



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Orientador(a): Profa. Dra. Milla Alves Baffi

Aluno: Arthur Morya Gama Ferreira

“PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES POR *Pochonia chlamydosporia* E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS”

Uberlândia
Julho de 2024

ARTHUR MORYA GAMA FERREIRA

“PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES POR *Pochonia chlamydosporia* E APLICAÇÃO NA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS”

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientador(a): Profa. Dra. Milla
Alves Baffi

Uberlândia
Julho de 2024

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	5
2.	METODOLOGIA	7
2.1.	PREPARO DO INÓCULO	8
2.2.	BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS	8
2.3.	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	9
2.4.	QUANTIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS	9
2.4.1.	Exoglucanase (Avicelase)	9
2.4.2.	Endoglucanase (carboximetilcelulase).....	10
2.4.3.	β -Glicosidase	10
2.4.4.	Celulase total (FPase).....	10
2.4.5.	Xilanase	11
2.4.6.	β -Xilosidase.....	11
2.5.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA β -GLICOSIDASE.....	11
2.6.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	12
2.7.	QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS.....	12
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
3.2.	FERMENTAÇÃO 1 (FARELO DE TRIGO).....	14
3.3.	FERMENTAÇÃO 2 (BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR).....	17
3.4.	FERMENTAÇÃO 3 (SABUGO DE MILHO)	20
3.5.	COMPARAÇÃO ENTRE SUBSTRATOS	23
3.6.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	24
3.7.	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	27
4.	CONCLUSÃO	28
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

RESUMO

O etanol de segunda geração, produzido a partir de resíduos lignocelulósicos, representa uma alternativa ao uso de combustíveis fósseis, que são finitos e danosos ao meio ambiente. Para se transformar em etanol 2G, estes resíduos devem ser submetidos à sacarificação (hidrólise) enzimática, muito frequentemente após etapa de pré-tratamento, a fim de serem convertidos em monossacarídeos (açúcares) fermentescíveis. Atualmente, este processo só é viável utilizando coquetéis enzimáticos comerciais, que possuem alto custo. Como alternativa a este fator limitante, tem-se a produção e investigação de extratos enzimáticos caseiros via fermentação em estado sólido (FES), utilizando resíduos vegetais como substratos. Neste contexto, esse trabalho investigou, pela primeira vez, o potencial do fungo *Pochonia chlamydosporiana* produção de celulases (exoglucanase, endoglucanase e β -glicosidase) e hemicelulases (xilanase e β -xilosidase) por FES em três substratos: farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho. Os dados demonstraram destaque para a produção de β -glicosidase em farelo de trigo, com pico de produção de 51 U/g em 168 horas de cultivo. Este coquetel foi caracterizado e apresentou estabilidade em várias faixas de pH (3,5–7,5) e temperatura (30–50°C), com pH ótimo de 4,5 e temperatura ótima de 50°C, evidenciando seu potencial para aplicação em hidrólise enzimática, etapa realizada neste trabalho utilizando bagaço de cana e sabugo de milho brutos e pré-tratados com organossolve, com pico de 1,022 g/L de ART no sabugo de milho pré-tratado. Ademais, foi possível observar um aumento de 402,4% e 89,8% de rendimento de açúcares redutores totais (ART) na hidrólise utilizando o sabugo de milho e o bagaço de cana pré tratados, em comparação ao rendimento dos substratos brutos. Os resultados obtidos são promissores, visto que o coquetel enzimático apresentou características físico-químicas adequadas para uso em sacarificações de biomassas lignocelulósicas e a etapa de pré-tratamento se demonstrou altamente eficaz para maior liberação de ART.

Palavras-chave: *Pochonia chlamydosporia*, fermentação em estado sólido, celulases, hemicelulases, sacarificação.

ABSTRACT

Second generation ethanol, produced from lignocellulosic waste, represents an alternative to the use of fossil fuels, which are finite and harmful to the environment. To transform into 2G ethanol, these residues must undergo enzymatic saccharification (hydrolysis), very often after the pre-treatment step, to be converted into fermentable monosaccharides (sugars). Currently, this process is only viable using commercial enzyme cocktails, which are expensive. As an alternative to this limiting factor, there is the production and investigation of homemade enzyme extracts via solid state fermentation (SSF), using agroindustrial residues as substrates. In this context, this paper investigated, for the first time, the potential of the fungus *Pochonia chlamydosporia* in the production of cellulases (exoglucanase, endoglucanase and β -glucosidase) and hemicellulases (xylanase and β -xylosidase) by SSF in three substrates: wheat bran, sugarcane bagasse and corn cob. The data highlighted the production of β -glucosidase in wheat bran, with a peak production of 51 U/g in 168 hours of cultivation. This cocktail was characterized and showed stability in various pH (3.5–7.5) and temperature (30–50°C) ranges, with an optimum pH of 4.5 and an optimum temperature of 50°C, highlighting its potential for application in enzymatic hydrolysis, a step carried out in this paper using both raw and pre-treated with organosolv sugarcane bagasse and corncob, with a peak production of 1.022 g/L of TDS in the pre-treated corncob. Furthermore, it was possible to observe an increase of 402.4% and 89.8% in TDS in hydrolysis using pre-treated corncob and sugarcane bagasse, compared to the raw substrates. The results obtained are promising, as the enzyme cocktail presented physicochemical characteristics suitable for use in saccharification of lignocellulosic biomass and the pre-treatment step proved to be highly effective for greater release of TDS.

Key-words: *Pochonia chlamydosporia*, solid state fermentation, cellulases, hemicellulases, saccharification.

1. INTRODUÇÃO

A expressiva expansão populacional e industrial nas últimas décadas fez com que a demanda energética também se elevasse de forma exponencial em todo o planeta. Atualmente, a matriz energética mundial é majoritariamente composta por produtos oriundos de fontes não renováveis, com destaque aos combustíveis com origem do petróleo e seus derivados (IEA, 2023). A dependência a esses produtos é preocupante, visto que eles estão se esgotando de forma crescente (STEPHENS, et al., 2010; ZHONG, et al, 2023), além de trazer diversas problemáticas ambientais.

Diante dessa realidade, a busca por biocombustíveis de fontes renováveis mostra-se essencial. Para a produção de biocombustíveis, podem ser empregadas biomassas residuais (lignocelulósicas), provenientes de atividades agroflorestais e agroindustriais. Esse material refere-se à galhos, folhas, cascas, palha e bagaço, colhidos junto ao produto comerciável, que além de não possuir valor comercial, representam um passivo ambiental (HENDGES, 2019). A maior parte da biomassa residual disponível resulta da produção de grandes culturas, como soja, milho e cana-de-açúcar, sendo esta última predominante no Brasil (CROTMAN, 2024).

Quanto às suas características, a biomassa lignocelulósica é composta predominantemente por celulose, hemicelulose e lignina (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; CHAUDHARY et al, 2024), sendo que a proporção de cada uma dessas macromoléculas pode variar dependendo da sua origem. O bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, possui 40-44% de celulose, 30-32% de hemicelulose e 22-25% de lignina (SANTOS et al., 2012; RODRIGUES et al., 2021), enquanto o farelo de trigo tem 30% de celulose, 50% de hemicelulose e 15% de lignina (SUN et al., 2002; DIAS et al., 2017). Já o sabugo de milho, pode apresentar cerca de 33, 35 e 20% destes componentes, respectivamente (LOPES, 2015).

Na produção de etanol de segunda geração (2G), biocombustível gerado a partir de biomassas lignocelulósicas, podem ser utilizadas enzimas microbianas para promover a despolimerização das macromoléculas, processo conhecido como sacarificação (hidrólise) enzimática, transformando-as em

açúcares fermentescíveis (IDRIS et al., 2017). Na hidrólise enzimática da celulose, três tipos de celulases são empregadas: as exoglucanases (avicelases), que atuam na região externa da celulose; as endoglucanases (carboximetilcelulases), que clivam ligações internas nas regiões amorfas e as β -glicosidasas (celobiasas), que hidrolisam oligossacarídeos em glicose (DE CASTRO, et al., 2010). A degradação da xilana, o principal polímero da fração hemicelulósica, requer a ação de xilanases, β -xilosidasas e outras hemicelulases acessórias. Em conjunto, elas quebram as ligações glicosídicas desses polissacarídeos, resultando em uma redução no grau de polimerização e liberando oligossacarídeos e monossacarídeos fermentescíveis (POLIZELI et al. 2005; RODRIGUES et al., 2021).

Atualmente, um dos principais gargalos da produção de biocombustíveis 2G é o custo elevado dos coquetéis enzimáticos comerciais. Como alternativa, essas enzimas podem ser produzidas por microrganismos cultivados por FES. Esta técnica consiste em cultivá-los em substratos sólidos, na ausência de água livre (RAHARDJO et al., 2006; KHASWAL et al., 2024), utilizando resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono, sendo a produtividade enzimática definida pela linhagem microbiana e pelas condições de cultivo (GOMES et al., 2016; ERGUN; UREK, 2017).

Os fungos filamentosos do filo Ascomycota como *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Aspergillus* são os microrganismos mais utilizados para a produção de celulases e hemicelulases (TIWARI et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020). Espécies de Basidiomicetos dos gêneros *Pleurotus*, *Trametes* e *Ganoderma* também vêm sendo estudadas na produção de enzimas lignolíticas para posterior aplicação em hidrólises de biomassas residuais e produção de biocombustíveis (RODRIGUES et al., 2020; RAMANAIAH et al., 2021). Entretanto, a busca por novas espécies produtoras dessas enzimas a partir de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, ainda tem sido amplamente investigada (SCARPA et al. 2019; TEIXEIRA et al. 2020).

O fungo endofítico *Pochonia chlamydosporia* é muito utilizado na agricultura no controle biológico de nematóides (YI, et al., 2021). Esta espécie também foi utilizada na geração de etanol empregando quitosana como

substrato (ARANDA-MARTINEZ, et al., 2017). No trabalho citado anteriormente, *P. chlamydosporia* conseguiu produzir duas vezes mais açúcares redutores e cerca de três vezes mais etanol que *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, além de possuir o melhor índice de tolerância ao etanol. *P. chlamydosporia* foi capaz de converter uma concentração de 3 g/L de substrato em aproximadamente 0,275 g/L de ART, enquanto as outras duas espécies converteram a mesma quantidade de quitosana em 0,12 e 0,15 g/L de ART. Quanto à produção de etanol, *Pochonia chlamydosporia* atingiu uma produção de 8-9 g/L, enquanto os demais permaneceram na faixa de 2-3 g/L. Esta espécie também mostrou capacidade para produção de enzimas extracelulares, tais como lipases, esterases, proteases e quitinases utilizando diferentes substratos (ESTEVES, et al., 2009). Entretanto, até o momento, não existem relatos na literatura a respeito da sua utilização na produção de celulases e hemicelulases.

