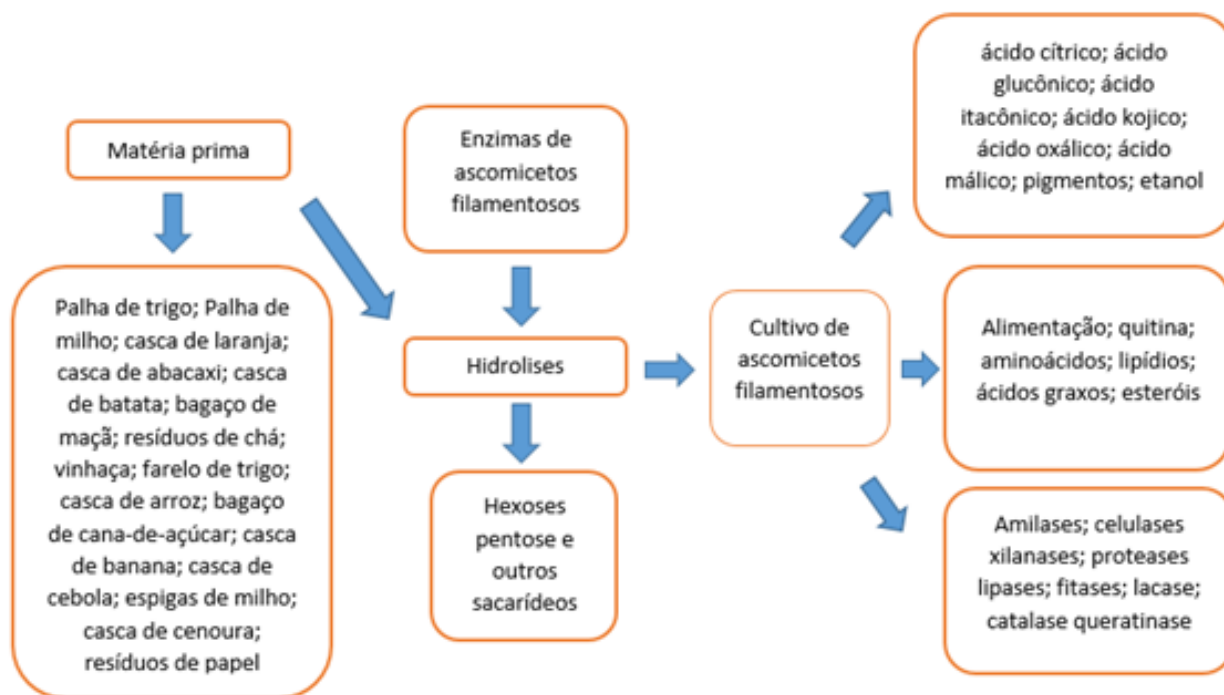
Os Basidiomicetos possuem os dois sistemas enzimáticos extracelulares que são fundamentais para degradar a biomassa vegetal: o primeiro é o sistema hidrolítico que atua na degradação dos polissacarídeos, como as hemicelulases e celulasas. O segundo é o ligninolítico que degrada a lignina e abre anéis fenólicos, sendo

composto, principalmente, por lacases e peroxidases (PERALTA *et al.*, 2017). Segundo Peralta *et al.* (2017), das 10.000 espécies registradas de fungos de podridão branca, as espécies com eficiência avaliada são: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus sanguineus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Inonotus hispidus*, *Phellinus igniarius*, *Ganoderma lucidum* e *Ganoderma applanatum*, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus* e *Phlebia radiata*.

No filo Ascomycota, existem diferentes espécies de fungos que secretam celulases e hemicelulases que decompõem a biomassa vegetal: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* (BANSAL *et al.*, 2012; *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2017), *Myceliophthora thermophila*, *Rhizomucor* sp. (DE CASSIA PEREIRA *et al.*, 2015; MORETTI *et al.*, 2012), *Trichoderma reesei* (DU *et al.*, 2018), entre outros. Algumas espécies, como *Trichoderma reesei* e *Aspergillus* sp., *Myceliophthora thermophila*, produzem ainda enzimas oxidativas como lacases e peroxidases (KIISKINEN *et al.*, 2004; MEKMOUCHE *et al.*, 2014).

Ascomicetos têm demonstrado um grande potencial biotecnológico. Esses microrganismos apresentam ampla contribuição no setor industrial como na produção de antibióticos por *Penicillium chrysogenum*, na remoção de poluentes orgânicos, na geração de produtos de valor agregado, na produção de diversas enzimas por espécies de *Aspergillus* (amilase, protease, lipase, lactase, entre outras), além de produzirem ácidos orgânicos como o cítrico, glucônico, itacônico, málico e oxálico (FERREIRA *et al.*, 2016; GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; WHITEWAY *et al.*, 2015). No campo da Biorrefinaria de resíduos, os Ascomicetos podem ainda gerar uma variedade de produtos de alto valor agregado (Figura 17).

Figura 17: Substratos potenciais e produtos de valor agregado produzidos em biorrefinarias de resíduos à base de Ascomicetos filamentosos.



Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (2016, p.336)

3.7. O mercado de enzimas industriais

Em tempos de avanço no mercado científico e tecnológico, um dos destaques tem ocorrido no setor de enzimas. Consideradas catalisadores naturais, as enzimas são proteínas com alta especificidade por seus substratos que catalisam reações bioquímicas úteis em processos industriais e na produção de bioprodutos de interesse alimentício, farmacêutico, têxtil, bioquímico, bioenergético, entre outros (SOCCOL *et al.*, 2017). A conversão enzimática de polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica é uma das rotas tecnológicas mais promissoras para a produção de etanol 2G e biorrefinarias (FARINAS, 2018). No entanto, este processo ainda não é economicamente viável, sendo necessário melhorar a produção de enzimas pois, atualmente, os coquetéis enzimáticos comerciais disponíveis são de alto custo (KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2012).

Recentemente, o mercado de enzimas industriais foi avaliado em US\$ 6,1 bilhões em 2017 e deve atingir US \$ 8,5 bilhões em 2022 (ZHANG; HE; SIMPSON, 2018). Na produção de etanol 2G, ainda não se tem um consenso sobre o custo de

enzimas. Conforme alguns estudos, o mercado de celulases, por exemplo, não é padronizado uma vez que vários índices são utilizados para indicar a atividade enzimática (CTBE, 2011; KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2012).

Alguns autores acreditam que o custo das enzimas é um dos fatores mais relevantes que impactam no valor final do produto, justificando a pesquisa por métodos mais baratos de produção (BRIJWANI; OBEROI; VADLANI, 2010); (PANDEY; NEGI, 2015); (PANDEY; EDGARD; NEGI, 2016). Como exemplo, Klein-Marcuschamer *et al.*(2012) construíram um modelo técnico-econômico, incluindo todas as operações unitárias necessárias para a produção de celulases, utilizando o fungo *Trichoderma reesei*, para estimar este valor. Após alguns estudos, esses autores concluíram que o custo das enzimas era quase que exclusivamente contabilizado e relatado em dólar por galão de etanol produzido (valores que variavam de US\$ 0,10 a 0,40 /galão), dificultado uma análise mais robusta. No entanto, na produção do etanol, essas análises não consideraram o transporte da matéria prima, o tipo de pré-tratamento da biomassa, o crescimento de fungos, o método de produção de celulases, o processamento do material, entre outros fatores. Após a modelagem do processo de produção de enzimas, Klein-Marcuschamer *et al.*(2012) utilizaram os dados do modelo para a produção de etanol a partir de palha de milho, conseguindo assim, contextualizar o custo da enzima com base no rendimento em etanol. Para tanto, foram considerados: carga de sólidos de 20% (m/m) durante a sacarificação e carga enzimática de 10 FPU/g de celulose, no qual o rendimento de uma sacarificação de 5 dias nessas condições seria de 70% (m/m). A partir da avaliação de quatro cenários: (1) o rendimento máximo teórico baseado na conversão de todos os açúcares C5 e C6 presentes na palha de milho; (2) rendimento baseado apenas em açúcares C6 com eficiência de 95%; (3) rendimento baseado na conversão de todos os açúcares C5 e C6 após sacarificação com conversão de 70% da celulose e (4) o rendimento baseado na conversão de açúcares C5 e C6 esperados de uma sacarificação. Após este estudo, Klein-Marcuschamer *et al.*(2012) verificaram que o custo de produção de enzimas por etanol produzido foi muito superior ao que é encontrado na literatura (entre US\$ 0,60 a 1,40/ galão de etanol produzido) e concluíram que é necessário um esforço significativo para viabilizar economicamente a produção de bioetanol 2G.

Outros pesquisadores, no entanto, acreditam que esse valor tende a diminuir com o avanço das inovações tecnológicas, como por exemplo, as três maiores empresas produtoras de enzimas, a Novozymes, DSM e a DuPont, que têm investido em pesquisas para reduzir os preços de seus coquetéis (FARINAS, 2018). Conforme o relatório anual de 2014 da Novozymes, o mercado mundial de enzimas industriais é altamente condensado, sendo que 47% dele é dominado pela própria Novozymes (BRUMMER et al., 2014). Por isso, autores como Mendes et al. (2017) defendem que o desenvolvimento de novas tecnologias para produzir enzimas e aprimorar sua capacidade catalítica é estratégico para aumentar o reaproveitamento de biomassas de resíduos lignocelulósicos. No entanto, no Brasil não existem empresas que produzam coquetéis enzimáticos comerciais, de modo que a produção de etanol 2G em grande escala se tornou dependente do mercado internacional de enzimas. Portanto, no Brasil o custo da rota enzimática de produção do etanol 2G é um gargalo inegável, que precisa ser solucionado para transformar o etanol celulósico em uma possibilidade concreta. Por essa razão, estudos sobre a produção de enzimas a baixo custo utilizando resíduos agroindustriais são extremamente relevantes no intuito de alcançar independência dos coquetéis comerciais, reduzir os custos e consequentemente, expandir a produção deste biocombustível no país.

3.8. Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES)

Fungos filamentosos são capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas por fermentação em estado sólido (FES). A FES se refere ao crescimento de microrganismos em substratos sólidos com baixa disponibilidade de água livre no meio (PINTO *et al.*, 2006). Segundo Pinto et al. (2006), a FES é uma tecnologia que propõe caminhos alternativos para reutilização de resíduos, agregando valor a essas matérias-primas, através da produção de bioprodutos de interesse econômico a partir de substratos baratos, como enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, aromas, pigmentos, agentes de controle biológico de pragas, entre outros, contribuindo para a diversificação do agronegócio nacional. Este processo simula o ambiente natural dos microrganismos, possibilitando que cresçam e produzam enzimas do complexo ligno-hemi-celulolítico. Na FES, são utilizados resíduos agroindustriais como substratos, tais como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, casca de arroz, entre outros, que atuam como fontes de carbono e energia para o crescimento fúngico (HANSEN *et al.*,

2015). Segundo Mendes et al. 2017, o processo de produção de enzimas por FES é vantajoso, devido à baixa utilização de água, o que evita a contaminação do sistema de produção. Portanto, a FES poderia ser realizada em associação a uma planta de etanol 1G e 2G, utilizando os resíduos já disponíveis na usina e reduzindo, assim, os custos na compra de coquetéis comerciais. Esta técnica é eficiente em processos biotecnológicos com altas produções de enzimas hidrolíticas a partir de resíduos lignocelulósicos, conforme alguns estudos recentes (Tabela 1). Portanto, a aplicação desse processo na produção de enzimas pode ser uma alternativa viável na redução dos custos e na viabilização, em grande escala, de produção de etanol 2G.

Tabela 1: Produção de enzimas do complexo lignocelulolítico por FES e seus respectivos substratos.

Produção	Microrganismo	Substrato	Produtividade U/g	Tempo	Referências
<i>Enzimas</i>					
β -glicosidase	^a <i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Bagaço de cana e farelo de trigo	^a 78,47; ^b 43,02	144h	(RODRIGUES et al., 2017)
β -xilosidase	^b <i>Aspergillus fumigatus</i> SCBM6		^a 78,00	144h	
Xilanase			^a 3289,58 ; ^b 1774,50	144h e 24h	
^a β -glicosidase ^b α -amilase	<i>Aspergillus niger</i>	Casca de arroz	^a 319,1 ; ^b 659,5	144h	(ALIYAH et al., 2017)
		Bagaço de cana	^a 916,0 ; ^b 818,6	144h	
		Sabugo de milho	^a 850,1 ; ^b 753,5	144h	
β -glicosidase	<i>Aspergillus niger</i> SCBM1	Sorgo biomassa e Peptona 0,5 % (m/m)	63,61	168h	(DIAS et al., 2018)
Avicelase			30,64	24h	
Xilanase			300,07	96h	
β -xilosidase			64,88	168h	
CMCase			41,47	168h	
Xilanase	<i>Aspergillus lentulus</i>	Farelo de trigo, espiga de milho, palha de trigo, bagaço de cana	158,4	96h	(KAUSHIK; MISHRA; MALIK, 2014)
Endoglicanae	^a <i>Miceliophthora</i> sp. JCP 1-4	Bagaço de cana e farelo de trigo	^a 357,51; ^b 260,37 ; ^c 142,71; ^d 314,27	96h	(DE CASSIA PEREIRA et al., 2015)
β -glicosidase	^b <i>Rhizomucor</i> sp. JCP 1-9		^a 45,42; ^b 16,97; ^c 10,51; ^d 25,72	96h	
FPase (FPU)	^c <i>Rhizomucor</i> sp. JCP 1-15		^a 0,24 ; ^b 0,21; ^c 0,08; ^d 0,18	96h	
Avicelase	^d <i>Miceliophthora</i> sp. DABM 23/45		^a 3,58 ; ^b 1,59; ^c 2,54 ; ^d 3,30	96h	
Xilanase			^a 931,11 ; ^b 17,26; ^c 323,93; ^d 712,21	96h	
β -xilosidase			^a 1,03; ^b 2,17; ^c 8,26; ^d 0,97	96h	
β -xilosidase				150	
Xilanase	<i>Aspergillus niger</i> SCBM1 e <i>Aspergillus fumigatus</i> SCBM6 por consorcio	Bagaço de cana e farelo de trigo	375	96h	(DOS SANTOS et al., 2019)
β -glicosidase			80	24h	
CMCase			80	144h	
Fpase			4	144h	

Fonte: A autora

CAPÍTULO 1

Produção de enzimas celulases, hemicelulases e ligninases por
fermentação em estado sólido utilizando consórcios fúngicos
(Artigo publicado: RODRIGUES et al. 2020, Renewable Energy, 145: 2683-2693,
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>)

RESUMO

Fungos filamentosos têm sido amplamente estudados na produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido (FES) para fins biotecnológicos. Porém, o desempenho de consórcios de espécies fúngicas neste processo tem sido pouco avaliado. Neste estudo, cinco linhagens fúngicas (*Aspergillus niger* SCBM1 – Ni, *Aspergillus fumigatus* SCBM6 – Fu, *Trametes versicolor* 561 – Tr, *Ganoderma lucidum* 601 - Ga e *Pleurotus ostreatus* PL06 - PI) foram cultivadas isoladas e em consórcio em um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} para a biossíntese de celulases, hemicelulases e ligninases. Um total de 16 fermentações foram realizadas, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como fontes de carbono. O extrato produzido por *A. niger* SCBM1 (Ni – F1) apresentou os maiores picos de atividade para endoglucanase (82,70 U/g), exoglucanase (80,48 U/g), β -xilosidase (145,01 U/g) e manganês peroxidase - MnP (3,38 U/g). Entre os Basidiomicetos, o coquetel produzido por *T. versicolor* 561 (Tr - F5) se destacou na biossíntese de FPase (9,45 U/g). Entre os extratos produzidos por consórcio, o coquetel referente à Fermentação 6 (Ni+Tr+PI) foi o que apresentou máxima produção de β -glicosidase (171,09 U/g), β -xilosidase (139,99 U/g) e MnP (3,29 U/g). Para FPase (10,46 U/g) o destaque foi para o coquetel produzido em F12 (Ni+Fu+Ga). A biossíntese máxima de xilanase (2582,38 U/g) foi obtida em F4 (Ni+Fu+PI). Para lacase, a produção máxima (25,27 U/g) foi obtida em F13 a partir do consórcio entre Basidiomicetos (Tr+Ga+PI). A Análise de Componente Principal (ACP) demonstrou que os coquetéis produzidos com as espécies isoladas *G. lucidum* 601 (F4) e *P. ostreatus* PL06 (F3) foram os que apresentaram as menores produções para todas as enzimas. O coquetel F15 produzido por consórcio Fu+Tr+Ga seguiu o mesmo padrão com baixa produção de enzimas. Na ACP, esses extratos foram separados dos demais pelo eixo primário. De acordo com os resultados, os coquetéis que apresentaram as produções mais elevadas foram: Ni (F1); Ni+Fu+PI (F9); Ni+Tr+PI (F6) e Ni+Ga+PI (F10). Os resultados obtidos demonstraram que a presença de *A. niger* SCBM1 nas fermentações foi de extrema relevância para aumentar a produção de celulases, indicando que a utilização de consórcios microbianos pode ser uma excelente alternativa para se obter coquetéis com elevado sinergismo e alta variabilidade de enzimas.

Palavras-chave: Cocultivo, Ascomicetos, Basidiomicetos, coquetéis enzimáticos

4. INTRODUÇÃO

Os resíduos agroindustriais contendo biomassa lignocelulósica, tais como bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e farelo de trigo, podem ser reaproveitados na produção de biocombustíveis e outros bioprodutos de valor agregado (BAËTA *et al.*, 2016b; TRAVAINI *et al.*, 2016). Neste contexto, a bioconversão enzimática dos polissacarídeos presentes na biomassa (celulose e hemiceluloses) em monossacarídeos fermentescíveis pode ser uma alternativa sustentável e promissora para a produção de etanol de segunda geração (etanol 2G). Para uma hidrólise eficiente da lignocelulose, celulasas, hemicelulasas e ligninases produzidas por microrganismos, principalmente por fungos filamentosos, têm sido utilizadas (HANSEN *et al.*, 2015).

Contudo, para que o processo seja economicamente viável, é importante aprimorar a produção de enzimas e consequentemente obter coquetéis a custos mais acessíveis (KLEIN-MARCUSCHAMER *et al.*, 2012). Neste sentido, a obtenção de um coquetel enzimático potente produzido no mesmo local em que os biocombustíveis são processados, por exemplo, pode ser a chave para redução desses custos. No Brasil, esse é um grande gargalo que dificulta e encarece o processo de produção de etanol 2G, pois o país precisa importar coquetéis enzimáticos comerciais a um alto custo (HONG ZHANG CHEN; LAN WANG, 2017).

As comunidades microbianas no ecossistema natural que estão presentes no solo, nas pilhas de resíduos, na serapilheira e em diferentes materiais em decomposição produzem essas enzimas que atuam sinergisticamente na decomposição da biomassa vegetal (KHUSBOO LEPCHA e SHILPI GHOSH, 2018). Seu sistema lignocelulolítico consiste em diferentes enzimas extracelulares, responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, como lacases, peroxidases, celulasas e hemicelulasas, que agem de forma específica e sinérgica no substrato.

Assim, diversos estudos têm sido realizados utilizando fungos filamentosos para produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduos lignocelulósicos, como o próprio bagaço de cana (MORETTI *et al.*, 2012; BANSAL *et al.*, 2014; DE CASSIA PEREIRA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2017; DU *et al.*, 2018;). Grande parte desses trabalhos apresentam a produção de coquetéis enzimáticos por fungos cultivados isoladamente (DA CUNHA *et al.*, 2018; LOPEZ-

RAMIREZ *et al.*, 2018; OZCIRAK ERGUN; OZTURK UREK, 2017). No entanto, o uso de consórcios microbianos, combinando duas ou mais espécies fúngicas pode ser uma alternativa interessante para a produção de coquetéis com alto potencial catalítico (YANG *et al.*, 2004). A vantagem dos consórcios microbianos sobre as monoculturas puras pode estar relacionada a um maior rendimento enzimático, utilização de substratos de baixo custo (resíduos), maior capacidade metabólica e proteção contra contaminações (YANG *et al.*, 2004).

Neste contexto, este trabalho produziu coquetéis enzimáticos brutos por FES, utilizando bagaço de cana bruto e farelo de trigo, ambos excelentes indutores na produção de enzimas, como substratos lignocelulósicos, e diferentes combinações de espécies de fungos isoladas e em consórcio por meio de um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} . Foram analisadas duas espécies de Ascomicetos: *Aspergillus fumigatus* SCBM6 (Fu) e *Aspergillus niger* SCBM1 (Ni) e três Basidiomicetos: *Ganoderma lucidum* 601 (Ga), *Pleurotus ostreatus* PL06 (Pi) e *Trametes versicolor* 561 (Tr). Nove enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica foram investigadas: celulases - Atividade de papel de filtro (FPase), β -glicosidase, endoglucanase ou carboximetilcelulase (CMCase) e exoglucanase ou avicelase; hemicelulases - β -xilosidase e xilanase e ligninases - lacase (La), manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Microrganismos

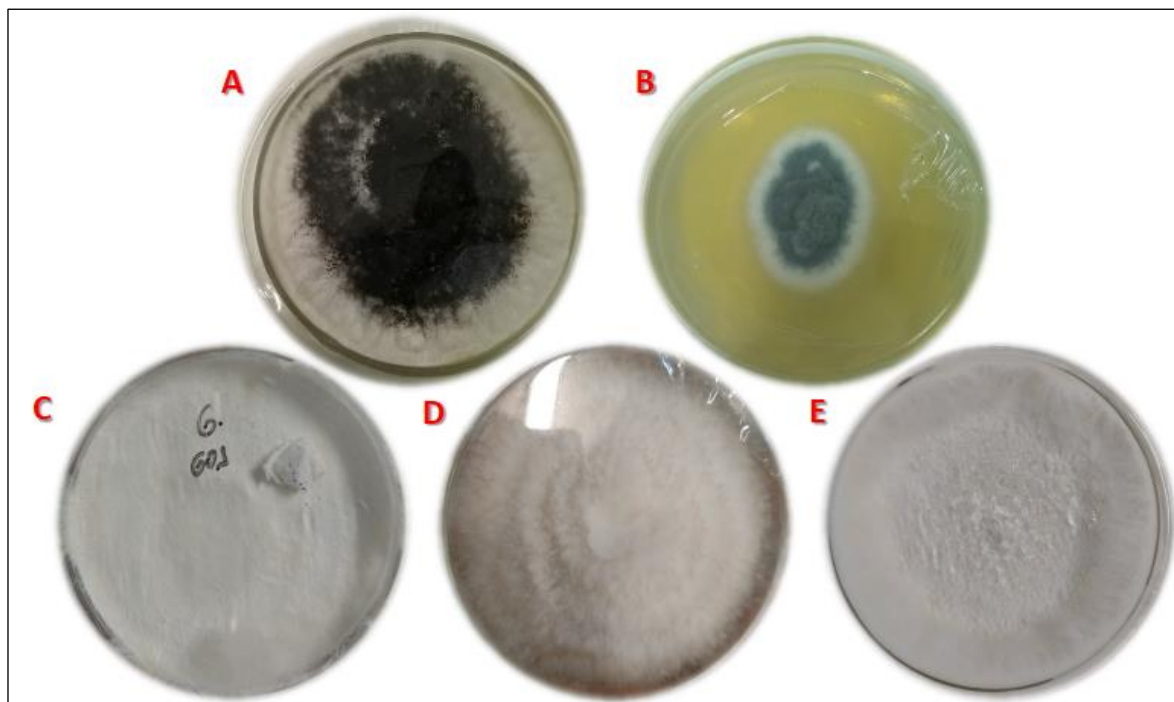
A linhagem *Pleurotus ostreatus* PLO6 (PI) foi obtida de shimeji comercial e doado pela Prof^a. Dr. Maria Catarina Megumi Kasuya, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). *G. lucidum* 601 (Ga) foi obtido da Brasmicel (Suzano, SP) e *Trametes versicolor* 561 (Tr) foi isolado de madeira em decomposição na região de Quijingue, BA. Ambas as linhagens foram cedidas pela Profa. Dra. Fernanda Badotti, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG).

Aspergillus fumigatus SCBM6 (Fu) e *Aspergillus niger* SCBM1 (Ni) foram obtidos da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Universidade Federal de Uberlândia (LAMIC – UFU), onde essa pesquisa foi desenvolvida. Estas linhagens foram previamente isoladas de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar (dos SANTOS *et al.*, 2015). Todas as culturas foram preservadas em frascos de vidro do tipo Castellani contendo água deionizada estéril e também mantidas em placas com meio de cultura ágar batata dextrose (PDA) à temperatura ambiente.

5.2. Pré-inóculos para FES

As linhagens fúngicas foram cultivadas individualmente em placas de Petri contendo meio PDA e incubadas por sete dias a 28 °C ou até que os fungos tomassem toda a placa, para a retirada de discos miceliais de cerca de 6 mm de diâmetro (Figura 18).

Figura 18: Pré-inóculos em placa das espécies fúngicas: (A) – *A. niger* SCBM1; (B) – *A. fumigatus* SCBM6; (C) – *G. lucidum* 601; (D) *P. ostreatus* PL06; (E) – *T. versicolor* 561.



5.3. Substrato e produção de enzimas por FES

Para a produção dos extratos enzimáticos brutos por FES empregando as cinco espécies fúngicas, foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} , para se obter uma matriz de experimentos em que fossem contempladas: fermentações com culturas puras, em consórcios associando três espécies e uma fermentação com as cinco espécies. Esse procedimento foi adotado para reduzir o número de fermentações. Assim, foram gerados 16 experimentos, conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Delineamento experimental empregado nas FES para culturas puras e consórcios fúngicos. (1): presença do fungo e (zero): ausência do fungo.

FES		Espécies				
Nº	*Culturas puras / Consórcios	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>G. Lucidum</i>	<i>P. ostreatus</i>
		SCBM1 (Ni)	SCBM6 (Fu)	561 (Tr)	601 (Ga)	PL06 (PI)
F1	<i>Ni</i>	1	0	0	0	0
F2	<i>Fu</i>	0	1	0	0	0
F3	<i>PI</i>	0	0	0	0	1
F4	<i>Ga</i>	0	0	0	1	0
F5	<i>Tr</i>	0	0	1	0	0
F6	<i>Ni+Tr+PI</i>	1	0	1	0	1
F7	<i>Fu+Tr+PI</i>	0	1	1	0	1
F8	<i>Ni+Fu+Tr</i>	1	1	1	0	0
F9	<i>Ni+Fu+PI</i>	1	1	0	0	1
F10	<i>Ni+Ga+PI</i>	1	0	0	1	1
F11	<i>Fu+Ga+PI</i>	0	1	0	1	1
F12	<i>Ni+Fu+Ga</i>	1	1	0	1	0
F13	<i>Tr+Ga+PI</i>	0	0	1	1	1
F14	<i>Ni+Tr+Ga</i>	1	0	1	1	0
F15	<i>Fu+Tr+Ga</i>	0	1	1	1	0
F16	<i>Ni+Fu+Tr+Ga+PI</i>	1	1	1	1	1

As fermentações foram conduzidas em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 2,5 g de bagaço de cana-de-açúcar e 2,5 g de farelo de trigo na proporção de 1:1 (m/m). O bagaço de cana foi adquirido da Usina Bioenergia Aroeira (Tupaciguara, MG). Depois de lavado e seco à temperatura ambiente, o bagaço foi triturado em liquidificador e peneirado para gramatura de 0,6 mm. O farelo de trigo, adquirido em uma cerealista comercial, foi lavado em água corrente várias vezes até que a água de lavagem estivesse incolor (significando que todo o resíduo de amido foi removido) e seco ao ar livre. Os substratos foram suplementados com 5 mL de solução nutriente, contendo % (m/v): 0,35% de sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄), 0,3% de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 0,05 % de sulfato de magnésio heptahidratado (Mg₂SO₄.7H₂O) e 0,05% de cloreto de cálcio (CaCl₂) (MORETTI *et al.*, 2012). Em seguida, os frascos foram vedados e autoclavados.

Após a esterilização, cada frasco contendo os substratos foi inoculado com três discos miceliais (± 6 mm) de cada linhagem fúngica (quando em consórcio triplo), com nove discos nas fermentações com apenas uma linhagem e com dez discos miceliais no inóculo que continha as cinco espécies, de acordo com cada fermentação (Tabela 1), acrescido de 9 mL de solução salina estéril (65% de umidade). A FES foi realizada a 28 °C por oito dias. Todas as fermentações foram conduzidas em triplicatas. A cada 24 horas, três frascos foram retirados da incubadora, acrescentados de 50 mL de água destilada, homogeneizados e submetidos à agitação orbital por 60 minutos a 150 rpm. Em seguida, o material foi filtrado em tecido *voil* e centrifugado duas vezes por 10 minutos a 10000 rpm ou 8760 G. Os sobrenadantes contendo os extratos enzimáticos brutos foram aliquotados e congelados a -20 °C.

5.4. Avaliação das atividades enzimáticas

5.4.1. *FPase* – (celulase de papel de filtro)

A atividade da *FPase* foi determinada utilizando papel de filtro como substrato, conforme GHOSE (1987). Nos ensaios, utilizou-se papel Whatman nº 1 (1,0 cm x 6,0 cm \approx 50 mg) em uma mistura de reação contendo 1,0 mL de tampão citrato de sódio 0,05M (pH 4,8) e 500 μ L de extrato enzimático bruto por 1 hora a 50 °C. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 3 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em seguida, o líquido foi fervido por cinco minutos e resfriado em banho de gelo. Foram adicionados 20 mL de água destilada e a absorbância foi lida a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de açúcar redutor por minuto a partir de uma curva padrão de glicose.

5.4.2. *Avicelase* e *CMCase*

As atividades de *Avicelase* e *CMCase* foram determinadas com 30 μ L do extrato enzimático bruto, 270 μ L de avicel 1,0% ou carboximetilcelulose (CMC) 4,0% (Sigma) como substratos, respectivamente, em tampão citrato de sódio 0,05 M à 50 °C. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 300 μ L de DNS (dos SANTOS et al. 2015). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição por 10 minutos, levado ao banho de gelo, e em seguida, acrescentou-se 2400 μ L de água destilada e absorbância foi medida a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade de

atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto de reação a partir de uma curva padrão de glicose.

5.4.3. β -glicosidase

A atividade da β -glicosidase foi quantificada nas temperaturas ótimas de 65 e a 70 °C para os extratos de *A. niger* SCBM1 (Ni) e *A. fumigatus* SCBM6 (Fu), respectivamente, previamente determinadas por Rodrigues et al. (2017), apenas nos extratos produzidos por essas culturas isoladas. Nos demais extratos, a temperatura dos ensaios foi padronizada em 50°C, em uma mistura de reação contendo 50 μL de extrato enzimático bruto, 250 μL de solução tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 4,8) e 250 μL de *p*-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, Sigma) como substrato. Após 10 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) 2 M. A concentração de *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado foi determinada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*NP por minuto de reação a partir de uma curva padrão de *p*NP (dos SANTOS et al. 2015).

5.4.4. β -xilosidase

A atividade de β -xilosidase foi determinada pelo mesmo procedimento e nas mesmas condições para β -glicosidase, porém, utilizando-se *p*-nitrofenil β -D-xilopiranosídeo 4 mM (PNPX, Sigma) como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*NP por minuto de reação, a partir da curva padrão de *p*NP (dos SANTOS et al. 2015).

5.4.5. Xilanase

A atividade enzimática da xilanase foi determinada pelo método do DNS, seguindo o mesmo procedimento descrito para avicelase e CMCase, porém, utilizando xilana 1 % como substrato em tampão citrato de sódio 0,05 M, por 10 minutos a 50 °C (dos SANTOS et al. 2015). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de xilose por minuto de reação, a partir de uma curva padrão de xilose.

5.4.6. Lacase

A atividade de lacase (La) foi determinada pelo monitoramento da oxidação do substrato ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS) a 50 °C, por 10 minutos em uma mistura de reação contendo 400 µL tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), 50 µL de solução de ABTS 0,01M e 50 µL de extrato enzimático bruto (MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015). A absorbância foi medida a 420nm. Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto. O cálculo da atividade baseou-se na lei de Lambert-Beer, utilizando coeficiente de absorvidade molar de $\epsilon_{420nm} = 3,6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.4.7. Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase (MnP) foi quantificada a 40 °C, por 10 minutos utilizando sulfato de manganês (MnSO_4) como substrato. A mistura de reação foi composta de 250 µL de tampão lactato de sódio 0,2M (pH 4,5), 100 µL de MnSO_4 0,4 M, 100 µL de extrato enzimático, 20 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,1 M e 530 µL de água destilada. A absorbância foi medida a 240nm. O cálculo da atividade utilizou o coeficiente de absorvidade molar de $\epsilon_{240nm} = 8,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (AITKEN; IRVINE, 1990).

5.4.8. Lignina peroxidase

A atividade de Lignina peroxidase (LiP) foi medida em uma mistura de reação composta por 250 µL de tampão tartarato de sódio 0,2M (pH 3,0), 1000 µL de álcool veratrílico 0,4 M como substrato, 100 µL de extrato enzimático, 20 µL de H_2O_2 e 530 µL de água destilada, a 40 °C, por 10 minutos. A absorbância foi medida a 310nm, e o cálculo da atividade foi realizado utilizando o coeficiente de absorvidade molar de $\epsilon_{310nm} = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (MING TIEN & T. KENT KIRK, 1988).

As atividades de ligninases foram calculadas, conforme equação geral abaixo:

$$A = \epsilon \times L \times C$$

Sendo: A: é a variação da absorbância (ΔABS)

ϵ : coeficiente de absorvidade molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

L: caminho óptico (cm)

C: concentração (M)

5.5. Análise dos dados

A análise de variância (ANOVA) foi realizada, seguida de um teste de Scott Knott, para identificar se houve ou não diferença significativa entre os extratos enzimáticos na produção de enzimas, com nível de significância de 5%. Um estudo comparando os extratos foi realizado aplicando a correlação linear de Pearson. As análises foram executadas no Action 2.9 (ANOVA) e Sisvar 5.6 (Scott Knott).

5.6. Análise de Componente Principal – ACP

As associações entre as produções enzimáticas e os diferentes consórcios de fungos foram verificadas pela Análise de Componentes Principais (ACP) (JEAN LEPS e PETR SMILAUER, 2003), por meio do programa CANOCO versão 4.5 (Biometris, The Netherlands). Antes de realizar a ACP, o comprimento do gradiente foi avaliado pela Análise de Correspondência Distendenciada (ACD) que se mostrou menor que 3 unidades do desvio padrão, indicando uma ordenação linear dos dados.

Para confirmar as associações indicadas na ACP, a análise de correlação de Pearson foi realizada, utilizando o programa SAS versão 9.22 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Para as correlações, os valores de r entre 0,01 e 0,09 foram considerados insignificantes; entre 0,10 e 0,29 baixos; entre 0,3 e 0,49 moderados; entre 0,50 e 0,69 substanciais entre 0,70 e 0,99 muito alto e $r = 1$ correlação perfeita (DAVIS, 1971).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Produção de enzimas por FES

6.1.1. Produção de enzimas por Ascomicetos isolados

A partir do delineamento experimental, 16 condições de fermentações (numeradas de F1 a F16) foram avaliadas para a produção de lignocelulases empregando as linhagens fúngicas isoladas e em consórcio (Tabela 2). A curva de produção das enzimas em função do tempo foi avaliada em cada fermentação. A partir desses dados, o pico máximo de síntese para cada enzima foi estabelecido (Tabela 3 – ver pag. 87).

Nas FES utilizando as linhagens de *Aspergillus* isoladas, observou-se que *A. niger* SCBM1 – Ni (F1) apresentou eficiência superior na produção de enzimas em relação à F2 realizada com *A. fumigatus* SCBM6 – Fu (Figura 19 A e B). No extrato enzimático Ni (F1), entre as celulases, as enzimas avicelase e CMCCase apresentaram as maiores atividades, com picos de produção (80,48 e 82,70 U/g) obtidos respectivamente no terceiro e quarto dia de fermentação (Figura 19-A). Para FPase, a fermentação com *A. niger* SCBM1 (F1) foi também a que mais destacou (9,48 U/g) com pico de produção no terceiro dia de cultivo (Figura 19A). Nesse mesmo extrato (Ni), o pico de β -glicosidase foi observado no quinto dia (50,36 U/g), após os picos de FPase, CMCCase e avicelase. Este resultado corrobora a escala de atuação sinérgica na degradação da celulose, onde a β -glicosidase é a última enzima a entrar em ação, atuando na hidrólise dos dímeros de celobiose liberados pela ação das outras celulases. No extrato Fu (F2), CMCCase foi a celulase que mais se destacou na produção em função do tempo, com pico de atividade (54,32 U/g) no oitavo dia de fermentação.

Bansal et al. (2012) avaliaram a produção de celulases por *A. niger* NS-2 em FES, com diferentes resíduos e, para cana-de-açúcar, obtiveram atividades inferiores ao presente trabalho: CMCCase (5 U/g), FPase (1,5 U/g) e β -glicosidase (3,0 U/g). Após realizarem o pré-tratamento do bagaço com NaOH, as atividades aumentaram para: 90,7 (CMCase), 15,3 (FPase), e 16,3 U/g (β -glicosidase). Ang et al. (2013) utilizaram resíduo de tronco de palmeira inoculado com *A. fumigatus* SK1 na produção de celulases por FES e obtiveram 54,27, 3,36 e 4,54 U/g de CMCCase, FPase e β -glicosidase, respectivamente. Oliveira et al. (2018) avaliaram diferentes biomassas na

produção de celulases por *A. fumigatus* por FES e o melhor resíduo foi o bagaço de cana, na qual foram obtidas 4,20 e 0,64 U/g de CMCase e FPase, respectivamente. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho para produção de celulases pelas linhagens *A. niger* SCBM1 (F1) e *A. fumigatus* SCBM6 (F2) isoladas foram superiores à maioria desses estudos anteriores.

Para hemicelulases, o extrato Ni (F1) foi também o que apresentou as maiores produções de β -xilosidase (145,01 U/g) e xilanase (2271,68 U/g) no sétimo e sexto dia de FES, respectivamente (Figura 19-A). Estes dados estão de acordo com outros estudos que relataram a alta produção de xilanases em extratos enzimáticos obtidos a partir de FES empregando espécies do gênero *Aspergillus*, principalmente *A. niger*. Kamoldeen *et al.* (2017) avaliaram a produção de xilanase por FES por uma cepa *A. niger* USM SD2 inoculada em resíduos de frutos de palmeira e produziram 2512 U/g (4^a dia), valor próximo ao encontrado no presente trabalho. Rodrigues *et al.* (2017) utilizaram as mesmas linhagens de *Aspergillus* do presente estudo e registraram altas atividades de xilanase (1774,50 U/g no 1^o dia para *A. fumigatus* SCBM6 e 3289,58 U/g entre o 4^o e 6^o dia por *A. niger* SCBM1, utilizando os mesmos substratos). Khanahmadi *et al.* (2018) relataram uma produção de 2919 U/g (2^o dia) de xilanase pelo cultivo de *A. niger* CCUG33991 em farelo de trigo. Esses autores sugeriram que a alta atividade xilanásica poderia estar associada à otimização da umidade em 69% durante o processo de FES. Segundo Pandey *et al.* (1994) a água está envolvida na maioria das atividades metabólicas vitais e geralmente células microbianas requerem de 70 a 80% de umidade para crescimento, portanto uma baixa quantidade de água pode limitar o desenvolvimento de microrganismos e, conseqüentemente a síntese de enzimas. Em contrapartida, níveis altos de teor de umidade reduzem a porosidade da fibra preenchendo poros pequenos, impedindo o desenvolvimento dos fungos (KHANAHMADI *et al.*, 2018). Portanto, há a necessidade de um equilíbrio da água no meio para que a FES tenha bons resultados. No presente estudo, as FES foram realizadas com um teor de umidade de 65%, próximo ao do trabalho supracitado, o que pode ter contribuído de forma positiva nas altas concentrações de xilanases nos coquetéis produzidos com as culturas isoladas de *Aspergillus*.

De Oliveira Rodrigues *et al.* (2017b) realizaram um estudo comparativo de diferentes sistemas de cultivos para a produção de xilanase e β -glicosidase pelo fungo *Aspergillus fumigatus* SCB4 durante a FES, utilizando bagaço de cana bruto, e submetido aos pré-tratamentos peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 7,5%, hidróxido de

sódio (NaOH) 2% e Organossolve, além da polpa Kraft e Avicel. Após os pré-tratamentos obteve amostras com teor reduzido de hemiceluloses e lignina. Como resultado registraram para β -glicosidase 30,52 U/g em 96h (bagaço *In natura*), xilanase 1878,76 U/g 120h (polpa Kraft), chegando à conclusão que a pequena biossíntese enzimática após a FES usando o bagaço pré-tratado pode ser devido à presença de alguns inibidores produzidos após os pré-tratamentos, que podem ter restringido o crescimento do fungo e conseqüentemente, a produção das enzimas.

Kang *et al.*, (2004) também investigaram a produção de hemicelulases por *Aspergillus niger* KK2, por FES, utilizando diferentes proporções de palha de arroz como substrato, e obtiveram atividade máxima para β -xilosidase de 193 U/g no sexto dia de fermentação, valor um pouco superior ao encontrado no presente estudo. β -Xilosidases também desempenham um papel importante na degradação de xilana, pois hidrolisam os xilooligossacarídeos a partir da extremidade redutora produzindo os monômeros de xilose (KNOB; TERRASAN; CARMONA, 2010). Dessa forma, a emprego de β -xilosidases e de xilanases fúngicas ganharam importância nos últimos anos devido à sua aplicação biotecnológica em diversos setores, como a indústria de papel e celulose, alimentos e ração animal, além da bioconversão de resíduos lignocelulósicos em compostos de valor agregado e produtos fermentescíveis (PÉEREZ-RODRIGUES *et al.*, 2015). Todos esses fatores incentivam a produção de coquetéis que também sejam ricos em hemicelulases.

