



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DE CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS
PARA PRODUÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS POR *Penicillium ucsense*
S1M29 EM CULTIVO SUBMERSO**

SIMONE ZACCARIA

Caxias do Sul

2024

Simone Zaccaria

**ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS
PARA PRODUÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS POR *Penicillium ucsense*
S1M29 EM CULTIVO SUBMERSO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

CAXIAS DO SUL
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

Z13e Zaccaria, Simone

Estratégias de utilização de biomassas lignocelulósicas para produção de coquetéis enzimáticos por *Penicillium ucsense* S1M29 em cultivo submerso [recurso eletrônico] / Simone Zaccaria. – 2024.

Dados eletrônicos.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Orientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. *Penicillium*. 2. Enzimas. 3. Lignocelulose. 4. Celulase. 5. Biotecnologia. I. Dillon, Aldo José Pinheiro, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 582.282.123.2

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

**ESTRATÉGIAS DE UTILIZAÇÃO DE BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS
PARA PRODUÇÃO DE COQUETÉIS ENZIMÁTICOS POR *Penicillium ucsense*
S1M29 EM CULTIVO SUBMERSO**

Simone Zaccaria

Tese submetida a banca examinadora designada pela coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Doutor em Biotecnologia.

Aprovada em ____ de _____ de 2024

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profa. Dra. Eloane Malvessi
Universidade de Caxias do Sul - UCS

Prof. Dr. José Geraldo Pradella
Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

AGRADECIMENTOS

A todos que me apoiaram durante a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

- Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Lourdes, por guiarem meus passos e iluminarem meu caminho, orientando-me em qual direção seguir.

- Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, pela confiança em mim depositada e pelo incentivo durante esta jornada.

- Agradeço a Dra. Roselei Claudete Fontana, pela paciência, disponibilidade, ensinamentos, e suporte durante todo o período de doutorado, tornando este momento possível. E a Profa. Dra. Marli Camassola, também sempre presente com ideias, incentivos e entusiasmo durante este trabalho.

- Aos professores da banca de acompanhamento, Profa. Dra. Eloane Malvessi e Profa. Dra. Mirian Salvador, bem como aos membros da banca de avaliação, Prof. Dr. Adriano Brandelli e Prof. Dr. José Geraldo Pradella, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

- Aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas, por todos os momentos compartilhados e pela troca de conhecimentos.

- À Universidade de Caxias do Sul e aos órgãos de fomento CAPES e FAPERGS.

- Um agradecimento especial à Gabriele Menegotto, bolsista de iniciação científica, pela ajuda na realização das diversas atividades deste trabalho, pela amizade e pelo companheirismo.

- Agradeço também ao Imperial College London, e a meu orientador Jason P. Hallet. Apesar da pandemia ter impedido o término da pesquisa e o uso dos resultados, o tempo e aprendizado adquiridos permanecerão comigo para sempre.

- Agradeço aos meus pais, Nair e Denir, meus maiores exemplos e meus heróis, por me cercarem de carinho e bons princípios. E aos meus irmãos Edilso, Cedenir, Cedinei e Silvane, pelo companheirismo e apoio incondicional.

"A ciência é feita de erros, mas de erros que é preciso cometer, pois pouco a pouco eles conduzem a verdade"

Jules Verne, Viagem ao centro da Terra.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	ENERGIA RENOVÁVEL	18
2.2	MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	19
2.2.1.	Bagaço de cana-de-açúcar.....	21
2.2.2.	Capim elefante	22
2.2.3.	Polpa de eucalipto/pinus	22
2.2.4.	Resíduos da colheita do milho	23
2.3	PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	23
2.4	ENZIMAS CELULOLÍTICAS	24
2.2.1.	Celulases	24
2.2.2.	Xilanases	25
2.5	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS	26
2.2.3.	Gênero <i>Penicillium</i>.....	27
2.6	PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS	27
3.	OBJETIVOS	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1	DIFERENTES CONDIÇÕES DE INÓCULO NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE <i>Penicillium ucsense</i> S1M29 EM CULTURAS SUBMERSAS	33
4.2	BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS UTILIZADAS EM REGIME DESCONTÍNUO E DESCONTÍNUO ALIMENTADO RESULTAM EM DIFERENTES COMPORTAMENTOS NA SECREÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR <i>Penicillium ucsense</i> S1M29.....	42
4.3	PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR <i>Penicillium ucsense</i> EM BIORREATOR, UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E CAPIM ELEFANTE COMO PRINCIPAIS FONTES DE CARBONO, MAIS ADITIVOS	68
4.4	CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E XILANASES PRODUZIDAS POR <i>Penicillium ucsense</i> S1M29 EM PROCESSO SUBMERSO UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS.....	90
4.5	PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR <i>Penicillium ucsense</i> UTILIZANDO RESÍDUOS DA COLHEITA DE MILHO COMO SUBSTRATO.....	112
4.6	CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E XILANASES PRODUZIDAS POR <i>Penicillium ucsense</i> S1M29 EM PROCESSO SUBMERSO UTILIZANDO RESÍDUOS DA COLHEITA DE MILHO	136
5	DISCUSSÃO GERAL	173

6	CONCLUSÕES.....	183
7	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	184
8	REFERÊNCIAS.....	185

LISTA DE TABELAS

Artigo 1. Diferentes condições de inóculo na produção enzimática de *Penicillium ucsense* S1M29 em culturas submersas

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos após 96 horas de cultivo submerso de *P. ucsense* em frascos agitados, utilizando inóculo com diferentes tempos de cultivo e celulose comercial como fonte de carbono.....37

Tabela 2. Atividades enzimáticas em cultivos de *P. ucsense* em frascos agitados em função do tempo de inóculo, utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas.....39

Artigo 2. Biomassas lignocelulósicas utilizadas em regime descontínuo e descontínuo alimentado resultam em diferentes comportamentos na secreção de celulasas e xilanases por *Penicillium ucsense* S1M29

Tabela 1. Composição das diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas por explosão a vapor ou com peróxido em meio alcalino.....51

Tabela 2. Percentual de retenção das biomassas pré-tratadas em peneiras da ASTM (mesh) devido a sua granulometria.....52

Tabela 3. Atividades enzimáticas em cultivos submersos em meio formulado com biomassas (bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante, polpa de eucalipto e pinus) úmidas, secas e secas e trituradas.....53

Tabela 4. Aumento ou declínio nas atividades enzimáticas em regime descontínuo alimentado, em relação ao regime descontínuo, para as diferentes biomassas e o controle com celulose.....60

Artigo 3. Produção de celulasas e xilanases por *Penicillium ucsense* em regime descontínuo alimentado utilizando bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante como principais fontes de carbono

Tabela 1. Efeito de aditivos - farelo de trigo, farelo de soja e sacarose - nas atividades enzimáticas de *P. ucsense* em cultivo em frasco agitado com bagaço de cana de açúcar como principal fonte de carbono.....76

Tabela 2. Efeito da mistura ou suplementação do bagaço de cana de açúcar com celulose ou lactose nas atividades enzimáticas de *P. ucsense* em cultivos em frascos agitados.....78

Tabela 3. Efeito de aditivos - farelo de trigo, farelo de soja e sacarose - nas atividades enzimáticas de *P. ucsense* em cultivo com capim elefante como principal fonte de carbono. Os cultivos em frascos agitados foram mantidos a 28°C, por até 96 horas.....84

Tabela 4. Efeito da mistura, ou da suplementação, do capim elefante com celulose ou lactose nas atividades enzimáticas de *P. ucsense* em cultivos em frascos agitados, mantidos a 28°C, por 96 horas.....85

Artigo 5. Produção de celulasas e xilanases por *Penicillium ucsense* utilizando resíduos da colheita de milho como substrato

Tabela 1. Caracterização da biomassa proveniente de resíduos da colheita de milho, *in natura*, e após ser submetida a diferentes pré-tratamentos. Os valores estão apresentados em fração percentual na composição da biomassa lignocelulósica.....122

Tabela 2. Caracterização dos licores e da água de lavagem da biomassa proveniente dos diferentes pré-tratamentos de resíduos da colheita de milho. Os valores estão apresentados em mg.mL⁻¹124

Tabela 3. Resultados obtidos para a produção de diferentes enzimas avaliadas, utilizando resíduos de milho *in natura* e pré-tratados em diferentes métodos, secos e úmidos, como principal fonte de carbono. Os cultivos foram realizados em frascos agitados, contendo 100 mL de meio, mantidos sob agitação recíproca, a 28°C por 96h.....125

Tabela 4. Atividades enzimáticas obtidas nas diferentes condições de cultivo avaliadas, utilizando licor proveniente do pré-tratamento, ou o pré-tratamento na íntegra. Os cultivos foram realizados em frascos agitados, contendo 100 mL de meio, mantidos sob agitação recíproca, a 28°C por 96h.....130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composição do material lignocelulósico na parede celular (Adaptada de Zabed <i>et al.</i> , 2016).....	19
Figura 2. Representação esquemática do processo de clivagem da celulose pelo complexo enzimático celulolítico (Adaptado de Juturu & Wu, 2014).....	25
Artigo 1. Diferentes condições de inóculo na produção enzimática de <i>Penicillium ucsense</i> S1M29 em culturas submersas	
Figura 1. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E) obtidas em cultivo em biorreator com agitação mecânica (STR) de <i>P. ucsense</i> , utilizando celulose como indutor, a 28°C, por 96 horas, incubado com inóculo crescido por 48h (□) e 72h (▲).....	40
Artigo 2. Biomassas lignocelulósicas utilizadas em regime descontínuo e descontínuo alimentado resultam em diferentes comportamentos na secreção de celulases e xilanases por <i>Penicillium ucsense</i> S1M29	
Figura 1. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E) obtidas em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo. (●) celulose, (▲) SB, bagaço de cana-de-açúcar, (▼) EG, capim elefante e (■) PEP. Os cultivos ocorreram a 28°C, por 96 horas.....	55
Figura 2. Crescimento micelial (A), oxigênio dissolvido (B), frequência dos impelidores (C), consumo de sacarose (D) e glicose livre no meio (E) durante os cultivos em regime descontínuo, em biorreator com agitação mecânica. (●) celulose, (▲) SB (bagaço de cana-de-açúcar), (▼) EG (capim elefante) e (■) PEP (polpa de eucalipto/pinus0. A temperatura foi mantida a 28°C e o tempo de cultivo foi de 96 horas.....	57
Figura 3. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E) obtidas em cultivo submerso conduzido em regime descontínuo alimentado, em biorreator com agitação mecânica. (●) Celulose, (▲) SB - bagaço de cana-de-açúcar, (▼) EG - capim elefante e (■) PEP - polpa de eucalipto/pinus. Os cultivos foram mantidos a 28°C, por 168 horas.....	59
Figura 4. Crescimento micelial (A), oxigênio dissolvido (B), frequência dos impelidores (C), consumo de sacarose (D) e glicose livre no meio (E) durante cultivos em regime descontínuo alimentado. (●) celulose, (▲) SB – bagaço de cana-de-açúcar, (▼) EG – capim elefante e (■) PEP – polpa de eucalipto/pinus. Os cultivos foram conduzidos em biorreator com agitação mecânica (STR) a 28°C por 168 horas.....	62
Figura 5. Zimogramas para a atividade de β -glicosidases (A), Endoglicanases (B) e Xilanases (C), e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas (D) produzidas por <i>P. ucsense</i> em cultivos submersos, conduzidos em biorreator com agitação mecânica, em regimes descontínuo (RD) e descontínuo alimentado (RDA).....	63
Figura 6. Glicose liberada da hidrólise de (A) Bagaço de cana-de-açúcar, (B) Capim elefante, (C) Polpa de eucalipto/pinus por diferentes soluções enzimáticas obtidas de <i>P. ucsense</i> . As soluções enzimáticas foram obtidas em meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono em regime descontínuo (celulose, bagaço de cana-de-açúcar - SB, capim elefante - EG, e polpa de eucalipto/pinus – PEP), Utilizou-se um volume de enzima para uma atividade total de 15 FPU/g do substrato a ser hidrolisado. Como controle foi utilizado o complexo enzimático comercial Celluclast®.....	65
Artigo 3. Produção de celulases e xilanases por <i>Penicillium ucsense</i> em regime	

descontínuo alimentado utilizando bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante como principais fontes de carbono

Figura 1. Efeito da sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar, em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo alimentado. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E).....80

Figura 2. Parâmetros do processo fermentativo decorrentes da sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar, em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo alimentado. Consumo de sacarose (A), biomassa micelial (B), oxigênio dissolvido (C), frequência dos agitadores (D).....82

Figura 3. Efeito da sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos em cultivo com capim elefante em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo alimentado. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E).....87

Figura 4. Parâmetros do processo fermentativo decorrentes da sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos em cultivo com capim elefante em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo alimentado. Consumo de sacarose (A), biomassa micelial (B), oxigênio dissolvido (C), frequência dos agitadores (D).....88