Assim, tendo em vista a necessidade de investigar e prospectar novas espécies produtoras destas enzimas, este trabalho objetivou avaliar o potencial de *P. chlamydosporia* para a produção de celulases e hemicelulases, utilizando resíduos agroindustriais como substratos (farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho). Posteriormente, o extrato com maior produção de β -glicosidase foi caracterizado com relação aos efeitos do pH e temperatura e o potencial deste coquetel enzimático foi investigado na hidrólise de bagaço de cana (BC) e sabugo de milho (SM), através da liberação de ART. Na sacarificação, foram empregadas amostras de BC e SM brutas e pré-tratadas. O pré-tratamento de biomassas é fundamental em processos de hidrólise, pois ajuda a segregar a lignina da fração celulósica da biomassa, diminuindo a resistência do substrato à ação das enzimas, aumentando a disponibilidade de ART ao fim do processo (PARK et al., 2018). Neste trabalho, investigou-se o potencial de liberação de ART de BC e SM pré-tratados pelo método organossolve, que consiste em utilizar uma combinação de solventes orgânicos e água em alta temperatura (WEI-KIT et al., 2017).

2. METODOLOGIA

A produção de celulases (celulase total, endoglucanase, exoglucanase

e β -glicosidase) e hemicelulases (xilanase e β -xilosidase) pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* foi investigada via FES nos resíduos farelo de trigo (FT), bagaço de cana-de-açúcar (BC) e sabugo de milho (SM). Após a FES, o extrato com maior produção de β -glicosidase foi caracterizado e utilizado na sacarificação de SM e BC em forma bruta e pré-tratados pelo método organossolve (ARAÚJO, 2022), para liberação de ART. Os protocolos de cultivo dos microrganismos, produção de enzimas e hidrólise enzimática foram realizados de acordo com RODRIGUES et al., (2020).

2.1. PREPARO DO INÓCULO

O fungo *P. chlamydosporia* foi fornecido pela empresa Biosag (H.T.M. Comércio e Serviços Agrícolas Ltda) e inoculado em placas contendo meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar) a 28°C. Após sete dias, o crescimento microbiano foi avaliado e foram retirados cinco discos miceliais com cerca de 0,5cm² de diâmetro, com auxílio de bisturi estéril ou a parte traseira de uma ponteira estéril de 1000 μ l. Os discos foram ressuspensos e homogeneizados em 5 mL de solução nutriente e a suspensão de esporos foi inoculada em cada frasco de fermentação. A solução nutriente estéril foi composta por: 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).

A Figura 1 mostra o crescimento do fungo *P. chlamydosporia* em meio de cultura BDA, para retirada dos discos miceliais.



Figura 1 - Crescimento de *P. chlamydosporia* em meio de cultura BDA, após 14 dias. Fonte: autor.

2.2. BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido da Usina Aroeira, localizada em Uberaba, MG, lavado com água destilada e seco em estufa a 45°C por 48 horas. Posteriormente, foimóido e homogeneizado. O farelo de trigo foi obtido de uma cerealista local e submetido ao mesmo tipo de lavagem e secagem. O sabugo de milho foi cedido pela empresa JC Rações e Insumos Siderúrgicos, lavado e seco a 45°C por 48 horas. BC e SM foram previamente pré-tratados por método organossolve (em etanol:água 1:1) em um estudo anterior do grupo de pesquisa (ARAÚJO, 2022). As composições químicas das biomassas brutas foram também obtidas em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa e são apresentadas na Tabela 1. O BC pré-tratado continha 56,11% de celulose, 12,87% de hemicelulose e 20,95% de lignina, enquanto SM pré-tratado apresentou 55,27, 18,40 e 17,33% desses componentes, respectivamente (ARAÚJO, 2022).

Tabela 1: Composição química dos substratos lignocelulósicos brutos utilizados no presente trabalho. Fonte: autor.

Composição Química (%)	Bagaço de cana	Farelo de trigo	Sabugo de milho
Celulose	41,25	45,2	33,18
Hemicelulose	29,30	28,8	35,15
Lignina Klason total	27,02	19,3	19,54
Protein	N.A.	15,8	N.A.
Autor	Araujo (2022)	Correa et al. (2023)	Araujo (2022)

* N.A.: Não analisado.

2.3. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

As FES foram conduzidas em frascos tipo Erlenmeyer contendo 5 g de substrato previamente esterilizado em autoclave por 20 minutos, e o volume completado com solução nutriente para 14 mL, para atingir cerca de 60% de umidade. Os frascos contendo os substratos (já inoculados com cinco discos

miceliais cada) foram incubados em duplicata a 28°C por sete dias, totalizando 14 frascos. Foram realizadas três fermentações: Fermentação 1 (com farelo de trigo como substrato), Fermentação 2 (com bagaço de cana-de-açúcar) e Fermentação 3 (com sabugo de milho). A cada 24 horas, os extratos enzimáticos foram obtidos através da adição de 50 mL de água destilada em cada frasco, homogeneizados suavemente, seguido de agitação a 150 rpm por 60 minutos, para solubilização das enzimas extracelulares produzidas. As amostras foram filtradas utilizando duas camadas de tecido *voil* e o filtrado foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos para a separação do micélio. O extrato enzimático bruto foi utilizado imediatamente ou estocado a -20° C. Este processo foi repetido até o final da fermentação.

2.4. QUANTIFICAÇÕES ENZIMÁTICAS

2.4.1. Exoglucanase (Avicelase)

A atividade de avicelase foi determinada com 10 µL do extrato enzimático bruto, 90 µL de avicel (Sigma) 1,0% em tampão acetato 0,1 M, como substrato, em banho maria a 40°C. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS, Sigma). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição por 10 minutos e em seguida, acrescido de 800 µL de água destilada (RODRIGUES et al., 2017). A quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria 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, determinado a partir de uma curva padrão de glicose.

2.4.2. Endoglucanase (carboximetilcelulase)

A atividade de carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada com 10 µL do extrato enzimático bruto, 90 µL de CMC (Sigma) 1,0% em tampão acetato 0,1 M, como substrato, em banho maria a 40°C. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS, Sigma). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição por

10 minutos e em seguida, acrescido de 800 μ L de água destilada (adaptado de RODRIGUES et al., 2017). A quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto de reação, determinado a partir de uma curva padrão de glicose.

2.4.3. β -Glicosidase

A atividade de β -glicosidase foi determinada com 50 μ L do extrato enzimático bruto, 250 μ L de tampão acetato 0,1 M e 250 μ L de *p*-nitrofenil-Dglicopiranosídeo (PNPG, Sigma) a 4 mM, por 10 minutos em banho maria a 40°C. A reação foi interrompida com 2 mL de carbonato de sódio (NaCO₃) 2 M e o *p*-nitrofenol liberado quantificado a 410 nm (RODRIGUES et al., 2017). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de *p*-nitrofenol.

2.4.4. Celulase total (FPase)

A atividade de celulase total por unidades de papel de filtro (FPU) foi determinada a 50°C em uma mistura de reação contendo 1 mL de tampão citrato 0,05M, pH 4,8, 0,5 mL de extrato enzimático e uma fita de papel de filtro de 1 cm de largura por 6 cm de comprimento, pesando aproximadamente 50 mg (GHOSE, 1987). A reação ocorreu por 60 minutos e foi interrompida pela adição de 3 mL de DNS e o volume final foi homogeneizado e levado ao banho de ebulição por 5 minutos. Após esse período, os tubos contendo as amostras foram levados ao banho de gelo e 20 mL de água destilada foram adicionados. A quantidade de glicose liberada foi medida a 540 nm, a partir de uma curva padrão de glicose. A FPase foi quantificada somente no melhor extrato selecionado previamente para β -glicosidase.

2.4.5. Xilanase

A atividade de xilanase foi determinada com 10 μ L do extrato

enzimático bruto, 90 μL de xilana (Sigma) 1,0% em tampão acetato 0,1 M, como substrato, em banho maria a 40°C. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS, Sigma). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição por 10 minutos e em seguida, acrescido de 800 μL de água destilada (RODRIGUES et al., 2017). A quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria 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, determinado a partir de uma curva padrão de glicose.

2.4.6. β -Xilosidase

A atividade de β -xilosidase foi determinada com 50 μL do extrato enzimático bruto, 250 μL de tampão acetato 0,1 M e 250 μL de *p*-nitrofenil- β -Dxilopiranosídeo (PNPG, Sigma) a 4 mM, por 10 minutos em banho maria a 40°C. A reação foi interrompida com 2 mL de carbonato de sódio (NaCO_3) 2 M e o *p*-nitrofenol liberado quantificado a 410 nm (RODRIGUES et al., 2017). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de *p*-nitrofenol.

2.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Para caracterização físico-química, escolheu-se o extrato mais rico em β -glicosidase, tendo em vista que esta enzima desempenha papel central na degradação de resíduos lignocelulósicos, sendo a enzima que atua na etapa final do processo de decomposição da celulose, pela hidrolisação dos resíduos de celobiose, liberando monossacarídeos fermentescíveis (DE CASTRO, et al., 2010). Após a seleção do melhor substrato, foi realizada a caracterização físico-química. Foram avaliados: pH ótimo, temperatura ótima, pH de estabilidade e termoestabilidade em amplas faixas de pHs e temperaturas, de acordo com RODRIGUES et al. (2017). Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.5.1. pH ótimo

O pH ótimo foi determinado avaliando a atividade enzimática do extrato bruto em diferentes faixas de pH, entre 3,5 e 7,5, variando de 0,5 em 0,5.

A atividade de β -glicosidase foi determinada com 50 μ L do extrato enzimático bruto, 250 μ L de tampão (3,5-7,5) e 250 μ L de *p*-nitrofenil-Dglicopiranosídeo (PNPG, Sigma) a 4 mM, por 10 minutos em banho maria a 40°C. A reação foi interrompida com 2 mL de carbonato de sódio (NaCO₃) 2 M e o *p*-nitrofenol liberado quantificado a 410 nm (RODRIGUES et al., 2017). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*-nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de *p*-nitrofenol.

Os tampões utilizados foram: tampão citrato de sódio 0,1 M (3,5 a 6,0) e tampão Tris-HCl 0,1 M (7,0 e 7,5).

2.5.2. Temperatura ótima

A temperatura ótima foi avaliada nas mesmas condições para a determinação do pH ótimo, porém, utilizando o pH ótimo em temperaturas de 30 a 70 °C, variando de 5 em 5° C.