Para ligninases, a produção por *Aspergillus* foi relativamente baixa. MnP foi a que apresentou maior atividade (3,38 U/g no terceiro dia) também no extrato Ni utilizando *A. niger* SCBM1 como inóculo (F1). Esses microrganismos representam o segundo grupo de fungos colonizadores de madeira, sendo os Basidiomicetos os principais (LOPEZ *et al.*, 2007). No entanto, poucos estudos têm sido descritos sobre o papel de Ascomicetos na produção de enzimas envolvidas na degradação da lignina e, portanto, é importante que seu potencial seja investigado (LIERS *et al.*, 2006; VANE *et al.*, 2005).

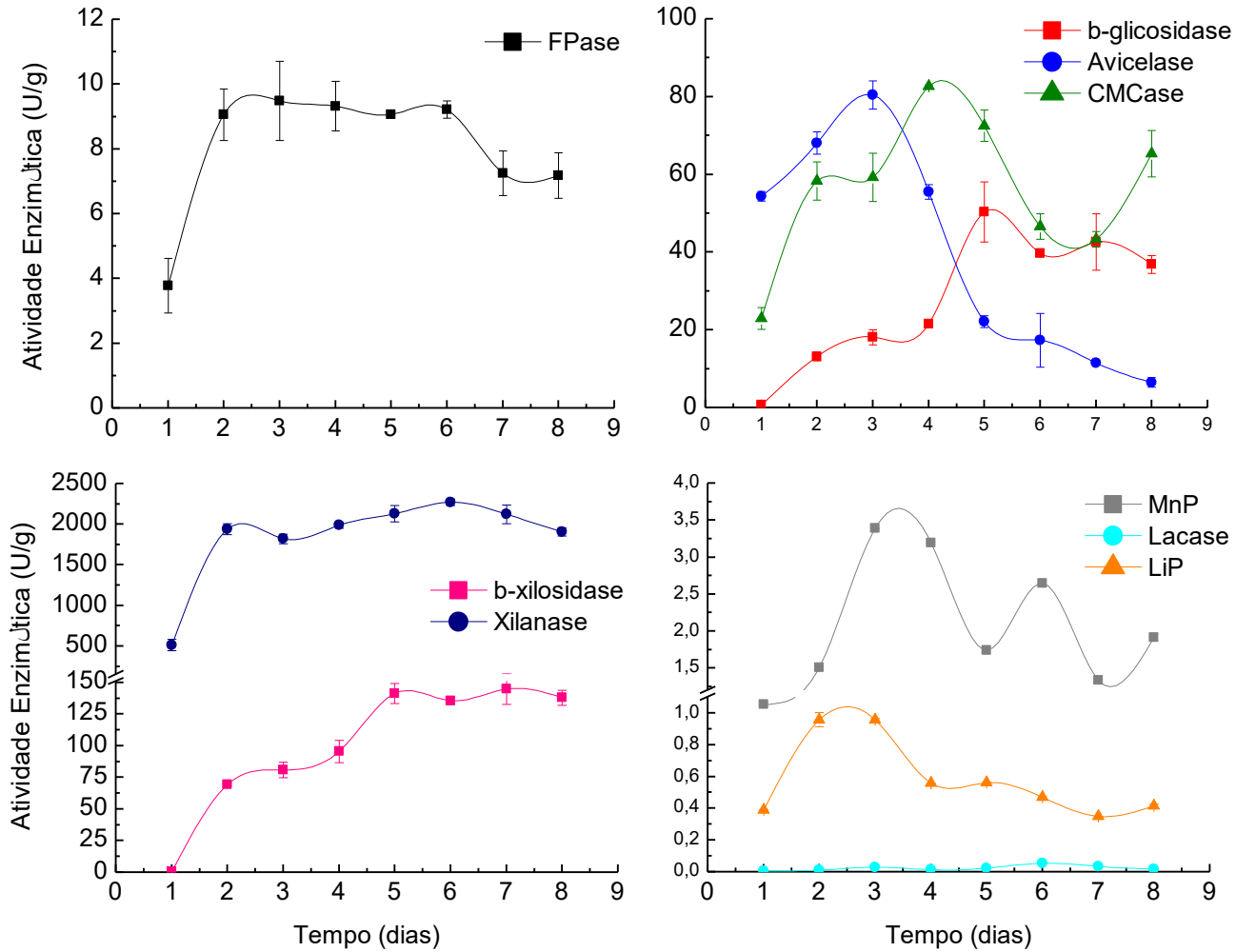
Com base nesses dados, concluiu-se que, sem qualquer tipo de suplementação de nutrientes na FES ou pré-tratamento da biomassa, as linhagens de *Aspergillus* cultivadas isoladas foram ótimas produtoras de celulasas e hemicelulases, demonstrando atividade elevada e superior às encontradas em outros estudos. De forma geral, a fermentação 1 utilizando *A. niger* SCBM1 se sobressaiu na produção

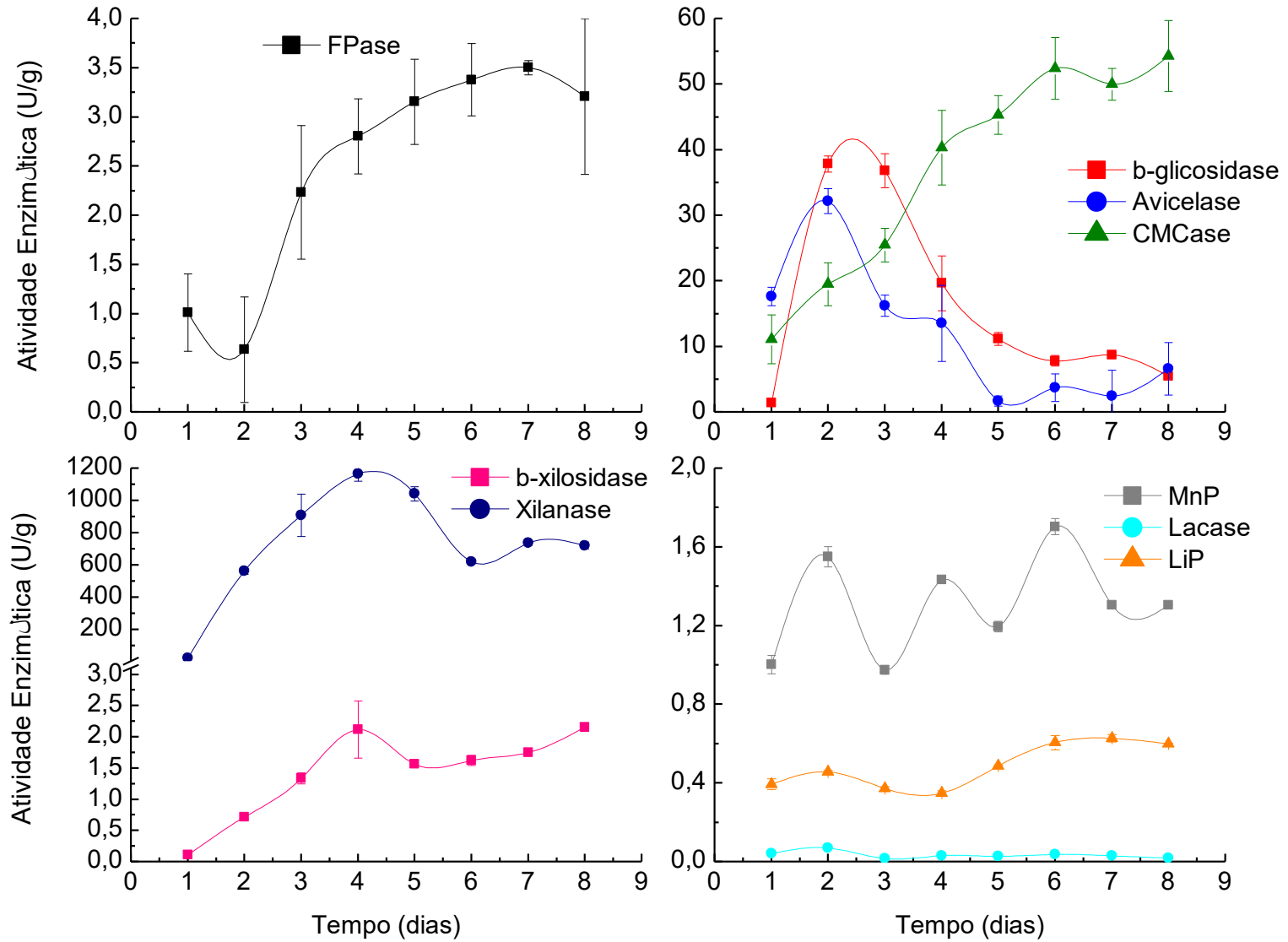
de todas as enzimas analisadas em relação à F2 utilizando *A. fumigatus* SCBM6 como inóculo.

Figura 19 A e B: Curvas de produção das enzimas nos extratos obtidos nas fermentações com Ascomicetos isolados: A – *Aspergillus niger* SCBM1 (F1) e B – *Aspergillus fumigatus* SCBM6 (F2).

A

Aspergillus niger SCBM1



B**Aspergillus fumigatus SCBM6**

6.1.2. Produção de enzimas por Basidiomicetos isolados

As Figuras 20 A, B e C apresentam a produção de enzimas nos extratos produzidos com Basidiomicetos em culturas isoladas (extratos Ga, Tr e PI). Para as celulases FPase, CMCCase e β -glicosidase, as maiores atividades foram observadas quando *T. versicolor* 561 (F5) foi empregado como inóculo (extrato Tr), obtendo picos máximos de 9,45 (6º dia), 56,51 (entre o 3º e 4º dia) e 80,31 U/g (5º dia), respectivamente (Figura 20C). No entanto, para avicelase, *P. ostreatus* PL06 (F3) (Figura 20A) e *G. lucidum* 601 (F4) (Figura 20B) se destacaram na produção, com picos de 39,39 U/g no 3º dia e 57,16 U/g no 5º dia de fermentação, respectivamente. Estes valores foram superiores quando comparado com outros estudos com Basidiomicetos. Kurt e Buyukalaca (2010) avaliaram a produção de CMCCase por FES em diferentes resíduos agrícolas e observaram que os picos de CMCCase por *Pleurotus ostreatus* HK 35 (2,20 U/g) e *P. sajor-caju* ATCC 32078 (1,63 U/g) foram detectados a partir do 5º dia, com palha e farelo de trigo como substratos. Para hemicelulases, não foram encontradas atividades significativas nas FES utilizando Basidiomicetos isolados (Figuras 20 A, B e C). Além disso, as atividades foram inferiores às encontradas quando se utilizou linhagens de *Aspergillus* nas fermentações (Figuras 19 A e B).

Para ligninases, as culturas isoladas de Basidiomicetos apresentaram produção superior às FES realizadas com as linhagens de *Aspergillus*. A enzima lacase apresentou pico de 2,88 U/g no extrato produzido por *T. versicolor* 561 (F5) e 9,66 U/g no extrato produzido por *G. lucidum* 601 (F4), ambas no 4º dia de fermentação (Figuras 20 A, B e C). Para MnP, o pico de atividade foi de 2,10 U/g (5º dia) no extrato Tr (F5) e 1,96 U/g (8º dia) no extrato Ga (F4). Estes valores foram superiores às atividades encontradas por KUHAR et al. (2015). Apesar de não terem sido observadas produções expressivas de ligninases, houve registro de atividades das três enzimas. Entre as linhagens analisadas, *Ganoderma lucidum* 601 foi a que mais se destacou na produção de lacase (Figura 20 B).

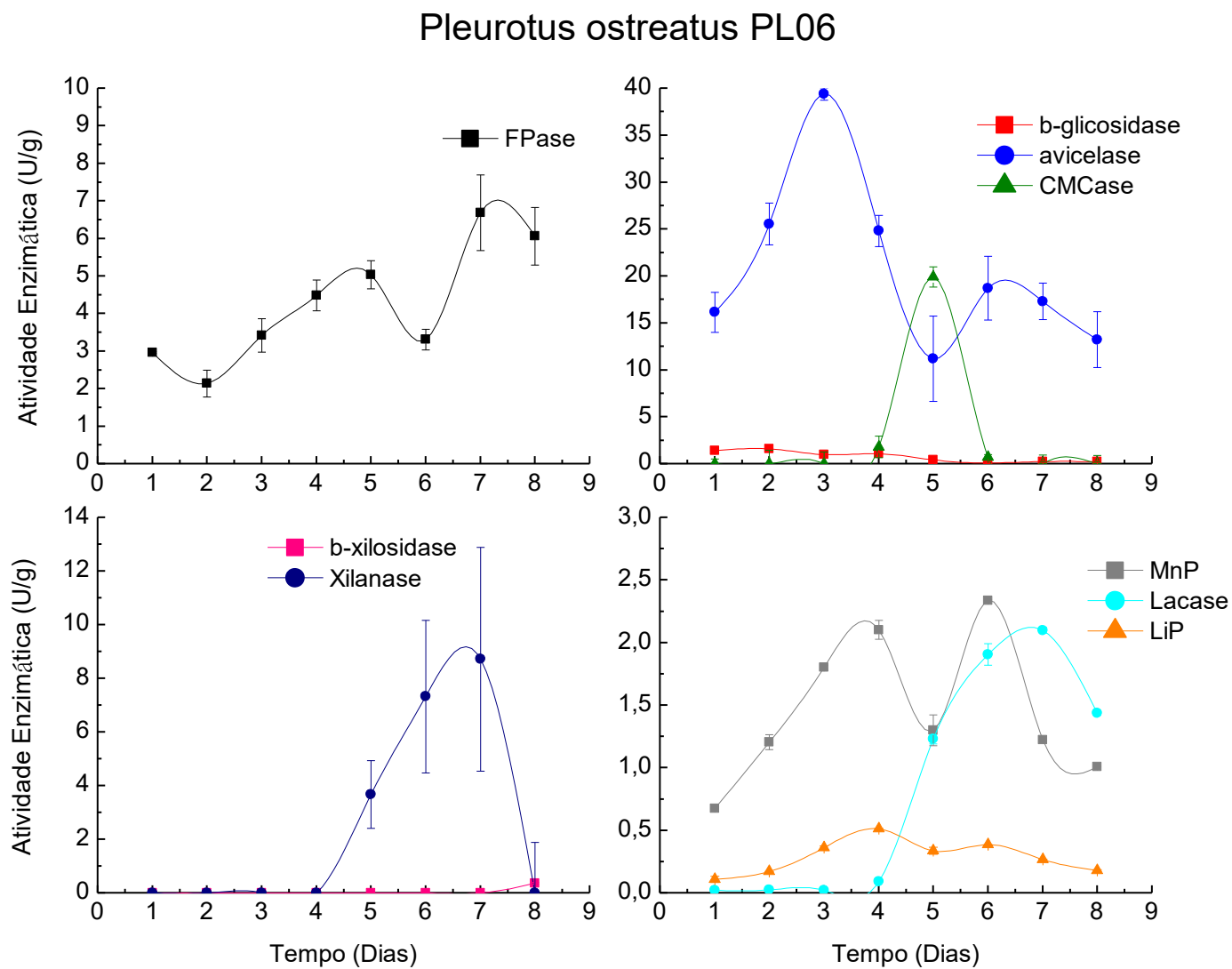
Fungos de podridão branca são geralmente aplicados em diferentes processos ambientais em função da sua capacidade em produzir sistemas lignolíticos extracelulares (ANG NAM; SEAK MAY CHUA; CHENG NGOH, 2014; PERALTA et al., 2017). Como são decompositores da madeira, estudos

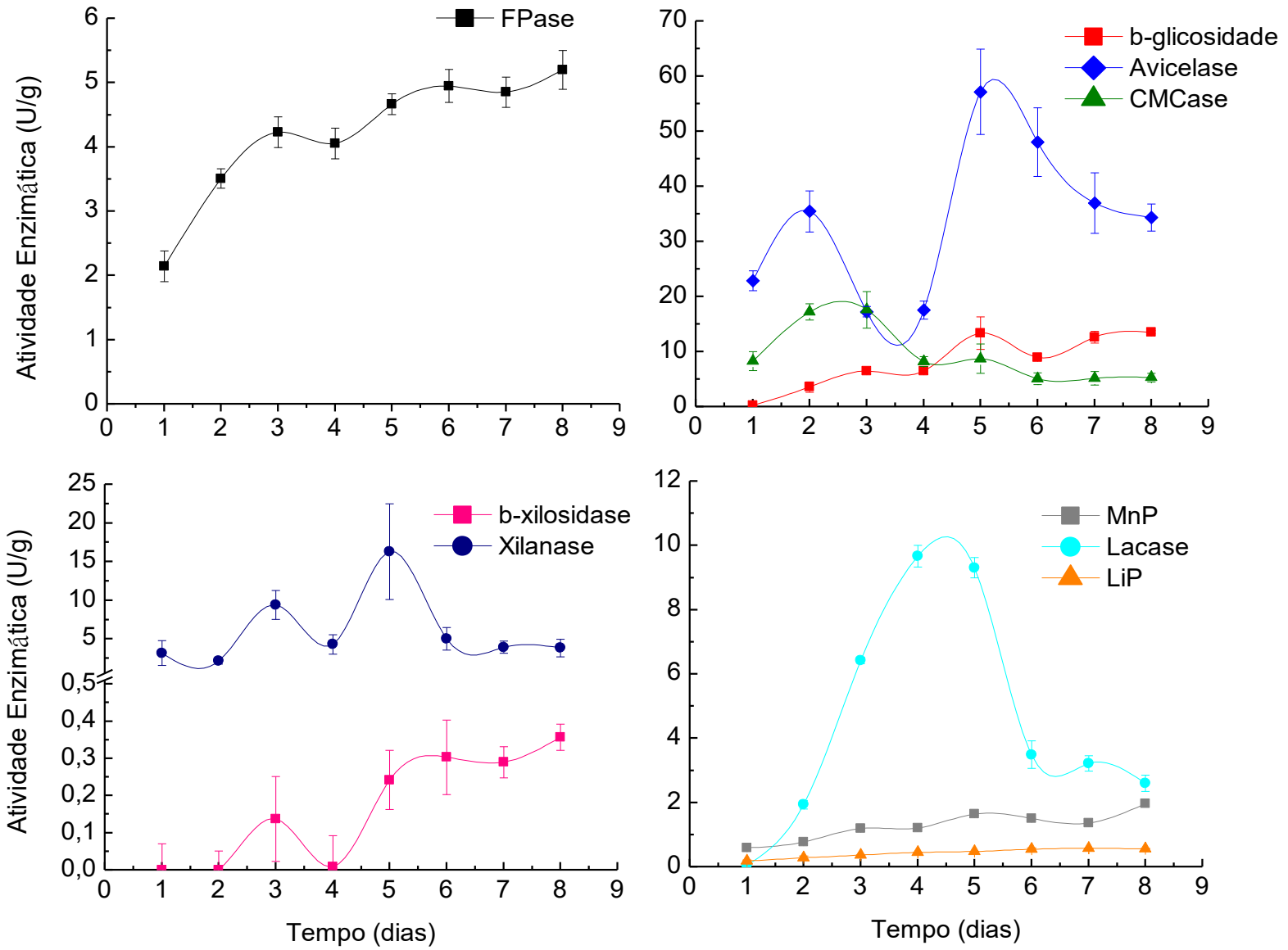
avaliando a produção de ligninases são comumente encontrados (ANG NAM; SEAK MAY CHUA; CHENG NGOH, 2014; FANG *et al.*, 2018; KÜES, 2015; VISWANATH *et al.*, 2014). Porém, poucos trabalhos destacaram fungos de podridão branca na produção de celulases e hemicelulases, recebendo maior destaque na produção de ligninases (FANG *et al.*, 2018; KÜES, 2015). Como exemplo, Kuhar *et al.* (2015) investigaram o efeito da interação de *T. versicolor* BAFC 4272 e *G. lucidum* E47 na produção de lacase e MnP por FES utilizando serragem e semente de aveia como substratos. Com as culturas isoladas, obtiveram picos de 2,24 U/g (*G. lucidum* E47) e 0,86 U/g (*T. versicolor* BAFC 4272) para lacase. A MnP (0,13 U/g) foi detectada apenas no cultivo de *T. versicolor* BAFC 4272.

Outro trabalho evidenciando a eficiência desses Basidiomicetos na produção de ligninases foi o de Fang *et al.* (2018), que investigaram o papel de *T. versicolor* MES 11914 e *P. sajor-caju* MES 03464 para melhorar a digestibilidade anaeróbica de um digerido sólido coletado de uma usina de codigestão, que trata principalmente resíduos agrícolas, como resíduos de frutas e legumes. Neste estudo, os autores encontraram para *T. versicolor* MES 11914 uma atividade para lacase de 284,9 U/g, após uma semana de fermentação, enquanto para MnP foi de aproximadamente 40 U/g após cinco semanas de fermentação. Com *P. sajor-caju* os referidos autores registraram atividade enzimática de 103,1 U/g (MnP) e 45,8 U/g (lacase), ambos com pico em quatro semanas de fermentação.

Figura 20 A, B e C: Curvas de produção das enzimas nos extratos obtidos por fermentação de Basidiomicetos separados: A – *Pleurotus ostreatus* PL06 (F3); B – *Ganoderma lucidum* 601 (F4); C – *Trametes versicolor* 561 (F5).

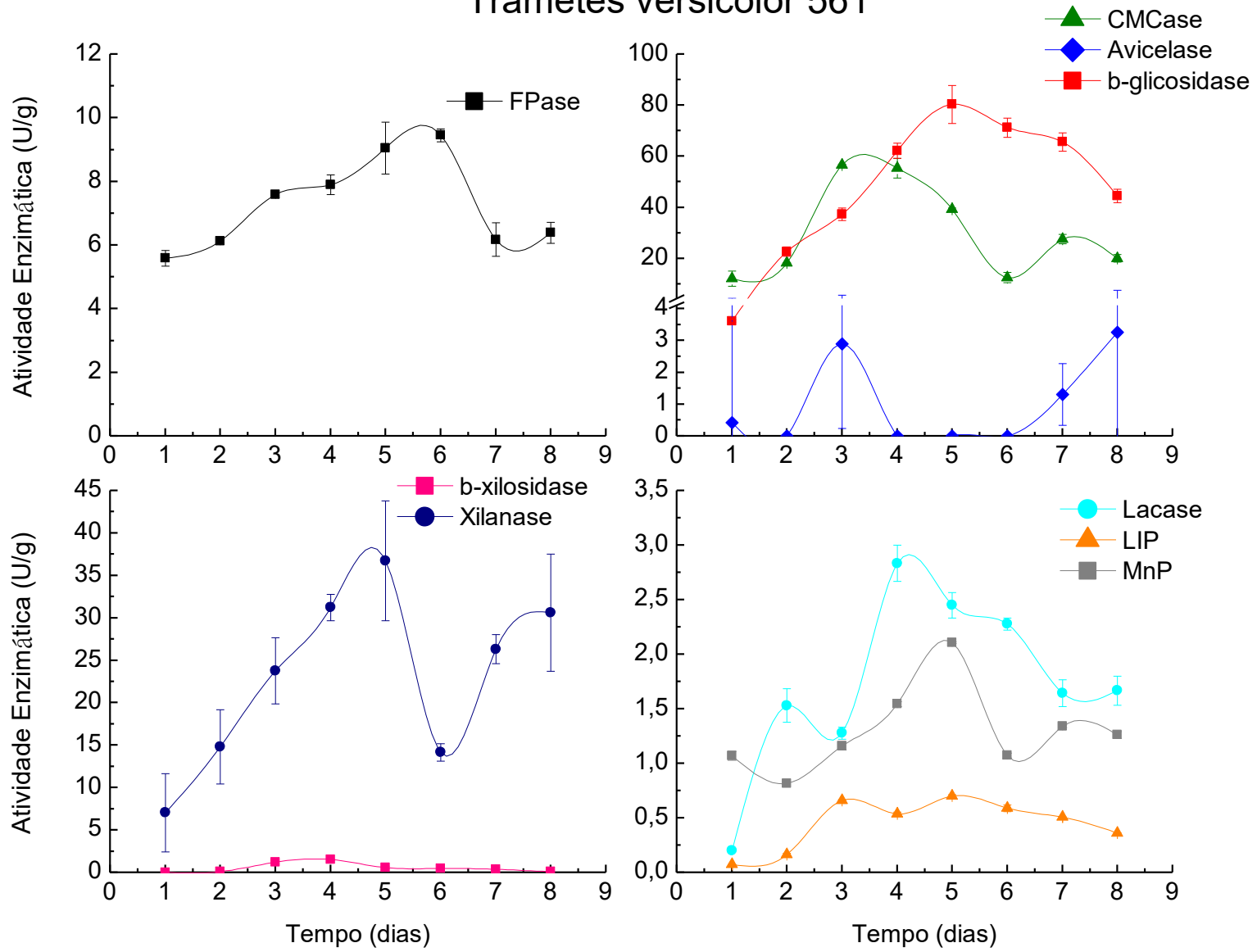
A



B**Ganoderma lucidum 601**

C

Trametes versicolor 561



Em função do alto potencial na produção de ligninases, espécies de Basidiomicetos têm sido empregadas em processos de deslignificação ou biopolpação de biomassas lignocelulósicas, no intuito de auxiliar na fragmentação da estrutura da lignina em arranjos menores (FONSECA *et al.*, 2014). Entre eles, os gêneros mais estudados na produção dessas enzimas e em pré-tratamentos biológicos são *Trametes* e *Pleurotus* ((FONT *et al.*, 2003, TINOCO-VALENCIA *et al.*, 2014). Assim, a investigação do potencial desses microrganismos pode servir de base para estudos futuros a fim de produzir coquetéis enzimáticos mais potentes. No presente estudo, o foco foi verificar a eficiência dessas espécies de basidiomicetos na produção dessas enzimas empregando o bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como fontes de carbono. No entanto, a otimização de parâmetros como temperatura ou a variação nos tipos e proporções de substrato, na composição em termos de celulose, hemiceluloses e lignina, dentre outras condições, devem ser testadas em estudos futuros para potencializar a produção dessas enzimas por estes fungos.

6.1.3. Produção de enzimas por consórcio entre Ascomicetos e Basidiomicetos

Fungos filamentosos apresentam bom desenvolvimento quando cultivados em resíduos agroindustriais. A FES tem sido utilizada com sucesso para o crescimento desses microrganismos, por reproduzir de forma muito semelhante o seu habitat natural (HANSEN *et al.*, 2015). Esse método já vem sendo aplicado em larga escala para produção de enzimas comerciais, por promover um alto rendimento enzimático (PRÉVOT *et al.*, 2013). Por ser bastante heterogênea, a biomassa lignocelulósica requer um pool enzimático misto para potencializar sua degradação. No entanto, nem todas as enzimas necessárias são produzidas por um único microrganismo em concentrações altas. Como alternativa, consórcios fúngicos entre fungos Basidiomicetos e Ascomicetos foram avaliados no intuito de aumentar a produção de enzimas lignocelulolíticas no presente trabalho.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) houve diferença significativa entre os extratos ($p < 0,05$) para a produção das enzimas (Tabela 3, pag.87). Com relação às celulases, nos extratos preparados a partir de consórcios, observou-se um aumento entre 75 e 110% da enzima β -glicosidase, quando comparado com a sua produção nas monoculturas avaliadas (Figuras 21 A, D e E; Tabela 3 – ver pag. 87).

No consórcio Ni+Fu+PI realizado entre *A. niger* SCBM1, *A. fumigatus* SCBM6 e *P. ostreatus* PL06 (F9), o pico de produção de β -glicosidase foi de 104,70 U/g (Figura 21D). Já no extrato Ni+Ga+PI produzido por *A. niger* SCBM01, *G. lucidum* 601 e *P. ostreatus* PL06 (F10), a produção máxima foi de 106 U/g (Figura 21E). No cocultivo entre *A. niger* SCBM01 (Ni), *T. versicolor* 561 (Tr) e *P. ostreatus* PL06 (PI) (F6), o pico de produção dessa enzima foi de 171,09 U/g (Figura 21A). Para essas fermentações, o pico de atividade ocorreu no quarto dia. Para as outras celulases, não houve um único consórcio que se destacou. A enzima CMCase apresentou alta atividade no consórcio entre *A. fumigatus* SCBM06 e *G. lucidum* 601 e *P. ostreatus* PL06 (F11) (73,32 U/g; 7º dia), não diferindo significativamente do extrato Ni (F1) que apresentou a maior produção 82,7 U/g (Tabela 3 – ver pag. 87). Para avicelase, o coquetel Ni+Tr+PI (F6) diferiu significativamente dos outros consórcios (66,65 U/g; 7º dia), assim como o extrato Ni que apresentou a máxima atividade para esta enzima (F1). Com relação à FPase, a produção máxima foi obtida na fermentação 12 com *A. niger* SCBM1, *A. fumigatus* SCBM6 e *G. lucidum* 601 (extrato Ni+Fu+Ga) em consórcio com 10,46 U/g no 2º dia de cultivo.

De forma geral, para atividade de FPase os resultados encontrados nesse estudo foram relativamente superiores aos encontrados em outros trabalhos com espécies de fungos reconhecidas como boas produtoras dessa enzima (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; FENG; JIANG; ZHU, 2009). Kilikian et al. (2014) relataram um pico de produção de 10 U/g de FPase em uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja cultivado com *Myceliophthora thermophila* M77 em cinco dias de FES. Para *Trichoderma harzianum* rifai IPT821, os autores relatam que a atividade ficou em torno de 5 U/g (3º dia). Considerando que essas duas espécies recebem destaque na literatura como bons produtores de celulases, os resultados do presente estudo foram bastante relevantes, visto que um pico de produção próximo (10,46 U/g) foi obtido no 2º dia de cultivo pelo consórcio Ni+Fu+Ga (F12).

Para hemicelulases, as atividades mais elevadas de β -xilosidase e xilanase foram obtidas nos consórcios Ni+Tr+PI (F6), com 139,99 U/g (4º dia) e Ni+Fu+PI (F9) com 2582,38U/g (4º dia), respectivamente (Figura 21 A e D). Como já mencionado, a completa degradação de substratos lignocelulósicos depende da disponibilidade de uma combinação de diferentes enzimas (FERREIRA et al., 2016). Dentre elas, as

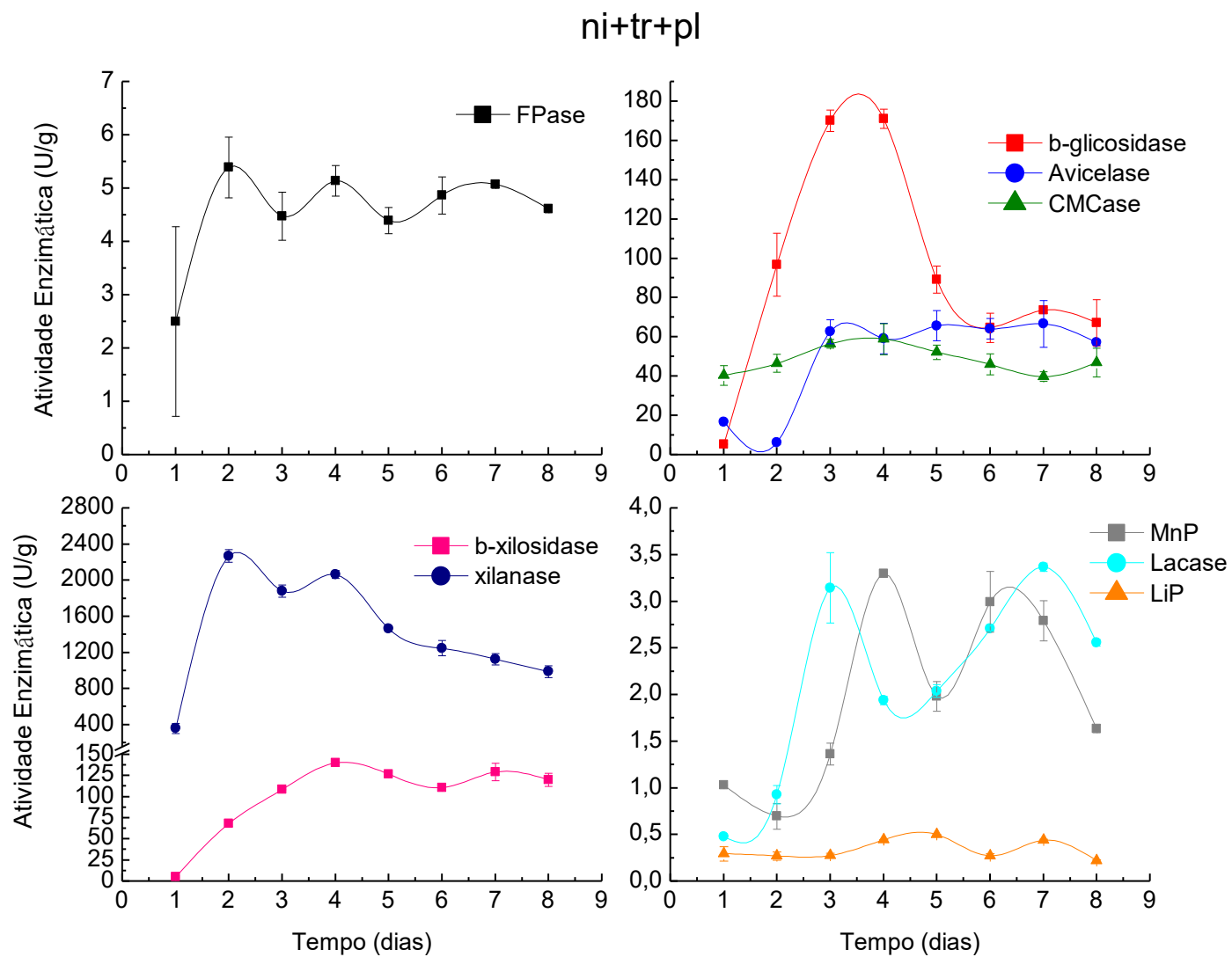
xilanases possuem um papel fundamental por atuarem na despolimerização da xilana, que é a forma mais predominante das hemiceluloses (FERREIRA *et al.*, 2016; SAJITH S, PRIJI P, SREEDEVI S, 2016). Assim, a remoção dos componentes hemicelulósicos da biomassa empregando xilanases pode ser uma excelente estratégia para aumentar o acesso de celulases à cadeia de celulose e contribuir para a eficiência da sacarificação enzimática (BINOD *et al.*, 2018).

Neste estudo foi possível comprovar a eficácia dos consórcios microbianos na produção de celulases, hemicelulases e ligninases (lacase). A bioprospecção de fungos na produção das enzimas rendeu bons resultados, quando comparado com a literatura, com destaque para os consórcios microbianos F8, F10, F11 e F12 que apresentaram excelentes atividades de FPase e CMCase, o consórcio F6 para avicelase, β -glicosidase, β -xilosidase e a fermentação F9 para xilanase. Observou-se ainda que todas essas fermentações foram realizadas com a espécie *A. niger* SCBM1 associada a outros fungos. Diante desses resultados conclui-se que a linhagem *A. niger* SCBM1 se destacou em relação às demais espécies avaliadas na produção de enzimas e que a utilização de consórcios fúngicos foi uma excelente alternativa para aumentar a produção de enzimas e obter coquetéis com alto sinergismo. Dessa forma, ficou constatado que a utilização de combinações de fungos em cocultivo pode favorecer a produção de enzimas sem causar impactos ao ambiente (COPETE-PERTUZ *et al.*, 2019).

Estudos prévios também relataram a combinação entre espécies fúngicas *A. niger* F44 e *T. viride* F26 ou *Coprinopsis cinerea* 7 e *Gongronella* sp. w5 no favorecimento da produção de enzimas lignocelulolíticas (MIKESKOVÁ; NOVOTNÝ; SVOBODOVÁ, 2012; PAN *et al.*, 2014). KUHAR *et al.* (2015) investigaram o efeito da interação de *T. versicolor* BAFC 4272 e *G. lucidum* E47 na produção de lacase e MnP por FES utilizando serragem e semente de aveia como substratos. Com as culturas isoladas, obtiveram picos de 2,24 U/g (*G. lucidum* E47) e 0,86 U/g (*T. versicolor* BAFC 4272) para lacase. Já no cocultivo, o pico de produção de lacase foi de 7,93 U/g, após 14 dias de fermentação, indicando que a produção dessas enzimas foi potencializada quando os fungos foram cultivados em consórcio.