Artigo 4. Caracterização de celulasas e xilanases produzidas por *Penicillium ucsense* S1M29 em processo submerso utilizando diferentes substratos

Figura 1. Atividades relativas de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), e Xilanases (D) observadas em diferentes temperaturas de reação.....95

Figura 2. Atividades relativas de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), e Xilanases (D) observadas em diferentes valores de pH.....98

Figura 3. Estabilidade de FPA ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D), mantidos a 50°C.....100

Figura 4. Estabilidade de endoglicanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) mantidos a 50°C.....101

Figura 5. Estabilidade de β -glicosidases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) mantidos a 50°C.....103

Figura 6. Estabilidade de xilanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) mantidos a 50°C.....104

Figura 7. Termoestabilidade de FPA ao longo do tempo observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) em pH 4,8.....106

Figura 8. Termoestabilidade de endoglicanases ao longo do tempo observada para três

coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) em pH 4,8.....107

Figura 9. Termoestabilidade de β -glicosidasas ao longo do tempo observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) em pH 4,8.....108

Figura 10. Termoestabilidade de xilanases ao longo do tempo observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) em pH 4,8.....110

Artigo 5. Produção de celulasas e xilanases por *Penicillium ucsense* utilizando resíduos da colheita de milho como substrato

Figura 1. Gráficos de pareto para o efeito dos indutores sacarose (As), farelo de trigo (FT) e farelo de soja (FS) na produção de enzimas celulolíticas por *P. ucsense* cultivado em resíduos de milho em estado submerso.....127

Figura 2. Gráficos de superfície de resposta para as diferentes enzimas celulolíticas produzidas por *P. ucsense* S1M29, em regime submerso, utilizando resíduos da colheita do milho como principal fonte de carbono e considerando o uso de 7,5 g.L⁻¹ de farelo de soja.....129

Figura 3. Atividades enzimáticas observadas em cultivo com resíduos da colheita do milho, em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo e descontínuo alimentado. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidasas (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E).....133

Artigo 6. Caracterização de celulasas e xilanases produzidas por *Penicillium ucsense* S1M29 em processo submerso utilizando resíduos da colheita de milho

Figura 1. Zimogramas para a atividade de β -glicosidasas (A), Endoglicanases (B) e Xilanases (C), e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas (D) produzidas por *P. ucsense* em cultivos submersos utilizando resíduos da colheita do milho, conduzidos em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo (RD), regime descontínuo com adição de licor proveniente do pré-tratamento (RDL) e regime descontínuo alimentado (RDA).....143

Figura 2. Atividades relativas de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidasas (C), exoglicanases (D) e Xilanases (E) observadas em diferentes temperaturas de reação.....145

Figura 3. Atividades relativas de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidasas (C), exoglicanases (D) e Xilanases (E) observadas em diferentes valores de pH.....148

Figura 4. Estabilidade de FPA ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E), mantidos a 50°C.....151

Figura 5. Estabilidade de endoglicanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes

condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) mantidos a 50°C.....153

Figura 6. Estabilidade de β -glicosidases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) mantidos a 50°C.....155

Figura 7. Estabilidade de exoglicanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) mantidos a 50°C.....157

Figura 8. Estabilidade de xilanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) mantidos a 50°C.....159

Figura 9. Termoestabilidade de FPA ao longo do tempo observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8.....161

Figura 10. Termoestabilidade de endoglicanases ao longo do tempo observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8.....163

Figura 11. Termoestabilidade de β -glicosidases ao longo do tempo observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8.....165

Figura 12. Termoestabilidade de exoglicanases ao longo do tempo observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8.....167

Figura 13. Termoestabilidade de xilanases ao longo do tempo observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8.....169

Figura 14. Glicose liberada da hidrólise de resíduos da colheita do milho (A) *in natura*, (B) pré-tratado com NaOH 2%, (C) pré-tratado com H₂SO₄ 1%, (D) pré-tratado hidrotérmico, e das biomassas (E) bagaço de cana-de-açúcar, (F) capim elefante e (G) polpa de eucalipto/pinus, por diferentes soluções enzimáticas obtidas de *P. ucsense*. As soluções enzimáticas foram obtidas em meios de cultivo contendo resíduos da colheita de milho submetidos a pré-tratamento hidrotérmico em RDA, e/ou RD, acrescidos ou não de licor proveniente de pré-tratamento (RDL). Utilizou-se volume de enzima para atividade total de 15 FPU.g⁻¹ do substrato a ser hidrolisado (exceto RD+RDL – 10 FPU.g⁻¹). Como controle foi utilizado o complexo enzimático comercial Celluclast® e enzimas produzidas por *P. ucsense* em RD utilizando celulose comercial como fonte de carbono.....171

RESUMO

No presente trabalho, quatro diferentes biomassas lignocelulósicas - bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante, polpa de eucalipto/pinus e resíduos da colheita do milho - foram avaliadas para a produção de celulasas e xilanases por *Penicillium ucsense* S1M29, em cultivo submerso. Em cultivos em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo, a utilização do bagaço de cana-de-açúcar e resíduos da colheita de milho se mostraram as mais promissoras, resultando em atividades superiores de FPA, endoglicanases, exoglicanases, β -glicosidases e xilanases. Em cultivos em regime descontínuo alimentado, incremento nas atividades enzimáticas foram observadas, exceto para polpa de eucalipto/pinus. Bagaço de cana-de-açúcar dobrou a atividade de FPA, enquanto que para capim elefante e resíduos da colheita de milho, esse aumento foi de 2,7 vezes. Para a polpa de eucalipto/pinus houve uma acentuada diminuição de atividade, indicando a sua ineficiência para emprego na produção do complexo enzimático em processo submerso. Os maiores incrementos na atividade foram observados para β -glicosidases quando produzidas utilizando capim elefante (8,6 vezes) e bagaço de cana-de-açúcar (4,6 vezes). Também foram avaliadas a estabilidade e atividade ótima dos extratos enzimáticos brutos de *P. ucsense* produzidos nas diferentes biomassas, e comparadas a dois controles – enzimas produzidas em celulose comercial e um coquetel enzimático comercial Celluclast®. As maiores atividades relativas para as enzimas produzidas em biomassas lignocelulósicas foram observadas em temperaturas entre 60 e 70°C, e pH variando entre 4 e 5,5. Em relação à termoestabilidade e estabilidade em diferentes valores de pH, as enzimas se apresentaram mais estáveis, após 72h, em pH entre 4 e 5. Já as temperaturas que resultaram em maior estabilidade após 72h foram entre 40 e 50°C, para a maioria das enzimas avaliadas, com destaque para endoglicanases e β -glicosidases produzidas em resíduos da colheita do milho, que foram mais estáveis em 60 e 65°C, respectivamente. Quanto a utilização dos diferentes extratos brutos na hidrólise das biomassas lignocelulósicas, as enzimas se mostraram eficientes quando comparadas ao coquetel comercial Celluclast®. Os resultados obtidos se mostram promissores para o desenvolvimento de processos de produção enzimática em larga escala utilizando resíduos lignocelulósicos, uma vez que títulos enzimáticos próximos ou superiores aos produzidos com celulose comercial foram alcançados, e as enzimas produzidas possuem características desejáveis para uma possível aplicação comercial destes coquetéis. Outro fator importante, é que o desenvolvimento de tal processo pode auxiliar na diminuição dos custos das

enzimas celulolíticas, e conseqüentemente no processo de produção de etanol de segunda geração, bem como de outros metabólitos microbianos de interesse econômico.

Palavras-chave: *Penicillium ucsense*, biomassas lignocelulósicas, celulasas, atividade, estabilidade.

ABSTRACT

In the present work, four different lignocellulosic biomasses - sugarcane bagasse, elephant grass, eucalyptus/pine pulp and corn harvest residues - were evaluated for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium ucsense* S1M29, in submerged culture. In stirred tank reactor, in a batch regime, the use of sugarcane bagasse and corn harvest residues proved to be more promising, resulting in higher activities of FPA, endoglycanases, exoglycanases, β -glucosidases and xylanases. In fed-batch, increases in enzymatic activities were observed, except for eucalyptus/pine pulp. Sugarcane bagasse doubled FPA activity, while for elephant grass and corn harvest residue, this increase was 2.7 times. For eucalyptus/pine pulp there was a marked decrease in activity, proving its inefficiency for use in enzyme complex production in a submerged process. Increases in activity were greater for β -glucosidases when produced using elephant grass (8.6 times) and sugarcane bagasse (4.6 times). The stability and optimal activity of crude enzyme extracts from *P. ucsense* produced in different biomasses were also evaluated, and compared to two controls – enzymes produced in commercial cellulose and a commercial enzyme cocktail Celluclast®. The higher activities related to enzymes produced in lignocellulosic biomasses were observed at temperatures between 60 and 70°C, and pH varying between 4 and 5.5. Regarding thermostability and stability at different pH values, the enzymes were more stable, after 72h, at pH between 4 and 5. The temperatures that resulted in greater stability after 72h were between 40 and 50°C, for the majority of the enzymes evaluated, with emphasis on endoglycanases and β -glucosidases produced in corn harvest residues, which were more stable at 60 and 65°C, respectively. Regarding the use of different crude extracts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass, the enzymes proved to be efficient when compared to the commercial Celluclast® cocktail. The results obtained are promising for the development of large-scale enzyme production processes using lignocellulosic waste, since enzyme titers close to or higher than those produced with commercial cellulose were achieved, and the enzymes produced have desirable characteristics for a possible commercial application of these cocktails. Another important factor is that the development of such a process can help reduce the costs of cellulolytic enzymes, and consequently in the production process of second-generation ethanol, as well as other microbial metabolites of economic interest.

Keywords: *Penicillium ucsense*, lignocellulosic biomasses, cellulases, activity, stability.

1. INTRODUÇÃO

Devido ao rápido crescimento populacional e ao grande desenvolvimento dos setores da indústria e de transportes, ocorrido nas últimas décadas, a demanda de energia pela população mundial também aumentou. Com a elevação dos níveis de consumo de energia, não só os combustíveis fósseis correm o risco de se extinguirem, como também houve um aumento na emissão de gases poluentes, alterando a composição da atmosfera, que apresenta efeito no processo de aquecimento global.

Com isso, surge a necessidade do desenvolvimento de novas formas de produzir energia, de maneira limpa e sustentável. A busca por novas fontes de energia renovável direciona as atividades de pesquisa & desenvolvimento para alguns segmentos específicos, sendo um deles a produção de etanol de segunda geração. A produção deste combustível por este processo não só utiliza fontes renováveis, mas também resíduos agroindustriais, que são abundantes em nosso país e que necessitam de uma destinação correta e sustentável.

Para que os resíduos lignocelulósicos possam ser aproveitados na produção de etanol, os mesmos precisam ser desconstruídos, podendo esse processo ser químico, físico ou enzimático. A produção de enzimas celulolíticas por microrganismos para utilização nestes processos vem sendo intensivamente estudada, visando à diminuição nos custos de produção. Para a produção de enzimas, várias determinantes devem ser analisadas visando sua eficiência, desde o microrganismo produtor, o processo de produção, e a formulação do produto final.

Nos processos industriais para a produção de enzimas, a fonte de carbono utilizada é principalmente a celulose comercial, que contribui para tornar o processo oneroso. A possibilidade da utilização dos próprios materiais lignocelulósicos para a produção da enzima, como fonte de carbono para o crescimento do fungo produtor e como indutor do complexo enzimático pode constituir-se em uma alternativa econômica para a produção destas.

Particularmente, o Brasil tem se destacado na produção mundial do etanol de segunda geração (2G), visto a instalação da planta industrial do mesmo em Alagoas, pela GranBio, inaugurada ainda em 2014 e que pretende ampliar sua produção de etanol 2G de 30 milhões para 50 milhões de litros anuais em 2026. Outro caso de sucesso que pode ser citado é a Raízen (joint venture entre a Cosan e Shell), que em maio de 2024 inaugurou sua segunda

planta de etanol 2G, capaz de gerar um volume de 80 milhões de litros por ano. Em ambas as empresas, a hidrólise dos materiais lignocelulósicos é realizada utilizando um complexo enzimático fornecido pela Novonosis[®].

Processos submersos operados em regime descontínuo alimentado para a produção de celulasas e hemicelulasas também tem se mostrado promissores para o aumento das atividades enzimáticas, comparado aos processos realizados em regime descontínuo. Entretanto ainda não é bem compreendido quais as exatas concentrações da fonte de carbono que devem ser adicionadas durante a batelada alimentada.