2.5.3. pH de estabilidade

A estabilidade frente a variações de pH foi analisada através da incubação do extrato enzimáticos durante 24 horas à temperatura ambiente em tampão, variando o pH de 3,5 a 7,5, com os mesmos tampões já descritos. A atividade residual (%) foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura, multiplicando o valor encontrado de atividade enzimática em cada pH por 100 e dividindo pela atividade enzimática do pH ótimo.

2.5.4. Termoestabilidade

A termoestabilidade foi investigada incubando o extrato enzimático

bruto em tampão no pH ótimo de cada enzima, por 1 hora em diferentes temperaturas de 30 a 70°C. A atividade residual (%) foi determinada nas respectivas condições ótimas de pH e temperatura, multiplicando o valor encontrado de atividade enzimática em cada temperatura por 100 e dividindo pela atividade enzimática da temperatura ótima.

2.6. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As frações sólidas (polpas pré-tratadas) de BC e SM foram hidrolisadas com o extrato caseiro produzidos por FES que apresentou a maior atividade de β -glicosidase. Foram realizadas quatro hidrólises com os seguintes substratos: BC e SM brutos e BCe SM pré-tratados por organossolve. Os ensaios foram conduzidos em frascos do tipo erlenmeyer de 50 mL com 10% de sólidos totais em tampão citrato de sódio, 0,05 mol/L, pH 4,8, carga de β -glicosidase de 30 CBU/g de biomassa, e volume final de 10 mL (MEIGHAN et al., 2017). As hidrólises foram realizadas em triplicatas sob agitação a 150 rpm e 50°C por 72 horas. Os hidrolisados foram centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos, filtrados e posteriormente utilizados para a quantificação de açúcares redutores totais ou congelados.

2.7. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS

Os açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método do ácido 3,5 dinitrosalissílico - DNS (MILLER, 1959). As reações foram realizadas com 100 μ L de hidrolisado e 100 μ L de DNS por 10 minutos no banho-maria em ebulição. Após esse período, foram adicionados 800 μ L de água destilada. Todas as dosagens foram realizadas em triplicatas. A quantidade de ART liberada foi medida por espectrofotometria a 540 nm (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto de reação, determinado a partir de uma curva padrão de glicose.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A Figura 2 mostra o crescimento do fungo em frasco erlenmeyer, contendo farelo de trigo (Fermentação 1). Observa-se que o fungo cresceu homogeneamente sobre o substrato sólido. Nas figuras 3 e 4, observa-se o crescimento do fungo em bagaço de cana-de-açúcar (Fermentação 2) e sabugo de milho (Fermentação 3) e nota-se que o crescimento não foi tão expressivo quanto em FT, devido ao fato dele possuir naturalmente um maior teor de celulose, hemicelulose e proteínas que os demais utilizados neste trabalho (CORREA et al., 2023).



Figura 2 - Crescimento de *P. clamydosporia* por fermentação em estado sólido em farelo de trigo, após 96 horas.



Figura 3 - Crescimento de *P. clamydosporia* por fermentação em estado sólido em bagaço de cana-de-açúcar, após 96 horas. Fonte: autor.



Figura 4 - Crescimento de *P. clamydosporia* por fermentação em estado sólido em sabugo de milho, após 96 horas. Fonte: autor.

3.2. FERMENTAÇÃO 1 (FARELO DE TRIGO)

Na fermentação utilizando FT como substrato, o pico de atividade das enzimas foi de 3,95 U/g para Avicelase, 3,26 U/g para CMCcase, 51,43 U/g para β -glicosidase, 8,49 U/g para Xilanase e 33,31 U/g para β -xilosidase, conforme Figuras 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente. A FPase (celulase total) também foi dosada para o extrato com a maior atividade de enzimas, que foi referente ao extrato de 168h, com 51,43 U/g de β -glicosidase. Estes resultados indicam uma produção superior de β -glicosidase (51,43 U/g em 168h de cultivo) em relação às demais enzimas investigadas.

Devido ao fato de não haver dados na literatura envolvendo a produção dessas enzimas por esta espécie, os resultados obtidos foram comparados com estudos prévios que relatam a produção por outras espécies fúngicas. Por exemplo, FREITAS (2018) também observou pico de 51 U/g de β -glicosidase pelo fungo *Byssochlamys spectabilis*, e BANSAL (2012) atingiu um pico de 33 U/g utilizando *Aspergillus niger*, ambos após 96h de cultivo, utilizando condições análogas e o mesmo substrato.

RODRIGUES et al. (2020) utilizaram bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos (1:1) para produção de enzimas pelas espécies *A. niger* e *A. fumigatus* e atingiram picos de produção de β -glicosidase de 50,36 e 37,85 U/g, após 108 e 48h de cultivo, respectivamente.

Utilizando o substrato bruto fibra de mesocarpo de dendê, ROMERO-

PELÁEZ et al. (2017) obtiveram 0,1 U/g de β -glicosidase com *Trichoderma reesei* após 312h de cultivo. Tais dados evidenciam o potencial promissor de *P. clamydosporia* para a produção dessa enzima.

Quanto às hemiceluloses, CORREA et al. (2023) observou uma atividade de 19,39 U/g de β -xilosidase, utilizando FT como substrato e associação dos fungos *Trametes villosa* e *Trichoderma asperellum*, após 48h de cultivo, enquanto AGUILAR(2024) obteve um pico de 11,24 U/g após 168h, utilizando o mesmo substrato e a espécie fúngica *A. awamori*, demonstrando que o valor de β -xilosidase obtido por *P. clamydosporia* do presente estudo é satisfatório e sobressai àqueles dispostos na literatura recente.

Essa elevada produção de β -xilosidase, e principalmente β -glicosidase, por *P. clamydosporia* no presente estudo, pode estar associada às características do substrato, visto que FT é rico em celulose, favorecendo maior produção de celulasas (Tabela 1), e rico em proteínas, contribuindo para melhor crescimento e colonização fúngica, dado que as proteínas em suas formas hidrolizadas (peptídeos e aminoácidos) são essenciais para o crescimento e diferenciação celular dos seres vivos (de SOUZA, 2014).

As demais enzimas não tiveram atividade significativa considerando este substrato.

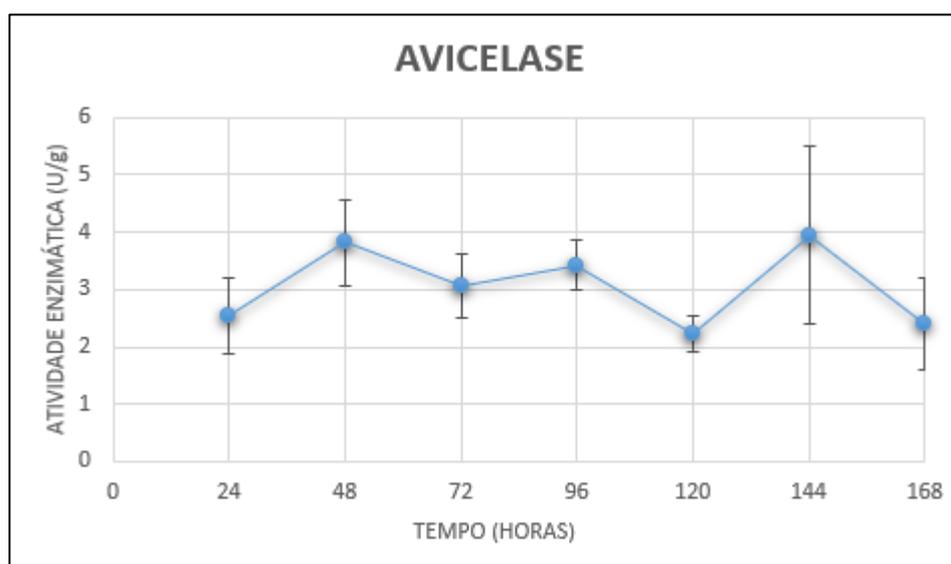


Figura 5 - Curva de produção de Avicelase (exoglucanase) em função do tempo no substrato farelo de trigo por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

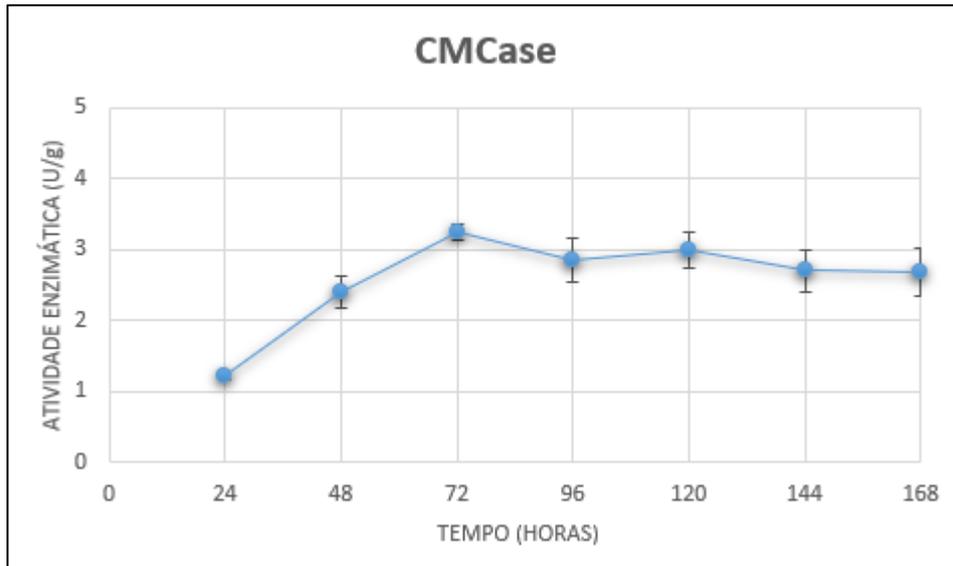


Figura 6 - Curva de produção de CMCase (endoglucanase) em função do tempo no substrato farelo de trigo por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