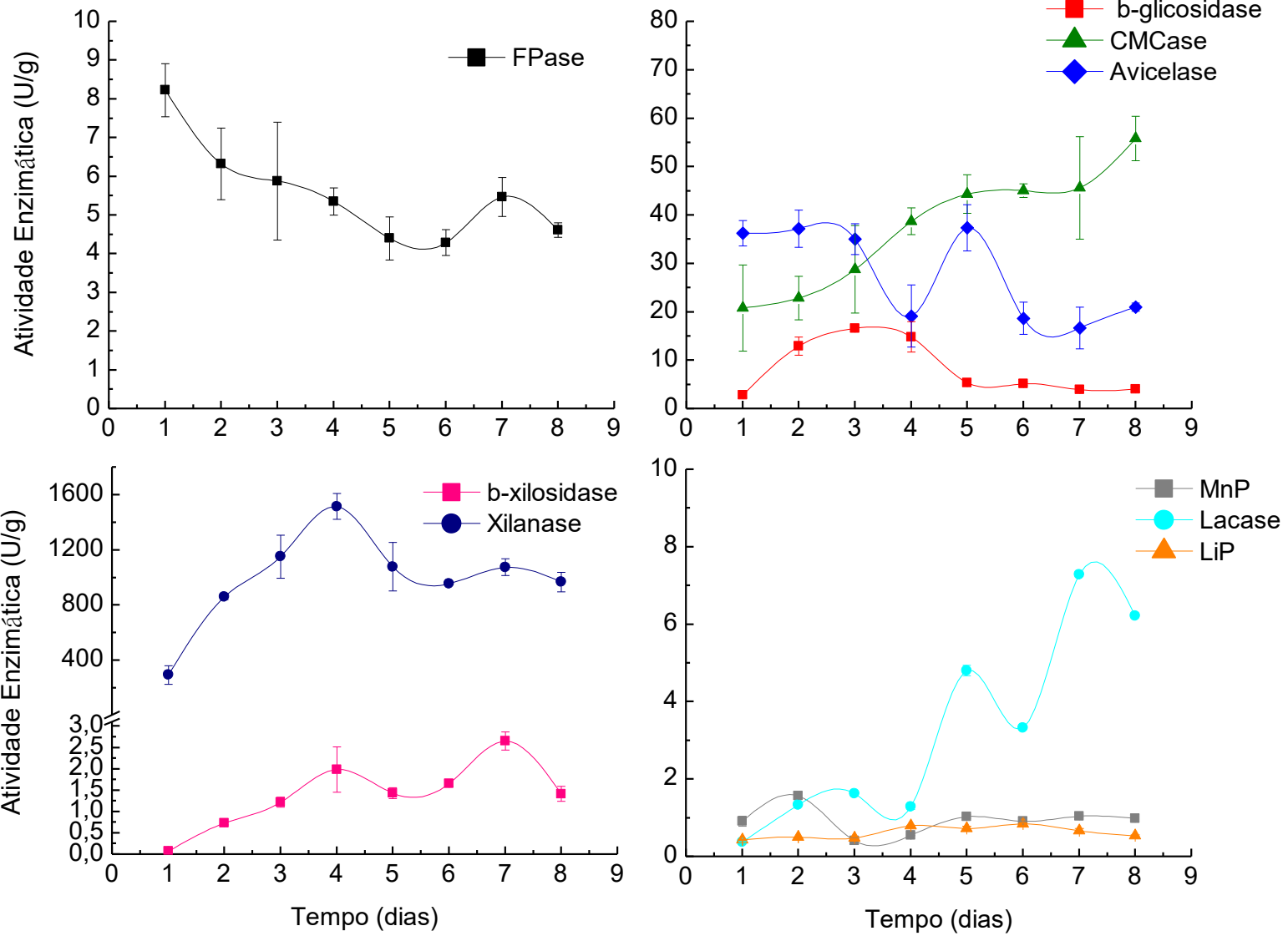
Figura 21 A a K: Curvas de produção das enzimas nos extratos: A – ni+tr+pl ((F6); B – fu+tr+pl (F7); C – ni+fu+tr (F8); D – ni+fu+pl (F9); E – ni+ga+pl (F10); F – fu+ga+pl (F11); G – ni+fu+ga (F12); H – tr+ga+pl (F13); I – ni+tr+ga (F14); J – fu+tr+ga (F15); K – ni+fu+tr+ga+pl (F16)

A

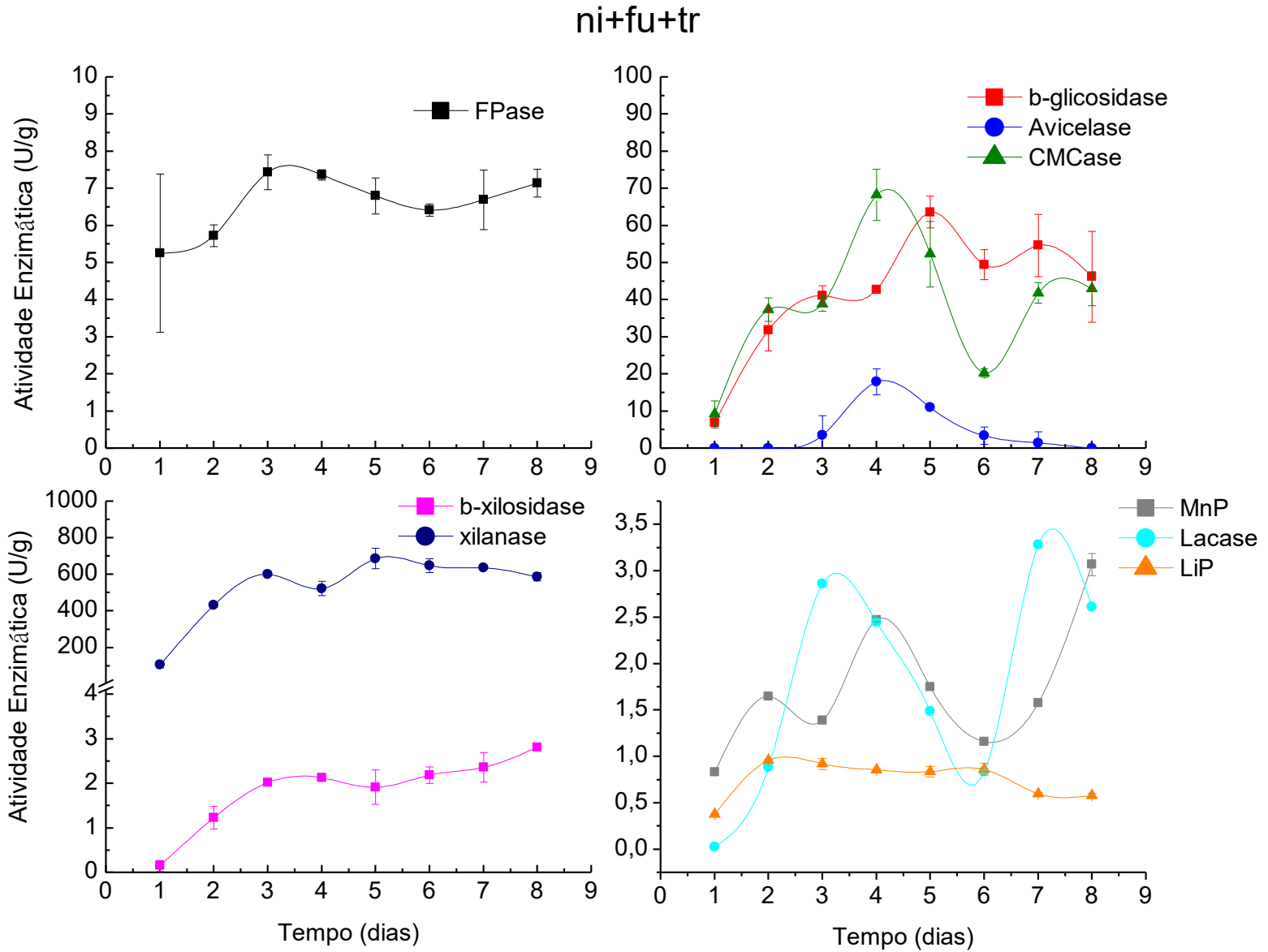


B

fu+tr+pl

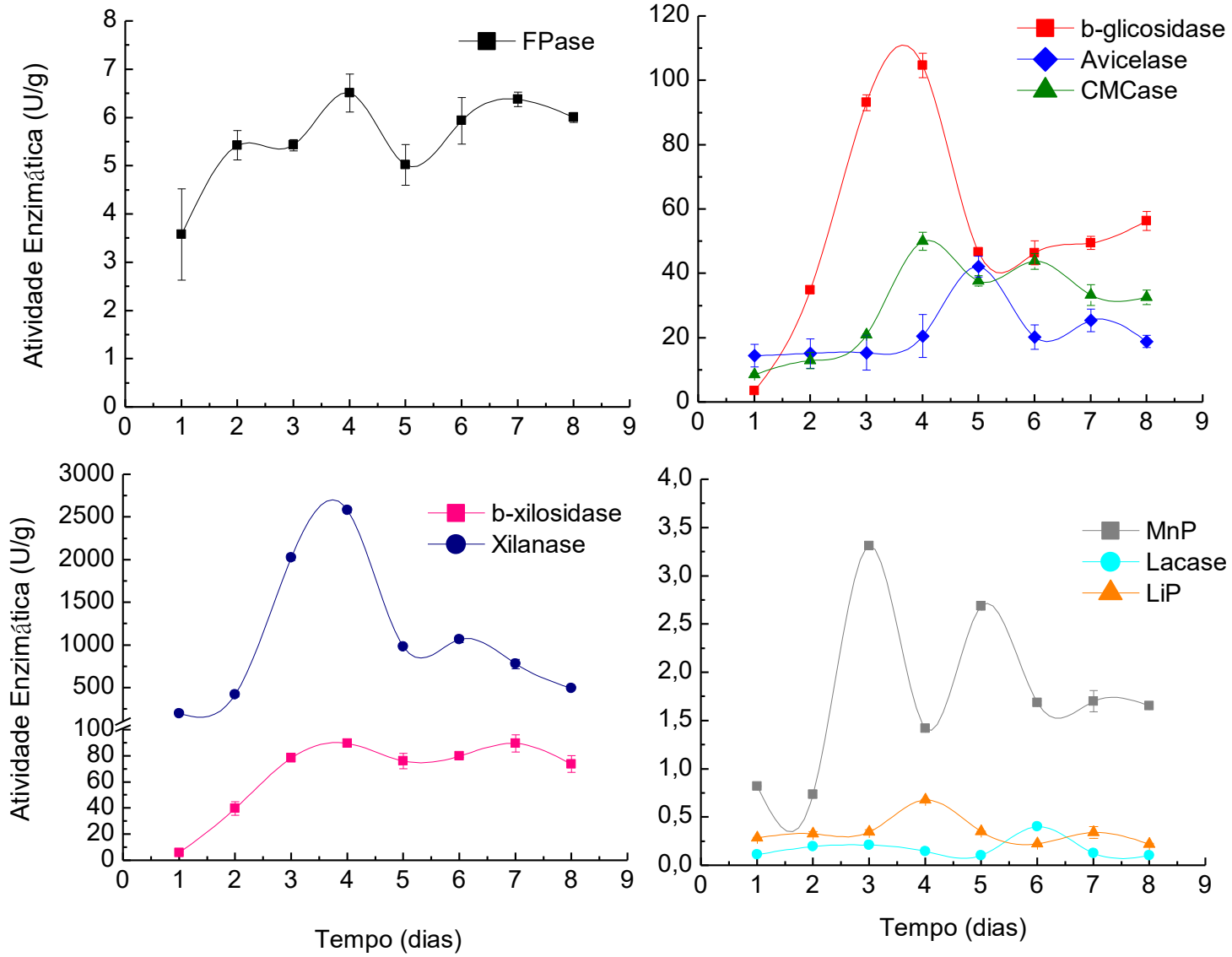


C



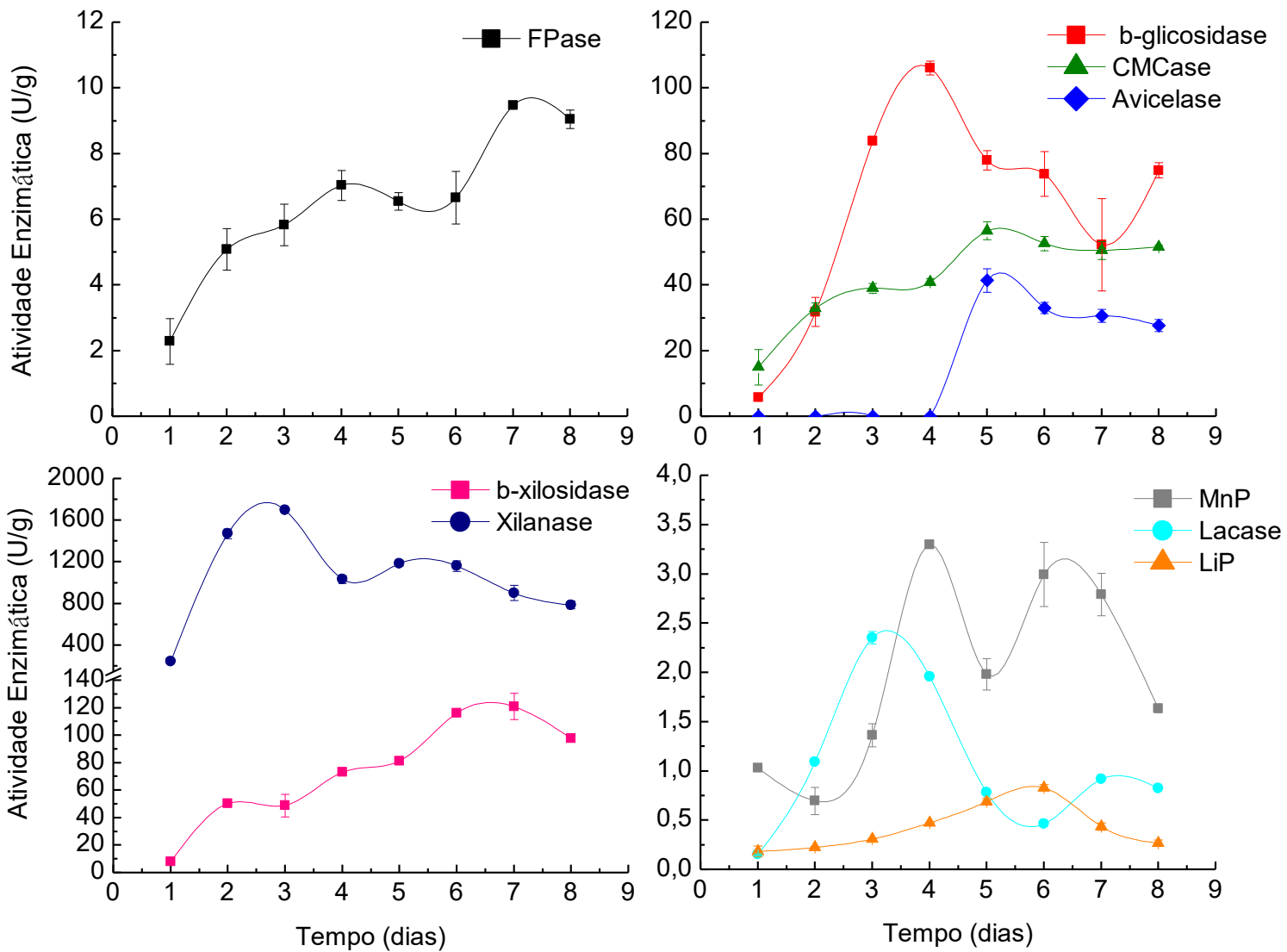
D

ni+fu+pl



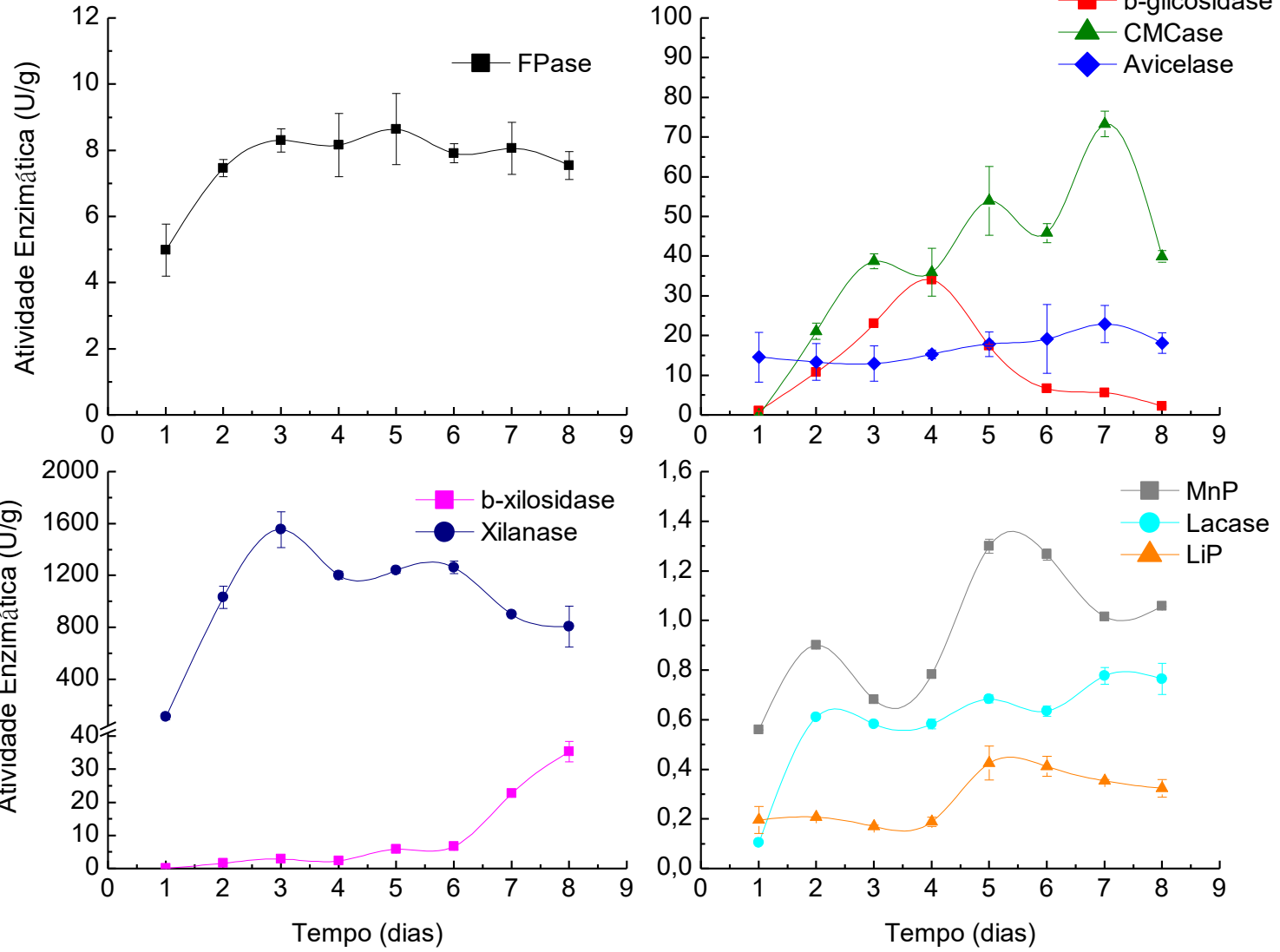
E

ni+ga+pl



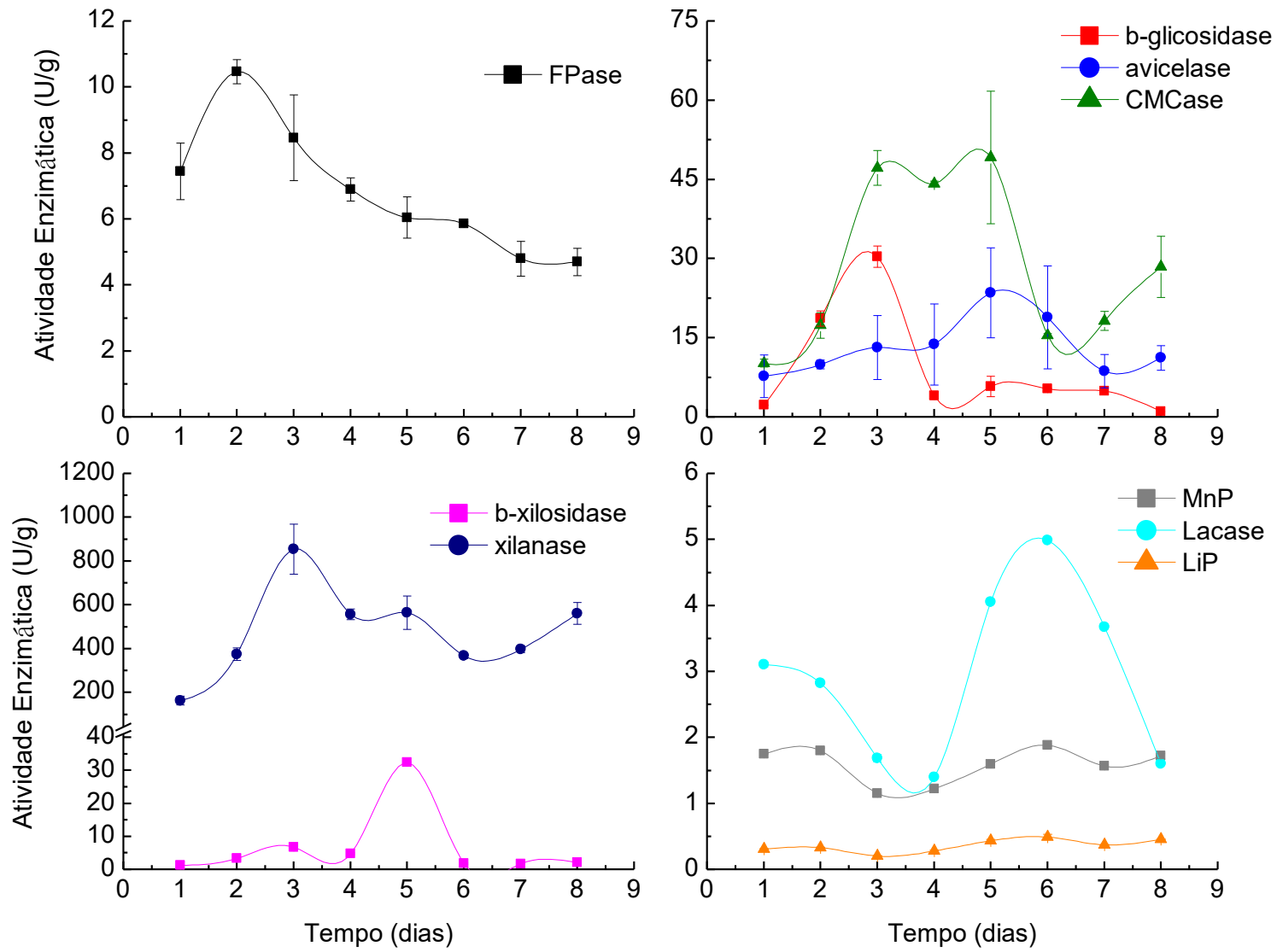
F

fu+ga+pl

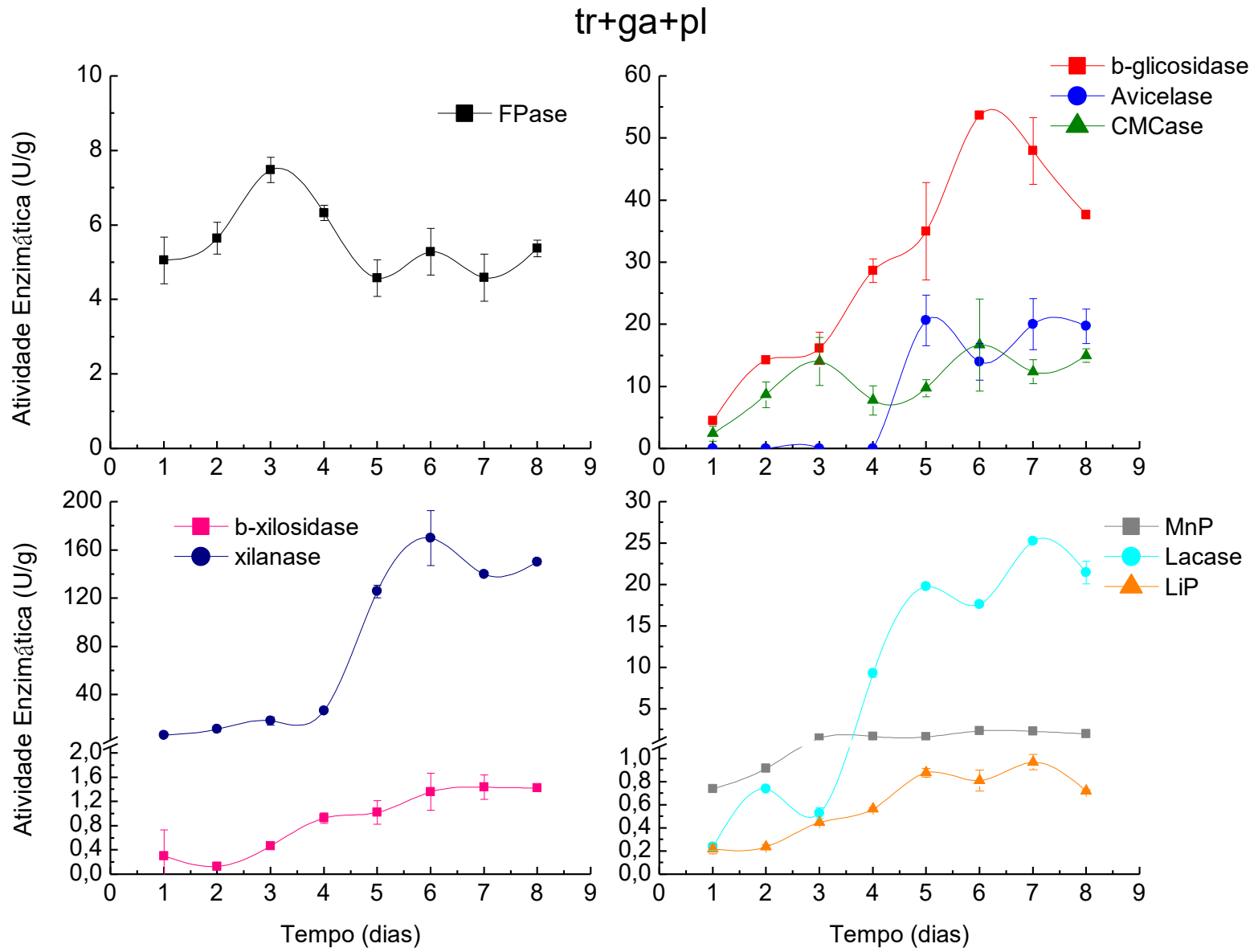


G

ni+fu+ga

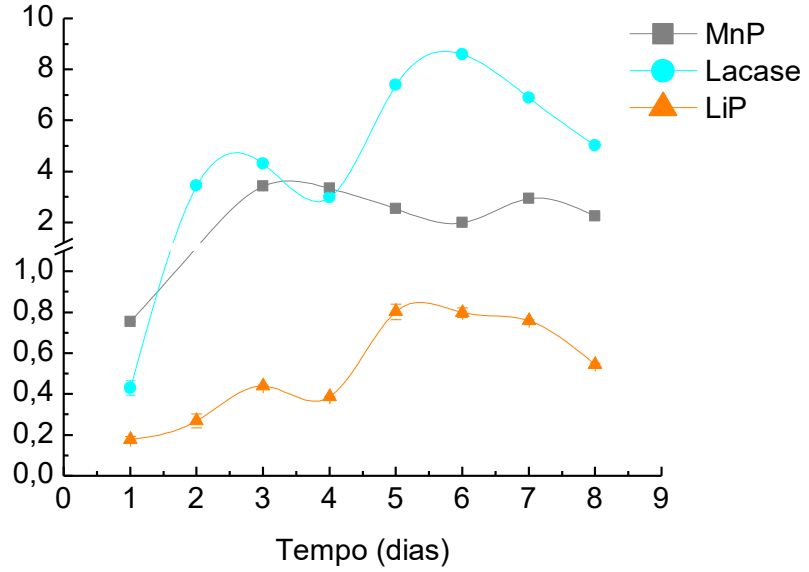
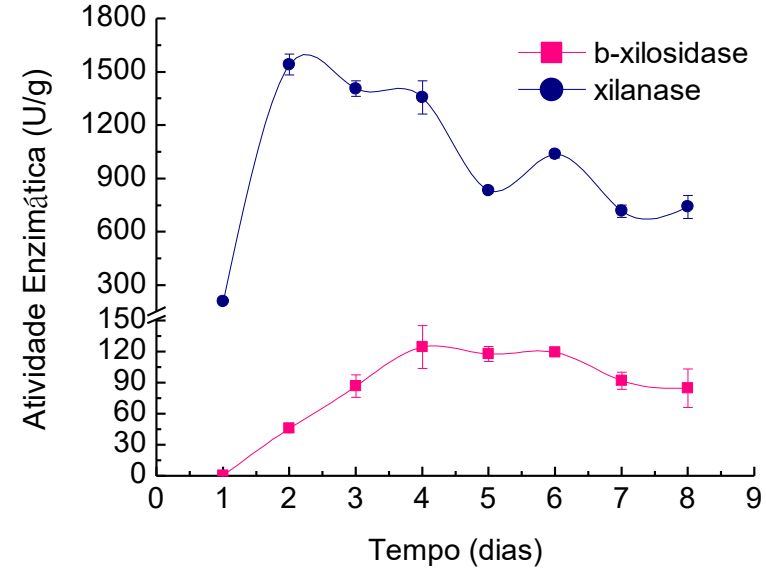
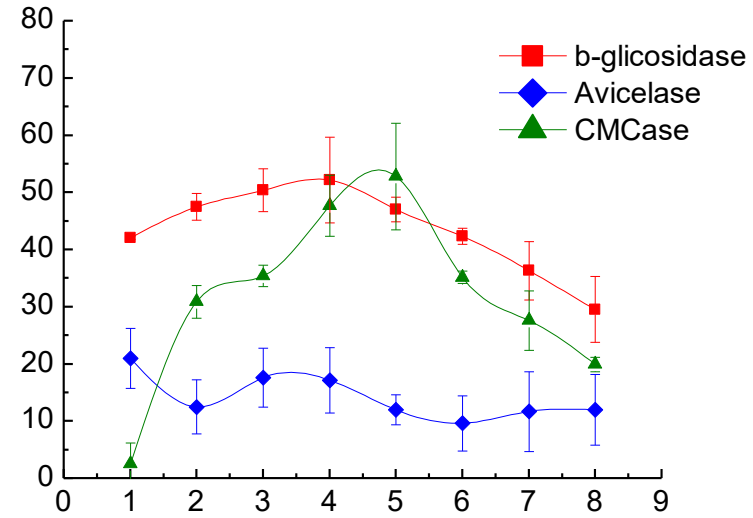
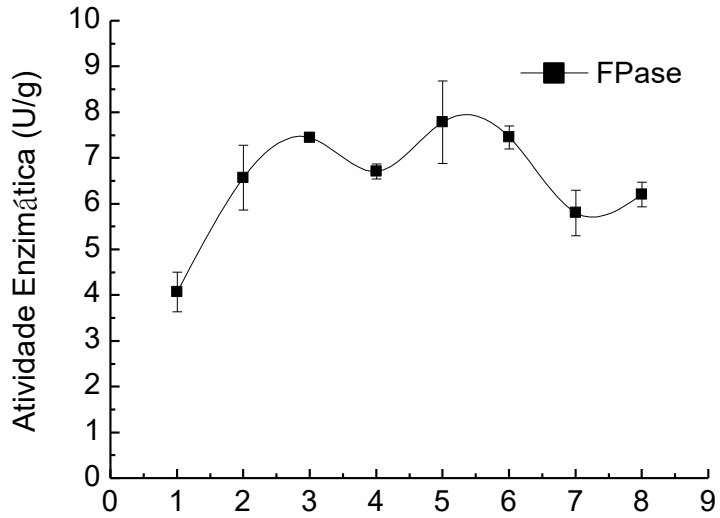


H



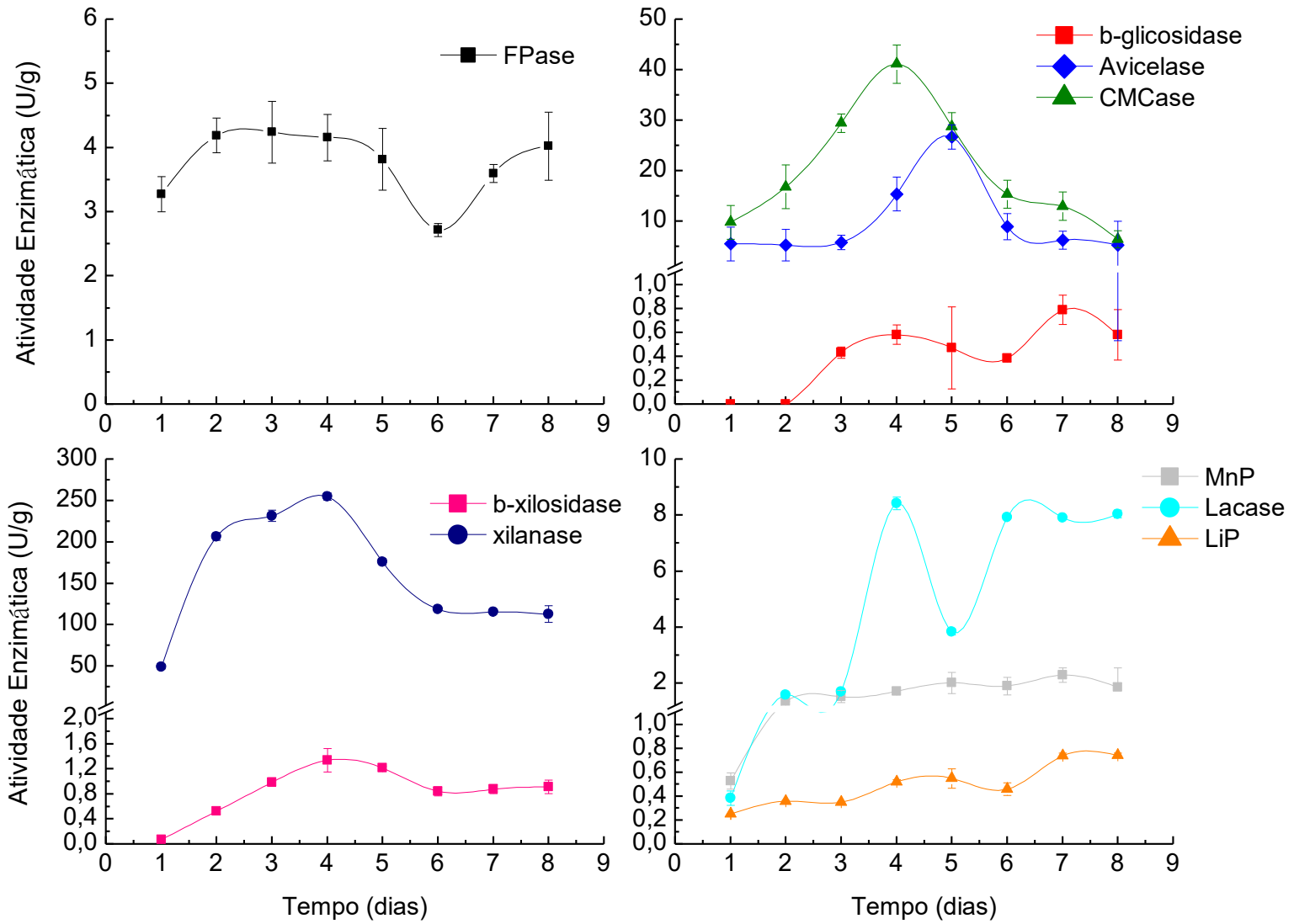
I

ni+tr+ga



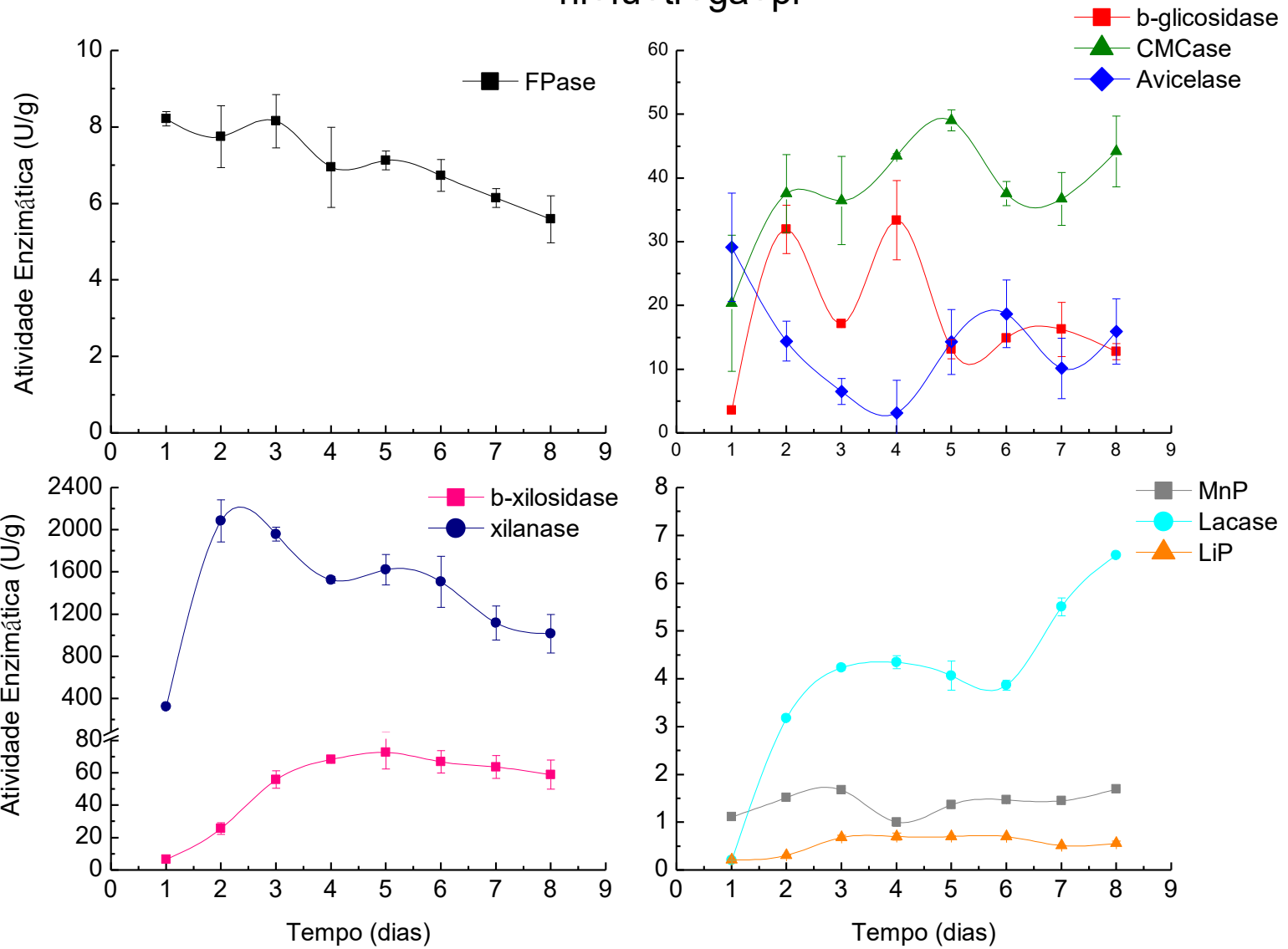
J

fu+tr+ga



K

ni+fu+tr+ga+pl



A tabela (3) a seguir traz um compilado dos dados da Fermentação em Estado Sólido (FES) das espécies em isolado e para os consórcios avaliados. As produções de cada enzima em cada fermentação, se referem aos picos de atividade. Os destaques em vermelho são as maiores produções de cada enzima, considerando se houve ou não diferença significativa.

Tabela 3: Picos das atividades (U/g) nos extratos enzimáticos produzidos em cada fermentação

FES	Enzimas	FPase	CMCase	Avicelase	β -glicosidase	β -xilosidase	Xilanase	Lacase	MnP	LiP
	Inóculo									
1	Ni	9,48 a \pm 1,21	82,70 a \pm 0,34	80,48 a \pm 3,63	50,36 e \pm 7,71	145,01 a \pm 12,49	2271,68 b \pm 39,43	0,05 n \pm 0,00	3,38 a \pm 0,00	0,95 a \pm 0,02
2	Fu	3,50 d \pm 0,07	54,32 b \pm 5,42	32,16 c \pm 1,87	37,85 f \pm 1,22	2,15 f \pm 0,06	1164,75 e \pm 44,84	0,06 n \pm 0,00	1,70 f \pm 0,02	0,62 e \pm 0,01
3	Pl	6,68 c \pm 1,00	19,90 c \pm 1,06	39,39 c \pm 0,66	1,60 h \pm 0,09	0 s	8,71 h \pm 4,17	2,09 k \pm 0,01	2,33 c \pm 0,00	0,51 g \pm 0,0
4	Ga	4,94 d \pm 0,25	17,58 c \pm 3,35	57,16 b \pm 7,75	13,55 g \pm 0,26	0,35 f \pm 0,03	16,30 h \pm 6,20	9,66 b \pm 0,22	1,96 d \pm 0	0,57 f \pm 0,00
5	Tr	9,45 a \pm 0,19	56,51 b \pm 0,41	6,49 e \pm 0,78	80,31 c \pm 7,48	1,50 f \pm 0,06	36,71 h \pm 7,04	2,88 i \pm 0,11	2,10 d \pm 0,00	0,70 d \pm 0,00
6	Ni+Tr+Pl	5,39 c \pm 0,57	58,88 b \pm 7,96	66,65 b \pm 11,88	171,09 a \pm 4,82	139,99 a \pm 1,54	2267,96 b \pm 70,53	3,36 h \pm 0,02	3,29 a \pm 0,02	0,49 g \pm 0,00
7	Fu+Tr+Pl	8,22 b \pm 0,68	55,80 b \pm 4,58	37,35 c \pm 4,74	16,56 g \pm 0,31	2,65 f \pm 0,21	1515,26 d \pm 94,21	7,28 e \pm 0,03	1,56 f \pm 0,05	0,84 b \pm 0,02
8	Ni+Fu+Tr	7,43 b \pm 0,47	68,26 a \pm 6,86	17,87 d \pm 3,52	63,59 d \pm 4,27	2,81 f \pm 0,07	687,38 f \pm 56,42	3,28 h \pm 0,01	3,06 b \pm 0,08	0,95 a \pm 0,00
9	Ni+Fu+Pl	6,51 c \pm 0,39	43,80 b \pm 2,46	42,16 c \pm 3,20	104,70 b \pm 3,76	89,72 c \pm 0,77	2582,38 a \pm 32,73	0,40 m \pm 0,02	3,31 a \pm 0,0	0,68 d \pm 0,0
10	Ni+Ga+Pl	9,46 a \pm 0,05	56,54 b \pm 2,79	41,40 c \pm 3,62	106,10 b \pm 2,06	121,02 b \pm 9,46	1697,74 d \pm 10,29	2,35 j \pm 0,04	3,29 a \pm 0,02	0,82b \pm 0,02
11	Fu+Ga+Pl	8,64 b \pm 1,07	73,32 a \pm 3,21	22,96 d \pm 4,65	34,04 f \pm 0,13	35,39 e \pm 3,08	1555,10 d \pm 137,82	0,77 l \pm 0,02	1,3 g \pm 0,01	0,42 h \pm 0,04
12	Ni+Fu+Ga	10,46 a \pm 0,36	49,15 b \pm 12,56	23,55 d \pm 8,52	30,37 f \pm 1,99	32,39 e \pm 0,18	855,32 f \pm 114,22	4,99 g \pm 0,01	1,88 e \pm 0,00	0,49 g \pm 0,03
13	Tr+Ga+Pl	7,48 b \pm 0,34	16,70 c \pm 7,41	20,65 d \pm 4,05	53,70 e \pm 0,32	1,43 f \pm 0,199	169,83 f \pm 22,78	25,27 a \pm 0,18	2,35 c \pm 0,02	0,96 a \pm 0,04
14	Ni+Tr+Ga	7,78 b \pm 0,90	52,80 b \pm 9,33	21,00 d \pm 5,26	72,79 c \pm 7,46	124,52 b \pm 20,83	1541,43 d \pm 58,88	8,6 c \pm 0,04	3,42 a \pm 0,08	0,80 b \pm 0,02
15	Fu+Tr+Ga	4,23 d \pm 0,47	41,13 b \pm 3,78	26,71 d \pm 2,41	0,78 h \pm 0,12	1,33 f \pm 0,188	254,90 g \pm 4,26	7,92 d \pm 0,03	2,29 c \pm 0,17	0,74 c \pm 0,01
16	Ni+Fu+Tr+Ga+Pl	8,21 b \pm 0,18	49,05 b \pm 1,65	29,16 c \pm 8,50	33,40 f \pm 6,21	72,63 d \pm 10,23	2084,21 c \pm 199,78	6,58 f \pm 0,00	1,69 f \pm 0,00	0,70 d \pm 0,04

¹Esta tabela apresenta as médias e desvio padrão (n=3) para o pico de atividade de cada enzima, em cada extrato enzimático bruto. As letras **a**, até **n**, mostram a diferenças entre os extratos para cada enzima ("a" representa maior atividade e assim por diante). As médias seguidas por letras distintas na coluna diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05). ²As abreviações se referem às espécies **Ni**: *Aspergillus niger* SCBM1; **Fu**: *Aspergillus fumigatus* SCBM6; **Tr**: *Trametes versicolor* 561; **Pl**: *Pleurotus ostreatus* PL06; **Ga**: *Ganoderma lucidum* 601.

6.2. Análise de Componente Principal – ACP e Análise de Correlação.

A ACP teve como objetivo avaliar os agrupamentos entre as condições de fermentação (espécies isoladas e em consórcio) e verificar as associações entre estas condições e produção de enzimas. Os dois primeiros eixos explicaram 54,6% da variabilidade, sendo que o primeiro eixo (PC1) explicou 37,2%, enquanto o segundo eixo (PC2) ilustrou 17,4% (Figura 22).

A ACP apresentou diferença entre os extratos enzimáticos na produção das enzimas. Os extratos produzidos com *G. lucidum* 601 (F4) e *P. ostreatus* PL06 (F3), ambos com as culturas isoladas e o consorcio Fu+Tr+Ga (F15) se separaram dos demais extratos pelo eixo primário (Figura 22). As análises de correlação de Pearson entre as enzimas e esses extratos também foram na sua maioria negativas (Tabela 14 – Apêndice). Esse perfil se confirmou pelas menores atividades registradas para todas as enzimas nesses extratos (Tabela 3). A atividade de lacase foi positivamente associada ao extrato Tr+Ga+PI (F13), que apresentou a maior produção (Tabela 3). Em contrapartida, lacase apresentou correlação negativa às fermentações 1, 2, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 (Figura 21 e Tabela 14). As enzimas CMCase, β -glicosidase, β -xilosidase, xilanase e MnP se associaram positivamente com os extratos enzimáticos brutos produzidas nas fermentações 1, 6, 9 e 10 (Figura 21). Esses extratos, se destacaram na produção dessas enzimas, pois estão localizados na mesma posição das variáveis de projeção plana multivariada.