Diante do exposto, o estudo da utilização de diferentes biomassas lignocelulósicas na produção de complexos enzimáticos celulolíticos, em cultivos submersos, se mostra importante para o desenvolvimento de tecnologias voltadas para a utilização destes resíduos em larga escala. Entretanto, é importante que não haja perdas na produtividade enzimática em relação a fonte de carbono largamente utilizada, a celulose comercial. Com isso, a utilização de regimes descontínuos alimentados pode ser uma alternativa promissora, sendo o alvo principal desta pesquisa.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENERGIA RENOVÁVEL

Atualmente, para atender a demanda de energia necessária, a humanidade depende principalmente da utilização de combustíveis fósseis, que condizem com cerca de 80% da energia global obtida, dos quais 58% são consumidos pelo setor de transportes. Entretanto, o rápido aumento no consumo desses combustíveis devido ao crescimento populacional e a industrialização cada vez maior, resultarão em seu esgotamento (Zabed *et al.*, 2016). A ideia de converter açúcares derivados da biomassa em biocombustíveis foi primeiro proposta na década de 1970, devido a fatores econômicos e geopolíticos, tais como elevado preço do petróleo, preocupações ambientais e instabilidade no fornecimento mundial deste combustível (Kuhad *et al.*, 2016).

Outro fator de grande impacto é que a utilização de combustíveis fósseis tem contribuído para as emissões de gases do efeito estufa, aumentando o aquecimento global e ocasionando mudanças climáticas, aumento do nível do mar e perda da biodiversidade do planeta, o que torna imprescindível o desenvolvimento de fontes de energia que sejam renováveis, sustentáveis, eficientes e econômicas (Zabed *et al.*, 2016). A utilização de etanol juntamente com a gasolina reduziu a emissão de dióxido de carbono na atmosfera, entretanto ainda há altos níveis de dióxido de carbono sendo liberados ao meio ambiente, o que faz com que a utilização do etanol de segunda geração seja uma alternativa viável, devido a abundância de suas fontes de obtenção (Zaldivar *et al.*, 2001).

O etanol pode ser produzido a partir de diferentes fontes, sendo estas divididas em três diferentes grupos: ricos em açúcares, ricos em amido e biomassa lignocelulósica (Zabed *et al.*, 2016). A biomassa lignocelulósica representa aproximadamente 50% da biomassa do planeta, possuindo assim alta disponibilidade e baixo custo, uma vez que a mesma pode ser proveniente de resíduos agroindustriais e florestais, tornando-a promissora para produção de energia renovável (Singhania *et al.*, 2010; Cardona & Sánchez, 2007). Resíduos vegetais lignocelulósicos podem ser uma alternativa eficaz às caras fontes de carbono, pois são fontes baratas, renováveis, abundantes e ricas em nutrientes para os microrganismos envolvidos na produção de celulasas (Bhardwaj *et al.*, 2021). Entretanto, a utilização de biomassa lignocelulósica ainda enfrenta dificuldades técnicas e econômicas, devido à necessidade de pré-tratamentos anteriores à sua utilização, necessitando de maiores estudos para aumentar sua eficiência (Zabed *et al.*, 2016).

2.2 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Os materiais lignocelulósicos são a matéria prima na produção de etanol de segunda geração. São constituídos por celulose, hemicelulose, lignina, pequenas quantidades de extrativos e sais minerais (Ferraz, 2004). Seu potencial de utilização é baseado em seu baixo custo econômico, uma vez que os mesmos estão presentes em resíduos, e no fato de não competir com a produção de alimentos. A biomassa lignocelulósica pode ser dividida em culturas energéticas, plantas aquáticas, resíduos florestais, resíduos agroindustriais e resíduos orgânicos municipais (Zabed *et al.*, 2016).

Anualmente, estima-se que cerca de $2,9 \cdot 10^3$ milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos são produzidos a partir do cultivo de cereais, $3 \cdot 10^3$ milhões de toneladas a partir da cultura de sementes oleaginosas e $5,4 \cdot 10^2$ milhões de toneladas em outras plantações, em todo o mundo (Kuhad *et al.*, 2016). A composição desses materiais se dá, basicamente, por polímeros de celulose e hemicelulose ligados firmemente a polímeros de lignina através de ligações de hidrogênio ou interações covalentes, o que torna a estrutura robusta e recalcitrante a despolimerização, sendo representada na Figura 1 (Zabed *et al.*, 2016).

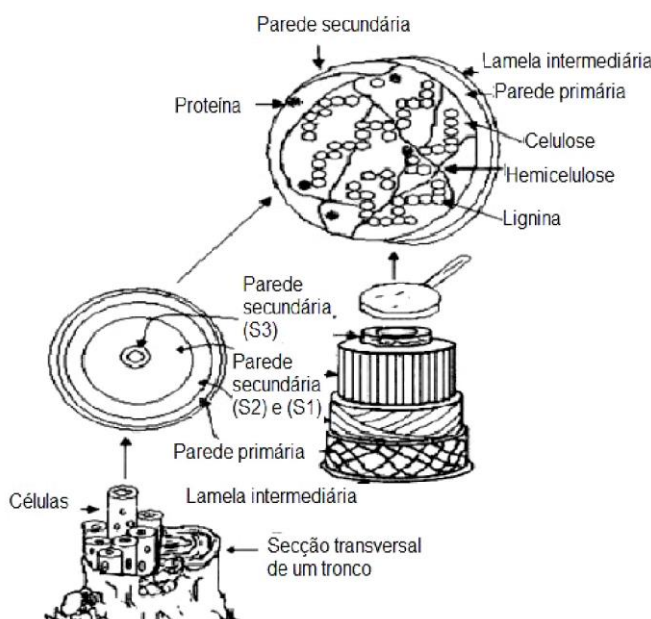


Figura 1. Composição do material lignocelulósico na parede celular (Adaptada de Zabed *et al.*, 2016).

Celulose é a substância orgânica renovável mais abundante na natureza, sendo um polímero natural composto por unidades de β -D-glicose, biossintetizado principalmente pelas células vegetais para constituição da parede celular (Ângelo, 2004). O total de unidades de glicose na molécula de celulose varia entre centenas até milhares, constituindo

de 15 a 30% de massa seca da parede celular primária e 40% da parede celular secundária nas células vegetais (Zabed *et al.*, 2016). É um homopolímero linear, com partes amorfas e cristalinas, cujos monômeros unem-se por ligações β -1,4-glicosídicas, compondo cerca de 50% da massa total dos materiais lignocelulósicos (Galvagno & Forchiassin, 2004; Ferraz, 2004).

A celulose pode ser hidrolisada quimicamente em meio ácido, ou enzimaticamente, liberando unidades de hexoses (Ângelo, 2004). Apesar de sua estrutura relativamente simples, não é um polímero facilmente degradável, uma vez que suas moléculas estão associadas formando microfibrilas cristalinas estabilizadas por ligações de hidrogênio, além de estar associada aos outros polímeros, como hemicelulose, lignina e substâncias pécticas (Galvagno & Forchiassin, 2004).

Hemicelulose constitui um grupo de polissacarídeos associados a outros componentes da parede celular, consistindo em uma cadeia linear de açúcares unidos por ligações β -1,4, geralmente com ramificações curtas, sendo formada principalmente por hexoses (β -D-glicose, α -D-galactose e β -D-manose) e pentoses (β -D-xilose e α -L-arabinose), sendo o açúcar mais abundante a xilose. As hemiceluloses, como componentes da parede da célula vegetal, são divididas em xilanas (mais abundantes em resíduos agroflorestais) e glicomanas (que além dos resíduos agroflorestais, estão presentes em maior quantidade em resíduos municipais, provenientes de alimentos). Sua hidrólise requer a participação de numerosas enzimas que atuem sobre a cadeia principal e também sobre as laterais, destacando-se as xilanases (Galvagno & Forchiassin, 2004; Juturu & Wu, 2012; Zabed *et al.*, 2016). Podem ser homopolímeros ou heteropolímeros, sendo que seu teor médio em materiais lignocelulósicos é bastante variável, podendo ser de 20% até 40% (Ferraz, 2004; Juturu & Wu, 2012). A hidrólise completa da hemicelulose resulta na liberação de outros componentes da lignocelulose, sendo sua quebra, portanto, um fator chave para aumentar a utilização da biomassa. A xilana é um dos principais componentes da hemicelulose em resíduos agrícolas, como farelo de trigo, palha de trigo e palha de milho, e constitui cerca de um terço do carbono orgânico renovável total na Terra (Li *et al.* 2020).

Lignina compõe parte das paredes das células vegetais formando uma matriz amorfa, junto à celulose e hemicelulose, com a qual pode ter uniões covalentes, sendo uma molécula de alta complexidade que requer sistemas enzimáticos não específicos e com alto poder redox para sua degradação (Galvagno & Forchiassin, 2004). É um polímero aromático altamente ramificado e composto basicamente por três compostos fenólicos: cumaril, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Seu teor é bastante variável, de acordo com

o tipo de material lignocelulósico, sendo que cascas de madeira macia possuem cerca de 30 a 60% de lignina, cascas de madeira dura 30 a 55%, gramíneas 10 a 30%, e resíduos agrícolas apenas cerca de 3 a 15% (Zabed *et al.*, 2016).

A aplicação industrial da biomassa lignocelulósica requer a superação de diversos desafios, como a necessidade de um pré-tratamento que reduza a cristalinidade da celulose, facilitando a sua degradação, a utilização de materiais mais econômicos, de extratos enzimáticos com atividades superiores às existentes atualmente, bem como microrganismos que produzem elevados títulos enzimáticos (Singhanian *et al.*, 2010). Muitos resíduos lignocelulósicos, como farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, palha de trigo, engaço de uva, sementes, bagaço de frutas, sabugo de milho e farelo de soja, foram avaliados na produção de celulasas. Além disso, a variação nas condições atmosféricas resulta em diferentes diversidades de plantas e estrutura composicional, causando assim variações nos resíduos disponíveis (Bhardwaj *et al.*, 2021). Dentre os resíduos agroindustriais de maior importância em nosso país, destacam-se o bagaço da cana-de-açúcar, o sabugo e a palha do milho, palhas de trigo e arroz e restos de madeira, que são materiais com enorme potencial para produção de etanol de segunda geração e que necessitam de um aproveitamento mais racional (Bon *et al.*, 2008b). A seguir serão discutidos os resíduos lignocelulósicos utilizados neste trabalho.

2.2.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é um resíduo agroindustrial abundante e amplamente difundido pelo mundo, com elevados teores de açúcares em sua composição (cerca de 50% de celulose e 25 % de hemicelulose), sendo considerada uma importante fonte para a produção de biocombustíveis e químicos, buscando o desenvolvimento do conceito de bioeconomia (Grigorevski-Lima *et al.*, 2013; Chambon *et al.*, 2018).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, possuindo mais de 9,75 milhões de hectares plantados e produzindo mais de 578 milhões de toneladas de cana anualmente, sendo também líder na produção de etanol derivado da mesma. Além da produção de açúcar e álcool, seus diferentes subprodutos e resíduos podem ser utilizados em diferentes áreas, tais como geração de energia, ração animal e fertilizante. A quantidade de bagaço produzida depende do teor de fibra da cana processada, sendo que em média são produzidos 280 quilos de bagaço por tonelada de cana, tornando-o um dos principais subprodutos da indústria sucroalcooleira (Embrapa, 2024a).

2.2.2. Capim elefante

O capim elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma cultivar tropical nativa da África e que foi introduzida na maioria dos países tropicais e subtropicais. Essa gramínea vem sendo considerada com uma alternativa para a produção de combustíveis renováveis, uma vez que possui elevada produtividade quando comparada a outras espécies e sua composição inclui, aproximadamente, 36% de celulose, 19% de hemicelulose e 21% de lignina (Scholl *et al.*, 2015; Menegol *et al.*, 2014).

O capim elefante caracteriza-se por ser uma gramínea robusta, com folhas largas e caules perenes, atingindo cerca de 3 metros de altura. Sua produção pode chegar a 50 t/ha/ano, apresentando maior produtividade e menor custo em relação ao cultivo da cana-de-açúcar e do milho (Embrapa, 2024b). Sua utilização torna-se uma alternativa promissora ao desenvolvimento sustentável, uma vez que resulta em melhoria na utilização de matérias-primas abundantes sem aplicação efetiva na indústria.

2.2.3. Polpa de eucalipto/pinus

O gênero *Eucalyptus* é originário da Oceania e seu cultivo se espalhou por todo o mundo. Embora existam cerca de 730 espécies reconhecidas botanicamente, apenas cerca de 20 delas são produzidas e utilizadas comercialmente. Estas espécies diferem entre si em suas composições químicas e propriedades físicas, possuindo, portanto, diversas aplicações industriais (Embrapa, 2024c). Na Europa, estima-se que cerca de 10% da madeira utilizada em indústrias de polpa e papel seja oriunda de plantações de eucalipto, sendo que sua composição varia de acordo com as diferentes espécies (43 – 53% de celulose, 12 - 16% de hemicelulose e 24 - 31% de lignina (Brito *et al.*, 2008; Barneto *et al.*, 2011). Segundo a Embrapa (2024c), no ano de 2013 a produtividade do eucalipto no Brasil chegou a 207,8 milhões de metros cúbicos de madeira. Outro dado importante é a produtividade média do eucalipto em nosso país, que chega a 39 m³/ha/ano, gerando cerca de 300 toneladas/ha de resíduos, como tocos, raízes e galhos, após a colheita. Já no ano de 2021, estimou-se que haviam cerca de 7,3 milhões de hectares de eucalipto plantados em nosso país, e cerca de 1,8 milhão de hectares de pinus (Agencia Brasil, 2024).