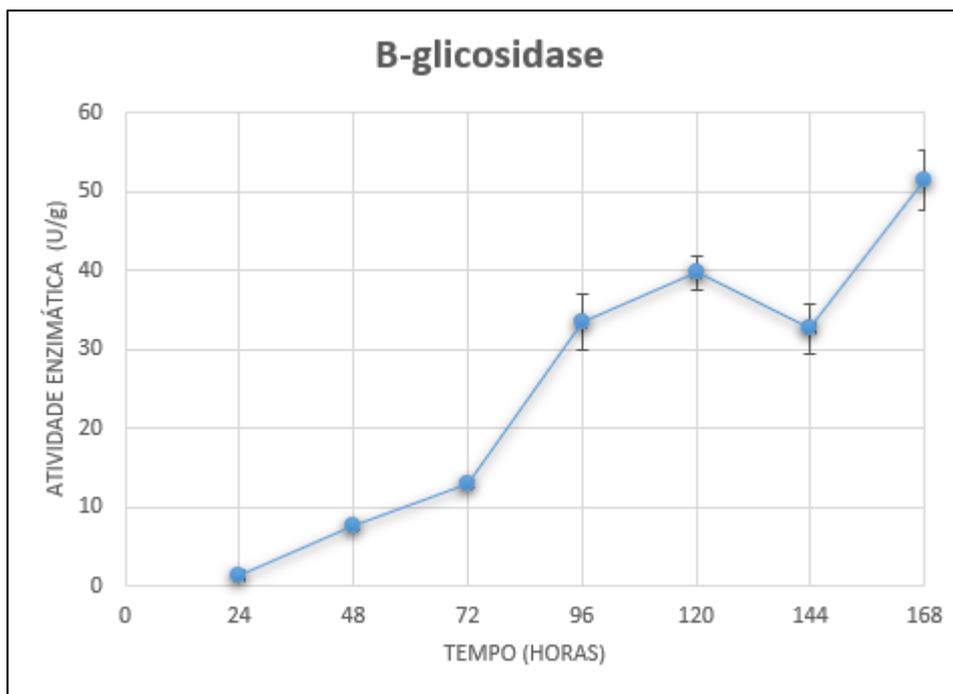


Figura 7 - Curva de produção de β -glicosidase em função do tempo no substrato farelo de trigo por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

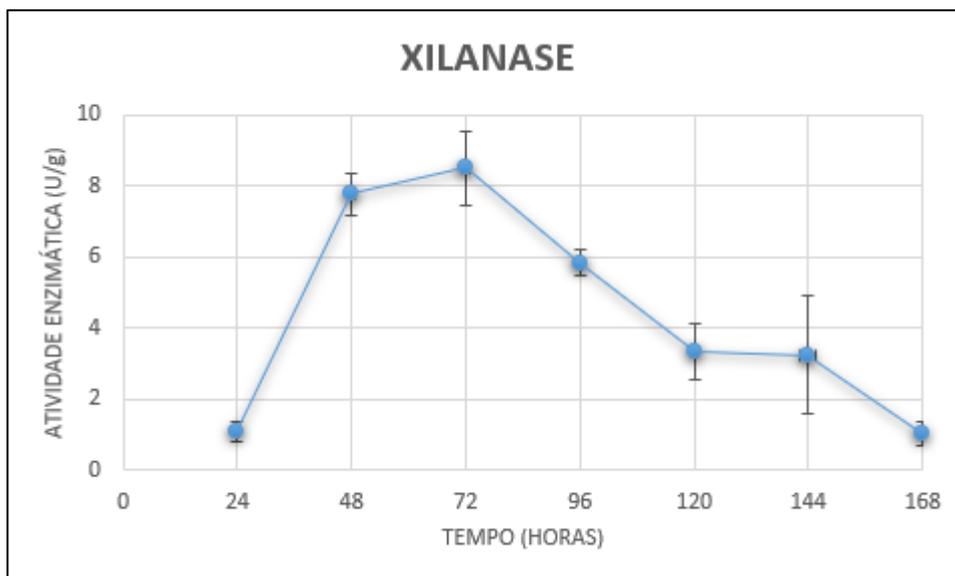


Figura 8 - Curva de produção de Xilanase em função do tempo no substrato farelo de trigo por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

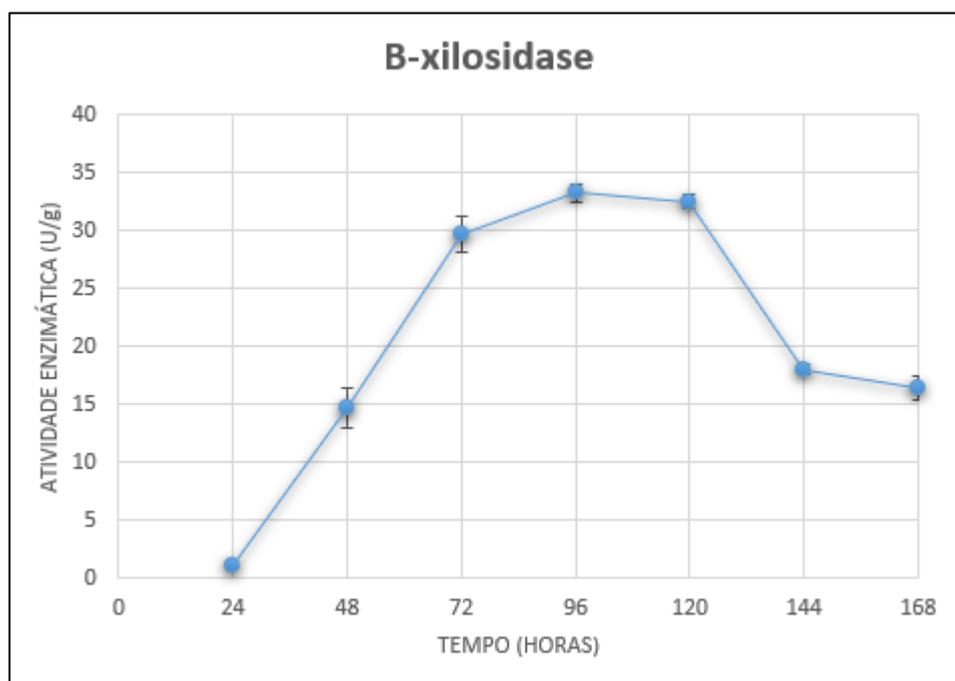


Figura 9 - Curva de produção de β -xilosidase em função do tempo no substrato farelo de trigo por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

3.3. FERMENTAÇÃO 2 (BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR)

A segunda fermentação, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, apresentou resultados inferiores à anterior. O pico de atividade das enzimas foi de 2,65 U/g para Avicelase, 1,79 U/g para CMCase, 0,64 U/g para β -glicosidase, 3,51 U/g para Xilanase e 0,84 U/g para β -xilosidase, conforme figuras 10, 11, 12, 13 e 14. A principal diferença de produção enzimática desse substrato, se comparado à

fermentação utilizando farelo de trigo, está nas atividades de β -glicosidase e β -xilosidase, que foram muito baixas. Esta baixa produção de enzimas pode estar relacionada à maior concentração de lignina neste substrato (Tabela 1), que dificulta o acesso à celulose e hemicelulose (TIAN, 2017).

Novamente, não foram encontrados dados na literatura reportando a produção dessas enzimas por esta espécie fúngica em bagaço de cana. Comparando com outras espécies, BANSAL et al. (2012) avaliaram a linhagem *A. niger* NS-2 na produção de enzimas, também utilizando BC como fonte de carbono, e obtiveram cerca de 3,0 U/g de β -glicosidase e 5,0 U/g de CMCase após 96h de cultivo.

Com essa mesma espécie e substrato, ALVES (2017) apresentou uma atividade de aproximadamente 38 U/g de CMCase e 18 U/g de β -glicosidase, ambos em 48h de cultivo.

RODRIGUES et al. (2017), por sua vez, atingiram 30,52 U/g de β -glicosidase em 96h de cultivo, 1.647,20 U/g de xilanase em 24h de cultivo neste substrato, por *A. fumigatus*. Estes dados indicam que, para este substrato, *P. clamydosporia* não obteve um rendimento expressivo, fazendo-se necessário o aprimoramento de condições e/ou associações com outros fungos e substratos para obtenção de melhores atividades enzimáticas.

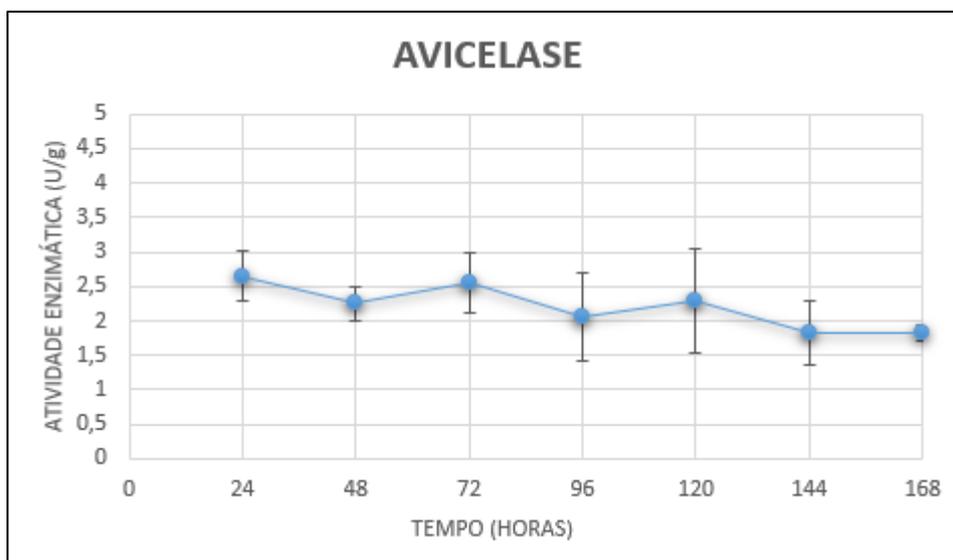


Figura 10 - Curva de produção de Avicelase em função do tempo no substrato bagaço de cana-de-açúcar por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

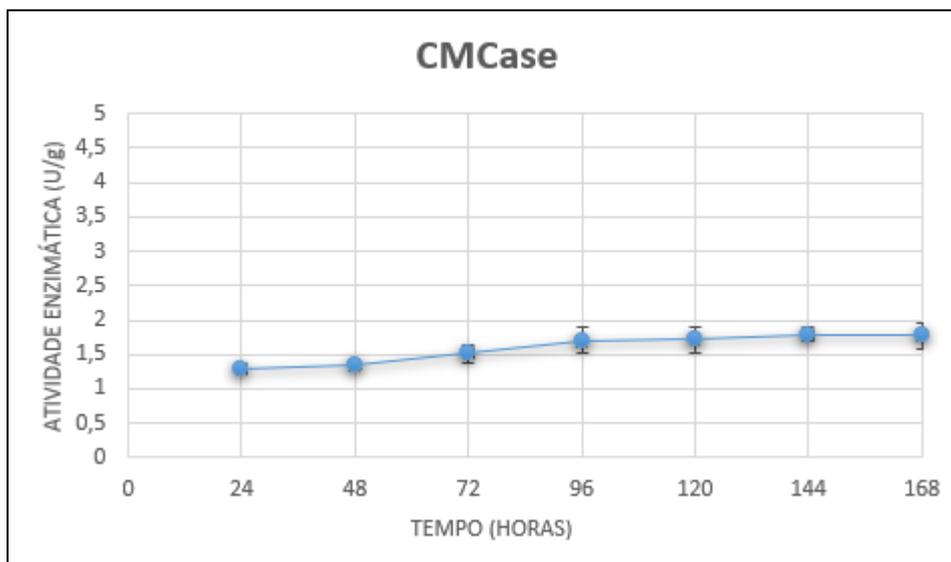


Figura 11 - Curva de produção de CMCase em função do tempo no substrato bagaço de cana-de-açúcar por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