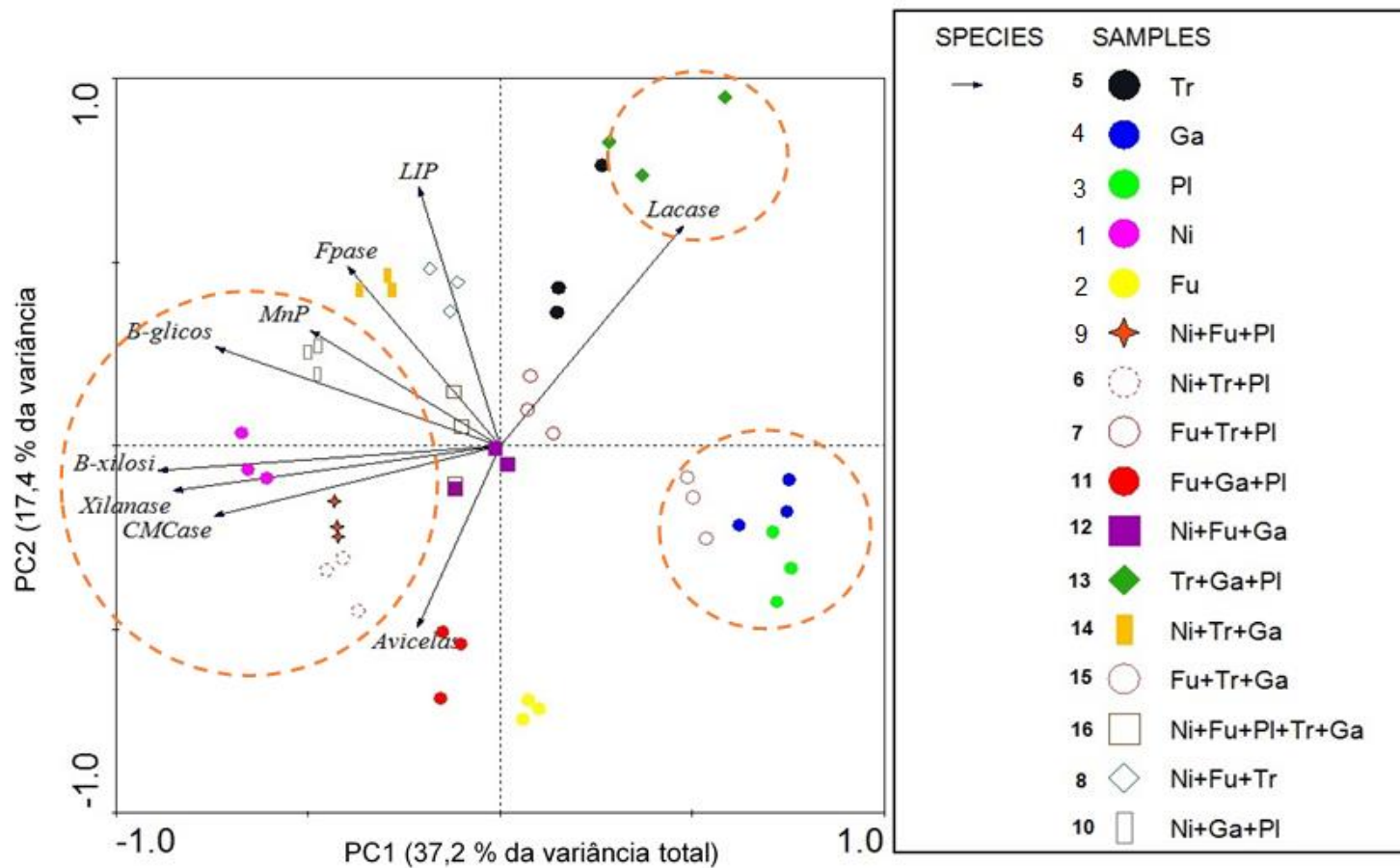
Na análise de interação entre os extratos e enzimas, as maiores correlações foram registradas a partir das associações entre: CMCase com F1 (Ni) (0,44; $p < 0,005$); β -glicosidase com F6 (Ni+Tr+PI) (0,687; $p < 0,001$); β -xilosidase com F1 (Ni) (0,446; $p < 0,005$); xilanase com F9 (Ni+Fu+PI) (0,417; $p < 0,005$) e MnP com F1 (Ni) (0,33; $p < 0,05$). Esses coquetéis foram os que apresentaram as maiores atividades para essas enzimas (Tabela 3). A ACP demonstrou ainda que a produção da avicelase está no sentido oposto ao extrato F5 (Tr), indicando sua baixa produção nesse tratamento. Este extrato e enzima apresentaram uma correlação negativa -0,379 e $p < 0,01$ (ver Tabela 14).

Quando foram avaliadas as associações apenas entre as classes de enzimas, verificou-se uma correlação de moderada a alta entre celulasas e hemicelulasas, que variaram entre 0,421 e 0,785, com $p < 0,005$, indicando que a produção sinérgica foi

favorecida. Em contrapartida, há uma associação negativa na produção da lacase (ligninase) em relação à CMCCase e xilanase (- 0,58 e - 0,416; $p < 0,001$ e $p < 0,005$) (Tabela 3 e Tabela 15 – Apêndice).

Portanto, a partir das análises univariada (Tabela 3), multivariada APC e da correlação de Pearson foi possível inferir que os melhores extratos produzidos em consórcios microbianos para biossíntese de celulases, hemicelulases e MnP foram: Ni+Fu+PI (F9); Ni+Tr+PI (F6) e Ni+Ga+PI (F10). Em culturas isoladas, o melhor extrato produzido foi Ni (F1), que apresentou os maiores picos de atividades para FPase, CMCCase, Avicelase, β -xilosidase, MnP e LiP.

Figura 22: Figura 22: Projeção plana multivariada dos 16 extratos enzimáticos brutos para produção de FPase, CMCase, Avicelase, β -glicosidase, β -xilosidase, Xilanase, Lacase, MnP e LiP; O plano formado pela Componente Principal 1 (PC1) e Componente Principal 2 (PC2), reproduziram 54,6% da variância. Ni: A. niger SCBM1; Fu: A. fumigatus SCBM6; Tr: T. versicolor 561; Pl: P. ostreatus PL06; Ga: G. lucidum 601



Fonte: A autora

7. CONCLUSÕES

Todas as FES avaliadas foram potenciais produtoras de celulases, hemicelulases e ligninases. O cultivo das linhagens fúngicas em consórcios proporcionou aumento na produção de enzimas, quando comparados com os cultivos isolados. A partir da análise estatística e ACP, observou-se que a fermentação realizada com *A. niger* SCBM1 isolado (F1) apresentou os maiores picos para CMCase, avicelase, β -xilosidase, xilanase, LiP e MnP. Os consórcios enzimáticos Ni+Fu+PI (F9); Ni+Tr+PI (F6) e Ni+Ga+PI (F10) foram os mais ativos para celulases e hemicelulases. Nestes extratos, as maiores atividades de celulases e hemicelulases ocorreram quase que na totalidade com até quatro dias fermentação. De maneira geral, os extratos enzimáticos produzidos por FES contendo a espécie *A. niger* SCBM1 entre os inóculos foram os mais ativos na produção de enzimas, demonstrando a importância dessa espécie na ativação dessa produção quando co-cultivada com outras espécies.

As espécies *G. lucidum* 601 e *P. ostreatus* PL06 não foram boas produtoras de celulases e hemicelulases. Em contrapartida, o extrato enzimático bruto produzido pelo cultivo em consórcio das três espécies de Basidiomicetos (F13) apresentou a maior produção de lacase. Foi possível observar que, para as enzimas β -glicosidase e lacase, o cocultivo das espécies potencializou suas produções, o que é importante principalmente para β -glicosidase, enzima chave no processo de hidrólise da celulose.

Com base nestes resultados, concluiu-se que a utilização de consórcios fúngicos na produção de enzimas decompositoras da biomassa lignocelulósica mostrou ser um caminho atraente e contribuiu para a maior produção das mesmas. Os resultados obtidos incentivam novos estudos sobre a utilização de consórcios microbianos, principalmente na produção das celulases e hemicelulases. A eficiência de cada um dos 16 extratos produzidos na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar será avaliada no capítulo seguinte.

CAPÍTULO 2

Efeito de coquetéis lignocelulolíticos produzidos por consórcios fúngicos na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar e produção de etanol

RESUMO

Na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, a estrutura polimérica dos carboidratos é clivada em glicose e outros açúcares monoméricos para posterior aplicação na produção de etanol de segunda geração (etanol 2G). Neste contexto, este estudo avaliou a eficiência de coquetéis enzimáticos produzidos por consórcio fúngico na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise (AH) e auto-hidrólise seguida de deslignificação alcalina (AH-Soda), com posterior fermentação alcoólica. Após o pré-tratamento hidrotérmico (AH), observou-se 69,26% de remoção da fração hemicelulósica. No bagaço pré-tratado por AH-Soda, essa redução aumentou para 89,20% e o conteúdo de lignina diminuiu em 37,85%, comparado ao bagaço AH. Para os hidrolisados de bagaço AH utilizando extratos produzidos por monoculturas fúngicas, a maior liberação de glicose (10,78 g/L e 16,31% de conversão) foi obtida no hidrolisado Ni (utilizando o extrato F1 de *Aspergillus niger* SCBM1). Nas hidrólises utilizando os extratos produzidos por consórcio, o maior rendimento em glicose foi observado no hidrolisado Fu+Ga+PI (extrato F11 produzido por *A. fumigatus* SCBM6, *Ganoderma lucidum* 601 e *Trametes versicolor* 561), com 9,76 g/L de glicose e 14,81% de conversão. Com relação à xilose, a hidrólise utilizando o complexo enzimático Ni+Fu+Tr (F8) foi a que mais se destacou (5,08 g/L e conversão de 51,04%). Este resultado foi superior ao obtido após a hidrólise realizada com enzima comercial (3,67 g/L e 36,93% de conversão). Nas hidrólises de bagaço AH-Soda, o hidrolisado utilizando extrato Ni+Ga+PI (F10) foi o que apresentou a maior concentração de glicose (11,92 g/L) com conversão de 13,53%. Para xilose, a hidrólise com extrato Fu (F2) apresentou melhor rendimento (1,37 g/L e conversão de 41,18%). Na fermentação alcóolica dos hidrolisados selecionados, foi obtido um valor máximo de 3,206 g/L e rendimento em relação ao máximo teórico de 60,80% na condição F1. Esses resultados indicaram que os coquetéis enzimáticos produzidos por consórcios fúngicos foram eficientes na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, sendo que os extratos obtidos pelo cocultivo de *A. niger* SCBM1 em associação com outras espécies foram os mais eficazes na liberação de açúcares. A utilização desses coquetéis de baixo custo surge como uma alternativa promissora para sacarificações de biomassas lignocelulósicas e produção de etanol 2G.

Palavras-chave: glicose, xilose, cocultivos, conversão

8. INTRODUÇÃO

No reaproveitamento de biomassa lignocelulósica de resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis, a hidrólise enzimática é empregada na fragmentação da lignina e na despolimerização da celulose e hemiceluloses em glicose e outros monossacarídeos (CHANDEL *et al.*, 2018). As enzimas responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas destes polissacarídeos são comumente produzidas por fungos filamentosos, que secretam coquetéis enzimáticos mistos (GARCÍA-CUBERO *et al.*, 2010). Endoglucanases, exoglucanases, e β -glicosidase estão entre as principais celulasas, enquanto que β -xilosidases e xilanases se destacam entre as principais hemicelulasas ((XUE *et al.*, 2017; TERRONE *et al.*, 2018). Entre as ligninases, lacases e peroxidases, como a lignina peroxidase e a manganês peroxidase realizam o ataque à fração de lignina presente na biomassa (GOMES *et al.*, 2009).

Neste processo, estas enzimas se distribuem na suspensão lignocelulósica, sendo adsorvidas na superfície do substrato e, posteriormente catalisam a sacarificação. Devido à complexidade da estrutura lignocelulósica, a hidrólise é um passo crítico no processo de liberação de açúcares monoméricos e posterior geração de produtos de valor agregado, como o etanol de segunda geração – 2G (PICCOLO; LIDÉN; BEZZO, 2009). Dessa forma, o rendimento em monossacarídeos fermentescíveis pode ser afetado pelas propriedades do substrato, tais como: quantidade de lignina, área de superfície acessível, tamanho de partículas, cristalinidade e grau de polimerização. Algumas características das enzimas, como adsorção improdutiva antes da reação, inibição pelo produto final, inativação térmica, entre outros, também podem influenciar o processo (ZHANG; LYND, 2004, PICCOLO; LIDÉN; BEZZO, 2009). Neste sentido, é importante que a biomassa receba um pré-tratamento para torná-la mais acessível à etapa de sacarificação.

Entre os pré-tratamentos, a auto-hidrólise (processo hidrotérmico) e a deslignificação alcalina têm recebido destaque no processamento e no fracionamento de diferentes resíduos (BAËTA *et al.*, 2016b; MOOD *et al.*, 2013). Durante a auto-hidrólise, grupamentos acetila e urônicos presentes nas cadeias de hemiceluloses são hidrolisados, gerando ácidos acético e urônico, que atuarão no rompimento e na remoção da fração hemicelulósica (BAËTA *et al.*, 2016b; MEIGHAN *et al.*, 2017). Na deslignificação alcalina com hidróxido de sódio (NaOH), ocorre a clivagem da estrutura da lignina, principalmente das ligações aril-alquil-éster, expondo a fração

celulósica à ação de celulases (ZABED *et al.*, 2016). Este pré-tratamento é ambientalmente vantajoso, visto que a lignina que é removida pode ser queimada para geração de calor. Além disso, o NaOH pode ser recuperado e reutilizado em outros processos, como feito na indústria de celulose técnica (MOOD *et al.*, 2013). Os processos catalisados por enzimas são mais vantajosos em sacarificações de biomassa lignocelulósica, devido à baixa formação de inibidores e degradação de açúcares por requererem condições mais amenas de temperatura, pH e pressão atmosférica (ZABED *et al.*, 2016). Assim, a bioconversão enzimática de bagaço de cana-de-açúcar tem se destacado em relação à hidrólise ácida (DE CASSIA PEREIRA *et al.*, 2015; DU *et al.*, 2018; MORETTI *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2017). Para maximizar a hidrólise, além de um pré-tratamento químico, um consórcio otimizado de enzimas deve ser aplicado, de acordo com a composição da lignocelulose em termos de lignina, hemiceluloses e celulose (ROCHA *et al.*, 2015). Atualmente, hidrólises catalisadas por enzimas têm sido investigadas em diferentes estudos por oferecerem maior conversão ao final do processo e devido ao potencial de redução de custos a médio/longo prazo, principalmente aqueles ligados a corrosão de equipamentos (ZABED *et al.*, 2016).

Coquetéis enzimáticos brutos contendo misturas de ligninases, celulases e hemicelulases produzidos por culturas mistas de microrganismos podem favorecer a degradação mais eficiente da lignocelulose e maximizar a liberação de açúcares (FERREIRA *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2004). Neste contexto, dando continuidade ao capítulo anterior, este estudo avaliou a eficiência de 16 coquetéis enzimáticos produzidos por consórcio fúngico na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (AH) e auto-hidrólise seguida de pré-tratamento alcalino (AH-Soda). Após a sacarificação, os hidrolisados que apresentaram maior rendimento em açúcares foram selecionados para produção de etanol.

9. MATERIAL E MÉTODOS

9.1. Substrato

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram adquiridas na Usina de Açúcar e Etanol de Jatiboca (Ponte Nova, MG, Brasil), da safra de 2012/2013. Esse material foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental, da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

9.2 Pré-tratamento Hidrotérmico (AH) e Auto-hidrólise seguida de deslignificação alcalina (AH-Soda)

O pré-tratamento hidrotérmico (AH) foi realizado com 0,238 g de bagaço seco (120 g) por mL de água destilada a 178,6°C, por 44 minutos em um reator cilíndrico (tipo autoclave) com volume de 1,9 L (Parr Instrument Company, modelo 4848), com controle eletrônico de temperatura e pressão, equipado com válvula de despressurização (BAËTA *et al.*, 2016a). O reator foi aquecido até atingir a temperatura programada, que foi mantida até o final da reação. O fator severidade foi usado para corrigir o tempo de reação otimizado para reatores pequenos de 195 mL, considerando a rampa de aquecimento de temperatura ambiente (22°C) até a temperatura pré-determinada. Ao final do processo, o reator contendo a mistura reacional foi resfriado em banho de gelo e despressurizado. O resíduo sólido pré-tratado foi transferido e prensado sob 9 toneladas de pressão para extrair o licor rico em hemiceluloses e armazenado a 5°C e umidade em torno de 30-40%.

Após a auto-hidrólise, o bagaço pré-tratado (83,8 g) foi deslignificado com hidróxido de sódio (NaOH) utilizando o mesmo sistema reator descrito acima com 16% de álcali ativo (Na₂O) em massa (16% m/m), a 170°C, por 60 minutos utilizando uma razão líquido-sólido de 10 mL/g (BAËTA *et al.*, 2016a). Ao final do processo, o reator contendo o sólido pré-tratado foi resfriado em banho de gelo e despressurizado. O sólido resultante foi então desfibrado a 2800 rpm por 1 minuto e lavado com água corrente em abundância para remover toda a alcalinidade. Esse processo foi repetido três vezes. Em seguida, o sólido foi centrifugado por 30 minutos em centrífuga Arno e armazenado a 5°C e umidade entre 60-70%. Os teores de celulose foram calculados com base no conteúdo de glicose. Para hemiceluloses foram considerados as quantidades de xilana, arabinana e acetila presentes nas amostras. Para a lignina total, foram somados os valores de lignina Klason solúvel e insolúvel.

9.3. Hidrólise enzimática com coquetéis enzimáticos brutos

Todos os 16 extratos enzimáticos produzidos por FES foram utilizados nas hidrólises do bagaço de cana-de-açúcar bruto (BB) e pré-tratado por auto-hidrólise (AH) e auto-hidrólise seguida de pré-tratamento alcalino (AH Soda) (Tabela 4).

Os ensaios foram conduzidos em frascos do tipo erlenmeyer de 50 mL, em tampão citrato de sódio, 0,05 mol/L, pH 4,8, com carga enzimática de 10 FPU/g de bagaço, sendo a mistura composta de 10% de sólidos totais e volume final da reação de 10 mL (MEIGHAN *et al.*, 2017). As hidrólises foram realizadas em triplicatas sob agitação a 150 rpm e 50°C por 72 horas. Posteriormente, a fração líquida contendo os açúcares foi centrifugada a 4500 rpm (1740 G) por 15 minutos e filtrada em membrana de 0,20 µm (Chromafil® Xtra CA-20/25).

Tabela 4: Extratos enzimáticos brutos de culturas puras e consórcios produzidos por FES utilizados no presente estudo (RODRIGUES *et al.* 2020).

Nº	Espécies fúngicas
1	Ni
2	Fu
3	PI
4	Ga
5	Tr
6	Ni+Tr+PI
7	Fu+Tr+PI
8	Ni+Fu+Tr
9	Ni+Fu+PI
10	Ni+Ga+PI
11	Fu+Ga+PI
12	Ni+Fu+Ga
13	Tr+Ga+PI
14	Ni+Tr+Ga
15	Fu+Tr+Ga
16	Ni+Fu+Tr+Ga+PI

* PI: *Pleurotus ostreatus* PL06, Ni: *Aspergillus niger* SCBM01, Fu: *Aspergillus fumigatus* SCBM06, Tr: *Trametes versicolor* 561 e Ga: *Ganoderma lucidum* 601.

9.4. Hidrólise enzimática com coquetel comercial

Foram também realizadas hidrólises enzimáticas de bagaço bruto e pré-tratado por AH e AH+Soda utilizando um coquetel comercial, contendo 85% (v/v) de Cellic

Ctec2 e 15% (v/v) de Cellic Htec2 (Novozymes®), contendo 10 FPU/g de bagaço nas mesmas condições da seção anterior. Posteriormente, a fração líquida que continha os açúcares foi centrifugada a 4500 rpm (1740 g) por 15 minutos e filtrada em membrana de 0,20 µm (Chromafil® Xtra CA-20/25).

9.5. Quantificação de açúcares nos hidrolisados

As concentrações de glicose e xilose foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando um cromatógrafo Shimadzu Series 10A, equipado com coluna Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm) e um detector de Índice de Refração. Como eluente, utilizou-se 0,005 mol/L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em fluxo de 0,6 mL/min a 55°C por 25 minutos.

As conversões de biomassa em glicose e xilose foram calculadas, respectivamente, conforme as equações abaixo (MEIGHAN et al., 2017):

$$C\%_{glicose} = \left(\frac{m_{glicose} f_{hg}}{m_{amostra} \gamma_{ic}} \right) \times 100 \quad C\%_{xilose} = \left(\frac{m_{xilose} f_{hx}}{m_{amostra} \gamma_{ix}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

$m_{glicose}$ e m_{xilose} (g): massa de glicose e xilose liberadas pela hidrólise enzimática de celulose e xilana, respectivamente,

$m_{amostra}$ (g): massa de amostra utilizada no ensaio,

f_{hg} (0,9) e f_{hx} (0,880): fatores de conversão considerando que uma molécula de água foi adicionada durante a hidrólise da celobiose e xilobiose, respectivamente.

γ_{ic} e γ_{ix} (%): teores de celulose e xilana, respectivamente.

9.6. Fermentação alcóolica dos hidrolisados

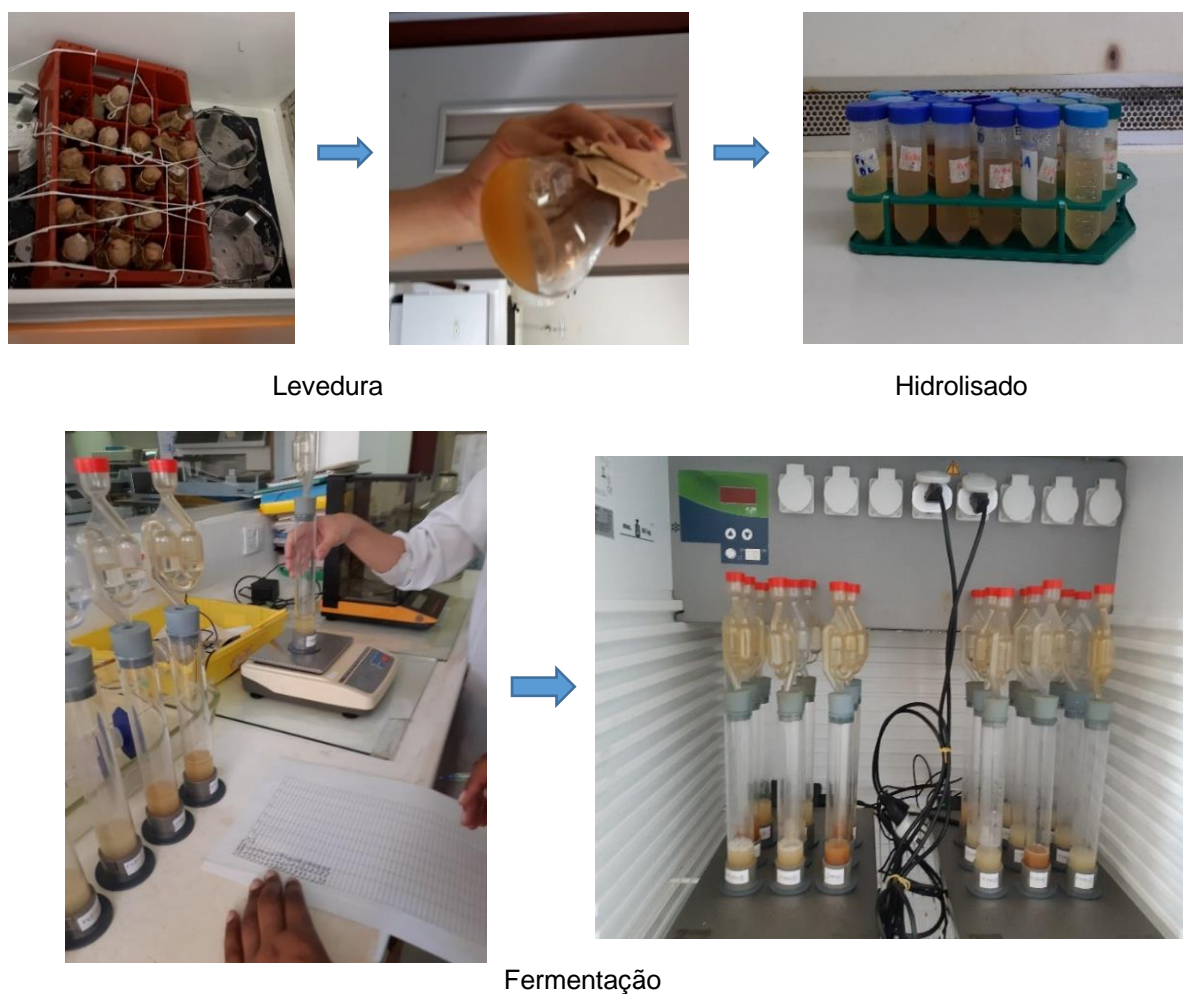
Os hidrolisados com maior rendimento em glicose na etapa anterior foram selecionados e autoclavados para fermentação alcóolica. Nas fermentações, utilizou-se a cepa *Saccharomyces cerevisiae* LBCM1042, previamente isolada de dorna de fermentação de cachaça. Esta cepa foi obtida a partir da Coleção de Leveduras do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Ouro Preto.

A linhagem LBCM1042 foi ativada em 5 mL de meio de cultura YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), composto por extrato de levedura 1% (m/v), peptona 2% (m/v) e glicose 2% (m/v) e, então incubada a 30°C, sob agitação por 24 horas. Esse

pré-inóculo foi cultivado em 30 mL de meio YPD a 30°C, a 200 rpm por 24 horas. Em seguida, calculou-se o volume a ser inoculado em cada tubo de fermentação através da medida da densidade óptica (D.O.) a 600 nm, sendo que cada frasco foi inoculado com 4×10^7 células/mL, correspondendo a DO_{600} de 4,0.

Posteriormente, as células foram centrifugadas a 3000 g (em micro-centrífuga Eppendorf 5415D) por 5 minutos e inoculadas nos tubos para a fermentação, contendo separadamente 30 mL de cada hidrolisado. Os tubos de fermentação foram incubados em duplicatas a 28°C, sem agitação, durante 48 horas (Figura 23). Os frascos foram pesados a cada 6 horas para verificar a perda de peso pela produção de CO_2 , para monitoramento da fermentação alcoólica. A composição química dos hidrolisados fermentados foi determinada por CLAE, conforme item 9.5.

Figura 23: Fermentação alcoólica de hidrolisados



Fonte: A autora

A produtividade e o rendimento em etanol dos hidrolisados fermentados foram calculados, conforme equações 2 e 3 considerando as concentrações de etanol produzido e de glicose inicial (SANTOS et al., 2015):

$$P = \frac{Etanol (g/L)}{t(h)} \quad (2)$$

Sendo:

P = Produtividade volumétrica (g/L/h);

$Etanol$ = Concentração de etanol obtida;

t = Tempo de fermentação;

$$Y = \left[\frac{[Ethanol (g/L)]}{0,511x[Glicose (g/L)]} \right] x 100 \quad (3)$$

Sendo:

Y = Rendimento de etanol %;

$Etanol$ = Concentração de etanol obtida;

$Glicose$ = Concentração de glicose inicial;

9.7. Análise estatística

As hidrólises realizadas em triplicatas foram relatadas com média e desvio padrão. As diferenças estatísticas dos dados gerados foram determinadas por ANOVA ($p < 0,05$) seguida por uma comparação de médias utilizando o teste de Scott Knott. As análises estatísticas foram executadas no programa Action 2.9, versão Sisvar 5.6.

10. RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1. Pré-tratamento hidrotérmico (AH) e por auto-hidrólise seguida de pré-tratamento alcalino (AH-Soda).

Pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas podem ser utilizados para promover a remoção parcial de lignina ou modificação de sua estrutura a fim de facilitar o acesso das enzimas hidrolíticas à fração polissacarídica (KARP *et al.*, 2013). Essa modificação não deve ocasionar a degradação dos carboidratos estruturais, mas sim torná-los mais acessíveis para a etapa seguinte de hidrólise enzimática (PERALTA *et al.*, 2017). No presente trabalho, amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foram pré-tratadas por AH para remoção de hemiceluloses. Após essa etapa, foi aplicado um pré-tratamento AH-Soda para promover a deslignificação e melhorar a digestibilidade dos resíduos celulósicos. Posteriormente, as concentrações de cada fração foram calculadas com base na massa seca e o balanço de massa foi obtido pela soma das porcentagens de celulose, hemiceluloses, lignina, extrativos e cinzas em cada amostra (Tabela 5).

Tabela 5: Composição mássica (%) de bagaço de cana-de-açúcar bruto (*in natura*), pré-tratado por auto-hidrólise (AH) e por deslignificação alcalina (AH-Soda).

Componentes mássicos (%)	<i>In natura</i>	AH	AH-Soda
Celulose	52,11 ± 0,07	59,25 ± 0,27	78,69 ± 0,33
Hemiceluloses	28,43 ± 0,58	8,74 ± 0,09	3,07 ± 0,14
Lignina	22,38 ± 0,23	29,77 ± 0,34	18,5 ± 0,33
Extrativos	2,19 ± 0,13	-	-
Teor de cinzas	0,36 ± 0,05	-	-
Balanço de massa	105,47 ± 0,23	97,76 ± 0,70	100,26 ± 0,20

Fonte: A autora

Para o bagaço *in natura*, as porcentagens de lignina, hemiceluloses e celulose observadas estão de acordo com estudos anteriores (MARYANA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2017). Após o pré-tratamento, observou-se uma redução da fração hemicelulósica de 69,26% no bagaço AH e de 89,20% no bagaço AH-Soda, em relação ao bagaço bruto. Esses resultados indicaram que o pré-tratamento hidrotérmico foi eficiente na remoção de hemiceluloses, porém, com a preservação da

celulose ao final do processo (Tabela 5). Vallejos et al. (2019) observaram que a auto-hidrólise promove uma remoção seletiva das xilanas presentes no material lignocelulósico. Segundo esses autores, o processo de auto-hidrólise ocorre sem danificar equipamentos, devido ao pH do meio não ser tão baixo, com baixa degradação da xilose e menor formação de inibidores, em razão da não utilização de ácidos inorgânicos, podendo ser, portanto, de alto valor para aplicação em biorrefinarias. Além do mais, com esse processo é possível recuperar de 55 a 84% das hemiceluloses, produzindo hidrolisados com baixa concentração de inibidores da fermentação alcoólica (GÍRIO *et al.*, 2010). Baêta et al. (2016b) relataram que durante o processo AH, as moléculas de água penetram na biomassa, promovendo uma hidratação da celulose, dissolução das hemiceluloses e leve remoção de lignina. Além disso, o pré-tratamento hidrotérmico pode aumentar a acessibilidade e susceptibilidade da celulose, permitindo maior conversão enzimática. Outro fator importante é que esse tipo de pré-tratamento leva à produção de um hidrolisado de hemiceluloses rico em pentoses que pode ser utilizado para produção de outros bioprodutos como biogás (BAÊTA *et al.*, 2016b).

Após a remoção da fração hemicelulósica, ocorreu a redistribuição das massas dos três componentes estruturais em relação ao bagaço bruto, ocasionando um aumento no percentual de lignina e celulose em 33,02 e 13,70% (m/m), respectivamente (Tabela 5). Após o pré-tratamento hidrotérmico seguido da deslignificação com NaOH (AH-Soda), houve uma remoção de 37,85% de lignina em relação ao percentual deste composto no bagaço AH (Tabela 5). Quando as proporções de celulose/lignina e celulose/hemiceluloses foram avaliadas, a eficiência dos pré-tratamentos foi mais evidente. Na primeira, a razão celulose/lignina aumentou 2 para 4,25, do pré-tratamento AH para AH-Soda. O mesmo aconteceu na razão entre celulose/hemiceluloses onde a proporção foi de 6,78 (AH) para 25,63 (AH-Soda), demonstrando que o processo de auto-hidrólise, seguido de deslignificação foi eficaz no aumento da digestibilidade do material.

O pré-tratamento hidrotérmico produz desacetilação parcial das hemiceluloses, modificação da estrutura da lignina e seu rearranjo dentro da estrutura lignocelulósica, ocasionando também uma leve remoção desse componente (MEIGHAN *et al.*, 2017; VALLEJOS *et al.*, 2019). Esse fenômeno facilita a acessibilidade enzimática à biomassa lignocelulósica, pois aumenta o tamanho dos poros nas fibras, a área superficial disponível e reduz a cristalinidade favorecendo,

assim, a sacarificação da celulose (CARVALHEIRO et al., 2016). Por outro lado, durante o pré-tratamento hidrotérmico podem ocorrer reações indesejadas de condensação da lignina em meio ácido, provocando sua repolimerização através da formação de novas ligações carbono-carbono (C-C) entre as suas unidades, como β - β , β -1 e ligações β -5, que podem levar à formação de lignina quimicamente modificada, dificultando sua posterior remoção (BITTENCOURT et al., 2019a; CARVALHO et al., 2015).

Já os pré-tratamentos alcalinos são mais indicados para a remoção de lignina (MOOD *et al.*, 2013; RABELO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2017). Assim, a aplicação de mais de uma etapa de pré-tratamento, como realizado no presente estudo, pode potencializar o fracionamento e a deslignificação da biomassa. Além da remoção de lignina, pré-tratamentos alcalinos promovem alterações na estrutura da celulose, principalmente na cristalinidade, na distribuição das regiões cristalinas e amorfa, além de uma despolimerização parcial, dependendo do substrato, da temperatura aplicada e da concentração alcalina (XU; SUN, 2016).

10.2. Hidrólise com coquetéis enzimáticos brutos

Dezesseis coquetéis enzimáticos brutos com alto sinergismo de celulasas, hemicelulasas e ligninases produzidos por monoculturas e por consórcios fúngicos (RODRIGUES et al., 2020) foram avaliados em processos de sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar bruto, pré-tratado por auto-hidrólise (AH) e por auto-hidrólise seguido de pré-tratamento alcalino (AH-Soda), no intuito de selecionar os hidrolisados contendo as maiores concentrações de açúcares fermentescíveis, para posterior utilização na fermentação alcoólica. As concentrações de glicose e xilose (g/L) e as porcentagens de conversão de celulose e hemiceluloses das amostras de bagaço *in natura*, AH e AH-Soda em seus respectivos hidrolisados são apresentadas nas Tabelas 6, 7 e 8.

Para o bagaço bruto, a análise estatística demonstrou que os hidrolisados Ni+Fu+PI (F9) e Ni (F1) foram os que apresentaram as maiores concentrações de glicose (3,39 e 3,1 g/L) e conversões de celulose (5,84 e 5,30%, respectivamente). As porcentagens de conversão não diferiram estatisticamente entre si. Para a produção de xilose, três extratos apresentaram a mesma eficiência após as hidrólises: Fu+Ga+PI (F11), Ni+Fu+Tr (F8) e Fu+Tr+Ga (F15) (Tabela 6).

Após a sacarificação enzimática de bagaço pré-tratado por AH, é possível notar que a remoção de hemiceluloses após este pré-tratamento, tornou os polissacarídeos mais acessíveis, mesmo com a redução da razão celulose/lignina (BB – 2,33 e AH – 2,0) e hemiceluloses/lignina (BB – 1,27 e AH – 0,29). Dois hidrolisados se destacaram na produção de glicose e conversão de celulose: hidrólise utilizando o extrato Ni (F1) com 10,78 g/L e 16,31% de conversão e o extrato Fu+Ga+PI (F11) com 9,76 g/L e 14,81% (Tabela 7). A hidrólise realizada com o extrato Ni+Fu+Tr (F8) foi a que obteve o maior rendimento em xilose com 5,08 g/L com 51,04% conversão (Tabela 7). Para o bagaço AH-Soda, observou-se que a maior concentração de glicose (11,92 g/L, 13,53%) foi obtida após a hidrólise com o extrato Ni+Ga+PI (F10). Este hidrolisado diferiu estatisticamente dos demais (Tabela 8). Observou-se ainda que a hidrólise realizada com o extrato F10 foi a mais influenciada pela remoção da lignina, em relação aos outros. Neste caso, após a deslignificação alcalina a concentração de glicose dobrou no hidrolisado produzido, sendo significativamente diferente do hidrolisado de bagaço pré-tratado por AH. Outros hidrolisados (com extratos F1, F6 e F11) também apresentaram bons rendimentos de glicose entre 10,32-10,60 g/L, porém, F1 e F11 não diferiram significativamente na concentração de glicose obtida nos hidrolisados produzidos com bagaço pré-tratado por AH (Tabela 8). As maiores concentrações de xilose foram obtidas após as hidrólises com os extratos Fu (F2) e Ga (F4), com 1,37 e 1,34 g/L e conversão de 41,18 e 39,71% de hemicelulose, respectivamente.

Como esperado, os resultados obtidos após as sacarificações de bagaço de cana pré-tratado por AH e AH-Soda demonstraram rendimentos em glicose superiores aos encontrados nos hidrolisados de bagaço bruto, indicando que ambos os pré-tratamentos influenciaram positivamente na eficiência das hidrólises enzimáticas e enfatizando a importância da etapa de pré-tratamento em processos de conversão de biomassa. Por outro lado, para xilose, as hidrólises de bagaço bruto apresentaram maiores concentrações deste açúcar quando comparado com as amostras de hidrolisados de bagaço pré-tratado, tanto por AH como por AH-Soda. Esta baixa concentração de xilose nestes hidrolisados de bagaço pré-tratado pode ser devido à alta remoção da fração hemicelulósica após ambos tipos de pré-tratamentos (redução de 69,26% no bagaço AH e de 89,20% no bagaço AH-Soda, em comparação ao bagaço bruto).

A partir das razões obtidas de celulose/lignina e celulose/hemiceluloses após os pré-tratamentos, observou-se que a fração celulósica se tornou mais acessível à hidrólise enzimática na amostra de bagaço pré-tratado por autohidrólise alcalina (celulose/lignina em AH de 2,00 e em AH-Soda de 4,25), conforme seção 10.1. Observou-se ainda, que um determinado extrato enzimático pode favorecer diferencialmente a despolimerização da fração celulósica. Como relatado no capítulo anterior, o extrato F10 apresentou altas atividades de celulases, principalmente FPase e β -glicosidase (Tabela 3, pag. 87), o que pode justificar o maior rendimento em glicose nesse hidrolisado. β -glicosidades são celulases que desempenham um papel fundamental na finalização do processo de despolimerização, pois são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas dos dímeros de celobiose derivados da celulose (BANSAL *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2018). Portanto, são enzimas chave na degradação da cadeia celulósica (SRIVASTAVA *et al.*, 2018; XUE *et al.*, 2017). Os hidrolisados utilizando o extrato Ni (F1) também apresentaram rendimentos superiores em glicose nas amostras de bagaço submetidas a ambos os tipos de pré-tratamentos quando comparado ao bagaço bruto (Tabelas 7 e 8), também provavelmente devido às elevadas atividades de celulases encontradas nesse extrato (FPase – 9,48, CMCCase – 82,70, avicelase 80,48, β -glucosidase – 50,36 U/g) (Tabela 3). Da mesma forma, os bons rendimentos em glicose nos hidrolisados F6 and F11 também podem ser devidos à alta produtividade de celulases, principalmente β -glicosidases presentes nesses extratos.

Pereira et al. (2016) investigaram a eficiência de um extrato enzimático bruto produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 na hidrólise de bagaço de cana, com carga enzimática de 10 FPU e 30 CBU por grama de celulose, obtendo 1,4 g/L de glicose e 0,5 g/L de xilose no hidrolisado de bagaço *in natura*. No hidrolisado de bagaço pré-tratado por ozonólise, esses valores aumentaram para 4,19 e 1,94 g/L de glicose e xilose, respectivamente, demonstrando também a importância da etapa de pré-tratamento. Em um estudo recente, Pereira Scarpa et al. (2019) utilizaram uma solução enzimática bruta produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* MCA16 na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico associado ao alcalino. Como resultado, obtiveram 6,20 g/L de glicose e 4,77 g/L de xilose, com rendimento de 7,3 e 23,5%, respectivamente. Após a otimização das variáveis tempo e temperatura, estes valores aumentaram para 7,23 g/L de glicose e 6,74 g/L de xilose. No presente estudo, após as hidrólises de bagaço de cana AH e

AH-Soda utilizando os extratos enzimáticos produzidos no capítulo anterior foram obtidos rendimentos superiores em glicose e xilose aos encontrados por esses autores, mesmo sem uma etapa de otimização de variáveis.

Cardoso et al. (2018) produziram coquetéis enzimáticos por fungos da podridão branca (*Pleurotus ostreatus* PLO06, *Pleurotus eryngii* PLE04, *Trametes versicolor* TRAM01, *Pycnosporus sanguineus* PYC02 e *Phanerochaete chrysosporium* PC) por FES utilizando palha de sorgo. Em cada coquetel, foram quantificadas as enzimas FPase, CMCase, avicelase, β -glicosidase, xilanase e lacase. Esses coquetéis foram aplicados na hidrólise de sorgo após diferentes tipos de pré-tratamentos, com carga enzimática de 8 FPU/g de substrato. Para sorgo deslignificado com NaOH, esses autores obtiveram aproximadamente 30% de conversão da biomassa em glicose após a hidrólise utilizando o coquetel produzido por *Trametes versicolor* TRAM01, 15% para o hidrolisado obtido com o extrato de *Pleurotus ostreatus* PLO06, 50% com o extrato *Phanerochaete chrysosporium*, 18% com *Pycnosporus sanguineus* PYC02 e 4% com extrato de *Pleurotus eryngii* PLE04. Algumas destas conversões foram maiores do que as registradas no presente trabalho, provavelmente em função das características da biomassa avaliada (sorgo) e do perfil dos extratos enzimáticos produzidos pelas linhagens fúngicas avaliadas.