O cultivo do pinus tornou-se um importante aliado no combate à exploração de madeiras nativas no Brasil, e atualmente o mesmo representa cerca de 30% das plantações destinadas à produção de papel e celulose em nosso país, enquanto que na Europa representa 32%. Sua composição química *in natura* é de aproximadamente 48% de celulose, 22% de hemicelulose e 21% de lignina (Brito *et al.*, 2008; Embrapa, 2024d).

2.2.4. Resíduos da colheita do milho

Desde sua domesticação a cerca de 9.000 anos, o milho (*Zea mays*) vem apresentando um papel cada vez mais importante, sendo que sua produção global é crescente, ocupando cerca de 197 milhões de hectares, espalhados entre os continentes (Erenstein et al, 2022). O milho é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo a produção mais expressiva dentre os cereais. Juntamente com a soja, equivalem a 80% da produção nacional de grãos, com safras durante o verão e o inverno, dependendo da região do país. Sua produção é voltada principalmente ao consumo interno, embora sua exportação venha sendo realizada de forma expressiva. A produção brasileira é principalmente destinada ao consumo animal, mas também para consumo humano na forma de grãos ou milho verde (Embrapa, 2024e). Além disso, atualmente, cerca de 15% do etanol produzido no Brasil é proveniente do milho. As frações do resíduo de milho são classificadas em colmo (medula e casca) e folha, e apresentaram diferentes tecidos, morfologia celular e composições químicas (Li et al, 2012). Sua colheita gera grandes quantidades destes resíduos, sendo, entretanto os sabugos os mais estudados, possuindo um percentual considerável de xilana e relativamente menor presença de cinzas que outras biomassas, permitindo uma gama maior de possibilidades de pré-tratamento (Kumar et al., 2023). Além da elevada produção nacional, o milho é uma cultivar amplamente difundida pelo mundo. Sua colheita gera diversos resíduos, tais como palhas, folhas e talos, que são atualmente deixados na própria lavoura, servindo apenas como parte da fertilização do solo para o novo plantio.

2.3 PRÉ-TRATAMENTO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

O pré-tratamento é a etapa chave para uma eficiente utilização da biomassa lignocelulósica, porém é a mais onerosa, sendo o desenvolvimento de tecnologias mais baratas, sustentáveis e eficientes para utilização em grande escala, um avanço necessário (Yamakawa *et al.*, 2018). Os pré-tratamentos mais conhecidos e utilizados são a hidrólise ácida, a explosão a vapor e os processos hidrotérmicos, que apresentam uma boa eficiência e aplicabilidade industrial, mas que em contrapartida resultam em custos elevados, devido à construção dos reatores que necessitam ser resistentes a altas pressões e a corrosão, bem como pelo gasto energético gerado pelas altas temperaturas utilizadas. Outros métodos que vêm sendo desenvolvidos utilizam condições em meio alcalino, processos oxidativos, e a utilização de organosolv e líquidos iônicos, entretanto os custos elevados ainda são um impedimento a sua utilização (Jönson & Martín, 2016).

Os pré-tratamentos mais utilizados citados anteriormente resultam em um material mais facilmente hidrolisável pelo complexo lignocelulolítico, uma vez que deixam as fibras de celulose mais expostas, sem, entretanto, promover a separação e recuperação efetiva dos três principais componentes da biomassa. Por outro lado, a utilização de solventes como etanol, acetona e líquidos iônicos são capazes de recuperar estas frações. No caso dos processos com organosolv, apesar do custo ser menor, a utilização de solventes voláteis em altas temperaturas e pressões pode resultar em um processo perigoso, enquanto que os líquidos iônicos, apesar de não apresentarem este problema, necessitam que seus custos sejam reduzidos (Yamakawa *et al.*, 2018; Moyer *et al.*, 2018).

2.4 ENZIMAS CELULOLÍTICAS

2.2.1. Celulases

As enzimas celulolíticas, responsáveis pela hidrólise da celulose, constituem um dos grupos enzimáticos já utilizados comercialmente que ainda possuem grande potencial para a multiplicação do volume atualmente explorado. Dentre as várias aplicações de celulases, destacam-se sua utilização na indústria de detergentes e na indústria têxtil, como agente de *peeling* da superfície das fibras de tecidos, na indústria de polpa de celulose e de papel, para melhorar as propriedades mecânicas das fibras e facilitar o processo de reciclagem, na indústria de sucos e alimentos, entre outros (Ângelo, 2004). Entretanto, apesar destas inúmeras aplicações, seu grande potencial de aplicação está na produção de etanol de segunda geração, necessitando, porém, de um maior desenvolvimento desse processo, uma vez que os custos de produção ainda são elevados e os títulos enzimáticos produzidos ainda podem ser aumentados (Singhania *et al.*, 2010).

A completa degradação enzimática da celulose depende da ação conjunta de várias enzimas que compõem o complexo celulolítico, sendo as principais delas as endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21) (Ângelo, 2004). Estas enzimas atuam em sinergia hidrolisando ligações glicosídicas presentes na celulose, produzindo glicose, celobiose e celo-oligossacarídeos. As endo- β -1,4-glicanases realizam a clivagem do polímero de celulose em suas regiões amorfas ou na superfície das microfibrilas, expondo um maior número de extremidades redutoras e não redutoras, enquanto que as exo- β -1,4-glicanases atuam sobre essas extremidades para liberar celo-oligossacarídeos e celobiose. Por fim a β -glicosidase cliva a celobiose em monômeros de glicose, completando a hidrólise da biomassa (Singhania *et al.*, 2010; Zabed

et al., 2016). A representação da ação sinérgica destas enzimas está representada na Figura 2.

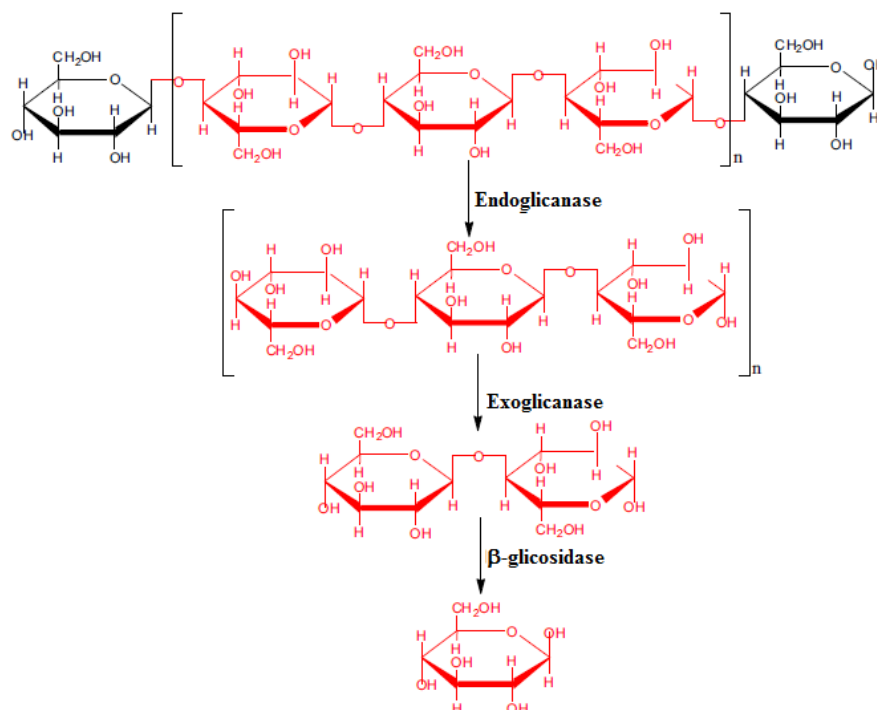


Figura 2. Representação esquemática do processo de clivagem da celulose pelo complexo enzimático celulolítico (Adaptado de Juturu & Wu, 2014).

2.2.2. Xilanases

O desenvolvimento comercial de xilanases para a hidrólise de materiais lignocelulósicos ainda não está tão avançado quanto o de celulasas, uma vez que as preparações enzimáticas comerciais têm sido desenvolvidas para a hidrólise de biomassa pré-tratada com ácido, onde a hemicelulose já foi removida (Bon *et al.*, 2008b). Sua principal aplicação está na indústria de polpa e papel, devido a necessidade de utilização de temperaturas entre 55 e 70°C, bem como de pH alcalino, nesses processos. Por serem termoalcalofílicas e termoacidofílicas podem ser utilizadas em processos de bioconversão, onde pré-tratamentos por explosão a vapor, alcalino ou com ácidos, entre outros, podem ser utilizados antes do tratamento enzimático (Coelho & Nascimento, 2008).

Um amplo espectro de enzimas atua sinergicamente na hidrólise de hemicelulose, sendo as mais importantes as endoxilanases (E.C.3.2.1.8) e β -xilosidases (EC 3.2.1.37), que são as enzimas chaves para hidrólise da xilana, o principal componente da hemicelulose. Endoxilanases hidrolisam as cadeias principais de xilana produzindo xilooligômeros, enquanto as β -xilosidases atuam nesses xilooligômeros liberando a xilose (Juturu & Wu, 2012; Zabed *et al.*, 2016).

2.5 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Sistemas celulolíticos completos são produzidos por diferentes gêneros e espécies de bactérias e fungos, compreendendo bactérias aeróbias e anaeróbias, fungos da degradação branca e da degradação macia, bem como fungos anaeróbios. Dentre esses, se destacam os fungos filamentosos, por suas produções elevadas das três classes de enzimas presentes no complexo celulolítico, dispostos nos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete* e *Aspergillus* (Bon *et al.*, 2008b; Singhanian *et al.*, 2010).

Como consequência, as celulasas fúngicas têm sido as mais estudadas e exploradas industrialmente, com a descoberta de diversas espécies com elevado potencial para a produção destas enzimas (Ângelo, 2004). O fungo *Trichoderma reesei* é o microrganismo cujo sistema celulolítico foi mais investigado, entretanto sua produção da enzima β -glicosidase é baixa, sendo necessária a sua suplementação nos preparados enzimáticos deste fungo (Bon *et al.*, 2008b).

A produção de celulasas a partir de outras espécies fúngicas pode resultar em um grande interesse industrial, desde que seus títulos enzimáticos e desempenho em processos de tratamento de têxteis celulósicos e na hidrólise de celulose possam se comparar ou ultrapassar os obtidos por *T. reesei* (Camassola *et al.*, 2004). Diversas espécies vêm sendo estudadas a fim de produzir elevadas concentrações de enzimas, especialmente utilizando resíduos lignocelulósicos no meio, sendo algumas destas espécies *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Humicola grisea*, *Melanocarpus* sp., *Monascus purpureus*, *Scytalidium thermophilum*, *Penicillium decumbens* e *Penicillium echinulatum* (Kuhad *et al.*, 2016).

A produção de celulase tem sido relatada para diversos fungos, sendo que a utilização de fungos mesófilos e termófilos apresenta-se como uma alternativa interessante, devido às altas temperaturas suportadas por eles, sendo relatados estudos de produção de celulasas a 30°C por *Penicillium decumbens* 114-2 e *Agaricus arvensis*, e a 45°C pelos gêneros *Melanocarpus*, *Myceliophthora* e *Scytalidium*. A produção destas enzimas em diferentes pH também é de extrema importância, tendo em vista a variedade de substratos que podem ser empregados, sendo relatada a produção de celulasas por *Aspergillus terreus* em condições extremamente ácidas (Kuhad *et al.*, 2016).

2.2.3. Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* tem demonstrado grande potencial na produção de celulases, uma vez que apresenta mais alta relação da atividade de β -glicosidases e da FPA, sendo superior a apresentada por outros fungos, dentre eles *T. reesei* (Martins *et al.*, 2008). Diversas espécies de fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* merecem atenção como alternativas ao *T. reesei* para produção de etanol de segunda geração, uma vez que diversos estudos relatam o desempenho superior de suas preparações enzimáticas em relação as enzimas produzidas por *Trichoderma* (Gusakov, 2011).