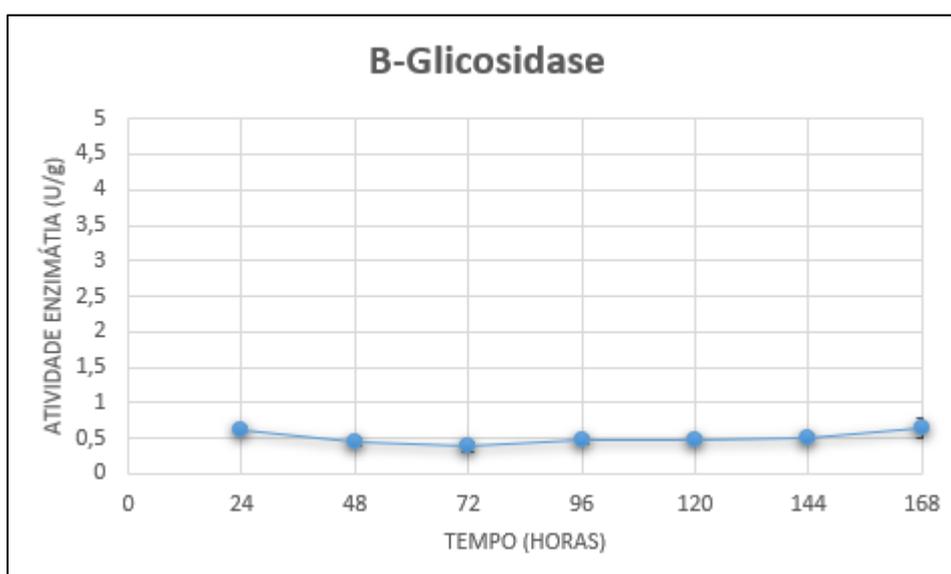


Figura 12 - Curva de produção de β -glicosidase em função do tempo no substrato bagaço de cana-de-açúcar por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

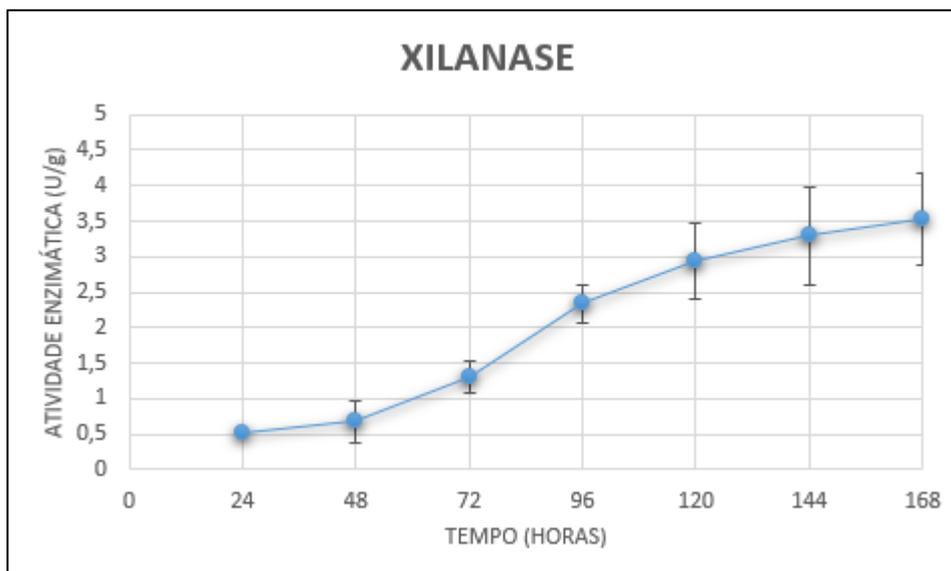


Figura 13 - Curva de produção de Xilanase em função do tempo no substrato bagaço de cana-de-açúcar por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

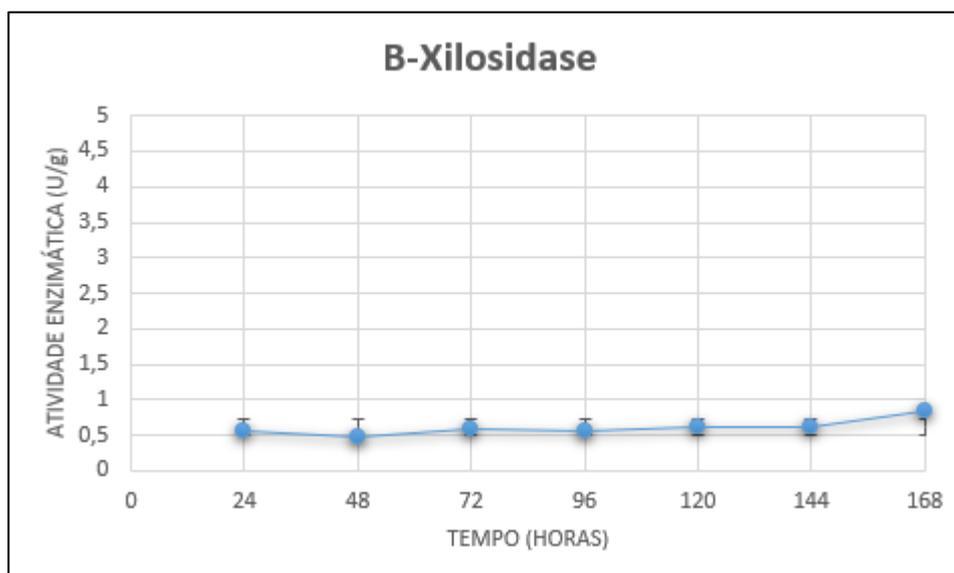


Figura 14 - Curva de produção de B-xilosidase em função do tempo no substrato bagaço de cana-de-açúcar por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

3.4.FERMENTAÇÃO 3 (SABUGO DE MILHO)

Na terceira fermentação, o pico de atividade das enzimas foi de 1,34 U/g para Avicelase, 3,8 U/g para CMCase, 6,53 U/g para β -glicosidase, 56,91 U/g para Xilanase e 4,07 U/g para β -xilosidase, conforme figuras 15, 16, 17, 18 e 19. O destaque foi paraxilanase, que apresentou um pico de produção de 56,91 U/g após 144 horas de cultivo, indicando o potencial deste fungo para produção desta hemicelulase, possivelmente decorrente do maior teor de

hemicelulose neste substrato, em comparação com os demais (Tabela 1). O pico de atividade de β -glicosidase foi de 6,53 U/g após 72 horas de cultivo.

Da mesma forma que nas fermentações 1 e 2, não foram encontrados relatos na literatura descrevendo a produção dessas enzimas por esta espécie utilizando sabugo de milho. Assim, os resultados obtidos foram comparados com outras espécies. FREITAS(2018) encontrou 1,1 U/g de β -glicosidase após 96h de cultivo do fungo *Byssoschlamysspectabilis* em sabugo de milho e SANTOS (2021) observou que a produção desta enzima não atingiu valores consideráveis cultivando *Penicillium sp*, também em sabugo de milho. Este mesmo autor, no entanto, encontrou uma atividade de cerca de 12 U/g de CMCase após 240h de cultivo. ISMAIL (2022) observou uma atividade de xilanase de 53,3 U/g em 240h de cultivo utilizando *Aspergillus flavus AW1*, no mesmo substrato. Os resultados obtidos demonstram estar alinhados com os da literatura, considerando condições análogas de produção enzimática, não descartando também a necessidade de outros estudos para aprimoramento da aplicação do sabugo de milho para obtenção de celulases e hemicelulases.

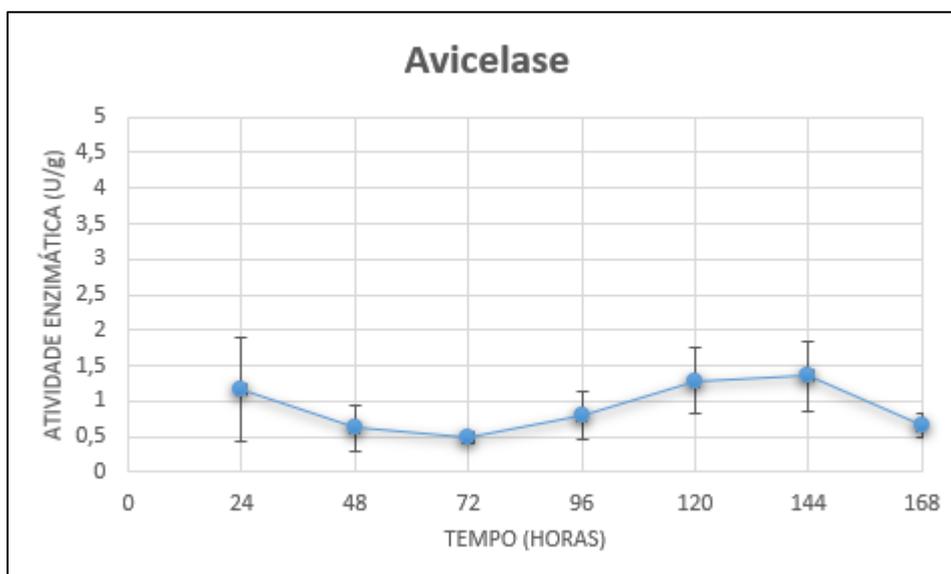


Figura 15 - Curva de produção de Avicelase em função do tempo no substrato sabugo de milho por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

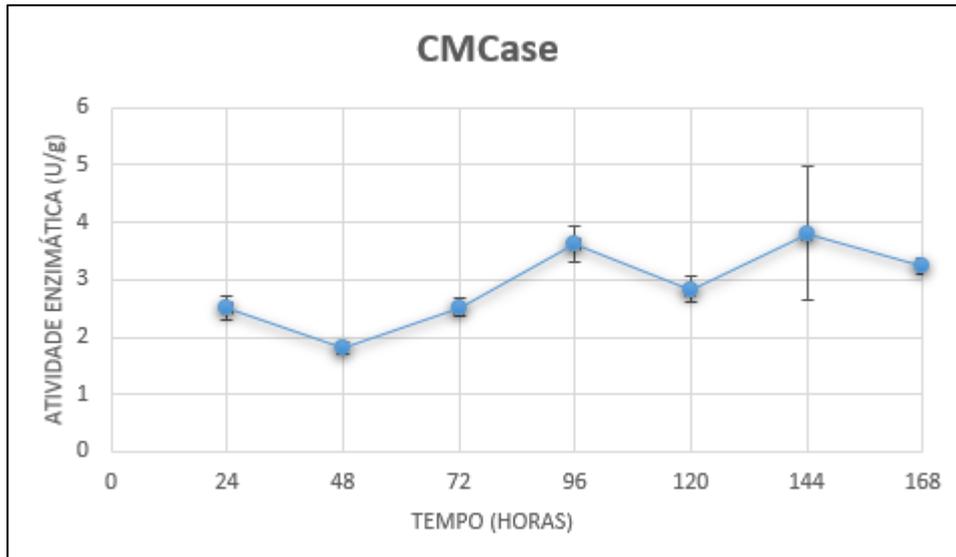


Figura 16 - Curva de produção de CMCase em função do tempo no substrato sabugo de milho por *P. clamydosporea*. Fonte: autor.