Até o momento, a maioria dos estudos publicados sobre hidrólises de bagaço de cana-de-açúcar e outras biomassas, visando a produção do etanol celulósico e outros produtos de valor agregado tem empregado enzimas comerciais nas etapas de sacarificação (BITTENCOURT et al., 2019b; FREITAS; RUOTOLO; FARINAS, 2019; MESA et al., 2016). Estudos de hidrólise de biomassas lignocelulósicas utilizando extratos enzimáticos não-comerciais são incomuns, de forma que, é complexo estabelecer comparações com a literatura. Assim, estudos como o presente trabalho, sobre a aplicação de coquetéis enzimáticos brutos de baixo custo e com alto poder sinérgico produzidos por FES em hidrólises de biomassas lignocelulósicas são de extrema relevância. Portanto, os dados obtidos demonstram o alto potencial dos coquetéis enzimáticos avaliados e apontam novos caminhos para aplicação destes extratos em hidrólises de biomassas lignocelulósicas.

Tabela 6: Produção de glicose e xilose após hidrólises de bagaço bruto utilizando os extratos enzimáticos produzidos por FES.

Bagaço bruto					
Glicose			Xilose		
Extratos	g/L	Conversão mássica de celulose (%)	g/L	Conversão mássica de hemiceluloses (%)	
Controle	1,23 ± 0	2,06 ± 0	4,98 ± 0	19,66 ± 0	
F1	<i>Ni</i>	3,1 ± 0,23 a	5,30 ± 0,31	5,16 ± 0,15 b	20,69 ± 0,40
F2	<i>Fu</i>	1,42 ± 0 c	0,35 ± 0,01	3,43 ± 0,03 d	13,77 ± 0,06
F3	<i>PI</i>	1,08 ± 0 d	1,85 ± 0	2,89 ± 0,03 d	11,66 ± 0,11
F4	<i>Ga</i>	0,33 ± 0,1 e	0,57 ± 0,02	3,35 ± 0,05 d	13,56 ± 0,23
F5	<i>Tr</i>	0,125 ± 0	0,21 ± 0	0,20 ± 0 f	0,79 ± 0,01
F6	<i>Ni+Tr+PI</i>	ND f	-	3,72 ± 0,03 c	15,02 ± 0,14
F7	<i>Fu+Tr+PI</i>	ND f	-	4,24 ± 0,04 c	17,11 ± 0,22
F8	<i>Ni+Fu+Tr</i>	1,11 ± 0,39 d	1,71 ± 0,56	5,79 ± 1,49 a	20,88 ± 4,90
F9	<i>Ni+Fu+PI</i>	3,39 ± 0,95 a	5,84 ± 1,66	5,17 ± 0,03 b	20,88 ± 0,08
F10	<i>Ni+Ga+PI</i>	0,53 ± 0,05 e	0,85 ± 0,11	4,52 ± 0,25 b	17,31 ± 1,55
F11	<i>Fu+Ga+PI</i>	2,21 ± 0,04 b	3,78 ± 0,05	5,46 ± 0,26 a	22,01 ± 1,18
F12	<i>Ni+Fu+Ga</i>	ND f	-	0,83 ± 0,14 e	3,15 ± 0,31
F13	<i>Tr+Ga+PI</i>	ND f	-	ND f	-
F14	<i>Ni+Tr+Ga</i>	1,06 ± 0,52 d	1,76 ± 0,99	4,93 ± 0,82 b	18,92 ± 4,64
F15	<i>Fu+Tr+Ga</i>	1,59 ± 0,04 c	2,69 ± 0,03	5,93 ± 0,47 a	23,52 ± 1,64
F16	<i>Ni+Fu+PI+Tr+Ga</i>	0,65 ± 0,22 e	1,09 ± 0,36	3,70 ± 0,06 c	12,56 ± 0,04

¹ND= não detectado.

² Controle: hidrólise realizada sem extrato enzimático (somente bagaço e tampão).

³Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 0,05.

Tabela 7: Produção de glicose e xilose após hidrólises de bagaço pré-tratado por auto-hidrólise (AH), utilizando extratos enzimáticos produzidos por FES.

Bagaço AH					
Glicose			Xilose		
Extratos	g/L	Conversão mássica de celulose (%)	g/L	Conversão mássica de hemiceluloses (%)	
Controle	0,2 ± 0	0,15 ± 0	0,59 ± 0	2,95 ± 0	
F1	<i>Ni</i>	10,78 ± 1,53 a	16,31 ± 2,39	3,10 ± 0,01 d	31,11 ± 0,08
F2	<i>Fu</i>	6,99 ± 2,93 c	10,59 ± 4,47	2,35 ± 0,18 f	23,62 ± 1,75
F3	<i>Pl</i>	2,80 ± 0,17 e	4,23 ± 0,26	1,93 ± 0,02 f	25,21 ± 0,09
F4	<i>Ga</i>	2,04 ± 0,01 f	3,08 ± 0,02	1,36 ± 0,04 g	13,64 ± 0,37
F5	<i>Tr</i>	3,09 ± 0,30 e	4,66 ± 0,45	2,62 ± 0,39 f	26,26 ± 3,9
F6	<i>Ni+Tr+Pl</i>	8,47 ± 0,01 b	12,87 ± 0	2,68 ± 0,01 e	27,00 ± 0,130
F7	<i>Fu+Tr+Pl</i>	7,26 ± 0,00 c	10,99 ± 0,02	2,78 ± 0,01 e	27,86 ± 0,09
F8	<i>Ni+Fu+Tr</i>	6,62 ± 0,01 d	10,03 ± 0,02	5,08 ± 0,00 a	51,04 ± 0,04
F9	<i>Ni+Fu+Pl</i>	6,54 ± 0,00 d	9,88 ± 0,01	3,10 ± 0,02 d	31,08 ± 0,20
F10	<i>Ni+Ga+Pl</i>	5,68 ± 0,89 d	8,61 ± 1,01	3,54 ± 0,24 b	35,62 ± 2,49
F11	<i>Fu+Ga+Pl</i>	9,76 ± 0,00 a	14,81 ± 0,01	3,36 ± 0,03 c	33,85 ± 0,25
F12	<i>Ni+Fu+Ga</i>	2,8 ± 0,00 e	4,24 ± 0,00	2,50 ± 0,00 f	25,14 ± 0,03
F13	<i>Tr+Ga+Pl</i>	1,55 ± 0,03 f	2,35 ± 0,05	2,89 ± 0,62 e	29,08 ± 0,25
F14	<i>Ni+Tr+Ga</i>	3,39 ± 0,03 e	5,10 ± 0,05	3,68 ± 0,04 b	37,02 ± 0,35
F15	<i>Fu+Tr+Ga</i>	1,95 ± 0,05 f	2,95 ± 0,07	2,87 ± 0,02 e	28,85 ± 0,19
F16	<i>Ni+Fu+Pl+Tr+Ga</i>	7,84 ± 0,45 c	11,90 ± 2,00	2,97 ± 0,59 h	29,92 ± 5,94

¹Controle: hidrólise realizada sem extrato enzimático.

²Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 0,05.

Tabela 8: Produção de glicose e xilose após hidrólise de bagaço pré-tratado por auto-hidrólise alcalina (AH-Soda), utilizando extratos enzimáticos produzidos por FES.

Bagaço AH-Soda					
Glicose			Xilose		
Extratos	g/L	Conversão mássica de celulose (%)	g/L	Conversão mássica de hemiceluloses (%)	
Controle	0,15 ± 0	0,16 ± 0	0,09 ± 0	2,51 ± 0	
F1	<i>Ni</i>	10,32 ± 0,23 b	11,46 ± 0,23	0,70 ± 0,01 c	20,59 ± 0,25
F2	<i>Fu</i>	2,36 ± 0,23 f	2,69 ± 0,27	1,37 ± 0,11 a	41,18 ± 3,41
F3	<i>Pl</i>	1,93 ± 0,01 f	2,18 ± 0,01	0,81 ± 0,03 b	24,28 ± 1,02
F4	<i>Ga</i>	1,62 ± 0,03 f	1,81 ± 0,09	1,34 ± 0,02 a	39,71 ± 0,82
F5	<i>Tr</i>	2,92 ± 0,22 e	3,18 ± 0,014	0,82 ± 0,07 b	23,78 ± 1,38
F6	<i>Ni+Tr+Pl</i>	10,38 ± 1,51 b	11,78 ± 1,80	0,71 ± 0,02 c	21,16 ± 0,42
F7	<i>Fu+Tr+Pl</i>	8,60 ± 1,53 c	9,81 ± 1,71	0,63 ± 0,01 d	19,11 ± 0,25
F8	<i>Ni+Fu+Tr</i>	6,58 ± 0,92 d	7,42 ± 0,97	0,81 ± 0,00 b	24,33 ± 0,03
F9	<i>Ni+Fu+Pl</i>	5,92 ± 0,24 d	6,67 ± 0,28	0,73 ± 0,04 c	21,80 ± 1,07
F10	<i>Ni+Ga+Pl</i>	11,92 ± 0,13 a	13,53 ± 0,10	0,78 ± 0,05 b	23,61 ± 1,33
F11	<i>Fu+Ga+Pl</i>	10,60 ± 0,00 b	11,79 ± 0,04	0,47 ± 0,00 e	13,79 ± 0,01
F12	<i>Ni+Fu+Ga</i>	6,16 ± 0,08 d	7,00 ± 0,11	0,36 ± 0,00 f	10,77 ± 0,09
F13	<i>Tr+Ga+Pl</i>	3,19 ± 0,05 e	3,51 ± 0,02	0,39 ± 0,02 f	11,28 ± 0,42
F14	<i>Ni+Tr+Ga</i>	6,45 ± 0,80 d	7,25 ± 0,93	0,73 ± 0,08 c	21,76 ± 2,43
F15	<i>Fu+Tr+Ga</i>	1,98 ± 0,06 f	2,12 ± 0,05	0,23 ± 0,01 g	6,62 ± 0,20
F16	<i>Ni+Fu+Pl+Tr+Ga</i>	9,85 ± 0,43 b	10,62 ± 0,12	0,61 ± 0,04 d	17,34 ± 0,46

¹Controle: hidrólise realizada sem extrato enzimático.

²Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância de 0,05.

10.3. Hidrólise enzimática com coquetel comercial

Alguns estudos relataram a utilização de enzimas comerciais na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise, com cargas enzimáticas superiores ao que a literatura sugere como padrão (10 FPU/g de substrato) (Da Cruz *et al.*, 2012 e Zhang *et al.*, 2018). No estudo atual, utilizamos a carga enzimática padrão (10 FPU/g de substrato), tanto nas hidrólises com extratos brutos produzidos por FES (ExB) quanto com extrato comercial (ExC) (BUSSAMRA *et al.*, 2015; DE CASSIA PEREIRA *et al.*, 2015; MEIGHAN *et al.*, 2017).

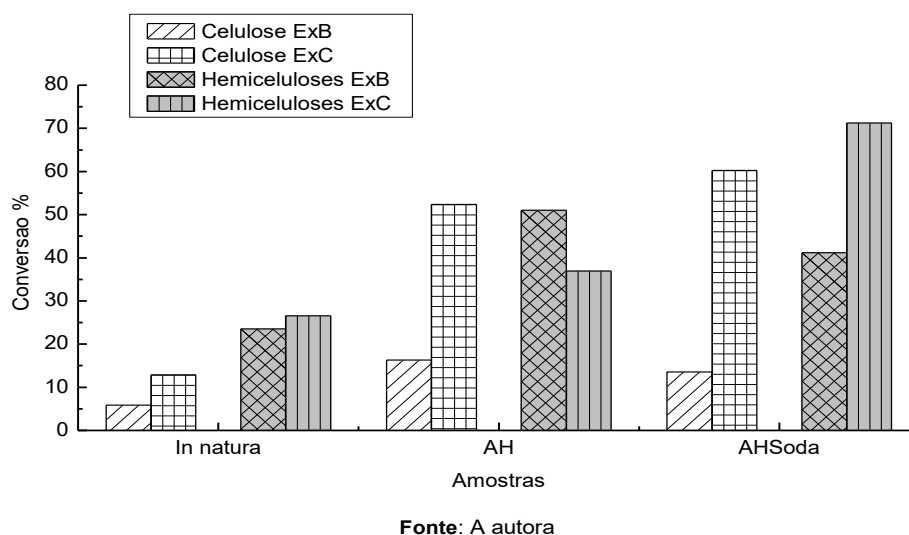
Neste trabalho, a hidrólise do bagaço pré-tratado por AH com extrato comercial resultou em 34,5 g/L de glicose e conversão de 52,38% (Tabela 9). No hidrolisado de bagaço pré-tratado por AH-Soda, esses valores aumentaram para 52,69 g/L e 60,23% de conversão. Para xilose, observou-se 3,67 g/L e 36,93% de conversão das hemiceluloses para o bagaço AH e 2,35 g/L e 71,25 % no hidrolisado de bagaço AH-Soda. Esses resultados indicaram que, para glicose, foram obtidos rendimentos superiores nas hidrólises realizadas com os coquetéis comerciais em relação aos extratos brutos produzidos por FES (Tabela 9 e Figura 24). No entanto, para xilose, a maior conversão de hemiceluloses (51,04%) foi obtida no hidrolisado de bagaço AH tratado com o extrato Ni+Fu+Tr (F8) (Figura 24).

Tabela 9: Produção de glicose e xilose após hidrólises enzimáticas de bagaço de cana-de-açúcar com coquetel comercial, na proporção de: 85% de Cellic Ctec2 e 15% de Cellic Htec2.

Amostras de bagaço	Glicose		Xilose	
	g/L	Conversão de celulose (%)	g/L	Conversão de hemicelulose (%)
<i>In natura</i>	7,47 ± 0,15	12,88 ± 0,28	6,55 ± 0,61	26,54 ± 2,52
AH	34,50 ± 0,54	52,38 ± 0,80	3,67 ± 0,04	36,93 ± 0,44
AH-Soda	52,69 ± 0,71	60,23 ± 0,77	2,35 ± 0,00	71,25 ± 0,04

Fonte: A autora

Figura 24: Conversão máxima (%) de celulose e hemiceluloses em glicose e xilose após hidrólises enzimáticas de bagaço de cana com extratos brutos (ExB) e extrato comercial (ExC). Foram utilizados os seguintes hidrolisados: bagaço *in natura*: extrato Ni+Fu+PI (F9) para celulose e Fu+Tr+Ga (F15) para hemiceluloses; bagaço AH: extrato Ni (F1) para celulose e Ni+Fu+Tr para hemiceluloses (F8); bagaço AH-Soda: extrato Ni+Ga+PI (F10) para celulose e Fu (F2) para hemiceluloses.



Era esperado com a deslignificação alcalina que o rendimento em glicose fosse maior após a hidrólise deste substrato. No entanto, a conversão aumentou apenas 15% em relação ao hidrolisado de bagaço pré-tratado por AH, apesar da relação celulose/lignina ter aumentado de 2,00 para 4,25. Da mesma forma, na seção 10.2, a maioria das concentrações de glicose obtidas após as hidrólises de bagaço AH com os coquetéis enzimáticos produzidos não diferiu estatisticamente das registradas com o substrato deslignificado (AH-Soda), indicando baixa afinidade das enzimas pela lignina residual no bagaço AH e sugerindo que não houve adsorção improdutivo das enzimas. Assim, esses resultados sugerem que a lignina repolimerizada pode ter sido o fator responsável pelos rendimentos em açúcares obtidos nas hidrólises realizadas. Segundo Pielhop et al. (2015) a repolimerização da lignina pode ocorrer durante o pré-tratamento hidrotérmico, principalmente nas unidades de guaiacil, no qual a redução da relação siringil / guaiacil da lignina da

biomassa, causa uma redução significativa na liberação de glicose em hidrólises enzimáticas após o pré-tratamento por autohidrólise.

Usualmente, coquetéis comerciais são formulações concentradas produzidas por microrganismos selecionados ou geneticamente modificados, contendo enzimas termoestáveis e mais ativas. Portanto, geralmente esses coquetéis são altamente eficientes em sacarificações de lignoceluloses. Por exemplo, o coquetel Cellic CTec2 é uma mistura de celulasas e hemicelulasas concentradas, com altos níveis de β -glicosidases e hemicelulasas, enquanto o coquetel HTec2 é composto principalmente de outras celulasas e de endoxilanasas com alta especificidade em relação à hemicelulose solúvel (Novozymes A/S, 2010). Por apresentarem estes perfis, tais coquetéis apresentam alto custo, tornando onerosa a produção de etanol 2G em larga escala. Por outro lado, extratos brutos produzidos por FES possuem uma produção simples utilizando fungos que podem ser isolados e cultivados no próprio resíduo lignocelulósico. Dependendo das características dessas biomassas (como a porcentagem de lignina, hemiceluloses e celulose), diferentes enzimas em altas concentrações podem ser sintetizadas (BANSAL *et al.*, 2012; NCUBE *et al.*, 2012; ADHYARU *et al.*, 2016).

SILVA *et al.* (2011) realizaram pré-tratamento por auto-hidrólise em diferentes condições de temperatura (185 °C/10 min; 190 °C/10 min; 195 °C/10 min) e o mesmo material foi deslignificado com soda (NaOH 1.0% (w/v); 100 °C, 1 hora). Posteriormente, as amostras de bagaço de cana pré-tratado foram hidrolisadas, utilizando um consórcio de enzimas comerciais, com carga enzimática de 15 FPU/g de substrato de Celluclast 1,5 L e 10 U/g de β -glicosidase (Novozym 188), a 45 °C por 72 horas. Com o melhor resultado para o bagaço de auto-hidrólise, obtiveram de glicose 66,8 g/L, com conversão da celulose de 69,2 %. Após a deslignificação alcalina, foram obtidos 86 g/L de glicose e 89,2 % de conversão, ambos com o bagaço pré-tratado na condição de 195 °C/10 min. No presente trabalho, na hidrólise realizada com coquetel comercial, foram obtidos valores próximos aos encontrados por estes autores (Bagaço AH - 34,50 g/L de glicose e 52,38 % de conversão; AH-Soda – 52,69 g/L e 60,23 % de conversão), porém, utilizando-se uma carga enzimática inferior (10 FPU/g de substrato) e somente um único tipo de extrato bruto.

A obtenção de um hidrolisado com elevadas quantidades de glicose, para posterior fermentação a etanol é uma tarefa que requer pesquisa e investimento. Muitas vezes se faz necessário a aplicação de altas cargas enzimáticas para se

alcançar bons rendimentos em glicose. No entanto, o elevado custo dos coquetéis comerciais limita a geração de bioprodutos de origem lignocelulósica, principalmente etanol 2G. Dessa forma, estudos para identificar microrganismos bons produtores de celulases e que possam ter sua atividade potencializada quando cultivados em consórcio pode ser uma alternativa interessante. Neste estudo, observou-se que o simples cocultivo de espécies fúngicas produtoras de celulases, hemicelulases e ligninases potencializou a produção dessas enzimas e influenciou positivamente nas hidrólises enzimáticas. No entanto, outros fatores associados à FES que podem interferir positiva ou negativamente na hidrólise tais como concentração de substratos, pH, temperatura e fontes de carbono não foram avaliados. A carga de substratos sólidos utilizada na hidrólise e o uso de surfactantes também são fatores importantes que podem influenciar diretamente no rendimento em açúcares. Desta forma, no próximo Capítulo, novos ensaios de hidrólise enzimática variando a carga de substrato (porcentagem de bagaço) e o uso de surfactantes foram realizados para avaliar os efeitos de tais parâmetros sobre o rendimento em açúcares fermentescíveis.

10.4. Fermentação alcoólica dos hidrolisados produzidos com extratos brutos

Os hidrolisados que apresentaram as maiores produções de glicose após a sacarificação enzimática de bagaço de cana pré-tratado por AH-Soda foram submetidos à fermentação alcoólica: F1 (10,32 g/L), F6 (10,38 g/L), F10 (11,92 g/L) e F11 (10,60 g/L) (Tabela 10).

Após as 68 horas de fermentação, não foi registrado a presença dos furanos – furfural e HMF nos fermentados. Dos ácidos orgânicos, apenas o ácido acético (0,382 g/L) e fórmico (0,810 g/L) foram encontrados, sendo as maiores concentrações obtidas na fermentação F10 (Tabela 10). De acordo com a literatura, os inibidores mais comuns da fermentação alcoólica são: glicerol, ácido succínico, ácido acético, álcoois, furfural e HMF (WIKANDARI et al., 2019). Esses inibidores podem ser formados a partir de pré-tratamentos tais como: métodos hidrotérmicos, ácido-base, alcalinos leves e oxidativos, porém, os métodos ácidos são os que geram as maiores concentrações destes compostos (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Dependendo das características da biomassa e da severidade do processo aplicado, esses inibidores podem exibir toxicidades variáveis (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; WIKANDARI et al., 2019). Neste estudo, as concentrações destes ácidos, que são formados a partir da degradação das hemiceluloses, foram relativamente baixas após as hidrólises

enzimáticas. Este resultado se deve, provavelmente, à alta remoção de hemiceluloses (69,26 % no bagaço AH e de 89,20 % no bagaço AH-Soda) após os pré-tratamentos realizados, contribuindo para a baixa concentração ou ausência desses compostos.

Após a fermentação alcoólica, toda a glicose foi consumida. Para etanol, a maior concentração foi obtida após a fermentação do hidrolisado F1 (3,206 g/L), seguido de F6 (3,084 g/L) (Tabela 10). A produtividade volumétrica e rendimento baseado no máximo teórico para F1 foi de 0,047 g/L*h e 60,80%, enquanto para F6, os valores foram 0,045 g/L*h e 58,15%, respectivamente (Tabela 10). Pereira Scarpa et al. (2019), realizaram um estudo sobre a utilização de um extrato enzimático bruto produzido por *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 na hidrólise de bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico/alcalino e na produção de etanol. A etapa de pré-tratamento hidrotérmico/alcalino foi realizada com carga sólida de 5,0 % m/v em solução de NaOH 0,5 mol /L, por 1 hora, a 120 °C. O hidrolisado obtido por esses autores na condição otimizada (120h, 55 °C, carga enzimática de 288,3 U/g de endoglucanase por celulose) produziu 7,23 g/L de glicose e, após a fermentação alcoólica, 10 g/L de etanol foram obtidos.

Tabela 10: Compostos produzidos e parâmetros avaliados após fermentações de hidrolisados selecionados.

Fermentações	Ác. Fórmico g/L	Ác. Acético g/L	Etanol g/L	<i>P</i> (g/L*h)	Y (%)
F1	0,488	0,113	3,206	0,047	60,80
F6	0,437	0,238	3,084	0,045	58,15
F10	0,810	0,382	2,775	0,041	45,56
F11	0,380	0,263	2,561	0,038	47,27

*Não foram registrados HMF e Furfural.; *P* é o fator de produtividade volumétrica; Y% baseado no máximo teórico

A fermentação F10 apresentou o menor rendimento em etanol (45,56 %). Era esperado que esta fermentação produzisse mais etanol, pois seu hidrolisado continha 11,92 g/L de glicose (Tabela 8). Provavelmente, esta produção inferior se deve às maiores concentrações dos inibidores fermentativos ácido fórmico e acético (0,810 e 0,382 g/L, respectivamente) nesta fermentação (Tabela 10). Baixas concentrações

deste açúcar (inferior a 3 g/L) também podem afetar negativamente a produção de etanol e levar o microrganismo fermentativo à morte (WIKANDARI et al., 2019). Considerando a concentração de glicose (entre 10,32 e 11,92 g/L) nos hidrolisados avaliados na fermentação alcoólica, provavelmente essa condição não foi um fator limitante na produção do etanol.

11. CONCLUSÕES

Os dados obtidos demonstraram que os pré-tratamentos por AH e AH-Soda foram eficientes na remoção de hemiceluloses e lignina. Para hemiceluloses, houve uma redução de 89,20% desse polissacarídeo no bagaço de cana pré-tratado por AH-Soda. Os extratos enzimáticos brutos aplicados nas hidrólises de bagaço de cana pré-tratado resultaram em bons rendimentos em açúcares fermentescíveis (glicose e xilose). Dentre os 16 extratos analisados, as hidrólises realizadas com os extratos Ni (F1), Ni+Tr+PI (F6), Fu+Ga+PI (F11) e Ni+Ga+PI (F10) apresentaram as maiores concentrações de glicose, sendo que os extratos F1 e F10 também foram os que tiveram as maiores atividades celulolíticas e hemicelulolíticas, conforme Capítulo 1. Para xilose, o hidrolisado utilizando o extrato F8 produzido pelo consórcio Ni+Fu+Tr e bagaço pré-tratado por AH foi o que obteve o melhor rendimento, apresentando conversão superior à obtida na hidrólise com as enzimas comerciais.

Os extratos produzidos por consórcios fúngicos, principalmente aqueles que continham a espécie *A. niger* SCBM1 se destacaram em relação aos demais na sacarificação de bagaço de cana pré-tratado. Estes resultados demonstraram, portanto, que, a utilização destes extratos enzimáticos brutos pode ser uma excelente alternativa em processos de sacarificação de biomassa, contribuindo para torná-lo viável economicamente. A fermentação alcóolica demonstrou o potencial dos hidrolisados selecionados para a produção de etanol.

Esses resultados preliminares são importantes, pois confirmaram que a associação de fungos Basidiomicetos e Ascomicetos, através de um método de baixo custo (FES), é uma estratégia interessante na geração de coquetéis com alto grau de sinergismo e eficientes na produção de açúcares fermentescíveis após as hidrólises. Aliado à escassez de relatos na literatura sobre a aplicação de coquetéis produzidos por FES, os resultados obtidos incentivam novas pesquisas. Dessa forma, os extratos F1, F6, F10 e F11 foram selecionados para a realização de novas sacarificações, porém, utilizando carga superior de sólidos e surfactante.

CAPÍTULO 3

Hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar com alta carga de sólidos e suplementação com surfactante utilizando coquetéis produzidos por consórcios fúngicos

RESUMO

A aplicação de altas cargas de sólidos em hidrólises enzimáticas de biomassas lignocelulósicas tem sido uma estratégia interessante na viabilização da produção de etanol 2G. Neste capítulo, o efeito do aumento da porcentagem de substratos e da adição de surfactante na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise (AH) foi avaliado através das concentrações de açúcares redutores totais (ART) e de glicose. Após as sacarificações, as concentrações de ART aumentaram com o acréscimo da porcentagem de 10 para 35% de bagaço nos hidrolisados F1 (de 11,54 para 44,84 g/L) e F6 (de 11,88 para 31,77 g/L). No aumento de 30 para 35% de bagaço, não houve diferença significativa na produção de açúcares (de 44,02 para 44,84 g/L em F1 e de 30,94 para 31,77 g/L em F6). O uso de surfactante Triton X-100 em hidrólises realizadas com 30% de bagaço contribuiu positivamente para aumentar a concentração de ART, sendo de 42,35 para 45,16 g/L em F1 e de 36,57 para 48,16 g/L em F6, indicando que o aumento da carga de sólidos foi uma estratégia adequada para potencializar a sacarificação enzimática. Com relação à liberação de glicose, a adição de surfactante não influenciou nas hidrólises, mantendo constante a concentração deste açúcar. Por outro lado, observou-se que o uso de surfactante reduziu a concentração de ácidos orgânicos nos hidrolisados, compostos que são potenciais inibidores do processo fermentativo. Na fermentação alcoólica, as conversões de glicose a etanol foram de 81,70% (F1 c/S) e 88,03% (F6 c/S), em relação ao máximo teórico. Por se tratar de um estudo preliminar, outras condições de hidrólise devem ser investigadas (amostras de bagaço submetidas a outros tipos de pré-tratamento, variação na concentração de extratos enzimáticos, temperatura, tempo, agitação, concentração e o uso de outros tipos de surfactantes) a fim de otimizar o processo de hidrólise e, conseqüentemente, aumentar a produção de açúcares fermentescíveis e de etanol.

Palavras chave: porcentagem de bagaço, Triton x-100, fermentação alcoólica.

12. INTRODUÇÃO

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais na geração de etanol de segunda geração (2G) representa uma alternativa para aumentar a produção deste biocombustível e diminuir o uso de combustíveis fósseis. Para a produção em grande escala de etanol 2G, a biomassa lignocelulósica presente em resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, deve ser processada em diferentes etapas, incluindo: pré-tratamentos físico-químicos, sacarificações enzimáticas e fermentação alcoólica (TRAVAINI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017). Dentre elas, a hidrólise enzimática constitui a etapa mais limitante, visto que é nesta fase que os açúcares fermentescíveis são produzidos. Neste sentido, bons rendimentos em monossacarídeos dependem da porcentagem de substrato utilizada, da razão de atividades distintas de celulasas, das interações das enzimas com a biomassa, da transferência de massa, da concentração de enzimas e dos produtos formados (açúcares, ácidos e inibidores do processo) durante a hidrólise enzimática (GOMES et al., 2018).

As baixas concentrações de açúcares após a hidrólise enzimática e conseqüentemente, a baixa produção de etanol após a fermentação, podem inviabilizar o processo, visto que os custos da purificação de etanol aumentam muito quando as concentrações de etanol são baixas (HERNÁNDEZ-BELTRÁN; HERNÁNDEZ-ESCOTO, 2018; ZHAO et al., 2013). Portanto, para que o processo se torne economicamente viável, são necessários hidrolisados contendo altas concentrações de açúcares fermentescíveis (PAULOVA et al., 2015).

Dentre as diversas estratégias estudadas para aumentar a eficiência hidrolítica, a utilização de altas cargas de sólidos tem sido uma alternativa interessante para a viabilizar o processo (GATT et al., 2019; HERNÁNDEZ-BELTRÁN; HERNÁNDEZ-ESCOTO, 2018; RAJ; KRISHNAN, 2019; ZHAO et al., 2013). Porém, essa estratégia apresenta algumas limitações obstáculos a serem superadas. Problemas como aumento da viscosidade do material, transferência de massa reduzida, inibição da reação enzimática devido à adsorção improdutiva na lignina residual e inibição pelo produto são questões a serem solucionadas ((LIU; CHEN, 2016). O processo de batelada alimentada pode reduzir o problema da transferência de massa, uma vez que o aumento da porcentagem de substrato é realizada à medida que ocorre a liquefação da biomassa inicial (SOTANIEMI et al., 2016). Basicamente, este processo consiste em iniciar a sacarificação com uma carga moderada de

biomassa e, após um determinado tempo, adições periódicas de substrato são realizadas até se alcançar a carga desejada (GOMES et al., 2018; RAJ; KRISHNAN, 2019). Raj e Krishnan, (2019) avaliaram o efeito do tempo de alimentação da biomassa na hidrólise e verificaram que a liberação de monossacarídeos foi maior quando a reação foi alimentada com biomassa em um curto intervalo de tempo, em um total de cinco adições de substrato em até 22 horas (para uma carga final de 40% sólidos). Esses autores justificaram que, durante a hidrólise da biomassa por um tempo prolongado, as enzimas perdem gradualmente sua atividade devido à ação da força de cisalhamento e ao efeito térmico da temperatura de reação. Raj e Krishnan, (2019) observaram ainda que, em longos intervalos de tempo, a alimentação da biomassa se beneficia da baixa viscosidade, porém, a atividade enzimática reduz devido à inativação das enzimas. Gomes et al. (2018) investigaram diferentes estratégias de batelada alimentada na hidrólise enzimática com adição de surfactante, no intuito de aumentar a concentração de sólidos e assim, promover a liberação de açúcares fermentescíveis após a sacarificação de bagaço de cana submetido a pré-tratamento ácido e alcalino. Neste estudo, um tempo de alimentação máximo de 48 horas e dividido em cinco alimentações foi determinado para uma carga de sólidos total de 27%, alcançando bons rendimentos em açúcar e etanol. De maneira geral, a literatura apresenta bons rendimentos em glicose com intervalos de tempo de alimentação variando entre 6, 12, 24, podendo chegar até 48 (GOMES et al., 2018; KIM et al., 2019; LIU et al., 2015; WANDERLEY et al., 2013). Portanto, o fator tempo de alimentação pode variar de acordo com a proposta de trabalho.

A adição de surfactantes (por exemplo Triton X-100, Tween 20 e Tween 80) também é uma boa alternativa para potencializar o processo de hidrólise, pois pode auxiliar na redução de interações negativas das enzimas com a lignina, influenciando positivamente nos rendimentos em açúcares (CHEN et al., 2018; LIU; CHEN, 2016) Diante do exposto, o presente estudo investigou os efeitos do aumento periódico da porcentagem de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise e a adição de um surfactante (Triton X-100) no processo de hidrólise enzimática no intuito de obter hidrolisados com maiores concentrações de açúcares fermentescíveis.

13. MATERIAL E MÉTODOS

13.1. Bagaço de cana-de-açúcar

Foram utilizadas amostras do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por auto-hidrólise (AH), conforme descrito nas seções 8.1 e 8.2. Esse pré-tratamento foi selecionado por empregar menos etapas de processamento da biomassa, ocasionando, portanto, menor custo ao final do processo. Além disso, este material apresentou a mesma eficiência na produção dos açúcares (glicose e xilose), após as hidrólises enzimáticas, quando comparado com o bagaço pré-tratado por auto-hidrólise seguido de deslignificação alcalina (AH-Soda).

13.2. Estratégias de hidrólise enzimática em batelada

A hidrólise enzimática com alta carga de sólidos foi realizada em batelada alimentada a 50°C e 200 rpm de agitação. A carga inicial de sólidos foi de 10% (base seca) e as outras alimentações de biomassa foram realizadas em intervalos de tempo pré-determinados até atingir 40% de substrato (Tabela 11). Esta primeira sequência de ensaios teve como objetivo avaliar qual a melhor resposta em concentração de açúcares redutores totais (ART), a partir da carga de sólidos utilizada nas hidrólises.

A carga total de enzimas nesta etapa foi de 40 FPU, correspondendo a 10 FPU/g de substrato seco, que foi adicionada no tempo de 0 horas. O tempo de hidrólise foi estabelecido em 72 horas e os ensaios foram realizados em duplicatas. Os extratos enzimáticos brutos selecionados para esta etapa foram os que apresentaram as melhores atividades de celulases e hemicelulases na seção 6.1.3: F1 – extrato de *Aspergillus niger* (Ni) e F6 - extrato produzido pelo consórcio entre *A. niger*, *T. versicolor* e *P. ostreatus* (Ni+Tr+PI), conforme Tabela 3 (página 87). Estes extratos apresentaram 13,62 (F1) e 12,44 FPU/mL (F6) de atividade de celulase de papel de filtro (FPU). Estes extratos também apresentaram boa eficiência hidrolítica, conforme Capítulo 2.

Tabela 11: Tempos de alimentação de biomassa na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar com carga de sólidos de 10 a 40%.

Ensaio	Adição de bagaço de cana (%)						
	10	5	5	5	5	5	5
A	0h	-	-	-	-	-	-
B	0h	12h	-	-	-	-	-
C	0h	12h	12h	-	-	-	-
D	0h	12h	12h	12h	-	-	-
E	0h	12h	12h	12h	12h	-	-
F	0h	12h	12h	12h	12h	12h	-
G	0h	12h	12h	12h	12h	12h	6h

Após as hidrólises, as frações líquidas contendo os açúcares foram centrifugadas a 10.000 rpm (8760 G) por 10 minutos e filtradas em membrana de 0,20 µm (Chromafil® Xtra CA-20/25). Os açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método do ácido 3,5 dinitrosalissílico - DNS (MILLER, 1959). As reações foram realizadas com 100 µL de hidrolisado e 100 µL de DNS por 10 minutos no banho-maria em ebulição. Após esse período, foram adicionados 800 µL de água destilada. Todas as dosagens foram realizadas em triplicatas. A concentração de ART (g/L) foi calculada conforme equação a seguir:

$$ART_{(g/L)} = \frac{(((ABS+0,0393)/0,0035)/0,1) \times d}{1000} \quad (4)$$

Sendo,

ABS = Absorbância do teste,

d = Diluição do hidrolisado antes da leitura,

1000 = Fator de conversão de µg/ mL para g/L,

0,1 = Volume de amostra do hidrolisado (mL),

0,0393 = Coeficiente linear da reta (*a*),

0,0035 = Coeficiente angular da reta (*b*).

a e **b** foram determinados a partir de uma curva padrão utilizando glicose, como açúcar redutor de referência.

Após a seleção das melhores condições de hidrólises para cada extrato enzimático (F1 e F6), novas hidrólises foram realizadas nas mesmas condições,

porém, com a adição do surfactante Triton X-100, com um teor de 5% por peso seco de bagaço, em um volume final de 50 mL. As hidrólises foram realizadas com carga de sólidos inicial (0h) de 20% e carga enzimática total de 150 FPU (correspondendo a 10 FPU/g de bagaço) em um volume final de 50 mL. A cada 12 horas, foram adicionados 5% de bagaço de cana até atingir o total de 30%. Após as hidrólises, as concentrações de ART foram novamente determinadas pelo método do DNS (MILLER, 1959).

13.3. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica dos hidrolisados foi realizada utilizando a cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae* Y-904, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Líbia Santos Diniz, do Laboratório de Química de Alimentos, da Universidade Federal de Uberlândia (LAQUI -UFU). O processo de fermentação foi realizado conforme descrito na seção 9.6, porém, por 48h.

13.4. Métodos analíticos

Açúcares, etanol, ácidos orgânicos, HMF e Furfural foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As amostras foram diluídas com a fase móvel (solução aquosa 0,1% ácido fosfórico – H_3PO_4), filtradas em membrana de 0,20 μm (Chromafil® Xtra CA-20/25) e injetadas no sistema cromatográfico (Shimadzu™ model LC-20A Prominence), utilizando coluna Supelcogel™ C-610H, equipada com detectores ultravioleta e de refração. O detector UV foi utilizado para detectar os ácidos orgânicos no comprimento de onda de 210 nm e o índice de refração para detectar HMF, Furfural, açúcares e etanol. As análises foram realizadas empregando H_3PO_4 0,1% (v/v) como fase móvel, com taxa de fluxo da bomba a 0,5 mL.min⁻¹ e temperatura a 32°C equipado com um detector de índice de refração (MOREIRA et al., 2017).

13.5. Análise estatística

As hidrólises enzimáticas realizadas em triplicatas foram relatadas com média e desvio padrão. As diferenças estatísticas dos dados gerados foram determinadas pelo Teste Kruskal-Wallis (com nível de significância de 5%), executado no sistema estatístico Action 2.9.

14. RESULTADOS E DISCUSSÃO

14.1 Influência da alta carga de sólidos na hidrólise enzimática

Um das principais vantagens em aplicar altas cargas de sólidos em hidrólises enzimáticas é a ativação na liberação de açúcares (MODENBACH; NOKES, 2013). Neste estudo, o efeito da adição de 10 a 40% de bagaço pré-tratado na sacarificação enzimática foi avaliado para a produção de açúcares redutores totais. Nos hidrolisados F1, observou-se que a concentração de ART dobrou de 15,54 para 31,56 g/L com o aumento da porcentagem de bagaço de 10 para 15% nas hidrólises (Figura 25). Nas hidrólises utilizando o extrato F6, houve um aumento de ART de aproximadamente 45% nestas condições (Figura 26). Conforme a porcentagem de substrato foi sendo elevada, observou-se que a concentração de ART também aumentou progressivamente, até atingir respectivamente 44,84 e 31,77 g/L nos hidrolisados F1 e F6 contendo 35% de bagaço (Figuras 25 e 26). No incremento de 30 para 35% de sólidos, não houve diferença significativa na produção de açúcares, no entanto, com 40% de bagaço, a concentração de ART diminuiu no hidrolisado F1, indicando a saturação do material com o substrato (Figuras 25). A redução na concentração de ART na hidrólise com 40% de sólidos pode estar relacionada ao aumento da viscosidade e à baixa disponibilidade de água livre, inviabilizando a continuidade do processo hidrolítico (MODENBACH; NOKES, 2013). Esta diminuição na produção de açúcares pode ainda estar associada à inibição das enzimas do extrato bruto pelo processo de *feedback negativo*, isto é, inibição pelo produto final (c). Nos hidrolisados F6, observou-se que as concentrações de ART se mantiveram constantes entre as porcentagens de 30 a 40% de bagaço (Figura 26), sugerindo uma curva hiperbólica de saturação enzimática pelo substrato, conforme modelo de Michaelis-Menten (DAVID L. NELSON, 2019).

Figura 25: Efeito do aumento da carga de sólidos (10 a 40%) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar utilizando o extrato enzimático F1 (ART em g/L). Porcentagem de bagaço adicionado em cada ensaio: A – 10%; B – 15%; C – 20%; D – 25%; E – 30%; F – 35%; G – 40%.