Penicillium echinulatum está entre os microrganismos que apresentam um grande potencial para secreção de enzimas celulolíticas, sendo capaz de secretar altos títulos de celulase em processos submersos (Dillon *et al.*, 2011). Estudos anteriores do grupo demonstraram que *P. echinulatum* é capaz de metabolizar sacarose, sem sofrer repressão catabólica, além de apresentar potencial de aumento em suas atividades de FPA quando cultivado em regime descontínuo alimentado, onde o uso de concentrações maiores de celulose é possível (Reis, 2017). Além disso, *P. echinulatum* apresenta alta estabilidade térmica a 50°C em suas atividades de FPA e de β -glicosidases (Camassola *et al* 2004), uma importante característica para sua utilização comercial. Recentemente, *P. echinulatum* S1M29 foi reclassificado, após estudos de seus genes, em uma nova espécie, nomeada como *P. ucsense* (Lenz *et al.*, 2022).

2.6 PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS

Biorreatores de tanque agitado são utilizados em cultivos aerados por sua flexibilidade e segurança, apresentando, entretanto, custos de manutenção e operação elevados quando comparados a biorreatores com agitação pneumática, como os biorreatores *airlift* e coluna de bolhas (Ward, 1991). Suas principais vantagens são a alta flexibilidade e a capacidade de fornecer elevada transferência de oxigênio e elevados valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (KLa), podendo ser utilizados para meios com viscosidades elevadas (Shuler & Kargi, 1992). Consistem em um tanque cilíndrico equipado com sistemas de chicanas, cuja função é evitar a formação de vórtices durante a agitação do meio. O agitador é montado em um eixo central ao fermentador, possuindo ao longo de sua altura uma série de turbinas ou impelidores (Schmidell *et al.*, 2001; Chisti & Moo-Young, 2002).

Além da escolha do biorreator mais adequado, o sucesso de um processo fermentativo depende também da correta definição do microrganismo a ser utilizado, do

meio de cultura, da forma de condução do mesmo e das etapas de recuperação do produto (Schmidell *et al.*, 2001).

A produção de celulasas é influenciada por vários parâmetros de processo, tais como o pH do meio, a temperatura de cultivo, a composição do meio, os nutrientes presentes no mesmo, entre outros (Kuhad *et al.*, 2016). A matéria prima é um dos componentes mais relevantes nos custos de produção de uma enzima, atingindo até 75% do custo total o que faz crescer o interesse no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos agroindustriais e florestais, dentre os quais destacam-se bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, palha de arroz e farelo de trigo, uma vez que não possuem custos de produção diretos. Além disso, sua utilização em bioprocessos representa uma forma de agregar valor a resíduos abundantes, solucionando o problema de seu acúmulo que representa um sério problema ambiental (Bon *et al.*, 2008a).

Celulasas são enzimas induzidas, sendo que diversas fontes de carbono vêm sendo estudadas a fim de identificar os substratos que resultem em maior efeito indutor (Mandels & Reese, 1957). No contexto atual, grande ênfase tem sido dada à utilização de rejeitos de biomassa lignocelulósica provenientes da agricultura e de processos industriais, tais como a produção de etanol e de polpa de celulose, como substratos para a obtenção de celulasas a partir de fermentação microbiana (Bon *et al.*, 2008a).

A adição de outras fontes de carbono ao meio, além da celulose, também pode influenciar positivamente a produção de celulasas. Dillon *et al.* (2011) observaram que a adição de sacarose ao meio de cultivo de *P. echinulatum* S1M29 não resulta em inibição da produção de celulasas, resultando em níveis superiores de FPA e endoglicanases. O estudo foi realizado em meio formulado contendo 1% (m/v) de celulose com a adição de 0,5% (m/v) de sacarose e comparado ao meio com de 1% (m/v) de celulose, condição na qual foram também observados níveis superiores de β -glicosidases. Outro fator importante a ser considerado é a fonte de nitrogênio utilizada, sendo que a resposta na secreção de celulasas varia de acordo com o microrganismo utilizado. *T. reesei* cresce em sulfato de amônio, fosfato de amônio e amônia, porém não em nitrato (Mandels & Weber, 1969). Para *P. echinulatum* foi verificado que a adição de nitrato de potássio pode ser realizada durante seu cultivo, com a vantagem desta fonte de carbono não provocar quedas bruscas no pH, quando comparada ao sulfato de amônio, mesmo quando pH mais ácido é empregado (Dillon *et al.*, 1999).

O pH é um dos fatores que mais influência na fisiologia dos microrganismos e, conseqüentemente, em seu crescimento e produção de enzimas (Reis, 2011). Os valores de

pH durante o cultivo variam devido ao metabolismo do fungo, sendo que, durante o cultivo em frascos, a manutenção do pH apresenta dificuldades, uma vez que os tampões podem ser assimilados pelo fungo ou podem tornar-se tóxicos se adicionados na quantidade necessária para o efetivo tamponamento da solução. Entretanto, em biorreatores, este problema é contornado pela adição automática de um tamponante no meio, mantendo o controle do pH durante o crescimento do microrganismo (Carlile & Watkinson, 1997). Reis (2011) verificou a influência do pH sobre a secreção de enzimas celulolíticas por *P. echinulatum* S1M29, constatando que para FPA e xilanases, maiores títulos enzimáticos são produzidos em pH 6,0, enquanto que endoglicanases apresentaram atividades superiores tanto em pH 5,5 quanto 6,0. β -glicosidases apresentaram maiores atividades em intervalos de pH mais ácidos, entre 5,0 e 6,0, sugerindo que o pH 6,0 é o mais indicado para a produção de enzimas por esse microrganismo.

O cultivo sólido e o submerso são os dois principais métodos utilizados para a produção de celulase e outras enzimas como proteases, xilanases e pectinases, sendo que o processo submerso possui várias vantagens no controle do processo, pois a água abundante reduz os gradientes de oxigênio, temperatura e concentração de nutrientes, e a recuperação da enzima é facilitada (Bhardwaj *et al.*, 2021). Os processos submersos são classificados por três diferentes regimes de operação: descontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo. No regime descontínuo o processo transcorre sem adição ou retirada de meio reacional do biorreator, o que pode ocasionar problemas como inibição pelo substrato, pelo produto, ou por outros metabólitos (Bon *et al.*, 2008a).

O regime descontínuo alimentado é definido como um modo de operação em que um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular e formação do produto são adicionados ao biorreator, sem que ocorra retirada do material durante a operação (Bon *et al.*, 2008a). A alimentação ocorre de maneira lenta, através da adição de meios contendo nutrientes altamente concentrados ao biorreator, mantendo a concentração de nutrientes relativamente baixa, minimizando assim a repressão por metabólitos (Hendy *et al.*, 1984). Ghose & Sahai (1979) foram pioneiros na utilização de processo descontínuo alimentado para a produção de celulases utilizando *T. reesei* QM 9414, sendo que o meio inicial era composto por glicose, cujo consumo iniciou o processo de alimentação utilizando celulose, obtendo resultados superiores quando esta alimentação foi realizada em mais de uma etapa. A utilização de regime descontínuo alimentado proporcionou aumento na atividade de endoglicanases e xilanases, bem como nas atividades de FPA, para a linhagem S1M29 de

P. echinulatum, não apresentando nenhum efeito sobre a atividade de β -glicosidases (Reis, 2017).

Nos processos contínuos a alimentação de nutrientes e a retirada de produtos são efetuadas continuamente durante o processo fermentativo, podendo-se operar o sistema por longos períodos de tempo, aumentando assim sua produtividade. Entretanto, esta forma de operação apresenta baixas concentrações enzimáticas se comparada a batelada alimentada, além de possuir alto risco de contaminação (Bon *et al.*, 2008).

Diante do contexto apresentado, a realização do presente trabalho é justificada pela contribuição ao desenvolvimento de processos de produção de celulasas em cultivo submerso utilizando como fontes de carbono resíduos agroindustriais, o que constitui um importante processo biotecnológico, uma vez que, além de reduzir os custos de produção da enzima, a utilização destes materiais se torna uma alternativa à sua destinação final. Além disso, o presente estudo visa contribuir para a obtenção de enzimas com menor custo de produção, auxiliando em sua comercialização e utilização nos processos de hidrólise de biomassa lignocelulósica para produção de etanol de segunda geração.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a capacidade de produção de celulasas e xilanases em processo submerso, descontínuo e descontínuo alimentado, por *Penicillium ucsense* S1M29 utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas – bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante, polpa de eucalipto/pinus, resíduos da colheita do milho - como fonte de carbono, tendo como objetivos específicos:

- Avaliar a produção de celulasas e xilanases em frascos agitados utilizando as biomassas em diferentes condições de pré-tratamento;
- Avaliar a influência das diferentes fontes de carbono, sobre a produção de enzimas celulolíticas por *P. ucsense* em processo descontínuo e descontínuo alimentado, em biorreator de bancada;
- Caracterizar as diferentes proteínas (enzimas) do complexo celulolítico, componentes do secretoma, produzidas em presença das diferentes biomassas;
- Avaliar a eficiência de hidrólise das enzimas produzidas sobre as diferentes biomassas, em comparação a enzimas comerciais;

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os materiais e métodos utilizados no presente estudo, bem como os resultados obtidos, estão apresentados a seguir agrupados em seis capítulos, os quais, na língua inglesa, serão submetidos a periódicos internacionais da área.

4.1 DIFERENTES CONDIÇÕES DE INÓCULO NA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE *Penicillium ucsense* S1M29 EM CULTURAS SUBMERSAS

4.1.1 Resumo

Pensando na produção de celulases em larga escala com a cepa *P. ucsense* S1M29, estudamos diferentes procedimentos de inóculo e fontes sustentáveis de carbono. Para inóculo foram utilizados esporos e células vegetativas, com diferentes tempos de crescimento, verificando-se a melhor condição para obtenção de maiores títulos enzimáticos de celulases e xilanases. Verificou-se, para frascos agitados utilizando cellulose como fonte de carbono, que o uso de inóculo com célula vegetativa de 72 horas resultou em maiores atividades enzimáticas de FPA, β -glicosidases, exoglicanases e xilanases, comparado ao inóculo de esporos ou cultura vegetativa de 24 horas, sendo estatisticamente igual (ou superior) ao cultivo que utilizou inóculo vegetativo de 48 e 96 horas como inóculo. Entretanto, para endoglicanases, foram observadas maiores atividades enzimáticas no cultivo realizado com inóculo de células vegetativas cultivadas por 96 horas. Para o cultivo em biorreator, foram avaliados os inóculos vegetativos de 48 e 72 horas, sendo que a condição com inóculo crescido por 72h apresentou atividades superiores para todas as enzimas avaliadas. Em relação à fonte de carbono, foram realizados cultivos em frascos agitados, para estudar bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante e polpa de eucalipto/pinus, também utilizando como inóculo célula vegetativa de 72 ou 48 horas. Para todas as biomassas avaliadas, de um modo geral, o inóculo de célula vegetativa de 72 horas resultou em maiores títulos enzimáticos. Os resultados obtidos no presente trabalho são importantes para delinear um processo de produção enzimática que seja mais eficiente desde a preparação de seu inóculo.

Palavras-chaves: *Penicillium ucsense*, celulases, inóculo, bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante, polpa de eucalipto/pinus.

4.1.2 Introdução

Devido ao crescimento populacional, o aumento da procura de combustíveis, bem como de outros bens, tem aumentado proporcionalmente. Segundo uma estimativa apresentada pelas Nações Unidas, a população mundial poderá atingir 9,7 bilhões em 2050 (Nações Unidas, 2022). A utilização de processos que não envolvam combustíveis fósseis em prol de processos sustentáveis é cada vez mais necessária. Assim, o conceito de

biorrefinarias é um ponto central a ser destacado, sendo as biomassas lignocelulósicas importantes matérias-primas devido à sua abundância e baixo custo (Bertacchi et al, 2021). Porém, a natureza recalcitrante dessas biomassas também é um obstáculo importante à sua utilização, sendo necessárias etapas de pré-tratamento para separar seus componentes (celulose, hemicelulose e lignina) (Sidana & Yadav, 2022). O bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), é um resíduo agroindustrial amplamente difundido, e considerado uma importante fonte para a produção de biocombustíveis e produtos químicos no conceito de bioeconomia (Grigorevski-Lima et al., 2013; Chambon et al., 2018). O capim elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma cultivar nativa da África que foi introduzida na maioria dos países tropicais e subtropicais, sendo considerada uma alternativa para a produção de combustíveis renováveis (Scholl et al., 2015; Menegol et al., 2014). O gênero *Eucalyptus* é originário da Oceania e seu cultivo se espalhou por todo o mundo, sendo amplamente utilizado pela indústria de papel e celulose (Brito et al., 2008; Barneto et al., 2011).