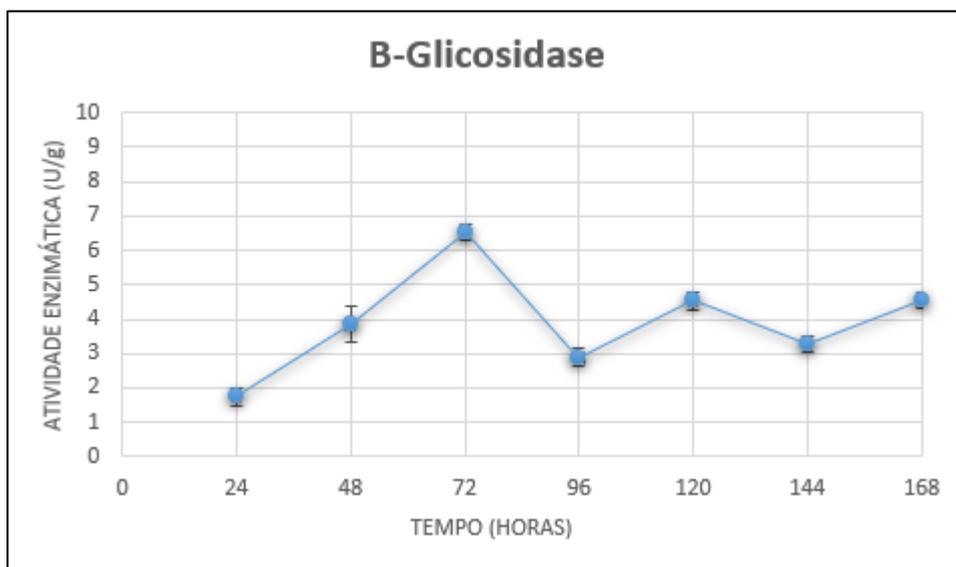


Figura 17 - Curva de produção de β-glicosidase em função do tempo no substrato sabugo de milho por *P. clamydosporea*. Fonte: autor.

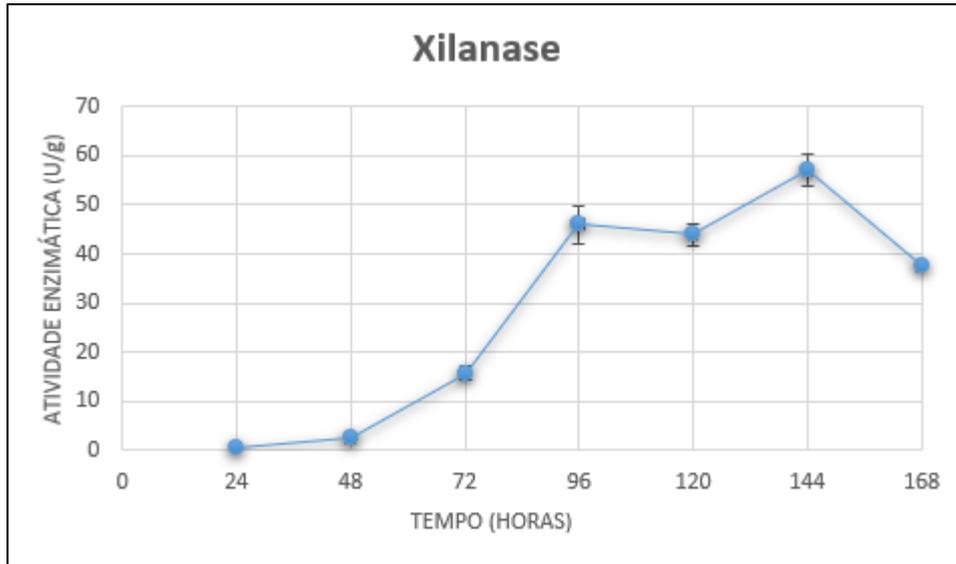


Figura 18 - Curva de produção de Xilanase em função do tempo no substrato sabugo de milho por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

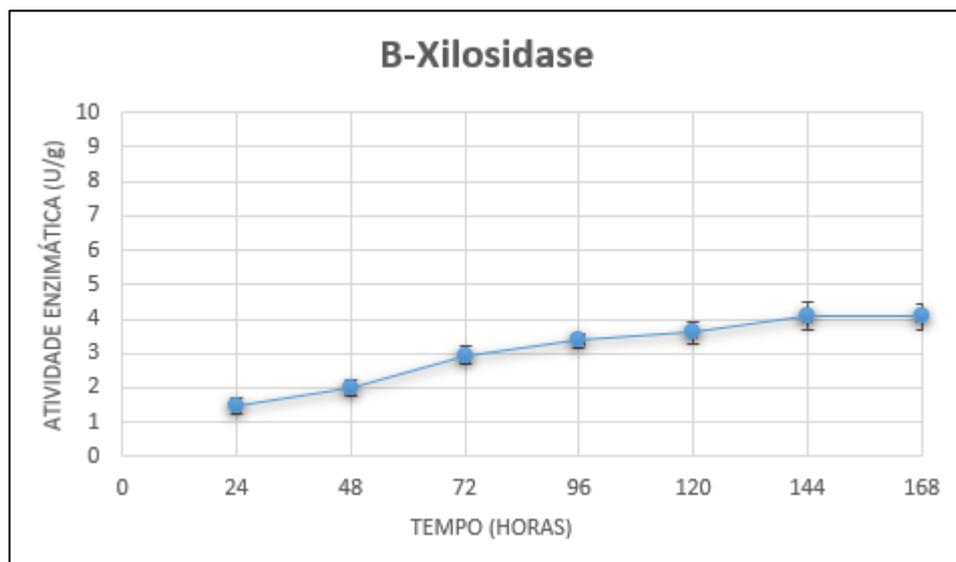


Figura 19 - Curva de produção de β -xilosidase em função do tempo no substrato sabugo de milho por *P. clamydosporia*. Fonte: autor.

3.5.COMPARAÇÃO ENTRE SUBSTRATOS

A Tabela 2 resume os resultados obtidos comparando os três substratos e indica que, o farelo de trigo foi mais favorável para o crescimento do fungo *P. clamydosporia* e, conseqüentemente, para produção das enzimas, em especial, a β -glicosidase, provavelmente devido à composição rica em celulose e proteínas deste substrato. Estes dados são promissores, visto que essa enzima é extremamente importante no processo de sacarificações enzimáticas de

biomassas lignocelulósicas, pois é responsável pela hidrólise de dímeros de celobiose em moléculas de glicose fermentescíveis (RODRIGUES et al., 2021).

Tabela 2: Pico de atividade enzimática por substrato. Fonte: autor.

Enzima	Pico de atividade enzimática em cada substrato (U/g)		
	Farelo de trigo	Bagaço de cana-de-açúcar	Sabugo de milho
Avicelase	3,81 ± 0,74	2,65 ± 0,36	1,34 ± 0,49
CMCase	3,26 ± 0,11	1,76 ± 0,09	3,8 ± 1,17
β-glicosidase	51,43 ± 3,79	0,64 ± 0,13	6,53 ± 0,22
FPase	1,51	-	-
Xilanase	8,49 ± 1,03	3,51 ± 0,69	56,91 ± 3,24
β-xilosidase	33,31 ± 0,79	0,83 ± 0,14	4,07 ± 0,37

3.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

O extrato bruto obtido na fermentação 1 com farelo de trigo após 168 horas de cultivo foi selecionado para a caracterização físico-química da enzima β-glicosidase. Os parâmetros analisados foram pH ótimo, temperatura ótima, pH de estabilidade e termoestabilidade (Figuras 20, 21, 22 e 23).

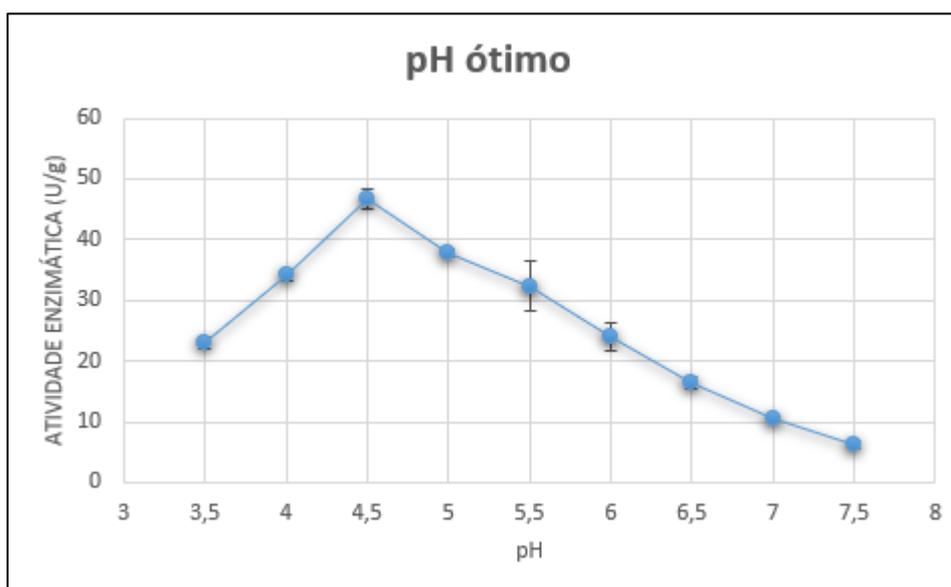


Figura 20 - Determinação de pH ótimo da β-glicosidase de *P. clamydosporia* (extrato F1 de 168h). Fonte: autor.