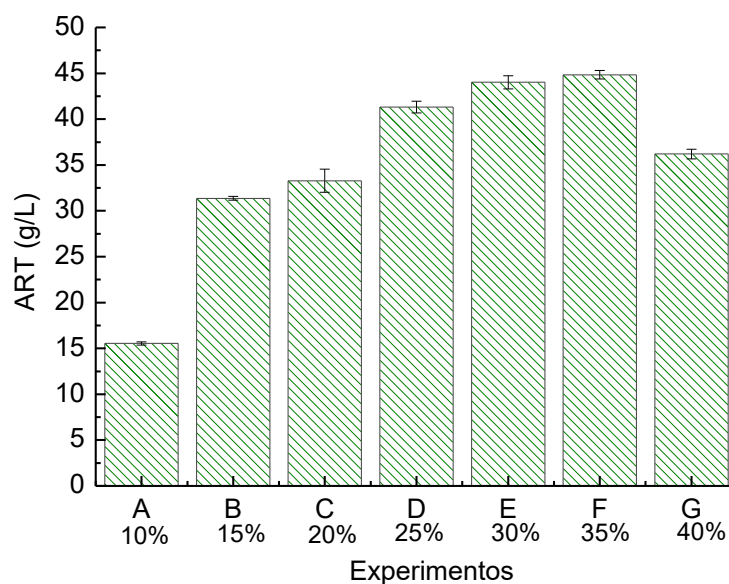
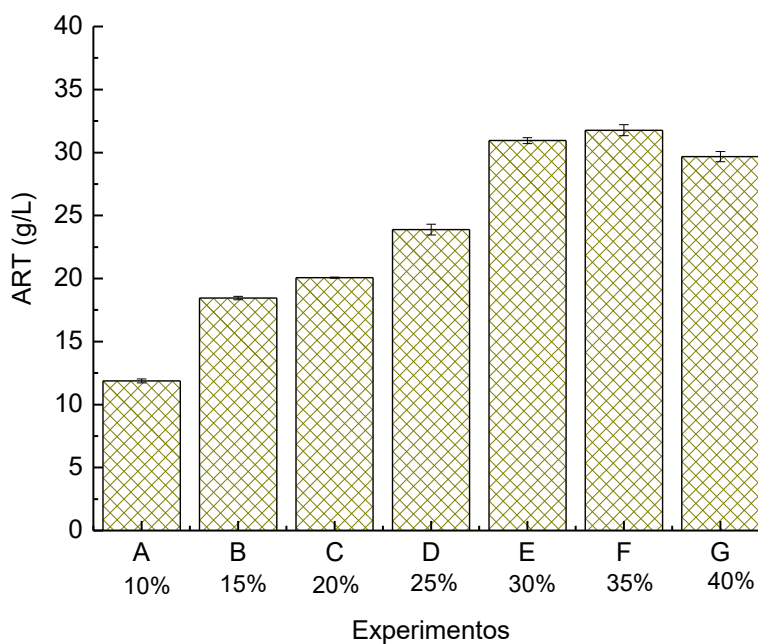


Figura 26: Efeito do aumento da carga de sólidos (10 a 40%) na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar utilizando o extrato enzimático F6 (ART em g/L). Porcentagem de bagaço adicionado em cada ensaio: A – 10%; B – 15%; C – 20%; D – 25%; E – 30%; F – 35%; G – 40%.



Estudos anteriores demonstraram que, para se obter um hidrolisado com altas concentrações de açúcares redutores, a hidrólise enzimática deve ser realizada com uma quantidade de biomassa superior a 15% (HERNÁNDEZ-BELTRÁN; HERNÁNDEZ-ESCOTO, 2018; LIU et al., 2015; ZHAO et al., 2013). Modenbach and Nokes (2013) afirmaram que um processo é considerado com alto teor de sólidos se a proporção de sólidos/líquidos for tal que pouca água esteja livre no meio. Contudo, a ausência de água livre pode ser também um dos grandes obstáculos em processos de sacarificação, quando cargas de substrato acima de 15% são aplicadas, devido à resistência do material à agitação, ocasionando a limitação da transferência de massa e calor e, conseqüentemente, menor eficiência hidrolítica (RAJ; KRISHNAN, 2019). Além de deixar o meio mais solúvel para auxiliar na transferência de massa e reduzir a viscosidade da pasta, a água é essencial no processo de hidrólise, visto que as enzimas dependem dela para catalisar o rompimento das ligações glicosídicas presentes nos polissacarídeos (KRISTENSEN; FELBY; JØRGENSEN, 2009). Neste sentido, alguns estudos têm descrito que o aumento na carga de sólidos em intervalos de tempo maiores pode minimizar esse problema e favorecer a liquefação da biomassa (GOMES et al., 2018; HERNÁNDEZ-BELTRÁN; HERNÁNDEZ-ESCOTO, 2018; LIU et al., 2015). No presente trabalho, estabeleceu-se um intervalo de tempo de apenas 6 horas entre as recargas de bagaço de 35 para 40%; tempo que pode ter sido insuficiente para a liquefação da biomassa.

Quando altas cargas de sólidos são aplicadas em processos de hidrólise, a velocidade de agitação do processo, o tipo de pré-tratamento previamente aplicado à biomassa e a concentração de enzimas adicionadas representam fatores que podem influenciar diretamente na eficiência hidrolítica (GATT et al., 2019; ZAIN et al., 2018). No presente trabalho, foram utilizados apenas 10 FPU de carga enzimática por grama de substrato. Esta proporção de 10 FPU/g é comumente aplicada em hidrólises realizadas com coquetéis enzimáticos comerciais, apresentando alta eficiência na liberação de açúcares. Zhao et al. (2013) investigaram a hidrólise de bagaço de cana com 20% de carga de sólidos, aplicando 10FPU/g de um coquetel comercial de celulasas da Novozymes por 144 horas e alcançaram 80% de conversão de celulose em glicose. Em outro estudo, Liu et al. (2015) utilizou 36% de bagaço de cana-de-açúcar e 8,5 FPU/g de Cellic CTec2 na sacarificação enzimática e obtiveram uma conversão de 59,8% de conversão. Coquetéis comerciais são preparações altamente concentradas de enzimas selecionadas, que apresentam maior resistência a

diferentes fatores (tempo, temperatura, pH, inibidores etc.) que podem influenciar o processo. No presente estudo, como foi aplicada uma solução enzimática bruta produzida por fermentação em estado sólido, sem processos de concentração, purificação e caracterização, é possível que a concentração de enzimas estipulada não tenha sido suficiente para as porcentagens de sólidos adicionadas. Assim, uma alternativa seria aplicar uma carga enzimática maior para os coquetéis brutos e aumentá-la conforme a relação sólido/líquido fosse crescendo, para favorecer a conversão em açúcares. Outros fatores que poderiam ser testados seriam: alterar a temperatura, o tempo e a agitação do processo hidrolítico.

Para comparar os resultados do presente estudo com a literatura científica, realizou-se a busca por estudos anteriores que investigaram o efeito da adição de diferentes cargas de sólido na hidrólise enzimática, utilizando extratos brutos produzidos por FES. No entanto, até o momento, foram encontrados somente trabalhos utilizando coquetéis enzimáticos comerciais nas hidrólises (GATT et al., 2019; GOMES et al., 2018; HERNÁNDEZ-BELTRÁN; HERNÁNDEZ-ESCOTO, 2018; KIM et al., 2019; LIU et al., 2015; RAJ; KRISHNAN, 2019). Diante do exposto, considerando a concentração de ART, a condição com 30% de carga de sólidos foi selecionada para novos ensaios, porém, com a suplementação de surfactante Triton X-100.

14.2. Efeito da adição de surfactante na hidrólise enzimática e na fermentação alcoólica

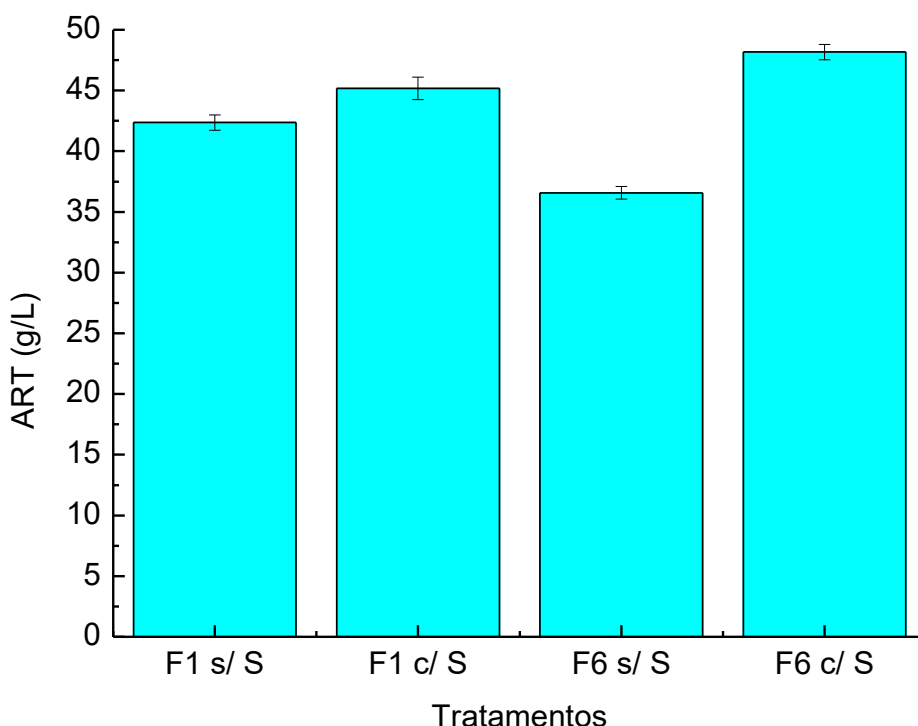
Surfactantes podem ser aplicados no meio reacional para auxiliar na redução da viscosidade e evitar a adsorção improdutiva de celulasas pela lignina, melhorando assim a estabilidade e atividade das enzimas (LI et al., 2016). A partir dos resultados obtidos na seção 14.1, novas hidrólises foram realizadas com carga de sólidos inicial de 20%, sendo que a cada 12 horas foram adicionados 5% de bagaço até atingir o total de 30%. Hidrólises controle (sem a adição de surfactante) foram realizadas para comparação.

Após as hidrólises, observou-se que o uso de surfactante aumentou a concentração de ART tanto no hidrolisado F1 como em F6, quando comparado aos controles (Figura 27). O aumento mais expressivo em ART (48,16 g/L) foi observado no hidrolisado F6 c/S (consórcio Ni-Tr-PI), enquanto o controle F6 s/S produziu 36,57

g/L, indicando que a presença do surfactante melhorou a eficiência hidrolítica (Figura 27).

Apesar dos bons resultados obtidos em ART pelo método do DNS, é importante ressaltar que este método quantifica além de monossacarídeos redutores, oligossacarídeos contendo pontas redutoras derivadas tanto de celulose como de hemiceluloses (GATT et al., 2019) Assim, é importante quantificar a concentração específica de glicose e xilose produzidas após a hidrólise.

Figura 27: Açúcares Redutores Totais (g/L) produzidos após hidrólises utilizando os extratos enzimáticos F1 e F6 e 30% de bagaço de cana-de-açúcar, com suplementação de Triton X-100. s/S: sem surfactante e c/S: com surfactante.



Após a análise cromatográfica, verificou-se que a concentração de glicose nos hidrolisados F1 se manteve constante tanto no controle quanto na presença do surfactante (Tabela 12). Na hidrólise utilizando o extrato F6, observou-se um pequeno aumento na produção de glicose após a adição do surfactante, com $p < 0,05$. Para xilose, a adição de surfactante na hidrólise não influenciou na produção desse açúcar (Tabela 12). As porcentagens máximas de glicose e xilose total obtidas por grama de celulose e hemiceluloses foram de 2,25 % e 37,94 %, respectivamente (Tabela 12). Esses resultados sugerem que a adição do surfactante Triton X-100 não influenciou

na produção de açúcar fermentescíveis, conforme se esperava. Por outro lado, além de açúcares, alguns ácidos orgânicos que costumam ser produzidos em processos de hidrólise, tais como ácidos acético e fórmico, foram produzidos em menor concentração nos hidrolisados que continham surfactante. Na condição F1c/S houve uma redução de 60% na concentração de ácido fórmico e de 44,82% na concentração de ácido acético em relação ao controle sem surfactante (Tabela 12). Segundo Wikandari et al. (2019), os efeitos inibitórios dos ácidos carboxílicos estão relacionados com o acúmulo de seus ânions intracelulares. As moléculas de ácido podem se dissociar nas células dos microrganismos, uma vez que o pH intracelular (7) é maior que o do meio (pH de 4,5 a 5,5 para as leveduras), resultando na redução do pH citosólico. Assim, as células tentam bombear os prótons através da membrana celular com gasto de energia na forma de ATP. Portanto, grandes quantidades de ácidos apresentam efeitos negativos na produção de etanol, enquanto que a baixa concentração de ácidos pode melhorar a sua produção (WIKANDARI et al., 2019). O ácido acético é um produto de degradação tipicamente encontrado em hidrolisados, formado pela hidrólise do grupo acetil presente nas hemiceluloses. A sua presença no meio fermentativo ocasiona um aumento no consumo de ATP pela levedura. Assim, parte do ATP que seria utilizado para o crescimento da levedura é desviado para manutenção de seu pH interno (BARAL; SHAH, 2014). Logo, a presença de altas concentrações de ácido acético é indesejável para uma boa eficiência fermentativa. Assim, os dados obtidos sugerem que a presença de surfactante auxiliou na redução destes inibidores da fermentação alcoólica, indicando baixa influência dos efeitos tóxicos destes compostos às leveduras, tais como a redução do crescimento e a inibição da fermentação (RODRIGUES, 2017).

Após a fermentação alcoólica, a produção máxima de etanol para F1 c/S foi de 1,67 g/L, com produtividade de 0,035 g/L por hora e rendimento de 81,70% em relação ao máximo teórico (Tabela 13). Para F6 c/S, a produção foi de 1,66 g/L, produtividade também de 0,035 g/L/h e rendimento de 88,03%. GOMES et al. (2018) investigaram diferentes estratégias de batelada alimentada na hidrólise com alta carga de sólidos, com o objetivo de melhorar a concentração de açúcares na sacarificação de bagaço de cana submetido a pré-tratamento ácido e alcalino. As melhores condições de hidrólise foram: 27% de sólidos, 300 rpm, 26 FPU/g de Cellic Ctec, 144 horas e 5% de surfactante polietilenoglicol 4000 por peso seco de substrato, com rendimento de 150 g/L de glicose. Com uma estratégia simultânea de sacarificação e fermentação,

estes autores obtiveram 62 g/L de etanol após 48 horas e produtividade de 6,6 g/L/h. No trabalho atual, condições mais brandas foram aplicadas (72 horas, 200 rpm e 10 FPU/g de extrato enzimático bruto) para hidrolisar 30% de bagaço, justificando a menor produção de glicose nos hidrolisados e, conseqüentemente, a menor produção de etanol, mesmo com a adição de surfactante. Assim como GOMES et al. (2018), outros estudos também aplicaram valores superiores para pelo menos uma dessas condições (tempo, agitação, carga enzimática), além de todos terem utilizado coquetéis comerciais (GATT et al., 2019; KIM et al., 2019; LIU et al., 2015; LIU; CHEN, 2016), indicando que as condições suaves desses parâmetros aplicados no presente estudo podem ter subestimado o potencial dos extratos avaliados. Segundo Modenbach e Nokes (2013), a hidrólise enzimática operada com alto teor de sólidos é uma estratégia importante para viabilizar o processo de conversão de biomassa lignocelulósica. Esse processo é considerado vantajoso principalmente para auxiliar na liberação de maiores concentrações de açúcares, o que teoricamente, levaria a rendimentos superiores de etanol, reduzindo assim o custo da produção (HUMBIRD et al., 2010). No entanto, outros fatores tais como o tipo de pré-tratamento, a fonte de enzimas, a variedade de enzimas, a carga enzimática, tipos de reatores, temperatura, tempo, agitação, entre outros, devem ser considerados e otimizados para que seja obtida uma boa conversão da biomassa. Portanto, os dados preliminares apresentados no presente estudo sugerem que novas hidrólises em outras condições devem ser investigadas a fim de potencializar a ação dos coquetéis enzimáticos brutos produzidos. Assim, o aumento da concentração de extratos enzimáticos, o emprego de outros tipos de surfactantes, ou ainda alterações na porcentagem dos mesmos, o tempo, a temperatura e a agitação do processo são fatores que também devem ser investigados em estudos futuros, a fim de melhorar a conversão da biomassa lignocelulósica contida no bagaço de cana-de-açúcar em monossacarídeos e, conseqüentemente, em etanol.

Tabela 12: Parâmetros avaliados nos hidrolisados de 30% de bagaço de cana-de-açúcar utilizando os extratos enzimáticos F1 e F6, com suplementação de Triton x-100. s/S: sem surfactante e c/S: com surfactante.

Hidrolisados	Glicose g/L	Celobiose g/L	Xilose g/L	Glicose total (%) por grama de celulose	Xilose total (%) por grama de hemiceluloses	Ac. Fórmico g/L	Ac. Isobutírico g/L	Ac. Acético g/L
F1 _{s/S}	4,00	0,66	9,95	2,25	37,94 ± 0,00	0,90 ± 0,00	0,93 ± 0,00	0,87 ± 0,00
F1 _{c/S}	4,00	0,44	7,98	2,24	30,45 ± 0,18	0,36 ± 0,00	0,78 ± 0,02	0,48 ± 0,01
F6 _{s/S}	3,45	0,79	9,67	1,94	36,89 ± 0,00	0,58 ± 0,00	0,95 ± 0,00	0,70 ± 0,00
F6 _{c/S}	3,69	0,92	8,89	2,07	33,90 ± 0,32	0,41 ± 0,04	0,88 ± 0,05	0,56 ± 0,04

*Não foram registrados HMF e Furfural.

Tabela 13: Parâmetros avaliados na fermentação alcoólica de hidrolisados com e sem adição de surfactante.

Fermentações	Ac. Fórmico g/L	Ac. Acético g/L	Xilose g/L	Etanol g/L	P g/L*h	Y%
F1 _{s/S}	0,50 ± 0,09	0,58 ± 0,01	5,93 ± 0,03	1,31 ± 0,00	0,027	64,09
F1 _{c/S}	0,37 ± 0,05	0,51 ± 0,04	6,52 ± 0,65	1,67 ± 0,15	0,035	81,70
F6 _{s/S}	0,47 ± 0,09	0,51 ± 0,05	6,13 ± 0,07	1,32 ± 0,02	0,028	74,87
F6 _{c/S}	0,35 ± 0,01	0,46 ± 0,01	6,92 ± 0,29	1,66 ± 0,18	0,035	88,03

*Não foram registrados HMF e Furfural.; Y% baseado no máximo teórico

15. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a hidrólise enzimática realizada com alta carga de sólidos aumentou a concentração de açúcares redutores totais (ART) de 15,54 (carga inicial de 10% de bagaço pré-tratado) para 44,84 g/L (carga final de 35% de substrato) no hidrolisado F1 e de 11,38 para 31,77 g/L para o hidrolisado F6, nas mesmas condições.

Com relação à liberação de glicose, um pequeno aumento na concentração deste açúcar com a adição do surfactante foi observado apenas no hidrolisado F6. Na fermentação alcoólica, o maior rendimento em etanol, baseado no máximo teórico foi de 88,030% para a condição F6_{c/s}. Os dados preliminares demonstraram a complexidade de hidrólises enzimáticas devido ao grande número de fatores que influenciam este processo e que devem ser considerados a fim de otimizar o rendimento em açúcares fermentescíveis. Novas condições operacionais devem ser avaliadas em estudos futuros a fim de potencializar a taxa de conversão de biomassa em glicose e assim, aumentar a produção de etanol 2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

16. CONCLUSÕES GERAIS

- O cultivo de linhagens de Basidiomicetos e Ascomicetos em consórcio foi extremamente relevante para a produção de coquetéis enzimáticos brutos com alto sinergismo de celulasas, hemicelulasas e ligninases.
- A Análise de Componente Principal (ACP) mostrou-se ser uma ferramenta satisfatória na análise das melhores condições de consórcios para a produção de enzimas e na seleção das combinações microbianas mais eficientes.
- Os pré-tratamentos hidrotérmico (AH) e por auto-hidrólise seguida de deslignificação alcalina (AH-Soda) de bagaço de cana-de-açúcar promoveram alta remoção de hemiceluloses (69,26% - AH e 89,20% - AH-Soda). A lignina foi parcialmente removida (37,85 %) após o processo AH-Soda, favorecendo a exposição da fração celulósica à hidrólise enzimática.
- Hidrólises que utilizaram extratos enzimáticos produzidos em consórcio, nos quais uma das espécies era *A. niger* SCBM1 foram as que apresentaram as maiores concentrações de glicose, com destaque para os hidrolisados Ni (F1), Ni+Tr+PI (F6), Fu+Ga+PI (F11) e Ni+Ga+PI (F10), sendo que F1 e F10 também foram os extratos que apresentaram as maiores atividades celulolíticas e hemicelulolíticas.
- O aumento nas porcentagens de bagaço pré-tratado AH na sacarificação enzimática favoreceu a produção de Açúcares Redutores Totais nos hidrolisados, triplicando a concentração de ART quando a porcentagem de substrato aumentou de 10 para 35%.
- O aumento na carga de sólidos e o uso de surfactante Triton X-100 não influenciou na liberação de glicose e xilose nos hidrolisados produzidos. Esta condição precisa ser reavaliada em um estudo futuro afim de investigar a influência de algum fator externo no rendimento em glicose.

PERSPECTIVAS DE PESQUISAS FUTURAS

O presente trabalho apresentou boas conversões em glicose após hidrólises utilizando extratos enzimáticos brutos produzidos por fermentação em estado sólido. Os resultados obtidos encorajam a continuação da pesquisa através de estudos adicionais de otimização de hidrólises. Alguns fatores, tais como tempo, temperatura, carga de enzima, tipos e concentrações de surfactantes, agitação, além de outras condições de pré-tratamento da biomassa, devem ser analisados a fim melhorar a eficiência do processo hidrolítico e contribuir para a melhoria nos processos de produção de etanol 2G.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011. doi.org/10.1590/S0100-40422011001000006

AITKEN, M. D.; IRVINE, R. L. Characterization of reactions catalyzed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 276, n. 2, p. 405–414, 1990. doi.org/10.1016/0003-9861(90)90739-L

ALQUS, R.; EICHHORN, S. J.; BRYCE, R. A. Molecular dynamics of cellulose amphiphilicity at the graphene-water interface. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 6, p. 1771–1783, 2015. doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00307

ANDI ALIYAH, GANDHI ALAMSYAH, RIZKY RAMADHANI, H. H. Production of α -Amylase and β -Glucosidase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob. **Energy Procedia**, v. 136, p. 418–423, 2017. doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.269

ANG NAM, T.; SEAK MAY CHUA, A.; CHENG NGOH, G. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production Fungal solid-state fermentation and various methods of. **Biomass and Bioenergy**, v. 7, n. August, p. 319–338, 2014. doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013

BAËTA, B. E. L. et al. Evaluation of hydrogen and methane production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysates by two-stage anaerobic digestion process. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 436–446, 2016a. doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.113

BAËTA, B. E. L. et al. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept.

Bioresource Technology, v. 200, p. 137–146, 2016b.

doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.003

BANSAL, N. et al. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste**

Management, v. 32, n. 7, p. 1341–1346, 2012. DOI:

10.1016/j.wasman.2012.03.006

BANSAL, N. et al. Highly thermostable and pH-stable cellulases from

Aspergillus niger NS-2: Properties and application for cellulose hydrolysis.

Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 172, n. 1, p. 141–156, 2014.

DOI: 10.1007/s12010-013-0511-9

BANZANELLA ET AL. Ligninolytic Enzymes from White-rot Fungi and

Application in the Removal of Synthetic Dyes. In: Eds ed. [s.l.] 2016, 2013. p.

258–279. DOI: 10.1201/b15247-11

BENTO, I. et al. Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases.

Structural and modelling studies focusing on proton transfer. **BMC Structural**

Biology, v. 10, p. 1–14, 2010. DOI: 10.1186/1472-6807-10-28

BERMEK, H.; LI, K.; ERIKSSON, K. E. L. Studies on mediators of manganese peroxidase for bleaching of wood pulps. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 3,

p. 249–252, 2002. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00132-3

BINOD, P. et al. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, p. #pagerange#,

2018. doi.org/10.1016/j.biteb.2018.06.005

BITTENCOURT, G. A. et al. Fractionation of sugarcane bagasse using

hydrothermal and advanced oxidative pretreatments for bioethanol and biogas

production in lignocellulose biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 292, n.

August, p. 121963, 2019a. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121963

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 120–128, 2010. doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.015

BRUMMER, V. et al. Suitable Technological Conditions for Enzymatic Hydrolysis of Waste Paper by Novozymes® Enzymes NS50013 and NS50010. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 4, p. 1299–1308, 2014. DOI: 10.1007/s12010-014-1119-4

BUNTERNGSOOK, B. et al. Development of tailor-made synergistic cellulolytic enzyme system for saccharification of steam exploded sugarcane bagasse. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 4, p. 390–396, 2018. doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.11.001

BUSSAMRA ET AL. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, 2015. doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.117

CABRAL, M. R. et al. Evaluation of pre-treatment efficiency on sugarcane bagasse fibers for the production of cement composites. **Archives of Civil and Mechanical Engineering**, v. 18, n. 4, p. 1092–1102, 2018. DOI: 10.1016/j.acme.2018.02.012

CARVALHEIRO, F. et al. Hydrothermal/Liquid Hot Water Pretreatment (Autohydrolysis): A Multipurpose Process for Biomass Upgrading. In: **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. [s.l: s.n.]. p. 315–347. doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00014-1

CARVALHO, D. M. DE et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118–126, 2015. doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.021

CHANDEL, A. K. et al. Sugarcane bagasse and leaves: Foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11–20, 2012.]. doi.org/10.1002/jctb.2742

CHANDEL, A. K. et al. Bioconversion of Hemicellulose Into Ethanol and Value-Added Products. In: **Advances in Sugarcane Biorefinery**. [s.l: s.n.]. p. 97–134. doi.org/10.1016/B978-0-12-804534-3.00005-7

CHANDRA, R.; TAKEUCHI, H.; HASEGAWA, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: A review in context to second generation of biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 3, p. 1462–1476, 2012. doi.org/10.1016/j.rser.2011.11.035

CHEN, Y. A. et al. Evaluation of the action of Tween 20 non-ionic surfactant during enzymatic hydrolysis of lignocellulose: Pretreatment, hydrolysis conditions and lignin structure. **Bioresource Technology**, v. 269, p. 329–338, 2018. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.08.119

CHUNG, H.; WASHBURN, N. R. Extraction and Types of Lignin. **Lignin in Polymer Composites**, p. 13–25, 2015. DOI: 10.1016/B978-0-323-35565-0.00002-3

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, 2005. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.06.005

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB.
Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar. [s.l: s.n.], 2019.

COPETE-PERTUZ, L. S. et al. Enhancement of ligninolytic enzymes production and decolourising activity in *Leptosphaerulina* sp. by co-cultivation with *Trichoderma viride* and *Aspergillus terreus*. **Science of the Total Environment**, v. 646, p. 1536–1545, 2019. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.387

DA CUNHA, M. C. et al. Using response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. May, p. 31–36, 2018. doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.018

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578–595, 2009. DOI: 10.7150/ijbs.5.578

DAVID L. NELSON, M. M. C. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7. ed. [s.l.] Artmed, 2019.

DE CASSIA PEREIRA, J. et al. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 928–939, 2015. DOI: 10.1111/jam.12757

DE OLIVEIRA RODRIGUES, P. et al. Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-)cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. March, p. 173–181, 2017a. doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.031

DE OLIVEIRA RODRIGUES, P. et al. Xylanase and β -glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 453–459, 2017b. doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.055

DE OLIVEIRA RODRIGUES, P. et al. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2683–2693, 2020. doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041

DEUTSCHMANN, R.; DEKKER, R. F. H. From plant biomass to bio-based

chemicals: Latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1627–1640, 2012. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.001

DIAS, L. M. et al. Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 708–718, 2018. DOI: 10.1111/jam.13672

DIAS, M. O. S. et al. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? **Bioresource Technology**, v. 102, n. 19, p. 8964–8971, 2011. doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.098

DOS SANTOS, B. S. L. et al. Thermotolerant and mesophylic fungi from sugarcane bagasse and their prospection for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 903–910, 2015. doi.org/10.1590/S1517-838246320140393

DOS SANTOS, B. V. et al. Use of an (Hemi) Cellulolytic Enzymatic Extract Produced by *Aspergilli* Species Consortium in the Saccharification of Biomass Sorghum. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 1, p. 37–48, 2019. DOI:10.1007/s12010-019-02991-6

DU, J. et al. The cellulose binding region in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I has a higher capacity in improving crystalline cellulose degradation than that of *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 266, n. June, p. 19–25, 2018. doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.050

EPE - EMPRESA DE PESQUISA E ENERGIA. **Relatório Síntese, BEN 2019 Ano Base 2018. Ministério de Minas e Energia - MME.** [s.l: s.n.].

EREZ-RODRIGUES, N.; OLIVEIRA, F.; PÉREZ-BIBBINS, B.; BELO, I.; AGRASAR, T. A.; DOMÍNGUEZ, M. J. Optimization of Xylanase Production by Filamentous Fungi in Solid-State Fermentation and Scale-up to Horizontal Tube Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, p. 317–319,

2015. doi.org/10.1007/s12010-015-1534-1.

FANG, W. et al. White rot fungi pretreatment to advance volatile fatty acid production from solid-state fermentation of solid digestate: Efficiency and mechanisms. **Energy**, v. 162, p. 534–541, 2018. doi.org/10.1016/j.energy.2018.08.082

FARINAS, C. S. Solid-State Fermentation for the On-Site Production of Cellulolytic Enzymes and Their Use in the Saccharification of Lignocellulosic Biomass. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l: s.n.]. p. 169–183. doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00009-8

FENG, Y.; JIANG, J. XIN; ZHU, L. WEI. Recent developments in activities, utilization and sources of cellulase. **Forestry Studies in China**, v. 11, n. 3, p. 202–207, 2009. DOI: 10.1007/s11632-009-0028-z

FERREIRA, J. A. et al. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 334–345, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.03.018

FREITAS, J. V.; RUOTOLO, L. A. M.; FARINAS, C. S. Adsorption of inhibitors using a CO₂-activated sugarcane bagasse fly ash for improving enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation in biorefineries. **Fuel**, v. 251, n. February, p. 1–9, 2019. doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.032

G. L. MILLER. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. III, p. 426–428, 1959. doi.org/10.1021/ac60147a030

GARCÍA-CUBERO, M. T. et al. Chemical oxidation with ozone as pre-treatment of lignocellulosic materials for bioethanol production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 21, p. 1273–1278, 2010. DOI: 10.1016/B978-0-12-802323-5.00018-9

- GATT, E. et al. Enzymatic hydrolysis of corn crop residues with high solid loadings: New insights into the impact of bioextrusion on biomass deconstruction using carbohydrate-binding modules. **Bioresource Technology**, v. 282, n. March, p. 398–406, 2019. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.03.045
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 695–702, 1987. doi.org/10.1351/pac198759020257
- GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical reviews in biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, 2000. DOI: 10.1080/07388550091144177
- GOMES, A. DA C. et al. Fed-batch strategies for saccharification of pilot-scale mild-acid and alkali pretreated sugarcane bagasse: Effects of solid loading and surfactant addition. **Industrial Crops and Products**, v. 119, n. January, p. 283–289, 2018. doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.026
- GOODELL, B.; QIAN, Y.; JELLISON, J. Fungal Decay of Wood : Soft Rot — Brown Rot — White Rot. **ACS Symposium Series**, v. 982, p. 9–31, 2008. DOI: 10.1021/bk-2008-0982.ch002
- HAAS, R. et al. Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 564–566, 2004. DOI: 10.1007/s00253-003-1453-x
- HADŽI-TASKOVIC SUKALOVIC, V. et al. The effects of manganese and copper in vitro and in vivo on peroxidase catalytic cycles. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 18, p. 1550–1557, 2010. doi.org/10.1016/j.jplph.2010.05.026
- HAGHIGHI MOOD, S. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.

doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033

HANSEN, G. H. et al. **Solid State and Submerged Fermentation Process Biochemistry**, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>>

HERNÁNDEZ-BELTRÁN, J. U.; HERNÁNDEZ-ESCOTO, H. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings through fed-batch operation.

Biomass and Bioenergy, v. 119, n. January, p. 191–197, 2018.

doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.020

HILDÉN, L. et al. Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? **FEBS Letters**, v. 477, n. 1–2, p. 79–83, 2000. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01757-9

HISCOX, J.; O'LEARY, J.; BODDY, L. Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay. **Studies in Mycology**, v. 89, p. 117–124, 2018.

doi.org/10.1016/j.simyco.2018.02.003

HONGZHANG CHEN; LAN WANG. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Biomass. In: **Technologies for Biochemical Conversion of Biomass**. [s.l.: s.n.]. p. 65–99. doi.org/10.1016/B978-0-12-802417-1.00004-1

HUMBIRD, D. et al. Economic impact of total solids loading on enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated corn stover. **Biotechnology progress**, v. 26, n. 5, p. 1245–1251, 2010. DOI: 10.1002/btpr.441

IEA Bioenergy – a Sustainable and Reliable Energy Source. . [s.l.: s.n.].

Disponível em: <<https://www.ieabioenergy.com/wp-content/uploads/2013/10/Executive-Summary-Bioenergy-a-sustainable-reliable-energy-source.pdf>>.

JANUSZ, G. et al. Enzyme and Microbial Technology Fungal laccase , manganese peroxidase and lignin peroxidase : Gene expression and regulation.

Enzyme and Microbial Technology, v. 52, p. 1–12, 2013.

doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.10.003

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016. doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009

JOSIANI DE CASSIA PEREIRA, RODOLFO TRAVAINI, NATALIA PAGANINI MARQUES, SILVA BOLADO-RODRÍGUES, D. A. B. M. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 122–129, 2016. doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.064

KAI, D. et al. Towards lignin-based functional materials in a sustainable world. **Green Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 1175–1200, 2016. DOI: 10.1039/C5GC02616D

KARP, S. G. et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: A Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 679–689, 2013. DOI: 10.1590/S1516-89132013000400019

KAUSHIK, P.; MISHRA, A.; MALIK, A. Dual application of agricultural residues for xylanase production and dye removal through solid state fermentation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 96, p. 1–8, 2014. doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.08.006

KHUSBOO LEPCHA AND SHILPI GHOSH. Glycoside Hydrolases from a Thermophilic Microbial Consortium and their implication in the saccharification of agroresidues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 160–166, 2018. doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.021

KIISKINEN, L. L. et al. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 3065–3074, 2004. DOI: 10.1099/mic.0.27147-0

KILIKIAN, B. V. et al. Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 279–286, 2014. doi.org/10.1590/S1517-83822014005000028

KIM, D. H. et al. Pretreatment and enzymatic saccharification of oak at high solids loadings to obtain high titers and high yields of sugars. **Bioresource Technology**, v. 284, n. March, p. 391–397, 2019. doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.134

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083–1087, 2012. doi.org/10.1002/bit.24370

KNOB, A.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. β -Xylosidases from filamentous fungi: An overview. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 389–407, 2010. DOI:10.1007/s11274-009-0190-4

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JØRGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 1–10, 2009. DOI: 10.1186/1754-6834-2-11

KÜES, U. Fungal enzymes for environmental management. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 268–278, 2015. doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.006

KUREK, B.; MONTIES, B. Oxidation of spruce lignin by fungal lignin peroxidase and horseradish peroxidase: Comparison of their actions on molecular structure of the polymer in colloidal solution. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 2, p. 125–130, 1994. doi.org/10.1016/0141-0229(94)90075-2

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **J Biotechnol**, v. 56, n. 1, p. 1–24, 1997. doi.org/10.1016/S0168-1656(97)00073-4

LI, K. et al. Comparison of dilute acid and alkali pretreatments in production of fermentable sugars from bamboo: Effect of Tween 80. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 414–422, 2016. doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.003

LIERS, C. et al. Mineralization of ¹⁴C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 5, p. 573–579, 2006. DOI: 10.1007/s00253-005-0010-1

LIGUORI, R., FARACO, V. Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. **Bioresource Technology**, 2016. doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.054

LIU, Y. et al. Optimization of high solids fed-batch saccharification of sugarcane bagasse based on system viscosity changes. **Journal of Biotechnology**, v. 211, p. 5–9, 2015. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.422

LIU, Z. H.; CHEN, H. Z. Periodic peristalsis enhancing the high solids enzymatic hydrolysis performance of steam exploded corn stover biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 13–24, 2016. doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.06.022

LOPEZ-RAMIREZ, N. et al. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 265, n. June, p. 291–298, 2018. doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.015

LOPEZ, M. J. et al. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 794–800, 2007. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.06.012

MAITAN-ALFENAS, G. P. et al. The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. **Bioresource**

Technology, v. 192, p. 670–676, 2015. doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.109

MARQUES, N. P. et al. 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. doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022

MARTÍN, C. et al. Study of the phenolic compounds formed during pretreatment of sugarcane bagasse by wet oxidation and steam explosion. **Holzforschung**, v. 61, n. 5, p. 483–487, 2007. doi.org/10.1515/HF.2007.106

MAURICE, N. **Role of Solid-State Fermentation to Enhance Cellulase Production**. [s.l.] Elsevier B.V., 2019. DOI: 10.1016/b978-0-444-64223-3.00009-6

MEIGHAN, B. N. et al. Two-stage fractionation of sugarcane bagasse by autohydrolysis and glycerol organosolv delignification in a lignocellulosic biorefinery concept. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. June, p. 431–441, 2017. doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.049

MEKMOUCHE, Y. et al. Gram-scale production of a basidiomycetous laccase in *Aspergillus niger*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 1, p. 25–27, 2014. doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.06.013

MELRO, E. et al. A brief overview on lignin dissolution. **Journal of Molecular Liquids**, n. 2017, p. #pagerange#, 2018. doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.021

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012. doi.org/10.1016/j.pecs.2012.02.002

MESA, L. et al. Techno-economic evaluation of strategies based on two steps organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for

ethanol production. **Renewable Energy**, v. 86, p. 270–279, 2016.
doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.105

MIKI, Y.; ICHINOSE, H.; WARIISHI, H. Molecular characterization of lignin peroxidase from the white-rot basidiomycete *trametes cervina*: A novel fungal peroxidase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 304, n. 1, p. 39–46, 2010. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01880.x

MING TIEN & T. KENT KIRK. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. In: **Methods Enzymology**. [s.l.: s.n.]. v. 161p. 238–249.
doi.org/10.1016/0076-6879(88)61025-1

MINTY, J. J.; LIN, X. N. **Engineering Synthetic Microbial Consortia for Consolidated Bioprocessing of Lignocellulosic Biomass into Valuable Fuels and Chemicals**. [s.l.] Elsevier B.V., 2015. doi.org/10.1016/B978-0-444-59592-8.00018-X

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526–544, 2013.
doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.031

MOREIRA, F. S. et al. Improvement of hydrogen production by biological route using repeated batch cycles. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 60–68, 2017.
doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.013

MORETTI, M. M. S. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1062–1071, 2012.
doi.org/10.1590/S1517-83822012000300032

OLIVEIRA, L. R. M. et al. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 1–7, 2014. doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.037

OLIVEIRA, S. D. et al. 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. doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.038

OSONO, T. Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. **Ecological Research**, v. 22, n. 6, p. 955–974, 2007. DOI: 10.1007/s11284-007-0390-z

OZCIRAK ERGUN, S.; OZTURK UREK, R. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 273–277, 2017. doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003

PALONEN, H. et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 65–72, 2004. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.09.011

PAN, K. et al. Induction of a laccase Lcc9 from *Coprinopsis cinerea* by fungal coculture and its application on indigo dye decolorization. **Bioresource Technology**, v. 162, p. 45–52, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.116

PANDEY, A. K.; EDGARD, G.; NEGI, S. Optimization of concomitant production of cellulase and xylanase from *Rhizopus oryzae* SN5 through EVOP-factorial design technique and application in Sorghum Stover based bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 98, p. 51–56, 2016. doi.org/10.1016/j.renene.2016.05.071

PANDEY, A. K.; NEGI, S. Impact of surfactant assisted acid and alkali pretreatment on lignocellulosic structure of pine foliage and optimization of its saccharification parameters using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 115–125, 2015. doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.054

PARK, J. et al. Understanding the relationship between the structure and

depolymerization behavior of lignin. **Fuel**, v. 217, n. December 2017, p. 202–210, 2018. doi.org/10.1016/j.fuel.2017.12.079

PARSONS, S.; MCMANUS, M. C.; TAYLOR, C. M. Second-Generation Ethanol from Lignocellulose. In: **Greenhouse Gas Balances of Bioenergy Systems**. [s.l: s.n.]. p. 193–206. doi.org/10.1016/B978-0-08-101036-5.00013-6

PAULOVA, L. et al. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1091–1107, 2015. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.002

PERALTA, R. M. et al. Enzymes from basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology. In: GOUTAM BRAHMACHARI (Ed.). **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. 1. ed. [s.l.] 119-149, 2017. p. 119–149. doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4

PEREIRA SCARPA, J. DE C. et al. Saccharification of pretreated sugarcane bagasse using enzymes solution from *Pycnoporus sanguineus* MCA 16 and cellulosic ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 141, n. June, p. 111795, 2019. doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111795

PICCOLO, C.; LIDÉN, G.; BEZZO, F. Effect of substrate specific area on lignocellulose enzymatic hydrolysis: An experimental and modeling investigation. In: **Computer Aided Chemical Engineering**. [s.l: s.n.]. v. 27p. 1701–1706, 2009. doi.org/10.1016/S1570-7946(09)70674-1]

PIELHOP, T. et al. Lignin repolymerisation in spruce autohydrolysis pretreatment increases cellulase deactivation. **Green Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 3521–3532, 2015. DOI: 10.1039/C4GC02381A

PRÉVOT, V. et al. Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 690–

693, 2013. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.135

QIN, X. et al. Induction, purification and characterization of a novel manganese peroxidase from *irpex lacteus* CD2 and its application in the decolorization of different types of dye. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0113282

RABELO, S. C. et al. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349–357, 2014. doi.org/10.1016/j.fuel.2014.07.033

RAJ, K.; KRISHNAN, C. Improved high solid loading enzymatic hydrolysis of low-temperature aqueous ammonia soaked sugarcane bagasse using laccase-mediator system and high concentration ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 131, n. August 2018, p. 32–40, 2019. doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.032

RAMOS, L. P. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 195–202, 2015. doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.087

RAWAT, R. et al. Generating Fermentable Sugars from Rice Straw Using Functionally. **Energy and fuels**, v. 28, n. 8, p. 5057–5075, 2014. doi.org/10.1021/ef500891g

ROCHA, G. J. DE M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 2015. doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.003

RODRIGUES, P. DE O. et al. Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. September, p. 173–181, 2017. doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.031

RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, Á. T. Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2 SPEC. ISS., p. 164–177, 2009. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x

SANTOS, D. A. et al. Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse by cellulases from marine-derived fungi strains. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 121, p. 66–78, 2017.
doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.03.014

SANTOS, L. D. et al. Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1725–1729, 2015.
doi.org/10.1016/j.procbio.2015.07.020

SCHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010. doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315

SHERPA, K. C.; GHANGREKAR, M. M.; BANERJEE, R. A green and sustainable approach on statistical optimization of laccase mediated delignification of sugarcane tops for enhanced saccharification. **Journal of Environmental Management**, v. 217, p. 700–709, 2018.
doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.008

SHUDDHODANA et al. Chapter 23 – Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Residues. **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**, p. 543–560, 2016. doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00023-2

SILVA, T. A. L. et al. Effect of Steam Explosion Pretreatment Catalysed by Organic Acid and Alkali on Chemical and Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1007/s12649-017-9989-7

SILVA, V. F. N. et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 7, p. 809–817, 2011. DOI: 10.1007/s10295-010-0815-5

SILVEIRA, M. H. L.; VANELLI, B. A.; CHANDEL, A. K. Second Generation Ethanol Production: Potential Biomass Feedstock, Biomass Deconstruction, and Chemical Platforms for Process Valorization. **Advances in Sugarcane Biorefinery**, p. 135–152, 2018. doi.org/10.1016/B978-0-12-804534-3.00006-9

SOCCOL, C. R. et al. **Lignocellulosic bioethanol: Current status and future perspectives**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. doi.org/10.1016/B978-0-12-385099-7.00005-X

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, 2017. doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002

SOMERVILLE, C. et al. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 790–792, 2010. DOI: 10.1126/science.1189268

SOTANIEMI, V. H. et al. Controlled feeding of lignocellulosic substrate enhances the performance of fed-batch enzymatic hydrolysis in a stirred tank reactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 271–277, 2016. doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.037

SRIVASTAVA, N. et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. September 2017, p. 2379–2386, 2018. doi.org/10.1016/j.rser.2017.08.074

SUN, S. et al. Bioresource Technology The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. v. 199, p. 49–58, 2016.

DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.061

TEIXEIRA, G. A. S. P. E. S. DE B. A. M. R. A. S. L. P. F. R. B. **Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agorindustriais Tropicais**. Disponível em:

<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426390/1/Ct102.pdf>>.

TERRONE, C. C. et al. Agroindustrial biomass for xylanase production by *Penicillium chrysogenum*: Purification, biochemical properties and hydrolysis of hemicelluloses. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 33, p. 39–45, 2018. doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.04.001

TIEN, M.; KENT KIRK, T. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. **Science**, v. 221, n. 4611, p. 661–663, 1983. DOI: 10.1126/science.221.4611.661

TOLMASQUIM M. T. ET AL. **Inventário Energético de Resíduos Rurais** Empresa de Pesquisa Energética - EPE , Recursos tecnológicos. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-251/topico-308/DEA 15 - 14 - Inventário Energético de Resíduos Rurais\[1\].pdf](http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-251/topico-308/DEA%2015-14-Invent%C3%A1rio%20Energ%C3%A9tico%20de%20Res%C3%ADuos%20Rurais%5B1%5D.pdf)>.

TRAVAINI, R. et al. Ozonolysis: An advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 2–12, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.143

UDAY, U. S. P. et al. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1041–1054, 2016. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.086

UTO, T. et al. Molecular dynamics simulations of theoretical cellulose nanotube models. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. March, p. 331–338, 2018. doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.004

VALLEJOS, M. E. et al. Influence of the Chemical Composition on the Enzymatic Hydrolysis of Hot Water and Organosolv Pretreated Sugarcane Bagasse. **Waste and Biomass Valorization**, n. 0123456789, 2019. DOI: 10.1007/s12649-019-00657-2

VANE, C. H. et al. Decay of cultivated apricot wood (*Prunus armeniaca*) by the ascomycete *Hypocrea sulphurea*, using solid state¹³C NMR and off-line TMAH thermochemolysis with GC-MS. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, n. 3, p. 175–185, 2005. doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.11.004

VISWANATH, B. et al. Fungal Laccase and Their Applications in Bioremediation. **Enzyme Research**, v. 2014, p. 1–21, 2014. DOI: 10.1155/2014/163242

WANDERLEY, M. C. DE A. et al. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 448–453, 2013. doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.131

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1–2, p. 161–187, 2003. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.011

WHITEWAY, M. et al. Metabolic regulation in model ascomycetes - adjusting similar genomes to different lifestyles. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 8, p. 445–453, 2015. doi.org/10.1016/j.tig.2015.05.002

WIKANDARI, R. et al. Fermentation Inhibitors in Ethanol and Biogas Processes and Strategies to Counteract Their Effects. In: **Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes for the Production of Liquid and Gaseous Biofuels**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 461–499.

doi.org/10.1016/B978-0-12-816856-1.00020-8

WONG, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 174–209, 2009. DOI: 10.1007/s12010-008-8279-z

XU, J. K.; SUN, R. C. Recent Advances in Alkaline Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: **Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery**. [s.l: s.n.]. p. 431–459, 2016. doi.org/10.1016/B978-0-12-802323-5.00019-0

XUE, D. et al. Expression of a bifunctional cellulase with exoglucanase and endoglucanase activities to enhance the hydrolysis ability of cellulase from a marine *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 52, p. 115–122, 2017. doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.030

YANG, Y. H. et al. Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium. **Colloids and Surfaces B**, v. 34, p. 1–6, 2004. doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.009

YEE, K. L. et al. Enzyme and Microbial Technology Furfural and 5-hydroxymethyl-furfural degradation using recombinant manganese peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 108, n. July 2017, p. 59–65, 2018. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2017.08.009

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016. doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038

ZAIN, M. M. et al. Synergistic effects on process parameters to enhance enzymatic hydrolysis of alkaline oil palm fronds. **Industrial Crops and Products**, v. 122, n. June, p. 617–626, 2018. doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.037

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004. DOI: 10.1002/bit.20282

ZHANG, Y.; HE, S.; SIMPSON, B. K. Enzymes in food bioprocessing — novel food enzymes, applications, and related techniques. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 30–35, 2018. doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.007

ZHANG, Z.; LIU, B.; ZHAO, Z. Efficient acid-catalyzed hydrolysis of cellulose in organic electrolyte solutions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 97, n. 4, p. 573–577, 2012. doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.01.010

ZHAO, M. et al. Growth, metabolism of *Phanerochaete chrysosporium* and route of lignin degradation in response to cadmium stress in solid-state fermentation. **Chemosphere**, v. 138, p. 560–567, 2015. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.019

ZHAO, X. et al. Batch and multi-step fed-batch enzymatic saccharification of Formiline-pretreated sugarcane bagasse at high solid loadings for high sugar and ethanol titers. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 350–356, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.09.074

ZOUARI-MECHICHI, H. et al. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 141–148, 2006. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.027

APÊNDICE

Tabela 14: Coeficientes de correlação de Pearson das associações entre as enzimas e os extratos enzimáticos com teste de significância.

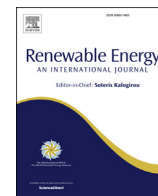
	Extratos enzimáticos															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	Ni	Fu	PI	Ga	Tr	Ni+Tr+PI	Fu+Tr+PI	Ni+Fu+Tr	Ni+Fu+PI	Ni+Ga+PI	Fu+Ga+PI	Ni+Fu+Ga	Tr+Ga+PI	Ni+Tr+Ga	Fu+Tr+Ga	Ni+Fu+Tr+Ga+PI
Fpase	0,262 0,072	-0,480 0,001	-0,085 0,567	-0,301 0,038	0,258 0,076	-0,246 0,092	0,106 0,472	0,008 0,958	-0,107 0,471	0,260 0,074	0,158 0,283	0,385 0,007	0,014 0,926	0,051 0,729	-0,389 0,006	0,105 0,477
CMCase	0,440 0,002	0,061 0,682	-0,399 0,005	-0,430 0,002	0,090 0,543	0,122 0,410	0,081 0,587	0,247 0,090	-0,080 0,589	0,090 0,541	0,315 0,029	-0,008 0,955	-0,442 0,002	0,040 0,785	-0,116 0,434	-0,010 0,948
Avicelase	0,594 <.0001	-0,042 0,779	0,054 0,718	0,287 0,048	0,379 0,008	0,412 0,004	0,027 0,857	-0,230 0,117	0,090 0,543	0,080 0,589	-0,163 0,270	-0,155 0,294	-0,193 0,189	-0,188 0,200	-0,113 0,443	-0,081 0,584
β-glicosidase	-0,024 0,872	-0,098 0,509	-0,311 0,031	-0,241 0,099	0,152 0,301	0,687 <.0001	-0,223 0,128	0,054 0,716	0,296 0,041	0,304 0,035	-0,120 0,416	-0,142 0,337	-0,004 0,977	0,108 0,464	-0,316 0,029	-0,124 0,402
β-xilosidase	0,446 0,002	-0,213 0,146	-0,223 0,128	-0,221 0,131	0,216 0,141	0,423 0,003	-0,211 0,151	-0,210 0,152	0,191 0,194	0,335 0,020	-0,060 0,688	-0,073 0,620	-0,216 0,140	0,351 0,014	-0,217 0,139	0,112 0,448
Xilanase	0,326 0,024	-0,001 0,993	-0,343 0,017	-0,341 0,018	0,335 0,020	0,325 0,024	0,102 0,489	-0,143 0,334	0,418 0,003	0,156 0,289	0,114 0,440	-0,093 0,530	-0,296 0,041	0,110 0,457	-0,270 0,063	0,271 0,063
MnP	0,339 0,018	-0,261 0,073	-0,036 0,806	-0,167 0,257	0,118 0,426	0,306 0,035	-0,310 0,032	0,225 0,124	0,312 0,031	0,306 0,035	-0,405 0,004	-0,197 0,179	-0,031 0,834	0,352 0,014	-0,050 0,735	-0,264 0,070
Lacase	-0,228 0,119	-0,228 0,120	-0,140 0,342	0,186 0,205	0,108 0,463	-0,085 0,564	0,084 0,573	-0,089 0,547	-0,213 0,146	-0,129 0,382	-0,197 0,180	-0,015 0,917	0,859 <.0001	0,140 0,342	0,111 0,453	0,053 0,718
LIP	0,372 0,009	-0,118 0,425	-0,288 0,047	-0,197 0,179	0,009 0,954	-0,310 0,032	0,197 0,179	0,371 0,010	-0,039 0,794	0,182 0,217	-0,418 0,003	-0,321 0,026	0,390 0,006	0,143 0,334	0,051 0,729	-0,007 0,965

¹ O primeiro número se refere ao valor do r , e o segundo ao valor do p .

Tabela 15: Coeficientes de correlação de Pearson das associações entre as enzimas com teste de Significância.

	Fpase	CMCase	Avicelase	B-glicosidase	B-xilosidase	Xilanase	MnP	Lacase	LIP
Fpase	1								
CMCase	0,3668 0,0103	1							
Avicelase	-0,16 0,2764	0,1347 0,3613	1						
B-glicosidase	0,0788 0,5944	0,292 0,044	0,21165 0,1487	1					
B-xilosidase	0,2283 0,1185	0,4213 0,0029	0,5048 0,0003	0,6514 <.0001	1				
Xilanase	0,1712 0,2447	0,5424 <.0001	0,43579 0,002	0,5282 0,0001	0,7857 <.0001	1			
MnP	0,0384 0,7957	0,1796 0,2219	0,3705 0,0095	0,6462 <.0001	0,6895 <.0001	0,3696 0,0097	1		
Lacase	-0,057 0,7003	-0,58 <.0001	-0,23942 0,1012	-0,168 0,2535	-0,282 0,0524	-0,416 0,0032	-0,116 0,4334	1	
LIP	0,1693 0,25	0,15 0,3088	-0,03141 0,8322	0,0326 0,8257	0,1014 0,493	0,0295 0,8424	0,4181 0,0031	0,3636 0,0111	1

ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO (CAPÍTULO 1)



Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes

Patrícia de Oliveira Rodrigues^a, Leandro Vinícius Alves Gurgel^b, Daniel Pasquini^c,
Fernanda Badotti^d, Aristóteles Góes-Neto^e, Milla Alves Baffi^{a,*}

^a Institute of Agricultural Sciences, Federal University of Uberlândia (ICIAG-UFU), 38405-320, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Chemistry, Institute of Exact and Biological Sciences, Federal University of Ouro Preto (ICEB-UFOP), 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

^c Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia (IQ-UFU), 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

^d Chemistry Department, Federal Center for Technological Education (CEFET), 30421-169, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^e Biological Sciences Institute, Federal University of Minas Gerais (UFMG), 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 February 2019

Received in revised form

12 June 2019

Accepted 6 August 2019

Available online 8 August 2019

Keywords:

Coculture

Ascomycetes

Basidiomycetes

Enzymatic cocktails

Synergism

ABSTRACT

In this study, five fungal strains (*Aspergillus niger* SCBM1 – Ni, *Aspergillus fumigatus* SCBM6 – Fu, *Trametes versicolor* 561 – Tr, *Ganoderma lucidum* 601 – Ga and *Pleurotus ostreatus* PL06 – Pl) were cultivated individually and in consortium for biosynthesis of lignocellulose-degrading enzymes by solid-state fermentation (SSF). The enzyme production was investigated using a 2^{5-1} fractional factorial design, with a total of 16 experiments (F1–F16) using raw sugarcane bagasse and raw wheat bran as substrates. Among the enzymatic extracts produced, Ni (F1) exhibited the highest production of endoglucanase (82.70 U/gds) (units per gram of dry substrate), exoglucanase (80.48 U/gds), β -xylosidase (145.01 U/gds) and manganese peroxidase (3.38 U/gds). For filter paper cellulase, Tr cocktail (F5) was the one that stood out (9.45 U/gds). Among the extracts produced in consortium, Ni + Tr + Pl (F6) presented the highest production of β -glucosidase (171.09 U/gds), β -xylosidase (139.99 U/gds) and manganese peroxidase (3.29 U/gds). For FPase, Ni + Fu + Ga (F12) exhibited the best production (10.46 U/gds). The highest xylanase biosynthesis (2582.38 U/gds) was obtained in Ni + Fu + Pl extract (F4). For laccase, the maximum biosynthesis (25.27 U/gds) was obtained in Tr + Ga + Pl (F13). The cocktails that presented the best enzyme production were: Ni (F1), Ni + Fu + Pl (F9), Ni + Tr + Pl (F6) and Ni + Ga + Pl (F10), demonstrating that the use of microbial consortium can be a promising alternative to obtain enzymatic cocktails with high synergism.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Agroindustrial wastes containing lignocellulose biomass, such as sugarcane bagasse, corn straw and wheat bran, can be used for production of biofuels and other added-value bioproducts [1,2]. In this context, the enzymatic bioconversion of polysaccharides from lignocellulose biomass (cellulose and hemicelluloses) into fermentable sugars can be a sustainable and promising alternative to produce second-generation ethanol (2G ethanol). Due to heterogeneous composition of biomass, a mixed enzymatic pool is required to increase its biodegradation. For this purpose, cellulases,

hemicellulases and ligninases produced by microorganisms have been employed to increase the efficiency of enzymatic hydrolysis [3,4].

In order to increase the economic feasibility of bioconversion process, it is imperative to improve the enzyme production and, consequently, to obtain cocktails at affordable price [5]. In Brazil, the price of commercial enzymes represents the major bottleneck limiting the 2G ethanol production in large scale, since the enzymatic cocktails are currently imported from other countries [6]. On the other hand, the microbial communities from natural ecosystems (soil, agroindustrial wastes and decomposing materials), mainly filamentous fungi, have lignocellulolytic systems consisting of different extracellular enzymes, such as laccases, peroxidases, cellulases and hemicellulases, which act in a synergistic way to increase the hydrolysis of lignocellulose biomass [7]. In this way,

* Corresponding author.

E-mail addresses: millabaffi@yahoo.com.br, milla.baffi@ufu.br (M.A. Baffi).

the cultivation of enzyme-producing microorganisms to generate powerful cocktails in the stand alone or integrated 1G-2G ethanol plant may be a promising alternative to reduce process costs.

Several studies have been carried out with filamentous fungi for production of enzymes by solid-state fermentation (SSF) of lignocellulose residues, such as sugarcane bagasse [8–12]. These microorganisms presented good growth in agroindustrial wastes, as these substrates are very similar to those present in their natural habitat [4]. Most of these studies have described the production of cellulases, hemicellulases and ligninases by isolated fungal species [13–15]. However, not all of the required enzymes were produced at high concentrations by a single fungal species. As an alternative to these studies, the utilization of a fungal consortium, with two or more species, may be an interesting strategy to increase the production of enzymatic cocktails with high catalytic potential and synergism [16].

In this context, this study evaluated the production of crude enzymatic extracts by SSF, employing raw sugarcane bagasse (SCB) and raw wheat bran (WB) as substrates and fungal species cultivated individually or in consortium, using a 2^{5-1} fractional factorial design. Two Ascomycetes (*Aspergillus fumigatus* SCBM6 - Fu and *Aspergillus niger* SCBM1 - Ni) and three Basidiomycetes (*Ganoderma lucidum* 601 - Ga, *Pleurotus ostreatus* PLO6 - Pl and *Trametes versicolor* 561 - Tr) species were investigated. The production of nine lignocellulose-degrading enzymes was evaluated: cellulases – filter paper activity (FPase), β -glucosidase, endoglucanase (carboxymethylcellulase - CMCCase) and exoglucanase (avicelase); hemicellulases – β -xylosidase and xylanase and ligninases – laccase, manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP).

2. Material and methods

2.1. Sugarcane bagasse and wheat bran

Raw SCB was kindly provided by Aroeira Bioenergy Plant (Tupaciguara, MG, Brazil). After washing and drying at room temperature, raw SCB was milled in a blender and sieved to around 0.6–1.0 mm particle size. Raw WB was purchased from a local cereal market (Uberlândia, MG, Brazil). Raw WB was washed under running water until the washing water was colorless, which indicates that all starch residue was removed, and then dried at room temperature.

2.2. Microorganisms

P. ostreatus PLO6 strain (Pl) was obtained from commercial shimeji and donated by Dr. Maria Catarina Megumi Kasuya (Department of Microbiology, Federal University of Viçosa, Brazil). *G. lucidum* 601 (GA) was obtained from Brasmicel (Suzano, SP, Brazil) and *T. versicolor* 561 (Tr) was isolated from decomposing wood in Quijingue, BA, Brazil. The strains *A. fumigatus* SCBM6 (Fu) and *A. niger* SCBM1 (Ni) were obtained from the Collection of Microorganisms from the Laboratory of Environmental Microbiology, Federal University of Uberlândia, Brazil. The Fu and Ni strains were previously isolated from raw sugarcane bagasse piles [17]. All cultures were preserved in sterile deionized water in Castellani glass vials and also maintained in Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) medium at room temperature.

2.3. Solid-state fermentation (SSF)

The fungal strains were cultivated individually in PDA medium and incubated for seven days at 28 °C or until the fungi cover the entire Petri dish for the removal of mycelial discs of about 6 mm diameter.

The crude enzymatic extracts were produced employing five fungal species. The Statistica® software (StatSoft Inc., version 10) was used to create the 2^{5-1} fractional factorial design and to generate the matrix of experiments for the monocultures and cocultures. The culture conditions (experiments from F1 to F16) are presented in Table 1. The cultures were performed in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 2.5 g of raw SCB and 2.5 g of raw WB. The substrates were supplemented with 5 mL of nutrient solution containing 0.35% of ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄), 0.3% of potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄), 0.05% of magnesium sulfate heptahydrate (MgSO₄·7H₂O) and 0.05% of calcium chloride (CaCl₂) and then autoclaved [8].

After sterilization, each flask was inoculated with mycelial discs of about 6 mm diameter in a total of nine discs for monocultures, three discs of each fungal strain for cocultures of three strains and ten discs for cocultures of five strains (two discs of each strain) and 9 mL of sterile saline solution (65% moisture). SSF was performed at 28 °C for eight days in triplicate. At intervals of 24 h, three flasks were removed from the incubator, supplemented with 50 mL of distilled water, homogenized and subjected to orbital agitation for 60 min at 150 rpm for the extraction of the enzymes produced. Afterward, the material was filtered through nylon cloth and centrifuged twice for 10 min at 10,000 rpm. The supernatants containing the crude enzymatic extracts were aliquoted and frozen at –20 °C.

2.4. Quantification of the enzymes produced

2.4.1. Filter paper cellulase (FPase)

The FPase activity was determined using filter paper as substrate, as described by Ghose [18]. The assays were carried out with Whatman No. 1 filter paper (1.0 cm × 6.0 cm ≈ 50 mg) in a reaction mixture containing 1.0 mL of 0.05 mol/L sodium citrate buffer (pH 4.8) and 500 μ L of crude enzymatic extract at 50 °C for 1 h. After this period, the reaction was stopped by the addition of 3 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). The reaction mixture was boiled in a boiling water bath for 5 min and then cooled in an ice bath. Then, 20 mL of distilled water was added and the absorbance of the solution was measured at 540 nm on a UV–Vis Spectrophotometer (model 5100, METASH). An enzymatic activity unit (U) was defined as the amount of enzyme required to release 1.0 μ mol of β -D-glucose per minute.

2.4.2. Avicelase, carboxymethylcellulase and xylanase

The activities of avicelase, carboxymethylcellulase (CMCase) and xylanase were determined using 1.0% (w/v) of avicel, 4.0% (w/v) of carboxymethylcellulose (CMC) and 1% (w/v) of xylan as substrates, respectively, in sodium citrate buffer solution (0.05 mol/L, pH 4.8) at 50 °C for 10 min [17]. After reaction, the reaction mixtures were boiled in a boiling water bath for 10 min and then cooled in an ice bath. Then, 2400 μ L of distilled water was added and the absorbance of the solution was measured at 540 nm. An enzymatic activity unit was defined as the amount of enzyme required to release 1 μ mol of β -D-glucose or β -D-xylose per minute [19].

2.4.3. β -glucosidase and β -xylosidase

The activities of β -Glucosidase and β -xylosidase were determined using *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (4 mmol/L, PNPG) and *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (4 mmol/L, PNPX) as substrates, respectively, in sodium citrate buffer solution (0.05 mol/L, pH 4.8) at 50 °C for 10 min [17]. The amount of *p*-nitrophenol (pNP) released was measured at 410 nm. An enzymatic activity unit was defined as the amount of enzyme required to release 1 μ mol of pNP per minute [17].

Table 1

2^{5-1} fractional factorial design used for investigation of enzymes production by solid-state fermentation of raw sugarcane bagasse and raw wheat bran using mono and cocultures of fungal species.

Experiment number	SSF	Species				
	Inoculum	<i>A. niger</i> SCBM1 (Ni)	<i>A. fumigatus</i> SCBM6 (Fu)	<i>T. versicolor</i> 561 (Tr)	<i>G. lucidum</i> 601 (Ga)	<i>P. ostreatus</i> PLO6 (Pl)
F1	Ni	1	0	0	0	0
F2	Fu	0	1	0	0	0
F3	Pl	0	0	0	0	1
F4	Ga	0	0	0	1	0
F5	Tr	0	0	1	0	0
F6	Ni + Tr + Pl	1	0	1	0	1
F7	Fu + Tr + Pl	0	1	1	0	1
F8	Ni + Fu + Tr	1	1	1	0	0
F9	Ni + Fu + Pl	1	1	0	0	1
F10	Ni + Ga + Pl	1	0	0	1	1
F11	Fu + Ga + Pl	0	1	0	1	1
F12	Ni + Fu + Ga	1	1	0	1	0
F13	Tr + Ga + Pl	0	0	1	1	1
F14	Ni + Tr + Ga	1	0	1	1	0
F15	Fu + Tr + Ga	0	1	1	1	0
F16	Ni + Fu + Tr + Ga + Pl	1	1	1	1	1

1: presence of the fungal strain; 0: absence of the fungal strain.

2.4.4. Laccase

The laccase (La) activity was determined by the oxidation of 2,3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). The enzymatic assay was carried in a reaction mixture containing 400 μ L of sodium acetate buffer solution (0.1 mol/L, pH 5.0), 50 μ L of ABTS (0.01 mol/L) and 50 μ L of each crude enzymatic extract at 50 °C for 10 min. Then, the absorbance was measured at 420 nm [20]. An enzymatic activity unit was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μ mol of ABTS per minute. The laccase activity was calculated using a molar absorptivity coefficient of 3.6×10^{-4} L mol⁻¹ cm⁻¹.

2.4.5. Manganese peroxidase

The manganese peroxidase (MnP) activity was determined using manganese sulfate (MnSO₄) as substrate. The enzymatic assay was performed in a reaction mixture containing 250 μ L of sodium lactate buffer solution (0.2 mol/L, pH 4.5), 100 μ L of MnSO₄ (0.4 mol/L), 100 μ L of crude enzymatic extract, 20 μ L of hydrogen peroxide (H₂O₂, 0.1 mol/L) and 530 μ L of distilled water at 40 °C for 10 min. The absorbance of the solution was measured at 240 nm. The MnP activity was calculated using a molar absorptivity coefficient of 8.1×10^3 L mol⁻¹ cm⁻¹ [21].

2.4.6. Lignin peroxidase

The lignin peroxidase (LiP) activity was determined using veratryl alcohol as substrate. The enzymatic assay was carried out in a reaction mixture containing 250 μ L of sodium tartarate buffer solution (0.2 mol/L, pH 3.0), 1000 μ L of veratryl alcohol (0.4 mol/L), 100 μ L of crude enzymatic extract, 20 μ L of H₂O₂ and 530 μ L of distilled water at 40 °C for 10 min. Then, the absorbance of the solution was measured at 310 nm. The LiP activity was calculated using a molar absorptivity coefficient of 9.3×10^3 L mol⁻¹ cm⁻¹ [22].

2.5. Data analysis

The analysis of variance (ANOVA) and the Scott Knott test were made to verify if there was a significant statistical difference between the enzymatic extracts produced, with a significance level of 5%. A study comparing the enzymatic extracts produced was performed by Pearson linear correlation. The statistical analyses were performed using Action 2.9 (ANOVA) and Sisvar 5.6 (Scott Knott) softwares.

2.6. Principal component analysis (PCA)

The associations between the enzymatic extracts produced and the different fungal consortia were evaluated by PCA [23], using the Canoco software (Biometris, Netherlands, version 4.5). Before PCA analysis, the gradient length was evaluated by the Detrended Correspondence Analysis (DCA), which was less than three standard deviations, indicating a linear ordination of the data [24].

To confirm the associations indicated by PCA, Pearson correlation analysis was performed using the SAS software (SAS Institute, Cary, NC, USA, version 9.22). For the correlations observed, the *r* values from 0.01 to 0.09 were considered as insignificant, from 0.10 to 0.29 were considered as low, from 0.3 to 0.49 were considered as moderate, from 0.50 to 0.69 were considered as substantial, from 0.70 to 0.99 were considered as very high and *r* = 1 was considered as perfect correlation [25].

3. Results and discussion

3.1. Production of enzymes by isolated Ascomycetes

The enzyme activity curves as a function of time for *A. niger* SCBM1 and *A. fumigatus* SCBM6 are presented in Fig. 1a–h. The values of maximum enzyme activity (U/gds) for each fungal strain are presented in Table 2. For SSF performed with monocultures, *A. niger* SCBM1 (Ni extract, experiment F1) showed higher enzyme production efficiency than *A. fumigatus* SCBM6 (Fu extract, experiment F2), as can be seen in Fig. 1a–h and Table 2. For Ni extract (experiment F1), the cellulases (avicelase and CMCCase) presented maximum activities of 80.48 and 82.70 U/gds on the third and fourth day of culture (Fig. 1b), respectively. For FPase, experiment F1 was the most remarkable (9.48 U/gds) with maximum activity observed on the third day of culture (Fig. 1a). For Ni extract, the maximum activity of β -glucosidase (50.36 U/gds) was observed on the fifth day of culture (Fig. 1b), after the maximum activities of FPase, CMCCase and avicelase. This result suggests a synergism of cellulases in the degradation of cellulose of the substrates (raw SCB and WB), since β -glucosidase is the last enzyme involved in the process, catalyzing the hydrolysis of cellobiose dimers that were previously released by the action of other cellulases. For Fu extract (experiment F2), CMCCase production is highlighted, with maximum activity of 54.32 U/gds on the eighth day of culture (Fig. 1f).

Bansal et al. [26] evaluated the production of cellulases by

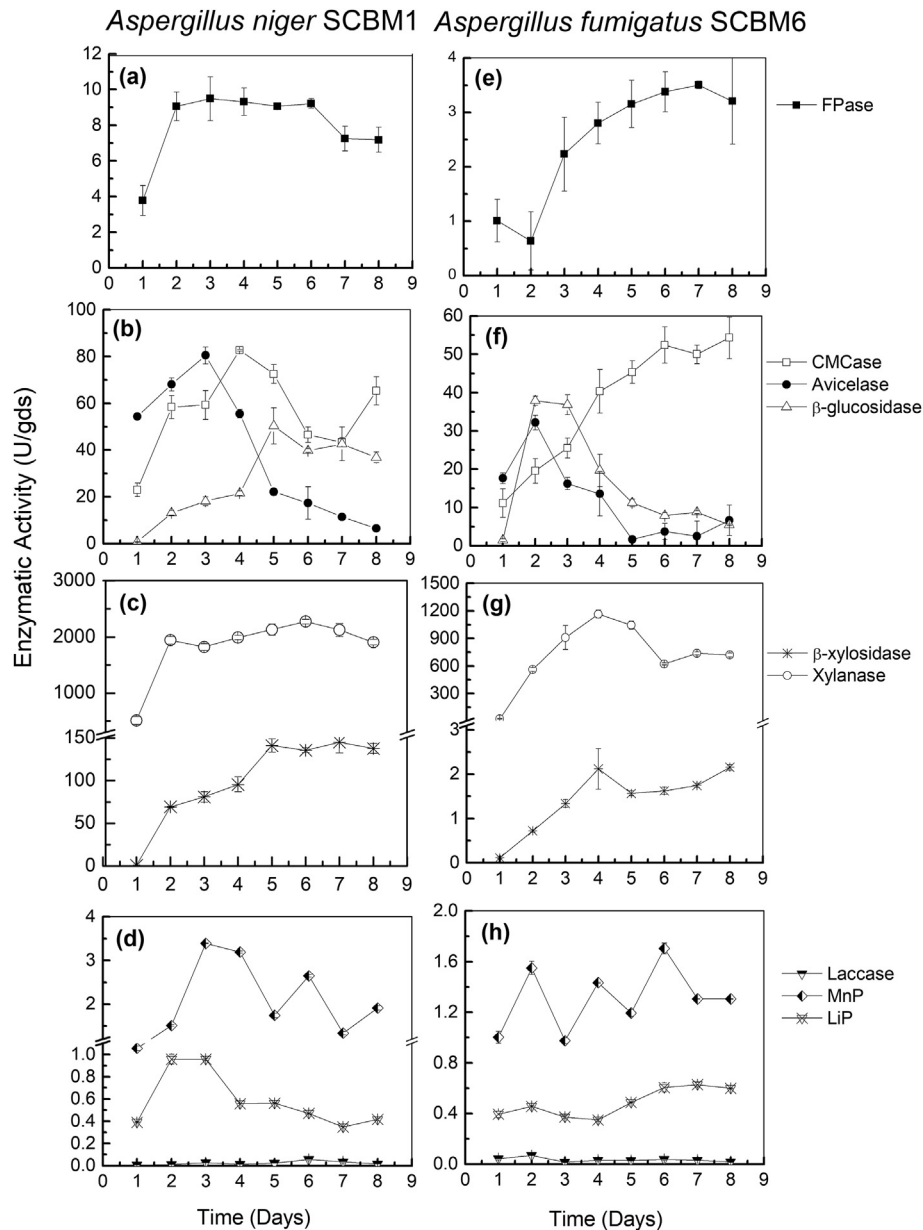


Fig. 1. Time course of enzymatic production by Ascomycetes after SSF using raw sugarcane bagasse and raw wheat bran as substrates (1:1, w/w). *Aspergillus niger* SCBM1 (F1) and *Aspergillus fumigatus* SCBM6 (F2).

A. niger NS-2 using SSF with raw SCB as substrate. These authors reported lower enzymatic activities in comparison to those observed in the present study (5 U/gds for CMCCase, 1.5 U/gds for FPase and 3.0 U/gds for β -glucosidase). In addition, after SSF using SCB previously submitted to alkaline pretreatment, the enzymatic activities increased to 90.7 U/gds for CMCCase, 15.3 U/gds for FPase and 16.3 U/gds for β -glucosidase. Ang et al. [27] inoculated *A. fumigatus* SK1 in palm stem residue and obtained enzymatic activities of 54.27, 3.36 and 4.54 U/gds for CMCCase, FPase and β -glucosidase after SSF, respectively. Oliveira et al. [28] evaluated different substrates (sugarcane bagasse, green coconut husk and cashew apple bagasse) for production of cellulases by *A. fumigatus*. The best results for production of cellulases were obtained using SCB as substrate (4.20 and 0.64 U/gds for CMCCase and FPase, respectively). Therefore, the production of cellulases by *A. niger* SCBM1 (experiment F1) and *A. fumigatus* SCBM6 (experiment F2) in

monocultures observed in the present study was higher than those reported in most of these previous studies.

For hemicellulases, Ni extract (experiment F1) exhibited the highest production of β -xylosidase (145.01 U/gds) and xylanase (2271.68 U/gds) on the seventh and sixth day of culture, respectively (Fig. 1c). These results are in good agreement with other studies that reported an elevated xylanase production by species of the genus *Aspergillus*, mainly *A. niger*. Kamoldeen et al. [29] evaluated the production of xylanase by SSF with *A. niger* USM SD2 inoculated in palm fruit residues. A xylanase activity of 2512 U/gds was obtained on the fourth day of culture, which is a similar value to that observed in the present study. Rodrigues et al. [11] also observed elevated xylanase activities of 1774.50 U/gds on the first day for *A. fumigatus* SCBM6 and 3289.58 U/gds between the fourth and sixth day of culture for *A. niger* SCBM1, using SSF with raw SCB and WB as substrates. Khanahmadi et al. [30] obtained a xylanase

Table 2
Maximum enzymatic activities (U/gds) in the extracts from each solid-state fermentation condition in mono and cocultures with the highest activity values in bold.

Experiment	Inoculum	Enzymes									
		FPase	CMCase	Avicelase	β -glucosidase	β -xylosidase	Xylanase	Laccase	MnP	Lip	
1	Ni	9.48 a ± 1.21	82.70 a ± 0.34	80.48 a ± 3.63	50.36 e ± 7.71	145.01 a ± 12.49	2271.68 b ± 39.43	0.05 n ± 0.00	3.38 a ± 0.00	0.95 a ± 0.02	
2	Fu	3.50 d ± 0.07	54.32 b ± 5.42	32.16 c ± 1.87	37.85 f ± 1.22	2.15 f ± 0.06	1164.75 e ± 44.84	0.06 n ± 0.00	1.70 f ± 0.02	0.62 e ± 0.01	
3	Pl	6.68 c ± 1.00	19.90 c ± 1.06	39.39 c ± 0.66	1.60 h ± 0.09	0 s	8.71 h ± 4.17	2.09 k ± 0.01	2.33 c ± 0.00	0.51 g ± 0.0	
4	Ga	4.94 d ± 0.25	17.58 c ± 3.35	57.16 b ± 7.75	13.55 g ± 0.26	0.35 f ± 0.03	16.30 h ± 6.20	9.66 b ± 0.22	1.96 d ± 0	0.57 f ± 0.00	
5	Tr	9.45 a ± 0.19	56.51 b ± 0.41	6.49 e ± 0.78	80.31 c ± 7.48	1.50 f ± 0.06	36.71 h ± 7.04	2.88 i ± 0.11	2.10 d ± 0.00	0.70 d ± 0.00	
6	Ni + Tr + Pl	5.39 c ± 0.57	58.88 b ± 7.96	66.65 b ± 11.88	171.09 a ± 4.82	139.99 a ± 1.54	2267.96 b ± 70.53	3.36 h ± 0.02	3.29 a ± 0.02	0.49 g ± 0.00	
7	Fu + Tr + Pl	8.22 b ± 0.68	55.80 b ± 4.58	37.35 c ± 4.74	16.56 g ± 0.31	2.65 f ± 0.21	1515.26 d ± 94.21	7.28 e ± 0.03	1.56 f ± 0.05	0.84 b ± 0.02	
8	Ni + Fu + Tr	7.43 b ± 0.47	68.26 a ± 6.86	17.87 d ± 3.52	63.59 d ± 4.27	2.81 f ± 0.07	687.38 f ± 56.42	3.28 h ± 0.01	3.06 b ± 0.08	0.95 a ± 0.00	
9	Ni + Fu + Pl	6.51 c ± 0.39	43.80 b ± 2.46	42.16 c ± 3.20	104.70 b ± 3.76	89.72 c ± 0.77	2582.38 a ± 32.73	0.40 m ± 0.02	3.31 a ± 0.0	0.68 d ± 0	
10	Ni + Ga + Pl	9.46 a ± 0.05	56.54 b ± 2.79	41.40 c ± 3.62	106.10 b ± 2.06	121.02 b ± 9.46	1697.74 d ± 10.29	2.35 j ± 0.04	3.29 a ± 0.02	0.82 b ± 0.02	
11	Fu + Ga + Pl	8.64 b ± 1.07	73.32 a ± 3.21	22.96 d ± 4.65	34.04 f ± 0.13	35.39 e ± 3.08	1555.10 d ± 137.82	0.77 l ± 0.02	1.3 g ± 0.01	0.42 h ± 0.04	
12	Ni + Fu + Ga	10.46 a ± 0.36	49.15 b ± 12.56	23.55 d ± 8.52	30.37 f ± 1.99	32.39 e ± 0.18	855.32 f ± 114.22	4.99 g ± 0.01	1.88 e ± 0.00	0.49 g ± 0.03	
13	Tr + Ga + Pl	7.48 b ± 0.34	16.70 c ± 7.41	20.65 d ± 4.05	53.70 e ± 0.32	1.43 f ± 0.199	169.83 f ± 22.78	25.27 a ± 0.18	2.35 c ± 0.02	0.96 a ± 0.04	
14	Ni + Tr + Ga	7.78 b ± 0.90	52.80 b ± 9.33	21.00 d ± 5.26	72.79 c ± 7.46	124.52 b ± 20.83	1541.43 d ± 58.88	8.6 c ± 0.04	3.42 a ± 0.08	0.80 b ± 0.02	
15	Fu + Tr + Ga	4.23 d ± 0.47	41.13 b ± 3.78	26.71 d ± 2.41	0.78 h ± 0.12	1.33 f ± 0.188	254.90 g ± 4.26	7.92 d ± 0.03	2.29 f ± 0.17	0.74 c ± 0.01	
16	Ni + Fu + Tr + Ga + Pl	8.21 b ± 0.18	49.05 b ± 1.65	29.16 c ± 8.50	33.40 f ± 6.21	72.63 d ± 10.23	2084.21 c ± 199.78	6.58 f ± 0.00	1.69 f ± 0.00	0.70 g ± 0.04	

¹ Averages and standard deviations (n = 3) for each enzyme in each extract. Letters a to n represent the differences among the extracts for each enzyme. The averages followed by different letters in the column differed from each other by the Scott-Knott test (P < 0.05).

² The abbreviations refer to fungal species Ni: *Aspergillus niger* SCBM1; Fu: *Aspergillus fumigatus* SCBM6; Tr: *Trametes versicolor* 561; Pl: *Pleurotus ostreatus* PL06; Ga: *Ganoderma lucidum* 601.

activity of 2919 U/gds on the second day of culture for *A. niger* CCUG33991 using SSF with WB as substrate. These authors suggested that the xylanase activity could be associated with the moisture content of the substrate (WB). After optimization, these authors reported an optimum moisture content of 69%. According to Pandey et al. [31], the microbial cells usually require a moisture content of about 70–80% for their growth. In contrast, the high moisture content of the substrate can reduce the porosity of the fiber by filling the small pores and limiting the fungal growth [30]. In the present study, the SSF experiments were performed with a substrate moisture of 65%, which may have positively contributed to the high xylanase activity in cocktails produced by monocultures of *A. niger* SCBM1.

Kang et al. [32] also investigated the production of hemicellulases by *A. niger* KK2 using SSF with different ratios of rice straw and wheat bran. These authors reported a maximum β -xylosidase activity of 193 U/gds on the sixth day of culture. This value of β -xylosidase activity was slightly higher than that observed in the present study. β -xylosidase plays an important role in the degradation of xylan through the hydrolysis of xylooligosaccharides, producing xylose monomers [33]. β -xylosidase and xylanase produced by fungal species have gained importance in recent years due to their biotechnological applications in the pulp and paper industry, production of food and animal feed and bioconversion of lignocellulose residues into fermentable products, stimulating the production of enzymatic cocktails rich in hemicellulases [34].

The production of ligninases by *Aspergillus* was not remarkable. MnP exhibited a maximum activity of 3.38 U/gds on the third day of culture for Ni extract (experiment F1, Fig. 1d). After the Basidiomycetes, the Ascomycetes represent the second group of wood-colonizers fungi [35]. However, few studies have described the role of Ascomycetes in the production of ligninolytic enzymes, and therefore, it is essential to investigate their potential [36,37].