Os microrganismos também são de grande importância para o conceito de biorrefinaria, sendo responsáveis tanto pela degradação enzimática da lignocelulose quanto pela conversão fermentativa dos açúcares hidrolisados (Bertacchi et al, 2021). Diversas espécies de fungos têm sido estudadas com o objetivo de produzir altas concentrações de enzimas celulolíticas, dentre elas o gênero *Penicillium* (Kuhad et al., 2016). Enzimas produzidas por *Penicillium* spp. são resistentes à repressão causada por derivados de lignina presentes após o processo de pré-tratamento, enquanto *P. echinulatum* resulta em conversão 10% maior de celulose em glicose quando comparado a *Trichoderma reesei* (Gusakov, 2011), além de apresentar estabilidade térmica a 50°C (Camassola et al 2004).

A hidrólise enzimática da biomassa pode ser realizada por diferentes enzimas capazes de degradar a lignocelulose. As celulasas são enzimas chave para biorrefinarias baseadas em resíduos lignocelulósicos, e sua demanda tem aumentado em diferentes indústrias, como celulose e papel, clarificação de sucos, têxteis e detergentes. No entanto, os títulos enzimáticos produzidos ainda são baixos (Singhania et al., 2010; Bhardwaj et al, 2021). A produção de celulasas é influenciada por diversos parâmetros do processo, como composição e nutrientes presentes no meio, pH, temperatura e inóculo (Kuhad et al., 2016).

Entre os microrganismos produtores de celulasas, as cepas de *Penicillium ucsence*, anteriormente *P. echinulatum* (Lenz et al, 2022), como 9AS1 e S1M29, apresentaram resultados importantes relacionados à termoestabilidade da enzima (Camassola et al, 2004), relações entre atividade de β -glicosidase e FPA (Martins et al, 2008), e produção de

celulases (Menegol et al, 2014, Reis et al, 2013; Dillon et al, 2011).

Considerando o potencial para uma futura produção comercial de celulases por *P. ucsense* este trabalho traz contribuições importantes com relação aos procedimentos de inóculo, considerando a influência de seu tempo de crescimento na posterior produção enzimática no cultivo principal realizado em diferentes biomassas lignocelulósicas.

4.1.3 Materiais e Métodos

4.1.3.1 Microorganismo

Foi utilizada a cepa *Penicillium ucsense* S1M29 (Lenz et al 2022). Pertencente ao Laboratório de Enzimas e Biomassas (Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul). A cepa foi obtida através de processo de mutagênese a partir da cepa mutante 9A02S1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSM 18942) (Dillon et al, 2011).

4.1.3.2 Biomassas lignocelulósicas

Três diferentes biomassas foram utilizadas como principal fonte de carbono: bagaço de cana (fornecido pela Casa Buco - Destilados Artesanais, Bento Gonçalves/RS/Brasil, proveniente da moagem da cana); capim elefante (fornecido por um produtor de Nova Petrópolis/RS/Brasil, submetido à moagem em moinho de facas); polpa de eucalipto/pinus (80%/20%) (fornecida por empresa papeleira, após tratamento com peróxido alcalino). O bagaço de cana-de-açúcar e o capim-elefante foram submetidos a pré-tratamento por explosão a vapor, e todas as biomassas foram secas antes de serem utilizadas.

4.1.3.3 Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer (500mL), contendo 100 mL do meio de cultura (5 g.L⁻¹ de celulose, 1 g.L⁻¹ de sacarose, 2 g.L⁻¹ de farelo de soja, 5 g.L⁻¹ de farelo de trigo, 0,5 g.L⁻¹ de Prodex®, 1 mL.L⁻¹ de Tween 80®, 5 mL de solução mineral baseada em Mandels & Reese (1957) e água destilada). Foram inoculados com suspensão contendo 1x10⁷ conídios, conforme Reis et al. (2013), e mantidos a 28°C, com agitação recíproca de 180 rpm, por 24, 48, 72 e/ou 96 horas.

4.1.3.4 Cultivos em frascos agitados

O meio de cultivo foi composto pela fonte de carbono avaliada (celulose, bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante ou polpa de eucalipto/pinheiro) em massa com teor de celulose equivalente a 10 g.L⁻¹. O meio também foi composto por 1 g.L⁻¹ de sacarose, 2

g.L⁻¹ de farelo de soja, 5 g.L⁻¹ de farelo de trigo, 0,5 g.L⁻¹ de Prodex[®], 1 g.L⁻¹ de Tween 80[®] e 5 ml de solução mineral baseada em Mandels & Reese (1957). Os testes foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio, onde foram adicionados 10 mL da suspensão do inóculo. Os frascos foram mantidos sob agitação recíproca de 180 rpm, a 28°C, por 96 horas, conforme Reis et al. (2013). Os cultivos foram realizados em triplicata.

4.1.3.5 Cultivo em biorreator com agitação mecânica (STR)

O biorreator utilizado possui volume operacional de 5L e agitação mecânica, com cuba cilíndrica, com 28 cm de altura e 20 cm de diâmetro, e três defletores distribuídos pelo sistema. A turbina possui formato em “U”, com aletas no corpo e dimensões de 15,3 cm de altura e 12,6 cm de largura (Reis, 2017).

O meio de cultivo para o STR foi semelhante ao dos frascos (utilizando celulose como fonte de carbono) e adicionado volume de inóculo de 500 mL (Reis et al, 2013). Amostras foram coletadas diariamente com intervalo de 8 horas, durante 96 horas.

4.1.3.6 Análises enzimáticas

Atividade sobre papel filtro (FPA) e atividade de endoglicanases foram determinadas conforme metodologia proposta por Ghose (1987), com adaptação proposta por Camassola & Dillon (2012), utilizando papel filtro e carboximetilcelulose (CMC), respectivamente, como substratos. Uma curva padrão de glicose foi construída e a leitura da absorbância realizada em 545 nm (Miller 1959). Unidades de FPA e endoglicanases foram definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por minuto. Atividade da xilanase foi determinada de acordo com Bailey et al. (1992), utilizando xilana como substrato. A absorbância foi medida a 545 nm e a concentração de xilanase foi determinada utilizando uma curva padrão de xilose. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de xilose por minuto. Exoglicanases foram determinadas utilizando p-nitrofenil- β -D-celobiosídeo (pNPC) como substrato, a 405 nm, utilizando metodologia adaptada de Deshpande et al. (1984). Uma curva padrão de pNPC foi construída e uma unidade de exoglicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a hidrólise de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de p-nitrofenil por minuto. Atividade das β -glicosidases foi determinada utilizando o substrato p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (pNPG), utilizando metodologia adaptada de Daroit et al. (2008). A leitura da absorbância foi em 405 nm, com construção de curva de calibração do p-nitrofenol. Uma unidade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima

necessária para liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrofenol por minuto. Toda as análises foram realizadas em triplicata.

4.1.3.7 Análise estatística

Análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism 5, utilizando análise de variância (ANOVA one-way) e pós-teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4.1.4 Resultados e discussão

4.1.4.1 Influência do tempo de preparação do inóculo na atividade enzimática

Para verificar as melhores condições para produção de celulases por *P. ucsense* S1M29 foi avaliada o melhor tempo de cultivo do inóculo. Estes foram produzidos em frascos agitados por 24, 48, 72 e 96 horas, utilizando celulose comercial como fonte de carbono. Foram realizados cultivos de 96 horas, também em frascos agitados, com diferentes condições de inóculo, sendo o controle a suspensão de esporos. Os resultados mostraram variação na produção de enzimas, de acordo com a condição do inóculo (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo dos resultados obtidos após 96 horas de cultivo submerso de *P. ucsense* em frascos agitados, utilizando inóculo com diferentes tempos de cultivo e celulose comercial como fonte de carbono.

Inóculo	FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	β -glicosidases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
Esporos	0.94 ^c $\pm$ 0.04	3.32 ^c $\pm$ 0.07	1.68 ^b $\pm$ 0.07	0.83 ^c $\pm$ 0.07	46.5 ^{bc} $\pm$ 1.6
24 h	0.79 ^{bc} $\pm$ 0.10	3.27 ^c $\pm$ 0.02	1.01 ^b $\pm$ 0.05	0.61 ^c $\pm$ 0.05	43.5 ^c $\pm$ 2.9
48 h	1.04 ^{ab} $\pm$ 0.04	3.89 ^b $\pm$ 0.09	2.66 ^b $\pm$ 0.06	1.16 ^b $\pm$ 0.10	51.1 ^{ab} $\pm$ 3.5
72 h	1.11 ^a $\pm$ 0.01	4.00 ^b $\pm$ 0.08	3.01 ^a $\pm$ 0.11	1.82 ^a $\pm$ 0.01	51.0 ^{ab} $\pm$ 1.2
96 h	0.94 ^{abc} $\pm$ 0.05	5.10 ^a $\pm$ 0.05	2.98 ^a $\pm$ 0.05	1.32 ^b $\pm$ 0.06	49.6 ^{bc} $\pm$ 2.2

Letras diferentes representam diferenças significativas com um interval de confiança de 95% ($p < 0.05$).

Para FPA, maiores atividades foram observadas quando foram empregados inóculos de células vegetativas de 48, 72 e 96 horas. Para endoglicanases, as maiores atividades enzimáticas foram obtidas com inóculo de 96 horas, seguido também pelo inóculo de 48 e 72 horas. Exoglicanases apresentaram atividades superiores com inóculo de células vegetativas crescidas por 72h. Para atividades de β -glicosidases, tanto o inóculo de 72 quanto o de 96h apresentaram valores superiores. Para as xilanases foram observados

valores próximos para todas as condições testadas, sendo as maiores atividades obtidas com o inóculo cultivado por 48 e 72 horas.

Estes resultados são importantes, uma vez que biorreatores com grandes volumes necessitam também de grandes volumes de inóculo, que podem variar de 1-10% do volume total do meio do biorreator. Foi claramente demonstrado que é possível a utilização de células vegetativas em vez de esporos de *P. ucsense* no preparo do inóculo. Embora os esporos sejam fáceis de obter em produções laboratoriais de enzimas, sendo necessário um grande volume, haveria um problema devido à necessidade de grandes superfícies para a produção de esporos. Além disso, o tempo de crescimento das células vegetativas para utilização como inóculo se mostrou importante. De acordo com os resultados apresentados, deve ser considerado um tempo de crescimento superior a 24 horas para as células vegetativas até o inóculo.

Destaca-se a relevância dos dados relativos às β -glicosidases (componente enzimático fundamental para a eficiência do complexo celulolítico) no que diz respeito à sua presença possibilitando maior liberação de glicose na hidrólise da celulose (Martins et al, 2008). Os resultados apontam claramente para a conveniência da utilização de inoculantes produzidos em período de tempo mais longo, visando a produção mais precoce do complexo enzimático de *P. ucsense* que possua maiores proporções de β -glicosidases.

Tendo em vista os dados obtidos para culturas com inóculos com tempos de 48 e 72 horas, que se apresentaram semelhantes para a maioria das enzimas avaliadas, estudos foram realizados, também em frascos agitados, utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas como fonte de carbono no meio e no STR utilizando celulose como fonte de carbono (Tabela 2 e Figura 1, respectivamente).

Tabela 2. Atividades enzimáticas em cultivos de *P. ucsense* em frascos agitados em função do tempo de inóculo, utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas.

	FPA (U.mL ⁻¹)		Endoglicanases (U.mL ⁻¹)		β -glicosidases (U.mL ⁻¹)		Exoglicanases (U.mL ⁻¹)		Xilanases (U.mL ⁻¹)	
	In. 48h	In. 72h	In. 48h	In. 72h	In. 48h	In. 72h	In. 48h	In. 72h	In. 48h	In. 72h
SB	0.06 ^a ± 0	0.05 ^b ± 0	0.4 ^b ± 0.01	0.5 ^a ± 0.04	0.4 ^a ± 0.1	0.5 ^a ± 0.04	0.3 ^b ± 0.02	0.4 ^a ± 0.01	11 ^a ± 1.1	12 ^a ± 0.8
EG	0.18 ^b ± 0.02	0.29 ^a ± 0	0.5 ^b ± 0.02	0.8 ^a ± 0	0.3 ^a ± 0.04	0.4 ^a ± 0.06	0.5 ^a ± 0.03	0.6 ^a ± 0.01	11 ^b ± 0.7	16 ^a ± 2
PEP	0.04 ^a ± 0	0.06 ^a ± 0.02	0.4 ^a ± 0.03	0.4 ^a ± 0	0.4 ^b ± 0	0.6 ^a ± 0.02	0.3 ^b ± 0.08	0.4 ^a ± 0.06	2.3 ^b ± 0.5	4.3 ^a ± 0.3

SB (bagaço de cana-de-açúcar), EG (capim elefante), PEP (polpa de eucalipto/pinus). Cultivos foram realizados a 28°C, por 96 horas, com inóculos crescidos por 48h e 72h. Letras diferentes entre os dois diferentes inóculos na mesma biomassa representam diferenças significativas para $p < 0.05$.