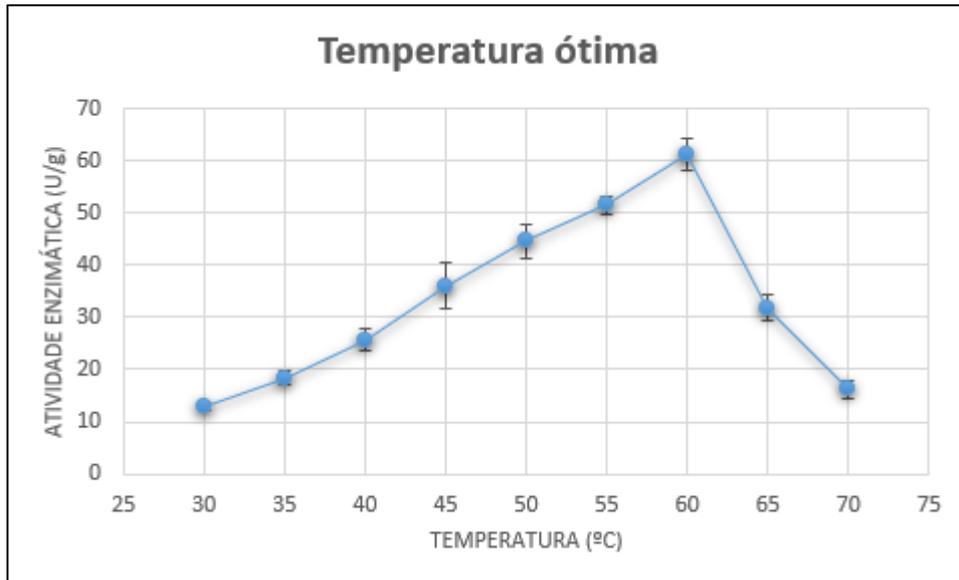


Figura 21 - Determinação da temperatura ótima para β -glicosidase de *P. clamydosporia* (extrato F1 de 168h). Fonte: autor.

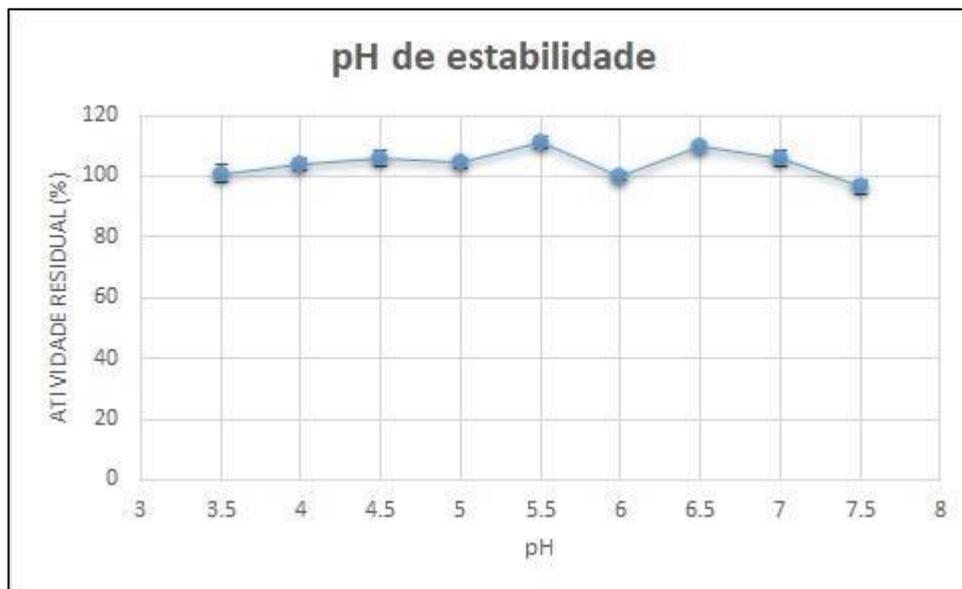


Figura 22 - Determinação de pH de estabilidade da β -glicosidase de *P. clamydosporia* (extrato F1 de 168h), em diferentes faixas de pH após 24h. Fonte: autor.

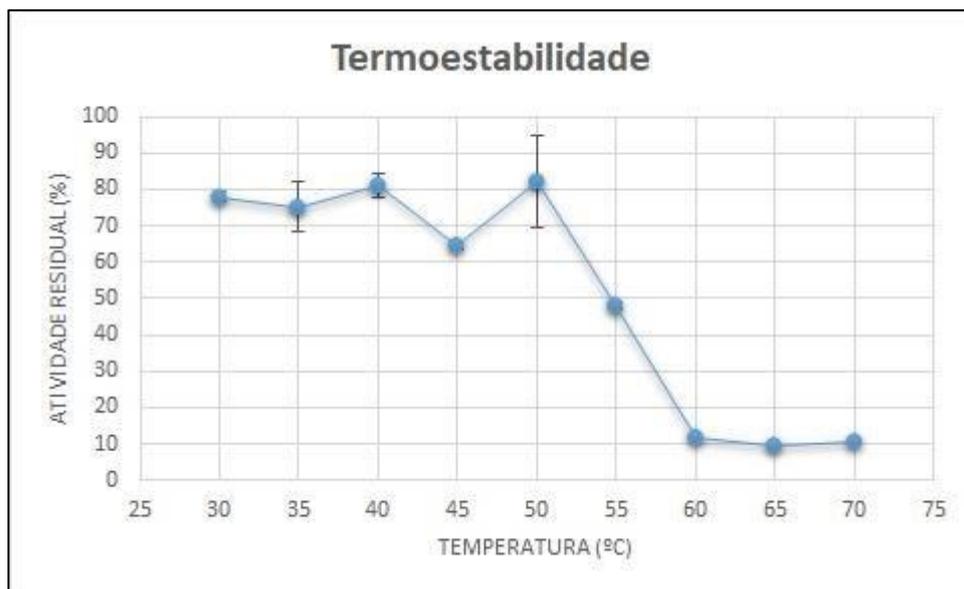


Figura 23 - Determinação da termoestabilidade da β -glicosidase de *P. clamydosporia* (extrato F1 de 168h), em diferentes faixas de temperatura por um período de 1h. Fonte: autor.

O pH ótimo encontrado foi de 4,5, quando a atividade enzimática atingiu um pico de 46,64 U/g, indicando que esta enzima apresenta caráter acidófilo. Esta natureza acidófila também foi descrita para β -glicosidase de *A. niger* (Rodrigues et al, 2017) e de *Trametes villosa* (Correa et al. 2023). A temperatura ótima, analisada nas condições ótimas de pH, foi de 60°C, atingindo 61,42 U/g. Em relação ao pH de estabilidade, a enzima demonstrou ser altamente estável em todas as faixas de pH analisadas. Quanto à termoestabilidade, a atividade residual observada frente às mudanças de temperatura foi satisfatória, apresentando 82% após 60 minutos de incubação a 50°C.

Estes dados estão de acordo com CORREA et al. (2023) que também obtiveram atividade ótima para β -glicosidase de *T. villosa* (F4) no pH 4,5 e a 65°C, bem como estabilidade entre os pHs 4,5–5,5 e 45–65 °C, demonstrando propriedades acidofílicas e termotolerância. RODRIGUES et al. (2017) também observaram quedas bruscas na atividade da β -glicosidase de *A. niger* quando a enzima foi incubada por 1 hora em temperaturas superiores a 55° C.

Estes resultados são promissores, dada a importância dessas duas variáveis no processo de hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis. Alterações nos valores de pH e temperatura podem ocasionar desnaturação proteica das enzimas, gerando alterações (sobretudo perdas) em

sua atividade (NELSON; COX; 2014). Portanto, a estabilidade da enzima analisada frente a variações no pH mostra um grande potencial para sua aplicação. Quanto à temperatura, observou-se queda acentuada na atividade residual da enzima em faixas acima de 50°C, o que é comum, visto que enzimas microbianas tendem a apresentar melhor desempenho entre 30 e 50°C, sendo pouco resistentes a temperaturas elevadas (NELSON; COX; 2014). O ideal, para essa enzima, é que ela seja utilizada em processos de hidrólise com temperatura igual ou inferior a 50°C (RODRIGUES et al. 2017).

3.7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Após a hidrólise enzimática nos substratos brutos e pré-tratados, utilizando o extrato de *P. clamydosphorya* com maior concentração de β -glicosidase (F1 após 168 h), observou-se diferentes perfis de liberação de ART (Figura 23). Os resultados indicam que a produção de ART foi maior em ambas as biomassas pré-tratadas, reforçando a importância de uma etapa de pré-tratamento para potencializar a sacarificação enzimática. O pré-tratamento da biomassa é importante pois auxilia na remoção da lignina e hemiceluloses, diminuindo a recalcitrância e complexidade do material, fazendo com que o acesso das enzimas à celulose seja facilitado, melhorando a liberação de açúcares fermentescíveis (HONGZHANG CHEN; LAN WANG, 2017, PARK et al., 2018). Os dados obtidos mostram ainda que a hidrólise com SM liberou mais ART do que com BC, provavelmente devido a menor porcentagem de lignina e maior concentração de polissacarídeos, no sabugo de milho pré-tratado (Figura 23).

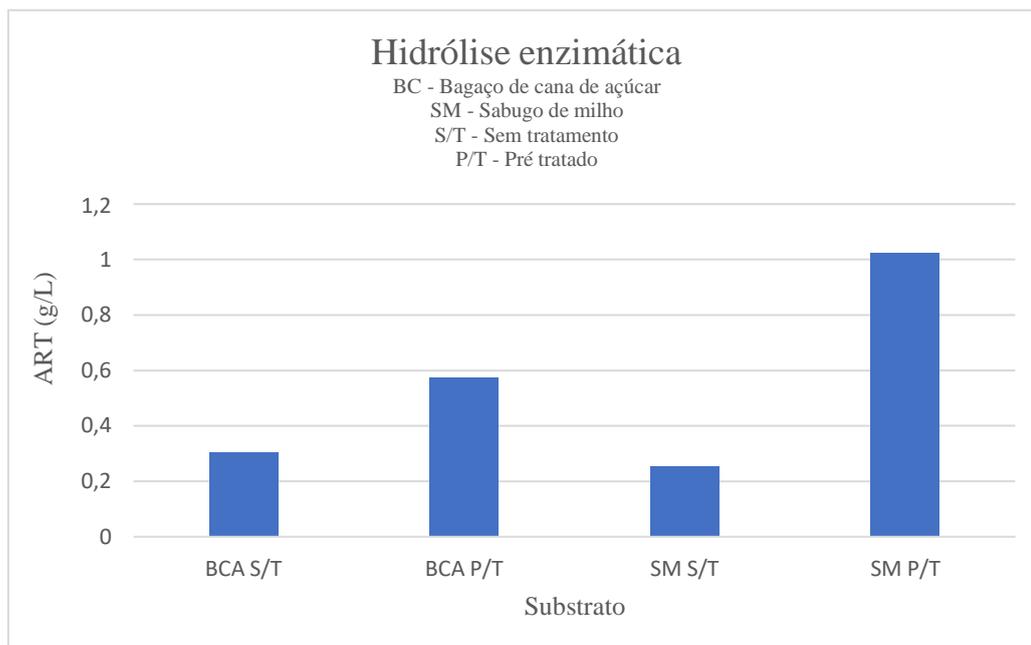


Figura 24 - Concentração de ART após sacarificação de bagaço de cana e sabugo de milho, utilizando extrato enzimático caseiro de *P. clamydosporia* (extrato F1 de 168h). Fonte: autor.