Based on the results obtained in the present study, it was concluded that the monoculture of *Aspergillus* strains demonstrated higher production of cellulases and hemicellulases in comparison to the previous studies, without nutrient supplementation and/or pretreatment of lignocellulose biomass used in the SSF experiments. Experiment F1 with *A. niger* SCBM1 stood out in the production of all enzymes (Ni extract) compared to experiment F2 carried out with *A. fumigatus* SCBM6 as inoculum (Fu extract).

3.2. Production of enzymes by isolated Basidiomycetes

The enzyme activity curves as a function of time for *P. ostreatus* PL06, *G. lucidum* 601 and *T. versicolor* 561 are presented in Fig. 2a–l. For production of cellulases by the Basidiomycetes, the maximum activities of FPase, CMCase and β -glucosidase were observed when *T. versicolor* 561 (Tr extract, experiment F5) was employed as inoculum, with maximum activities of 9.45 U/gds on the sixth day (Figs. 2i), 56.51 U/gds between third and fourth day and 80.31 U/gds on the fifth day of culture (Fig. 2j), respectively. For production of avicelase, *P. ostreatus* PL06 (experiment F3) and *G. lucidum* 601 (experiment F4) stood out with maximum activity of 39.39 U/gds on the third day and 57.16 U/gds on the fifth day of culture (Fig. 2b and f), respectively. These enzyme activities were higher than those reported in some previous studies with Basidiomycetes. Kurt and Buyukalaca [38] evaluated the production of CMCase using different agricultural residues and observed a maximum CMCase activity of 2.20 U/gds for *Pleurotus ostreatus* HK 35 and 1.63 U/gds for *P. sajor-saju* ATCC 32078 on the fifth day of SSF, with straw and wheat bran as substrates. For hemicellulases, no significant activities were observed after SSF performed with the monocultures of Basidiomycetes (Fig. 2c, g and k). Moreover, the production of

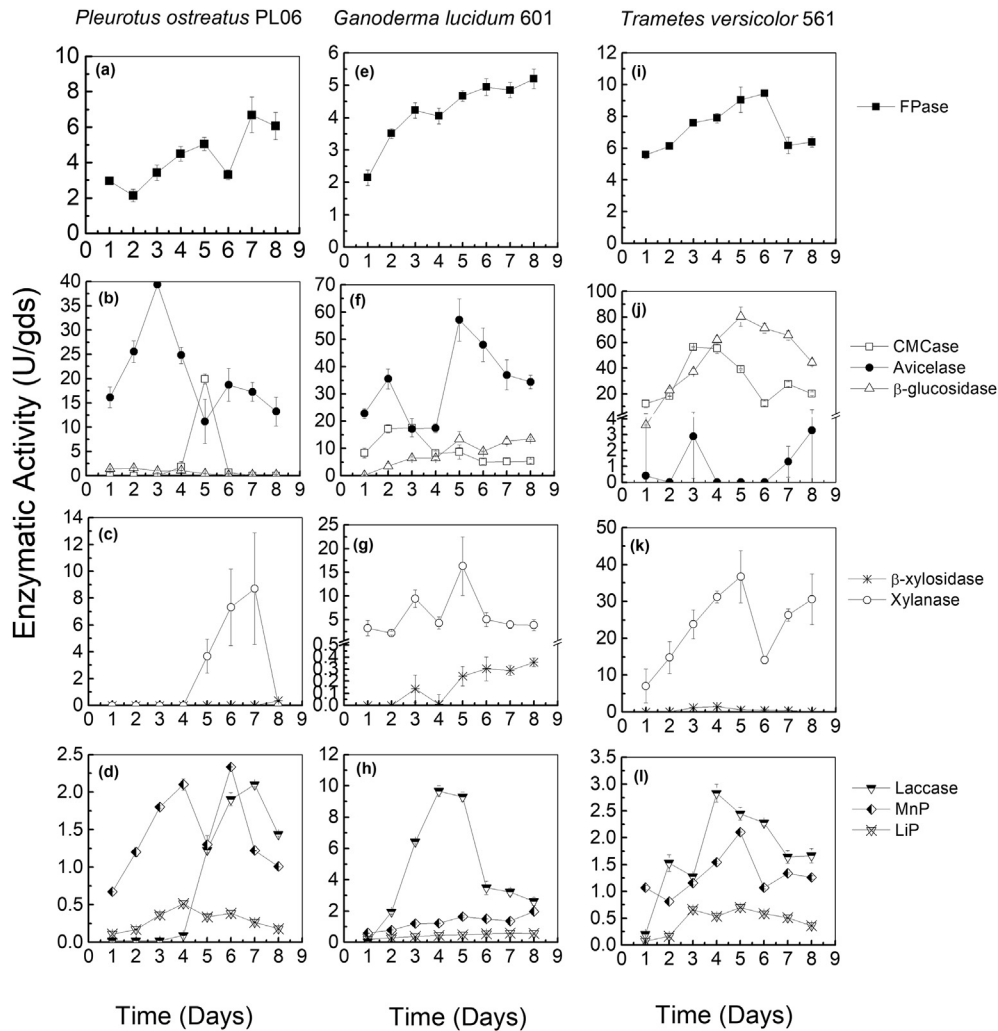


Fig. 2. Time course of enzymatic production by Basidiomycetes after SSF using raw sugarcane bagasse and raw wheat bran as substrates (1:1, w/w). *Pleurotus ostreatus* PL06 (F3); *Ganoderma lucidum* 601 (F4); *Trametes versicolor* 561 (F5).

hemicellulases by Basidiomycetes was lower than to those obtained by *Aspergillus* strains (Fig. 1c and g).

On the other hand, the monocultures of the Basidiomycetes presented higher production of ligninases in comparison to *Aspergillus* strains. The maximum laccase activities of 2.88 and 9.66 U/gds were observed on the fourth day of culture for Tr extract (experiment F5) and Ga extract (experiment F4) (Figs 2l and h), respectively. For MnP, the maximum activity was 2.10 U/gds (fifth day) for Tr extract (experiment F5) and 1.96 U/gds (eighth day) for Ga extract (experiment F4). These values of enzyme activity were higher than those reported by Kuhar et al. [39]. Among the strains evaluated, *G. lucidum* 601 was the one that stood out for production of laccase (Fig. 2h).

White rot fungi are generally employed in different environmental processes due to their ability to produce extracellular ligninolytic enzymes [27,40]. As wood decomposers, studies evaluating their ligninase production have been commonly reported [27,41–43]. For example, Kuhar et al. [39] investigated the production of laccase and MnP by *T. versicolor* BAFC 4272 and *G. lucidum* E47 using SSF with sawdust and oat seed as substrates. These authors reported maximum activities of 2.24 U/gds (*G. lucidum* E47) and 0.86 U/gds (*T. versicolor* BAFC 4272) for laccase. MnP (0.13 U/gds) was only produced by *T. versicolor* BAFC 4272. Fang et al. [41] investigated the role of *T. versicolor* MES 11914 and *P. sajor-caju* MES 03464 for production of ligninases. These authors

reported a laccase activity of 284.9 U/gds after seven days and a MnP activity of 40 U/gds after five weeks of culture for *T. versicolor* MES 11914. For *P. sajor-caju*, the authors reported enzyme activities of 103.1 U/gds for MnP and 45.8 U/gds for laccase, both after four weeks of culture. However, few studies have highlighted the production of cellulases and hemicellulases by these fungi [41,42].

Due to their high potential for production of ligninases, Basidiomycetes species have been employed in the delignification of lignocellulose biomass, contributing for degradation of lignin structure [44]. Among them, the most studied genera for production of these enzymes are *Trametes* and *Pleurotus* [45,46]. In this way, the investigation of their potential can be useful for future studies aiming at the production of more powerful enzymatic cocktails. The present study focused on the comparison of the efficiency of these three species for production of such enzymes. However, the optimization of culture condition parameters, such as temperature, substrate ratio, among others may be investigated in future studies to increase the production of these enzymes.

3.3. Production of enzymes by Ascomycetes and Basidiomycetes in consortium

Figs. 3–5 present the enzymatic activity as a function of time for the SSF experiments using fungal consortium. For cellulases, it was observed an increase of 75–110% in the β -glucosidase production in

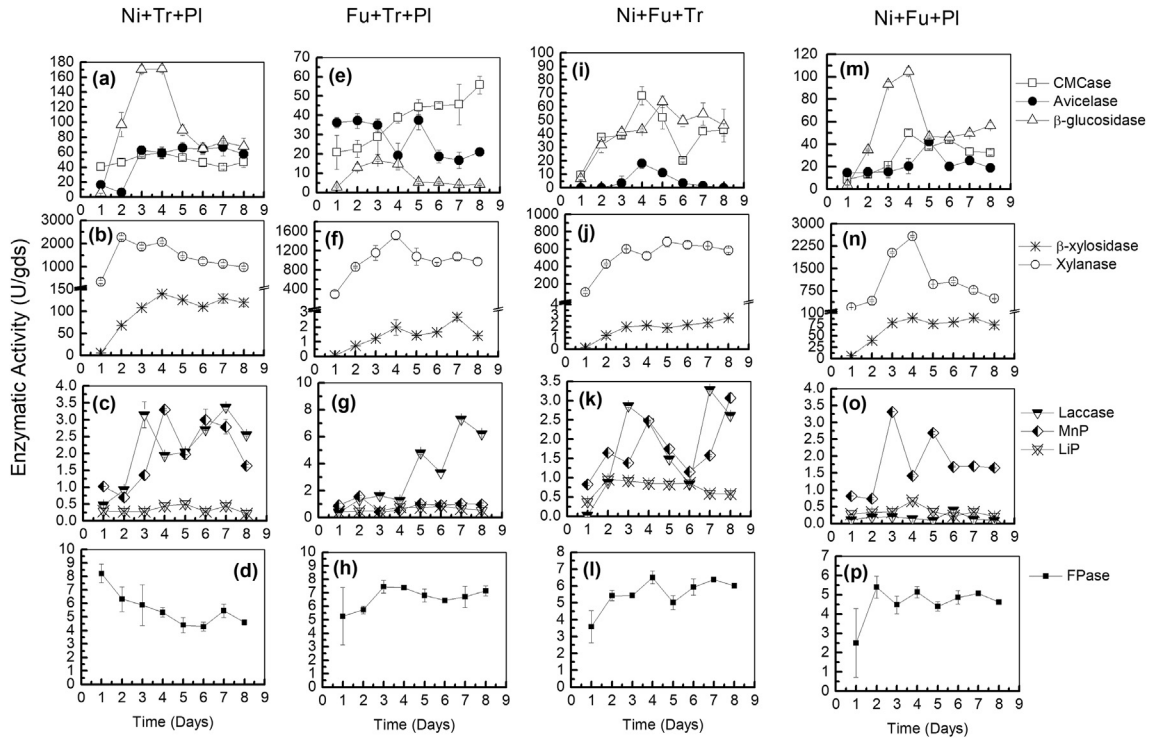


Fig. 3. Time course of enzymatic production by fungal consortium after SSF using raw sugarcane bagasse and raw wheat bran as substrates (1:1, w/w). Ni + Tr + PI (F6); Fu + Tr + PI (F7); Ni + Fu + Tr (F8); Ni + Fu + PI (F9).

the cocultures in comparison to the monocultures (Figs. 3–5, Table 2). According to the ANOVA, there was a significant difference between the enzymatic extracts (p -value < 0.05) produced in mono

and cocultures (Table 2). For Ni + Fu + PI extract obtained from the coculture of *A. niger* SCBM1, *A. fumigatus* SCBM6 and *P. ostreatus* PL06 (F9), the maximum β -glucosidase activity was 104.70 U/gds

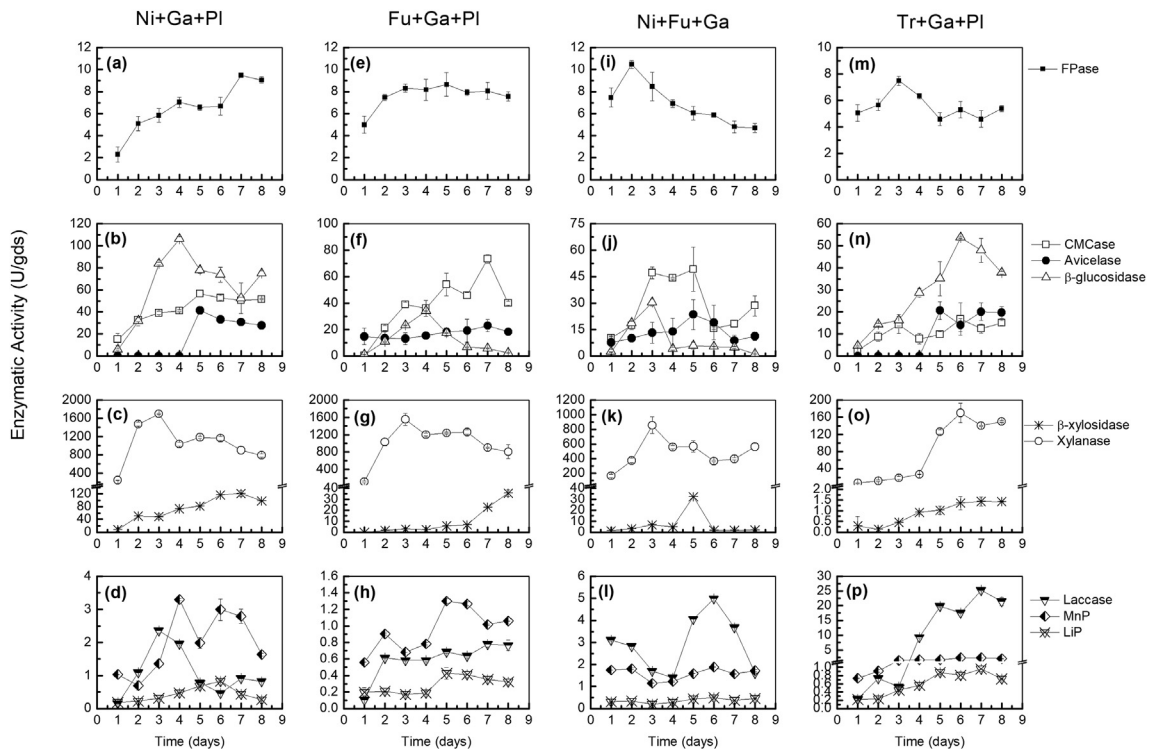


Fig. 4. Time course of enzymatic production by fungal consortium after SSF using raw sugarcane bagasse and raw wheat bran as substrates (1:1, w/w). Ni + Ga + PI (F10); Fu + Ga + PI (F11); Ni + Fu + Ga (F12); Tr + Ga + PI (F13).

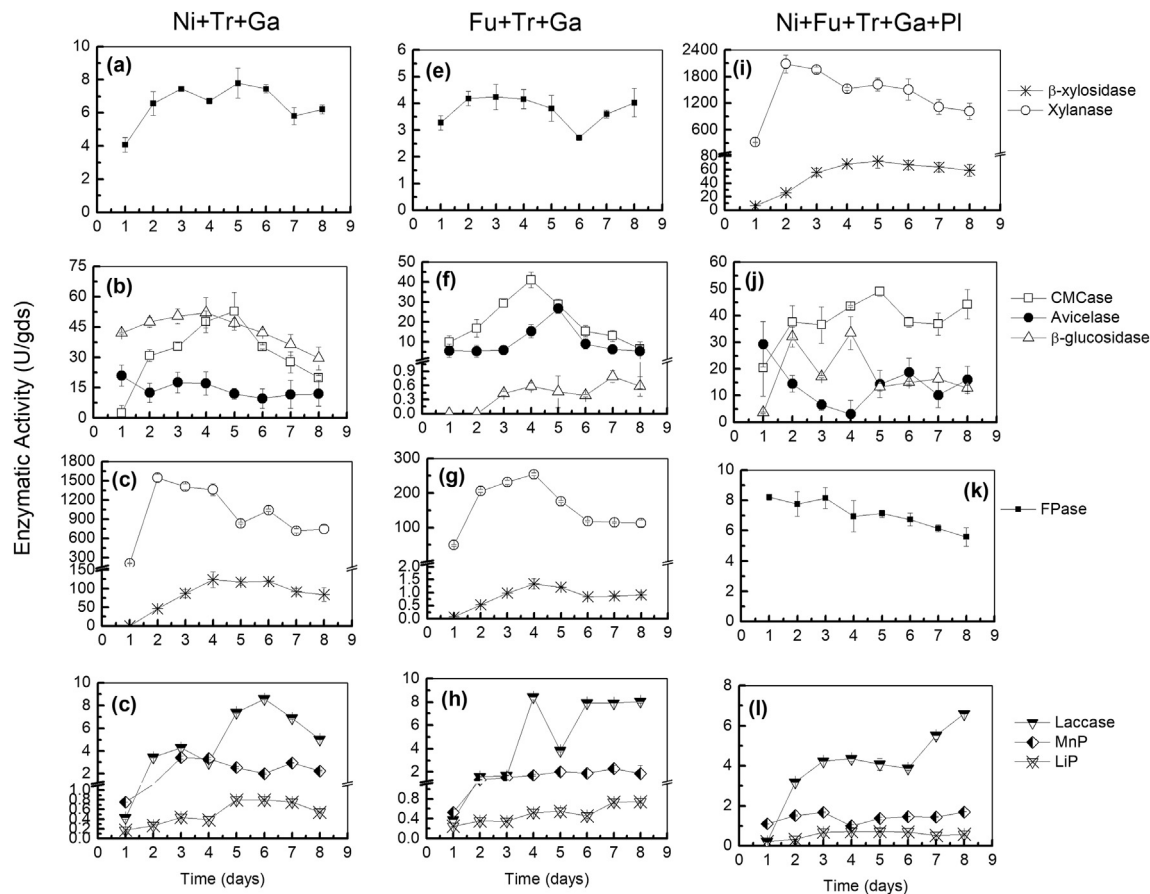


Fig. 5. Time course of enzymatic production by fungal consortium after SSF using raw sugarcane bagasse and raw wheat bran as substrates (1:1, w/w). Ni + Tr + Ga (F14); Fu + Tr + Ga (F15); Ni + Fu + Tr + Ga + PI (F16).

(Fig. 3m). For Ni + Ga + PI extract produced by the consortium among *A. niger* SCBM01, *G. lucidum* 601 and *P. ostreatus* PL06 (F10), the maximum β -glucosidase activity was 106 U/gds (Fig. 4b). For coculture of *A. niger* SCBM01 (Ni), *T. versicolor* 561 (Tr) and *P. ostreatus* PL06 (PI) (F6), the maximum β -glucosidase activity was 171.09 U/gds (Fig. 3a). For all these cocultures (experiments F6, F9 and F10), the maximum β -glucosidase activity was observed on the fourth day of culture. For other cellulases, CMCase presented the highest activity in the Fu + Ga + PI consortium (experiment F11) with 73.32 U/gds on the seventh day of culture (Fig. 4f). This result was not significantly different from Ni extract (experiment F1), which presented a maximum CMCase activity of 82.7 U/gds on the fourth day of culture (Table 2). For avicelase, the Ni + Tr + PI cocktail (experiment F6) exhibited the highest activity (66.65 U/gds, seventh day) among the consortia studied (Fig. 3a).

For FPase, a maximum activity of 10.46 U/gds (Ni + Fu + Ga extract) was observed on the second day of culture (Fig. 4i, experiment F12). These results were comparatively higher than those reported in previous studies with fungi well recognized as good FPase producers [47,48]. Kilikian et al. [49] reported maximum FPase activity of 10 U/gds for *Myceliophthora thermophila* M77 cultivated in a mixture of sugarcane bagasse and soybean meal in five days of SSF. In this same study, *Trichoderma harzianum* rifa IPT821 presented a maximum FPase activity of 5 U/gds on the third day of culture. Considering that these two fungal species stand out in the literature as good producers of cellulases, the results obtained in the present study were very interesting, with a maximum FPase activity of 10.46 U/gds obtained on the second day of culture

for the Ni + Fu + Ga consortium (experiment F12).

For hemicellulases, the highest activities of β -xylosidase and xylanase were obtained for Ni + Tr + PI consortium (experiment F6) with 139.99 U/gds on the fourth day and for Ni + Fu + PI consortium (experiment F9) with 2582.38 U/gds on the fourth day of culture (Fig. 3b and n), respectively. Xylanases have a fundamental role in the depolymerization of xylan, which is the most predominant form of hemicelluloses [50,51]. In this way, the removal of hemicelluloses from the lignocellulose biomass employing xylanases can be an excellent strategy to increase the access of cellulases to the cellulose fibers, contributing to the efficiency of the enzymatic saccharification process [52].

For ligninases, laccase was the only enzyme that exhibited a high activity (25.27 U/gds on the seventh day of culture) in the extract (experiment F13) produced by Tr + Ga + PI consortium (Fig. 4p). In this same extract, the highest LiP activity (0.96 U/gds on the seventh day of culture) was observed. Kuhar et al. [39] evaluated the production of laccase from the consortium between *T. versicolor* BAFC 4272 and *G. lucidum* E47 using sawdust and oat seed as substrates. These authors reported a laccase activity of 7.93 U/gds after the fourteen days of SSF. This value was lower than that observed in the monoculture of Ga (experiment F4) and cocultures of Tr + Ga + PI (experiment F13) and Ni + Tr + Ga (experiment F14) evaluated in the present study.

From the results obtained in the present study, it was demonstrated the efficiency of the fungal consortia studied for production of enzymes in comparison to the results reported in the literature. The experiments F8, F10, F11 and F12 presented excellent

enzymatic activities for FPase and CMCCase while the experiment F6 presented excellent enzymatic activities for avicelase, β -glucosidase and β -xylosidase. In addition, experiment F9 had an excellent enzymatic activity for xylanase. Previous studies also reported that the consortium of fungal species *A. niger* F44 and *T. viride* F26 or *Coprinopsis cinerea* 7 and *Gongronella sp.* W5 increased the production of lignocellulolytic enzymes [53,54]. Kuhar et al. [39] investigated the coculture of *T. versicolor* BAFC 4272 and *G. lucidum* E47 for production of laccase and MnP by SSF. These authors reported maximum activities for laccase of 2.24 U/gds (*G. lucidum* E47) and 0.86 U/gds (*T. versicolor* BAFC 4272) in monoculture. For coculture, the maximum activity for laccase was 7.93 U/gds after fourteen days of culture, indicating that the production of these enzymes increased when the fungi were cultivated in consortium. In the present study, it was observed that all cultures that exhibited an outstanding production of enzymes were performed by the cultivation of *A. niger* SCBM1 in consortium with other fungal species. Moreover, these results indicated that *A. niger* SCBM1 strain played a key role for production of enzymes and stood out in comparison to the other species. Therefore, the results obtained in the present study demonstrated that the fungal consortium was an excellent alternative to increase the production of enzymes and obtain cocktails with an improved synergism.

3.4. Principal component analysis (PCA) and correlation analysis

The PCA analysis was constructed with the experimental data of production of enzymes by fungal strains in monocultures and cocultures. Fig. 6 presents a score plot (PC1 versus PC2) with the relation between the types of enzymes produced and the extracts obtained from monocultures and cocultures (experiments from F1 to F16). The axes PC1 and PC2 counted for 54.6% of the explained variability while the axis PC1 counted for 37.2% of the explained variability while the axis PC2 counted for 17.4% of the explained variability (Fig. 6). This analysis indicated differences between the enzymatic extracts produced. The enzymatic extracts produced by *G. lucidum* 601 (experiment F4) and *P. ostreatus* PL06 (experiment F3) in monoculture and by Fu + Tr + Ga in coculture (experiment

F15) formed a separated cluster from the other extracts in the PCA plot (Fig. 6). The Pearson correlation analysis between the enzymes produced and the extracts were negative (Supplementary Table 1). This profile was confirmed by the lower activities observed for all enzymes in these extracts (Table 2). Laccase was positively associated with Tr + Ga + PI extract (experiment F13), which presented the highest production of this enzyme (Table 2). On the other hand, laccase exhibited negative correlation with the experiments F1, F2, F6, F8, F9, F10, F11 and F12 (Fig. 6, Supplementary Table 1). The enzymes CMCCase, β -glucosidase, β -xylosidase, xylanase and MnP were positively associated with the enzymatic extracts produced in the experiments F1, F6, F9 and F10 (Fig. 6). These extracts were highlighted because of the production of these enzymes, as they are in the same cluster of the PCA plot (Fig. 6).

In the analysis of interaction between the extracts and the enzymes produced, the highest correlations were observed for associations between CMCCase in experiment F1 (Ni extract) with r value of 0.44 and p -value < 0.005, β -glucosidase in experiment F6 (Ni + Tr + PI extract) with r value of 0.687 and p -value < 0.001, β -xylosidase also in experiment F1 with r value of 0.446 and p -value < 0.005, xylanase in experiment F9 (Ni + Fu + PI extract) with r value of 0.417 and p -value < 0.005 and MnP in experiment F1 with r value of 0.33 and p -value < 0.05. These cocktails were the those that presented the highest activities for these enzymes (Table 2). Likewise, PCA demonstrated that the production of avicelase was obtained in the opposite direction to experiment F5 (Tr extract), indicating its low production in this culture condition. This extract and the avicelase activity exhibited a negative correlation (r value of -0.379 and p -value < 0.01) (Supplementary Table 1).

When the associations were only evaluated between the classes of enzymes, there was a moderate to high correlation between cellulases and hemicellulases, with r values from 0.421 to 0.785 and p -values < 0.005, indicating that the synergistic production was favored by the presence of these enzymes. On the other hand, there was a negative association for production of laccase in relation to CMCCase and xylanase (r values of -0.58 and -0.416 and p -values < 0.001 and 0.005, respectively) (Table 2 and Supplementary Table 2). Therefore, based on the univariate (Table 2) and

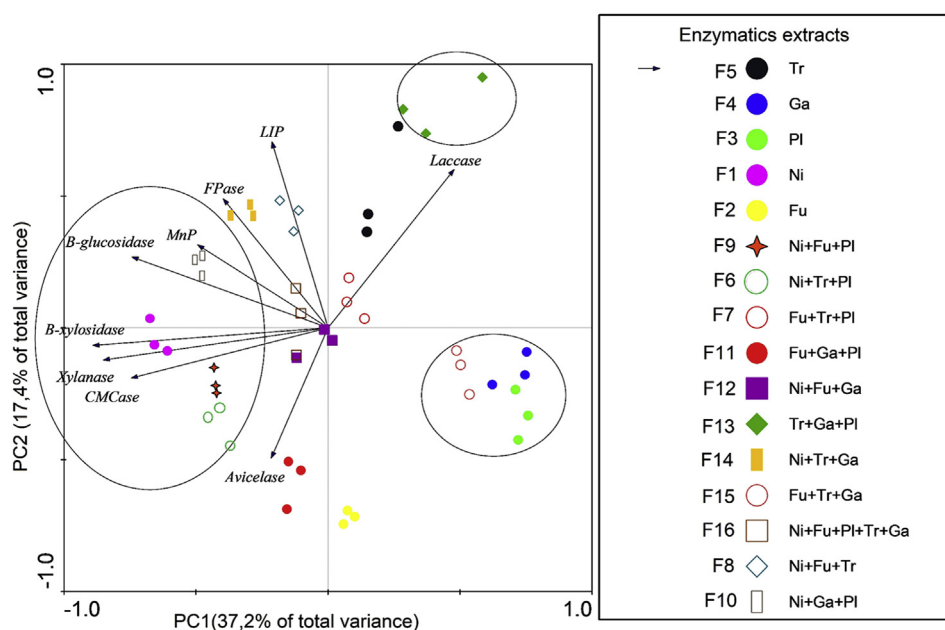


Fig. 6. Multivariate plot of the 16 crude enzyme extracts for production of FPase, CMCCase, avicelase, β -glucosidase, β -xylosidase, xylanase, laccase, MNP and LIP. Ni: *A. niger* SCBM1; Fu: *A. fumigatus* SCBM6; Tr: *T. versicolor* 561; PI: *P. ostreatus* PL06; Ga: *G. lucidum* 601.

multivariate analyses (PCA) (Fig. 6) and Pearson correlation coefficients (Supplementary Table 2), the best cultures for the biosynthesis of cellulases, hemicellulases and MnP were: Ni + Fu + PI (experiment F9), Ni + Tr + PI (experiment F6) and Ni + Ga + PI (experiment F10). For monocultures, experiment F1 was the best culture (Ni extract) with the highest activities for FPase, CMCase, avicelase, β -xylosidase, MNP and LiP.

4. Conclusions

This study demonstrated that the growth of fungal strains in cocultures by solid-state fermentation enhanced the production of lignocellulose-degrading enzymes when compared to monocultures. Statistical and PCA analyses indicated that the experiment F1 carried out with *A. niger* SCBM1 presented the maximum activities for CMCase, avicelase, β -xylosidase, xylanase, LiP and MNP while the cocultures of Ni + Fu + PI (experiment F9), Ni + Tr + PI (experiment F6) and Ni + Ga + PI (experiment F10) were the most efficient for production of cellulases and hemicellulases. In general, the fungal consortia containing *A. niger* SCBM1 among the inocula were the most active for production of enzymes, demonstrating the importance of this species in coculture with other species. The raw extract produced by the consortium among the Basidiomycetes *T. versicolor* 601, *G. lucidum* 601 and *P. ostreatus* PLO6 (experiment F13) exhibited the highest laccase production. These results demonstrated that this fungal consortium could increase the production of lignocellulolytic enzymes and encourage further studies on the application of these enzymatic extracts for saccharification of lignocellulose biomass.

Acknowledgements

The authors are grateful to Federal University of Uberlandia and Minas Gerais State Research Funding Agency (FAPEMIG grant number APQ-01360-14) for their financial support. The authors also thank to Dr. Simone Cristina Braga Bertini for her valuable clarification of doubts in the PCA analysis. Patrícia de Oliveira Rodrigues is grateful to FAPEMIG for the Doctorate fellowship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>.

References

- [1] B.E.L. Baeta, D.R.S. Lima, O.F.H. Adarme, L.V.A. Gurgel, S.F. de Aquino, Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept, *Bioresour. Technol.* 200 (2016) 137–146, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.003>.
- [2] R. Travaini, J. Martín-Juárez, A. Lorenzo-Hernando, S. Bolado-Rodríguez, Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited, *Bioresour. Technol.* 199 (2016) 2–12, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.143>.
- [3] J.M. Otero, J. Nielsen, Industrial systems biology, *Biotechnol. Bioeng.* 105 (2010) 439–460, <https://doi.org/10.1002/bit.22592>.
- [4] G.H. Hansen, M. Lübeck, J.C. Frisvad, P.S. Lübeck, B. Andersen, Solid state and submerged fermentation, *Process Biochem.* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>.
- [5] D. Klein-Marcuschamer, P. Oleskowicz-Popiel, B.A. Simmons, H.W. Blanch, The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels, *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 1083–1087, <https://doi.org/10.1002/bit.24370>.
- [6] Hongzhang Chen, Lan Wang, Enzymatic hydrolysis of pretreated biomass, in: *Technol. Biochem. Convers. Biomass*, 2017, pp. 65–99, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802417-1/00004-1>.
- [7] Khusboo Lepcha, Shilpi Ghosh, Glycoside hydrolases from a thermophilic microbial consortium and their implication in the saccharification of agro-residues, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 15 (2018) 160–166, <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2018.05.021%0D>.
- [8] M.M.S. Moretti, D.A. Bocchini-Martins, R. Da Silva, A. Rodrigues, L.D. Sette, E. Gomes, Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation, *Braz. J. Microbiol.* 43 (2012) 1062–1071, <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300032>.
- [9] N. Bansal, C. Janveja, R. Tewari, R. Soni, S.K. Soni, Highly thermostable and pH-stable cellulases from *Aspergillus Niger* NS-2: properties and application for cellulose hydrolysis, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 141–156, <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0511-9>.
- [10] J. De Cassia Pereira, N. Paganini Marques, A. Rodrigues, T. Brito de Oliveira, M. Boscolo, R. Da Silva, E. Gomes, D.A. Bocchini Martins, Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification, *J. Appl. Microbiol.* 118 (2015) 928–939, <https://doi.org/10.1111/jam.12757>.
- [11] P. de O. Rodrigues, J. de C. Pereira, D.Q. dos Santos, L.V.A. Gurgel, D. Pasquini, M.A. Baffi, Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification, *Ind. Crops Prod.* 109 (2017) 173–181, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.031>.
- [12] J. Du, X. Zhang, X. Li, J. Zhao, G. Liu, B. Gao, Y. Qu, The cellulose binding region in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I has a higher capacity in improving crystalline cellulose degradation than that of *Penicillium oxalicum*, *Bioresour. Technol.* 266 (2018) 19–25, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.050>.
- [13] M.C. da Cunha, L.C. Silva, H.H. Sato, R.J.S. de Castro, Using response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus Niger* under solid-state fermentation, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 16 (2018) 31–36, <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2018.07.018>.
- [14] N. Lopez-ramirez, T. Volke-sepulveda, I. Gaimpe-perraud, G. Saucedo-castaneda, Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor, *Bioresour. Technol.* 265 (2018) 291–298.
- [15] S. Ozcirak Ergun, R. Ozturk Urek, Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*, *Ann. Agrar. Sci.* 15 (2017) 273–277, <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2017.04.003>.
- [16] Y.H. Yang, B.C. Wang, Q.H. Wang, L.J. Xiang, C.R. Duan, Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium, *Colloids Surf., B* 34 (2004) 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.009>.
- [17] B.S.L. Dos Santos, A.F.S. Gomes, E.G. Franciscan, J.M. De Oliveira, M.A. Baffi, Thermotolerant and mesophilic fungi from sugarcane bagasse and their prospect for biomass-degrading enzyme production, *Braz. J. Microbiol.* 46 (2015) 903–910, <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140393>.
- [18] T.K. GHOSE, Measurement of cellulase activities, *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 695–702, <https://doi.org/10.1351/pac198759050695>.
- [19] G.L. Miller, Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428, <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- [20] G.P. Maitan-Alfenas, E.M. Visser, R.F. Alfenas, B.R.G. Nogueira, G.G. de Campos, A.F. Milagres, R.P. de Vries, V.M. Guimarães, The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporium cubensis* and commercial cocktails: a comparative study, *Bioresour. Technol.* 192 (2015) 670–676, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.109>.
- [21] M.D. Aitken, R.L. Irvine, Characterization of reactions catalyzed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.* 276 (1990) 405–414, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90739-L](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90739-L).
- [22] T.I.E.N.&T. MING, KENT KIRK, lignin peroxidase of *phanerochaete chrysosporium*, in: *Methods Enzymol.*, 1988, pp. 238–249.
- [23] Jean Leps, Petr Smilauer, Multivariate Analysis of Ecological Data Using CANOCO, 10, New York, 2003, <https://doi.org/10.15713/jins.mmj.3>.
- [24] S.C.B. Bertini, L.C.B. Azevedo, I. de Carvalho Mendes, E.J.B.N. Cardoso, Hierarchical partitioning for selection of microbial and chemical indicators of soil quality, *Pedobiologia* 57 (2014) 293–301, <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2014.06.001>.
- [25] James A. Davis, *Elementary Survey Analysis*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1971, Englewood.
- [26] N. Bansal, R. Tewari, R. Soni, S.K. Soni, Production of cellulases from *Aspergillus Niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues, *Waste Manag.* 32 (2012) 1341–1346, <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.03.006>.
- [27] T. Ang Nam, A. seak may chua, G. cheng ngoh, Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production Fungal solid-state fermentation and various methods of, *Biomass Bioenergy* 7 (2014) 319–338, <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>.
- [28] S.D. Oliveira, C.E. de Araújo Padilha, E.A. Azevedo, V.C. Pimentel, F.R. de Araújo, G.R. de Macedo, E.S. dos Santos, Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation, *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (2018) 937–944, <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.038>.
- [29] A.K. Ajjilolakewu, C.P. Leh, W.N. Wan Abdullah, C. keong Lee, Optimization of production conditions for xylanase production by newly isolated strain *Aspergillus Niger* through solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 11 (2017) 239–247, <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2017.07.009>.
- [30] M. Khanahmadi, I. Arezi, M. sadat Amiri, M. Miranzadeh, Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid-state fermentation in flask and tray bioreactor, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 13 (2018) 272–282, <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2018.01.005>.
- [31] A. Pandey, L. Ashakumary, P. Selvakumar, K.S. Vijayalakshmi, Influence of

- water activity on growth and activity of *Aspergillus Niger* for glycoamylase production in solid-state fermentation, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10 (1994) 485–486, <https://doi.org/10.1007/BF00144481>.
- [32] S.W. Kang, Y.S. Park, J.S. Lee, S.I. Hong, S.W. Kim, Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus Niger* KK2 from lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 91 (2004) 153–156, [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00172-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00172-X).
- [33] A. Knob, C.R.F. Terrasan, E.C. Carmona, β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (2010) 389–407, <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0190-4>.
- [34] M.J. Erez-Rodríguez, F. Oliveira, B. Pérez-Bibbins, I. Belo, T.A. Agrasar, Domínguez, Optimization of xylanase production by filamentous fungi in solid-state fermentation and scale-up to horizontal tube bioreactor, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 176 (2015) 317–319, <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0895-1>.
- [35] M.J. Lopez, M. del C. Vargas-García, F. Suárez-Estrella, N.N. Nichols, B.S. Dien, J. Moreno, Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: application for a lignocellulosic substrate treatment, *Enzym. Microb. Technol.* 40 (2007) 794–800, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.06.012>.
- [36] C. Liers, R. Ullrich, K.T. Steffen, A. Hatakka, M. Hofrichter, Mineralization of ^{14}C -labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69 (2006) 573–579, <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0010-1>.
- [37] C.H. Vane, T.C. Drage, C.E. Snape, M.H. Stephenson, C. Foster, Decay of cultivated apricot wood (*Prunus armeniaca*) by the ascomycete *Hypocrea sulphurea*, using solid state ^{13}C NMR and off-line TMAH thermochemolysis with GC-MS, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 55 (2005) 175–185, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.11.004>.
- [38] S. Kurt, S. Buyukalaca, Yield performances and changes in enzyme activities of *Pleurotus* spp. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3164–3169, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.011>.
- [39] F. Kuhar, V. Castiglia, L. Levin, Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 104 (2015) 238–243, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.017>.
- [40] R.M. Peralta, B.P. Silva, R.C.G. Corrêa, C.G. Kato, F.A.V. Seixas, A. Bracht, Enzymes from basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology, in: Goutam Brahmachari (Ed.), *Biotechnol. Microb. Enzym. Prod. Biocatal. Ind. Appl.*, first ed., 2017, pp. 119–149, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>, 119–149.
- [41] W. Fang, P. Zhang, X. Zhang, X. Zhu, J.B. van Lier, H. Spanjers, White rot fungi pretreatment to advance volatile fatty acid production from solid-state fermentation of solid digestate: efficiency and mechanisms, *Energy* 162 (2018) 534–541, <https://doi.org/10.1016/j.ENERGY.2018.08.082>.
- [42] U. Kües, Fungal enzymes for environmental management, *Curr. Opin. Biotechnol.* 33 (2015) 268–278, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.006>.
- [43] B. Viswanath, B. Rajesh, A. Janardhan, A.P. Kumar, G. Narasimha, Fungal laccase and their applications in bioremediation, *Enzym. Res.* 2014 (2014) 1–21, <https://doi.org/10.1155/2014/163242>.
- [44] M.I. Fonseca, J.I. Fariña, M.L. Castrillo, M.D. Rodríguez, C.E. Nuñez, L.L. Villalba, P.D. Zapata, Biopulping of wood chips with *Phlebia brevispora* BAFC 633 reduces lignin content and improves pulp quality, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 90 (2014) 29–35, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.11.018>.
- [45] X. Font, G. Caminal, X. Gabarrell, S. Romero, M.T. Vicent, Black liquor detoxification by laccase of *Trametes versicolor* pellets, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78 (2003) 548–554, <https://doi.org/10.1002/jctb.834>.
- [46] R. Tinoco-Valencia, C. Gómez-Cruz, E. Galindo, L. Serrano-Carreón, Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*, *J. Biotechnol.* 177 (2014) 67–73, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.013>.
- [47] M. Dashtban, H. Schraft, W. Qin, Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & perspectives, *Int. J. Biol. Sci.* 5 (2009) 578–595, <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578>.
- [48] Y. Feng, J. xin Jiang, L. wei Zhu, Recent developments in activities, utilization and sources of cellulase, *For. Stud. China* 11 (2009) 202–207, <https://doi.org/10.1007/s11632-009-0028-z>.
- [49] B.V. Kilikian, L.C. Afonso, T.F.C. Souza, R.G. Ferreira, I.R. Pinheiro, Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures, *Braz. J. Microbiol.* 45 (2014) 279–286, <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000028>.
- [50] J.A. Ferreira, A. Mahboubi, P.R. Lennartsson, M.J. Taherzadeh, Waste bio-refineries using filamentous ascomycetes fungi: present status and future prospects, *Bioresour. Technol.* 215 (2016) 334–345, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.018>.
- [51] B.S. Sajith, P. Priji, S. Sreedevi, An overview on fungal cellulases with an industrial perspective, *J. Nutr. Food Sci.* 06 (2016) 1–13, <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461>.
- [52] P. Binod, E. Gnansounou, R. Sindhu, A. Pandey, Enzymes for second generation biofuels: recent developments and future perspectives, *Bioresour. Technol. Rep.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.06.005>. #pagerange#.
- [53] H. Mikesková, C. Novotný, K. Svobodová, Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95 (2012) 861–870, <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4234-6>.
- [54] K. Pan, N. Zhao, Q. Yin, T. Zhang, X. Xu, W. Fang, Y. Hong, Z. Fang, Y. Xiao, Induction of a laccase Lcc9 from *Coprinopsis cinerea* by fungal coculture and its application on indigo dye decolorization, *Bioresour. Technol.* 162 (2014) 45–52, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.116>.