De acordo com a Tabela 2, ao nível dos frascos agitados, observou-se que 48 e 72h de crescimento do inóculo e da fonte de carbono variaram as atividades enzimáticas. Para FPA o inóculo de célula vegetativa cultivada por 72 horas foi mais favorável, nos meios compostos de capim elefante ou polpa de eucalipto/pinheiro, enquanto o inóculo de célula vegetativa de 48 horas foi mais favorável às culturas com bagaço de cana-de-açúcar. Por outro lado, para atividades de endoglicanases, valores superiores foram alcançados com inóculo de 72h em todos os três meios de cultivo, embora para polpa de eucalipto/pinus não tenha havido diferença significativa em relação ao resultado obtido com inóculo de 48h. As exoglicanases apresentaram maior atividade no cultivo com inóculo de 72h para bagaço de cana-de-açúcar e polpa de eucalipto/pinus, sem diferenças para capim elefante. As atividades das β -glicosidases não apresentaram diferenças nos dois diferentes tempos de inóculo para todas as biomassas. Entretanto, para as xilanases, o inóculo de 72 horas resultou em atividades superiores.

Para STR, verificou-se que a utilização do inóculo de 48 h resultou em atividades inferiores para todas as enzimas avaliadas, quando comparado ao inóculo de 72 h. Além disso, vale ressaltar que o pico de atividade para FPA, exoglicanases e xilanases foi alcançado precocemente, em 72 horas de cultivo ($0,62 \text{ U.m.L}^{-1}$, $1,16 \text{ U.m.L}^{-1}$, 44 U.m.L^{-1} , respectivamente), decaindo posteriormente. Esses dados sugerem que, além de atividades mais elevadas, a utilização desse tempo de crescimento para o inóculo, embora mais longo, leva à diminuição do tempo de cultivo. Pelos dados avaliados, o inóculo de 72 horas foi mantido para as próximas etapas do trabalho, pois foi superior para a maioria das condições e enzimas avaliadas, mantendo assim um padrão entre todas as biomassas.

Além disso, esses testes permitiram avaliar o desempenho de *P. ucsense* utilizando diferentes biomassas em cultivo submerso, em relação à sua capacidade de produção e aos dados já apresentados na literatura. A produção de endoglicanases e β -glicosidases por *Fusarium verticillioides* em diferentes concentrações de capim-gamba foi avaliada por Almeida et al. (2019), que observaram que a presença de menores concentrações da gramínea (2,5%) e menores tempos de cultivo (5 dias) favorecem a produção de endoglicanases ($6,5 \text{ U.mL}^{-1}$) em detrimento de β -glicosidases ($0,39 \text{ U.mL}^{-1}$), o que se aproxima das atividades alcançadas no presente estudo.

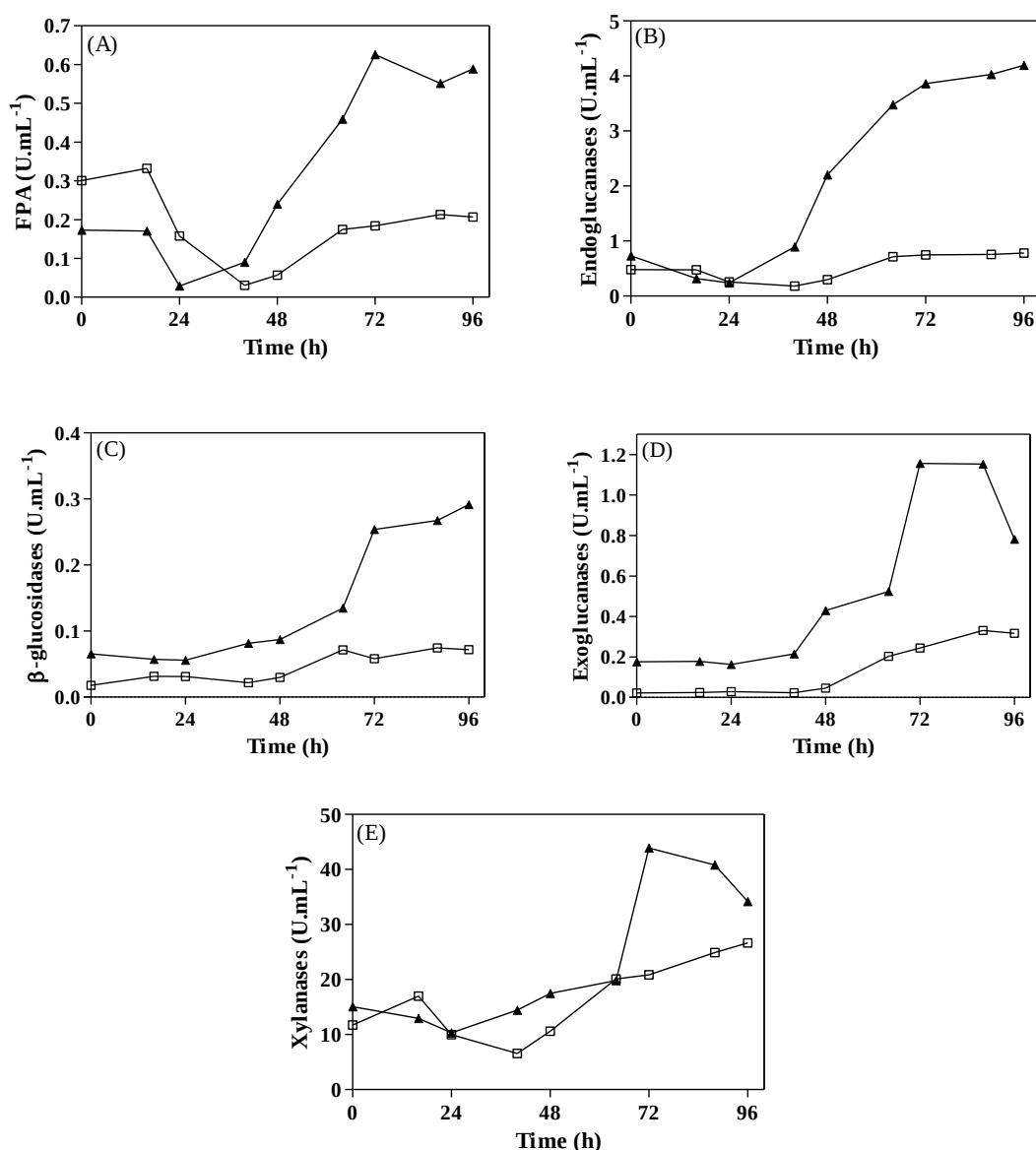


Figura 1. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E) obtidas em cultivo em biorreator com agitação mecânica (STR) de *P. ucsense*, utilizando celulose como indutor, a 28°C, por 96 horas, incubado com inóculo crescido por 48h (□) e 72h (▲).

Liao et al. (2015) observaram que em meio contendo palha de milho e palha de arroz pré-tratados com NaOH, *P. oxalicum* GZ-2 produziu níveis mais elevados de FPA quando comparado ao meio com Avicel, com cerca de 0,6, 1 e 0,2 U.mL⁻¹, respectivamente. Quanto às endoglicanases, os autores observaram atividades de 2,5 U.mL⁻¹ para palha de milho, 1,5 U.mL⁻¹ para palha de arroz e 0,2 U.mL⁻¹ para Avicel, e para β -glicosidases 2,5 U.mL⁻¹ para palha de arroz, 0,4 U.mL⁻¹ para palha de milho e 0,2 U.mL⁻¹ para celulose. Alguns destes resultados são semelhantes aos obtidos neste trabalho e mostram a possibilidade de alcançar maiores atividades enzimáticas utilizando biomassa

lignocelulósica. Brar et al. (2019) observaram atividades de 5,27 U.mL⁻¹ para endoglicanases, 0,45 U.mL⁻¹ para β -glicosidases, 0,13 U.mL⁻¹ para exoglicanases, 0,6 U.mL⁻¹ para FPA e 45 U.mL⁻¹ para xilanases, para *Achaetomium strumarium* cultivado com celulose comercial, farelo de trigo e palha de arroz (3:1:1).

4.1.5 Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o uso de um inóculo crescido por 72 horas resulta em atividades mais elevadas para a maioria das enzimas avaliadas, utilizando *P. ucsense* em processo submerso. Com isso, o presente estudo pode auxiliar no desenvolvimento de um processo mais eficiente e com menor custo, visando futura produção commercial de celulasas e xilanases.

4.2 BIOMASSAS LIGNOCELULÓSICAS UTILIZADAS EM REGIME DESCONTÍNUO E DESCONTÍNUO ALIMENTADO RESULTAM EM DIFERENTES COMPORTAMENTOS NA SECREÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *Penicillium ucsense* S1M29

4.2.1 Resumo

Três diferentes biomassas lignocelulósicas (Bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante e polpa de eucalipto/pinus) foram avaliadas para a produção de celulases e xilanases por *Penicillium ucsense* S1M29 em processo submerso. A utilização de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor mostrou-se mais indicada, enquanto que para o capim elefante, uma etapa de moagem também foi requerida. Polpa de eucalipto/pinus tratada com peróxido alcalino gerou melhores resultados quando utilizada seca e triturada. Ao escalonar o processo para biorreator com agitação mecânica, bagaço de cana-de-açúcar resultou em atividades superiores de FPA, endoglicanases, exoglicanases, β -glicosidases e xilanases, mesmo quando comparado ao controle com celulose. Capim elefante resultou em atividades inferiores as observadas para o controle (celulose) para todas as enzimas avaliadas, enquanto que a polpa de eucalipto/pinus mostrou atividade superior apenas para β -glicosidases. Em uma terceira etapa, onde os cultivos foram conduzidos em regime descontínuo alimentado, os resultados mostraram um elevado incremento nas atividades enzimáticas em relação ao regime descontínuo, exceto para polpa de eucalipto/pinus. Os cultivos com bagaço de cana-de-açúcar mostraram um incremento na atividade de FPA de 2 vezes, enquanto que para o capim elefante o incremento foi de 2,7 vezes. Para celulose (controle) o incremento em FPA também foi de 2 vezes. Polpa de eucalipto/pinus apresentou um acentuado declive na atividade (0,03 vezes para FPA) indicando sua ineficiência para produção enzimática em processos submersos. Os maiores aumentos em atividade enzimática foram observados para β -glicosidases produzidas em capim elefante (8,6 vezes) e bagaço de cana-de-açúcar (4,6 vezes). Os resultados obtidos se mostram promissores para o desenvolvimento de processos de produção enzimática em larga escala utilizando resíduos lignocelulósicos. Isto pode auxiliar na redução de custos das enzimas celulolíticas e nos processos de produção do etanol de segunda geração, bem como para outros metabólitos microbianos de interesse econômico.

Palavras-chave: *Penicillium ucsense*, bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante, polpa de eucalipto/pinus, celulases.

4.2.2 Introdução

Para atender a demanda de energia necessária para manter o padrão de vida atual, a sociedade depende principalmente da utilização de combustíveis fósseis, que condizem com cerca de 80% da energia global obtida, dos quais 58% são consumidos pelo setor de transportes. Entretanto, o rápido aumento em seu consumo devido ao crescimento populacional, e a crescente industrialização, resultará em seu esgotamento (Zabed *et al.*, 2016). A ideia de converter açúcares derivados da biomassa em biocombustíveis foi primeiro proposta na década de 1970, devido a fatores econômicos e geopolíticos, tais como elevado preço do petróleo, preocupações ambientais e instabilidade no fornecimento mundial deste combustível (Kuhad *et al.*, 2016). Outro fator de grande impacto é a contribuição dos combustíveis fósseis para as emissões de gases do efeito estufa. Entre os biocombustíveis, o etanol se destaca, e pode ser produzido a partir de diferentes biomassas, que pertencem a três diferentes grupos: materiais ricos em açúcares, materiais ricos em amido e biomassa lignocelulósica (Zabed *et al.*, 2016).

Os materiais lignocelulósicos são a matéria prima mais abundante na Terra, sendo constituídos por aproximadamente 40% de celulose, 26% de hemicelulose e 30% de lignina, além de outros compostos minoritários, tais como extrativos e sais minerais (Jönson & Martín, 2016). O interesse na utilização destas biomassas se deve ao seu baixo custo, uma vez que as mesmas são em sua maioria compostas por resíduos, e ao fato de não competir com a produção de alimentos (Zabed *et al.*, 2016). Atualmente, sua utilização está sendo considerada crucial para o desenvolvimento de uma economia de baixo carbono, buscando elevado potencial ambiental, social e econômico (Yamakawa *et al.*, 2018).