De acordo com a Figura 24, observou-se um aumento de 89,8% de ART após a hidrólise utilizando PT BC, passando de 0,303 para 0,575 g/L, enquanto em PT SM esse aumento foi de 402,4%, indo de 0,254 para 1,022 g/L, demonstrando o impacto positivo da etapa de pré-tratamento na produção de ART. Estes dados estão de acordo com ARAUJO (2022), que obteve aumentos de 91,6% e 320%, para estas biomassas em relação às brutas, respectivamente.

Quanto aos valores de ART encontrados, pode-se inferir que foram resultados positivos para um extrato enzimático caseiro produzido por apenas uma espécie fúngica, sobretudo nos ensaios utilizando os substratos que passaram pelo pré-tratamento, que renderam 0,575 e 1,022 g/L de ART.

Até o momento, não foram encontrados estudos prévios utilizando coquetéis de enzimas caseiras aplicados na sacarificação de bagaço de cana e sabugo de milho pré-tratados por organossolve, especificamente. Como exemplo em outras biomassas, BRANDAN et al. (2010) encontraram 0,05 e 0,3 g/L de ART aplicando coquetéis enzimáticos caseiros produzidos por *Ganoderma lucidum* e *Lentiluna edodes* a eucaliptotriturado e pré tratado com etanol (organossolve), com proporções de celulose, hemicelulose e lignina muito similares aos utilizados neste trabalho.

Desta forma, os resultados do presente estudo demonstram relevância científica por trazerem novas condições de hidrólise, utilizando um coquetel enzimático caseiro de *P. clamydosporia*, produzido por FES, de custo relativamente baixo em relação a enzimas comerciais, em biomassas pré-tratadas por organossolve.

4. CONCLUSÃO

A fermentação em estado sólido utilizando o fungo *Pochonia clamydosporia* foi eficiente na produção de enzimas do complexo hemicelulolítico, em especial β - glicosidase. Entre os substratos investigados, o farelo de trigo se destacou na produção de β -glicosidase, com pico de atividade de 51,43 U/g, após 168 horas. A caracterização dessa enzima demonstrou propriedades acidófilas e termotolerância, além de estabilidade em ampla faixa de pH (3,5 a 7,5) e em temperaturas de até 50°C.

Na hidrólise enzimática, as biomassas pré tratadas se destacaram quanto à liberação de açúcares redutores totais (ART), em relação às biomassas brutas. Este aumento foi de 89,8% de ART após a hidrólise utilizando bagaço de cana-de-açúcar prétratado, passando de 0,303 para 0,575 g/L, enquanto em sabugo de milho pré tratado esse aumento foi de 402,4%, indo de 0,254 para 1,022 g/L, demonstrando a importância da etapa de pré-tratamento para os processos de hidrólise enzimática.

Os resultados obtidos são promissores e reforçam a importância de investigar e testar novas espécies para a produção de enzimas degradadoras de celulose e hemicelulose, visto a necessidade do avanço dessa tecnologia frente ao desafio energético e os custos elevados de coquetéis enzimáticos comerciais, que limitam a produção de etanol 2G em larga escala.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, María C. Villegas et al. Use of wheat bran for the production of β -glucosidase, xylanase, β -xylosidase and CMCase BY *Aspergillus awamori*. I CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL, 2024.

ALVES, Tales Prado. Otimização da extração e caracterização parcial de celulases fúngicas obtidas por fermentação em estado sólido do bagaço da cana-de-açúcar. 2017. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química), 2017.

ARANDA-MARTINEZ, Almudena et al. Ethanol production from chitosan by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Microbiological Research*, v. 204, p. 30-39, nov. 2017.

ARAÚJO, Nathália Dias. Pré-tratamento organossolve de palha e sabugo de milho, e de palha e bagaço de cana-de-açúcar, visando a produção de etanol 2g. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, 30 set. 2022.

BANSAL, Namita et al. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues, *Waste Manag.* 32, 1341–1346, 2012.

BRANDAM, Leonardo de Castro et al. Avaliação do tempo de hidrólise de enzimas lignocelulolíticas de fungos basidiomicetos. 5º CONGRESSO INTERNACIONAL BIOENERGIA, p. 8p, 11 out. 2010.

CHAUDHARY, Vasu. Production of sustainable biocrude from Canadian agricultural biomass: Process optimization and product characterization. *Fuel Processing Technology*, 8 jul. 2024.

CROTMAN, Bruno et al. Assessing the feasibility of electric energy generation from agricultural waste in Brazil. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, v. 68, p. 1, 3 set. 2024.

DE CASTRO, Aline Machado; JUNIOR, Nei Pereira. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n.1, p. 181-188, 2010.

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, 18 dez. 2017.

ERGUN, Seyma Ozcirak; UREK, Raziye Ozturk. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals Of Agrarian Science*, [s.l.],v. 15, n. 2, p.273-277, jun. 2017. Elsevier BV.

ESTEVES, Ivânia et al. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamyosporia*. *Mycological Research*, v. 113, n. 8, p. 867-876, ago. 2009.

FREITAS, Haroldo Martins de. Produção de β -glicosidase pelo fungo *Byssochlamys spectabilis* por meio do Cultivo em Estado Sólido - CES. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, 2018.

GHOSE, T. K. MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1 jan. 1987.

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

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HENDGES, Camila et al. RESÍDUOS x AGRICULTURA: CLASSIFICAÇÃO, TRATAMENTO E DESTINAÇÃO FINAL AMBIENTALMENTE ADEQUADOS. Scientia Agraria Paranaensis – Sci. Agrar. Parana, v. 18, ed. 1, p. 1-8, 2019.

HONGZHANG CHEN; LAN WANG. Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Biomass. In: Technologies for Biochemical Conversion of Biomass. p. 65–99. 2016.

IEA. Internacional Energy Agency. World Energy Outlook 2023. Acesso em: <https://www.iea.org/reports/world-energy-outlook-2023>.

IDRIS, Ayman Salih Omer et al. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. Bioresource Technology, v. 242, p.265-271. Elsevier BV. out. 2017.

ISMAIL, Shaymaa A.; NOUR, Shaimaa A.; HASSAN, Amira A. Valorization of corn cobs for xylanase production by *Aspergillus flavus* AW1 and its application in the production of antioxidant oligosaccharides and removal of food stain. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 41, maio 2022.

KHASWAL, Ashutosh et al. Microbial enzyme production: Unlocking the potential of agricultural and food waste through solid-state fermentation. Bioresource Technology Reports, 15 jun. 2024.

LOPES, M. Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho suplementado com proteína de farelo de soja solubilizada para obtenção de bioethanol. 2015. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, 2015.

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.

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

NELSON, D. L.; COX, M.M. *Principles of biochemistry: LEHNINGER*. 6. ed. Madison: Artmed., 1328 p. 2004.

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.

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

RAHARDJO, Yovita S.P et al. Modeling conversion and transport phenomena in solid- state fermentation: A review and perspectives. *Biotechnology Advances*, v. 24, ed. 2, p.161-179, march-april 2006.

RAMANAIAH Illuri et al. Production, partial purification and characterization of ligninolytic enzymes from selected basidiomycetes mushroom fungi, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021.

RODRIGUES, Patrícia de Oliveira et al. Xylanase and β -glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments. *Industrial Crops and Products*, [s.l.], v. 95, p.453-459, jan. 2017. Elsevier BV.

RODRIGUES, Patrícia de Oliveira et al. Synergistic action of an *Aspergillus* hemi-cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops & Products*, 25 set. 2017.

RODRIGUES, Patrícia de Oliveira et al. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. *Renewable Energy*, v. 145, p. 2683-2693, jan. 2020.

RODRIGUES, Patrícia de Oliveira et al. On-site Produced Enzyme Cocktails for Saccharification and Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Fractionated by Hydrothermal and Alkaline Pretreatments. *Waste and Biomass Valorization*, 16 jun. 2021.

ROMERO-PELÁEZ, R. D. Et al.,. Obtenção de enzimas lignocelulolíticas de monocultivos e cocultivos de fungos filamentosos em fermentação submersa usando biomassas vegetais da agroindústria do dendê. In: ENCONTRO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA EMBRAPA AGROENERGIA, 4.,2017, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa, 2017. p. 107-113.

SANTOS, Fernando A et al. Potencial do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 13 jan. 2012.

SANTOS, Felipe Augusto. Produção de celulases por *penicillium* sp. fsde15 e hidróliseenzimática do sabugo de milho. Orientador: Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos. 2021. Mestrado (Engenharia Química), 2021.

SCARPA, Josiani de Cassia Pereira 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, 111795, 1 dez. 2019.

SCHNEIDER, Willian Daniel Hahn et al. Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. *Process Biochemistry*, v. 66, p.162-170, mar. 2018.

STEPHENS, Evan et al. Prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends in Plant Science*, v. 15, n. 10, p. 554-564, out. 2010.

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

TEIXEIRA, Wéllen Fabrícia Aviz et al. Minimal Enzymes Cocktail Development by Filamentous Fungi Consortia in Solid-State Cultivation and Valorization of Pineapple Crown Waste by Enzymatic Saccharification. *Waste and Biomass Valorization*, v. 12, p. 2521–2539, 11 ago. 2020.

TIAN, Dong et al. A comparison of various lignin-extraction methods to enhance the accessibility and ease of enzymatic hydrolysis of the cellulosic component of steam-pretreated poplar. *Biotechnology for Biofuels*, p. 1-10, 2017.

TIWARI S., et al. Sugarcane baggase agro-waste material used for renewable cellulase production from streptococcus and Bacillus sp. *Res. J. Microbiol.* 2017.

WEI-KIT, D., et al. Application of Organosolv Pretreatment on Pennisetum Purpureum for Lignin Removal and Cellulose Recovery. *ACM ISBN*. p. 84-90, 2017.

WORLD ENERGY BALANCES: DATABASE DOCUMENTATION (2020 edition) - International Energy Agency (IEA).

YI, Xiong; GUO, Yancui; KHAN, Raja Asad Ali; FAN, Zhenyu. Understanding the pathogenicity of *Pochonia chlamydosporia* to root knot nematode through omics approaches and action mechanism. *Biological Control*, v. 162, 2021.

ZHONG, Qiumeng et al. Incorporating scarcity into footprints reveals diverse supply chain hotspots for global fossil fuel management. *Applied Energy*, 2 ago. 2023.