Dentre as biomassas lignocelulósicas, bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é destacado, sendo um resíduo agro industrial abundante no plantio, com elevados teores de carboidratos em sua composição (Grigorevski-Lima *et al.*, 2013; Chambon *et al.*, 2018). O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com cerca de 578 milhões de toneladas produzidas anualmente, resultando em cerca de 280 quilos de bagaço por tonelada de cana processada na indústria sucroalcooleira (Embrapa, 2024a). O capim elefante (*Pennisetum purpureum*) é uma cultivar tropical nativa da África e que foi introduzida na maioria dos países tropicais e subtropicais. Essa gramínea vem sendo considerada uma alternativa para a produção de combustíveis renováveis devido a sua elevada produtividade e composição (Scholl *et al.*, 2015a; Menegol *et al.*, 2014). Sua produção pode chegar a 50 t/ha/ano, apresentando maior produtividade e menor custo em relação ao cultivo da cana-de-açúcar e do milho (Embrapa, 2024b).

O gênero *Eucalyptus* é originário da Oceania e seu cultivo se espalhou por todo o mundo. Na Europa, estima-se que cerca de 10% da madeira utilizada em indústrias de polpa e papel seja oriunda de plantações de eucalipto, sendo que sua composição varia de acordo com as diferentes espécies (Barneto *et al.*, 2011; Brito *et al.*, 2008). No Brasil, estima-se que cerca de 7,3 milhões de hectares de florestas plantadas de eucalipto existem atualmente, com produtividade média de 39 m³/ha/ano, gerando cerca de 300 toneladas/ha de resíduos, como tocos, raízes e galhos, após a colheita (Embrapa, 2024c). O cultivo de pinus tornou-se um importante aliado no combate à exploração de madeiras nativas no Brasil, com cerca de 1,8 milhões de hectares plantados, representando cerca de 30% das plantações destinadas à produção de papel e celulose, enquanto que na Europa representa 32% (Brito *et al.*, 2008; Embrapa, 2024d).

A completa degradação enzimática da celulose presente nessas biomassas depende da ação conjunta de várias enzimas. As principais delas são as endo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glicanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que atuam sinergicamente hidrolisando ligações glicosídicas presentes na celulose, liberando celoligossacarídeos, celobiose e glicose, respectivamente (Zabed *et al.*, 2016; Singhanian *et al.*, 2010). Essas enzimas constituem um dos grupos enzimáticos mais explorados, apresentando grande potencial de aplicação para a produção de etanol de segunda geração. Vários esforços vêm sendo feitos continuamente para reduzir seus custos de produção e aumentar os títulos enzimáticos do processo microbiológico. A matéria prima é um dos componentes mais relevantes nos custos de produção de uma enzima, aumentando o interesse mundial no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos para sua produção (Singhanian *et al.*, 2010).

Sistemas celulolíticos completos são produzidos por fungos e bactérias. Os mais estudados são os fungos filamentosos, por suas produções elevadas das três classes de enzimas presentes no complexo celulolítico, com destaque para os gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Phanerochaete* e *Aspergillus* (Singhanian *et al.*, 2010). Diversas espécies e meios de cultivo vêm sendo estudados a fim de produzir elevadas concentrações enzimáticas, especialmente utilizando resíduos lignocelulósicos (Kuhad *et al.*, 2016). Entretanto, a maioria destes estudos ainda é realizada em frascos agitados, estado sólido, ou utiliza celulose comercial quando em biorreator. O gênero *Penicillium* tem demonstrado grande potencial na produção de celulasas, uma vez que possui elevada atividade de β -glicosidases, sendo superior a apresentada por outros fungos, dentre eles *T. reesei* (Martins *et al.*, 2008). Estudos relatam que as enzimas produzidas por *Penicillium*

spp. são resistentes a repressão causada pelos derivados de lignina presentes após o processo de pré-tratamento, enquanto que *P. echinulatum* resulta em uma conversão 10% maior de celulose em glicose quando comparado a *T. reesei* (Gusakov, 2011). Além disso, *P. echinulatum* apresenta estabilidade térmica a 50°C nas atividades de FPA e de β -glicosidases (Dillon *et al.*, 2008).

O sistema mais utilizado para produção destas enzimas é o regime descontínuo em biorreatores com agitação mecânica, devido à facilidade no controle dos parâmetros necessários. Entretanto, o uso de um sistema descontínuo alimentado é mais vantajoso para a produção de celulasas em processos submersos utilizando celulose comercial (Hendy *et al.*, 1984; Esterbauer *et al.*, 1991; Reis (2017)). Reis (2017) demonstraram que a utilização de um sistema descontínuo alimentado resulta em incrementos relevantes na atividade enzimática de *P. echinulatum* S1M29, o que pode auxiliar no desenvolvimento de um processo com menores custos de produção. Além disso, as enzimas produzidas por este fungo apresentaram percentuais de sacarificação superiores aos observados para enzimas comerciais, sendo também estáveis a temperatura de 50°C (sua temperatura ótima de atividade), na qual os processos de sacarificação são usualmente conduzidos (Camassola *et al.*, 2004).

Diante disso, o presente estudo teve por objetivo avaliar a produção de enzimas celulolíticas de *P. ucsense* (anteriormente classificado como *P. echinulatum* – Lenz *et al.*, 2022), utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas, buscando determinar sua melhor maneira de utilização, bem como aumentar sua produtividade em diferentes regimes de produção. A eficiência destas enzimas em processos de hidrólise também foi avaliada, uma vez que esse fator também é de grande importância para processos industriais, que não depende somente da concentração, mas também das proporções dos componentes enzimáticos do extrato.

4.2.3 Materiais e métodos

4.2.3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Penicillium ucsense* S1M29 (Lenz *et al.*, 2022), obtido da linhagem mutante 9A02S1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSM 18942) após mutagênese (Dillon *et al.*, 2011). A linhagem pertence a coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

4.2.3.2 Biomassas lignocelulósicas

Três diferentes biomassas foram utilizadas: bagaço de cana-de-açúcar (cedido por Casa Buco - Destilados Artesanais, Bento Gonçalves/RS/Brasil, proveniente da moagem da cana e submetido a pré-tratamento por explosão a vapor); capim elefante (cedido por um produtor de Nova Petrópolis/RS/Brasil, submetido a moagem em moinho de facas e pré-tratado por explosão a vapor); polpa de eucalipto/pinus (80%/20%) (cedido pela companhia Melhoramentos[®], após tratamento com peróxido alcalino).

Para determinar o teor de umidade nas biomassas, 100 mg foram secos em estufa a 100°C *overnight*, e então transferidos para um dessecador para resfriamento a temperatura ambiente. A massa foi novamente mensurada e o teor de umidade calculado, com o teste conduzido em triplicata (Sluiter et al., 2008a). A determinação da granulometria foi realizada utilizando um conjunto de peneiras com mesh variando entre 6 (3,36 mm de abertura) e 35 (0,5 mm de abertura).

A determinação do teor de cinzas foi realizada em triplicata, utilizando 500 mg biomassa lignocelulósica em cadinhos de porcelana, os quais foram calcinados em mufla a 575°C, *overnight*, baseado no protocolo NREL/TP-510-42622 (Sluiter et al., 2008a). O teor de cinzas foi quantificado através da diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, sendo expresso em relação a quantidade de amostra inicial. Composição das biomassas foi avaliada de acordo com o protocolo NREL/TP-510-42618 (Sluiter et al., 2008b), em triplicata, utilizando 20 µL de amostra filtrada em membrana com poro de 22 µm, para análise em HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector RID-10A, coluna Aminex[®] HPX-87H (30x7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), operando a 60°C com fase móvel contendo 5 mmol.L⁻¹ de H₂SO₄ com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

4.2.3.3 Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo (5 gL⁻¹ de celulose, 1 gL⁻¹ de sacarose, 2 gL⁻¹ de farelo de soja, 5 gL⁻¹ de farelo de trigo, 0.5 gL⁻¹ de Prodex[®], 1 mL.L⁻¹ de Tween 80[®], 5 mL de solução mineral baseada em Mandels & Reese (1957) e água destilada para completar o volume) e inoculados com uma suspensão de 1x10⁷ conídios (Reis et al., 2013). Os frascos foram mantidos a 28°C, com agitação recíproca de 180 rpm, por 72 horas.

4.2.3.4 Cultivo em frascos agitados

O meio de cultivo utilizado nos testes em frascos agitados foi composto pela fonte de carbono avaliada (celulose, bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante ou polpa de eucalipto/pinus) em massa equivalente a 10 gL^{-1} de celulose, 1 gL^{-1} de sacarose, 2 gL^{-1} de farelo de soja, 5 gL^{-1} de farelo de trigo, 0.5 gL^{-1} de Prodex[®], 1 gL^{-1} de Tween 80[®] e 5 ml de solução mineral de Mandels & Reese (1957). Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio, e inoculados com uma suspensão com 1×10^7 conídios. Os frascos foram mantidos sob agitação recíproca de 180 rpm, a 28°C, por 96 horas, com coletas diárias, de acordo com Reis et al. (2013). Cultivos foram realizados em triplicata.

4.2.3.5 Cultivo em biorreator com agitação mecânica (STR)

O biorreator utilizado foi construído em uma parceria entre a Universidade de Caxias do Sul e Senai/Mecatrônica. Possui um volume operacional de 5L e agitação mecânica, com uma cuba cilíndrica com 28 cm de altura e 20 cm de diâmetro, e três chicanas distribuídas no sistema. A turbina tem formato de “U” com aletas no corpo e dimensões de 15,3 cm de altura e 12,6 cm de largura (Reis, 2017).

O meio de cultivo para STR foi similar aos frascos, e o volume de inóculo adicionado foi de 500 mL, mais água destilada para completar 5L, sendo mantido até 96 horas, de acordo com Reis et al. (2013). Para os testes conduzidos em regime descontínuo alimentado, a concentração de inicial da fonte de carbono foi equivalente a 5 gL^{-1} de celulose no meio. A alimentação foi realizada manualmente, adicionando biomassa equivalente a $6,24 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de celulose, alcançando uma concentração final equivalente de 40 g.L^{-1} , com os demais nutrientes mantidos na mesma concentração que para o regime descontínuo (Reis, 2017). Alimentação foi iniciada após 16 horas de processo e encerrada em 144 horas, com o cultivo mantido até 168 horas. Amostras foram coletadas diariamente com um intervalo mínimo de 8h.

4.2.3.6 Biomassa micelial

A biomassa micelial foi determinada por método indireto, através da quantificação de ergosterol presente no cultivo, de acordo com metodologia proposta Heleno et al. (2016). A extração do ergosterol foi realizada com base na metodologia proposta por Stoffel et al. (2019), onde 3 mL de amostra foram removidos do biorreator, liofilizados e então extraídos com 6 mL de metanol, agitando em vórtex por 10 segundos em intervalos de 15 minutos, por 1 hora. Subsequentemente, as amostras foram submetidas a 30 minutos

de banho ultrassom (200 W, 40 kHz), centrifugadas (3220 g, 15 min, 4° C) e filtradas em filtros de nylon com 0,2 µm de poro para análise em HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan), com detector UV-Vis, coluna de fase reversa Inertsil ODS-3 (250 x 4.6 mm e 5 µm de tamanho de partícula, GL Science, Tokyo, Japan), operada a 35°C, com fase móvel de acetonitrila/metanol (70:30, v/v), com fluxo de 1 mL.min⁻¹ e detecção a 282 nm (Barreira, Oliveira, & Ferreira, 2014). A identificação e quantificação do analito foi baseada em uma curva de calibração de ergosterol (concentrações entre 0,0039 e 1 mg.mL⁻¹).

4.2.3.7 Determinação de sacarose

A concentração de sacarose no meio foi avaliada conforme Falcone & Marques (1965), com modificações, na qual ocorre a hidrólise ácida do dissacarídeo presente no meio. Para tanto, 0,5 mL da amostra foi hidrolisada com 0,5 mL de HCL 2 mol.L⁻¹ por 10 minutos a 65°C. Após resfriar, foram adicionados 1,25 ml de NaOH 1 mol.L⁻¹ para neutralização e 0,75 ml para obter diluição final de 1:6. Em seguida, 20 µL foram filtrados em membrana com 22 µm de poro e o volume foi injetado em HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector RID-10A, coluna Aminex® HPX-87H (30x7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), operando a 60°C, com fase móvel contendo 5 mmol.L⁻¹ de H₂SO₄, com fluxo de 0.6 mL.min⁻¹, para determinar a glicose presente. Amostras não hidrolisadas também foram avaliadas usando o mesmo processo a fim de quantificar a glicose livre já presente no meio.

4.2.3.8 Análises enzimáticas

Atividade sobre papel filtro (FPA) foi determinada em triplicata, de acordo com metodologia proposta por Ghose (1987), com adaptações propostas por Camassola & Dillon (2012), usando papel filtro como substrato. Uma curva padrão foi construída apartir de concentrações conhecidas de glicose (0 a 2 g.L⁻¹) e a leitura da absorbância foi realizada a 545 nm, para a quantificação de açúcar redutor por DNS (Miller 1972). Unidades de FPA foram definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol.mL⁻¹ açúcar redutor por minuto.

Atividade de endoglicanase também foi determinada utilizando o método de Ghose (1987) com modificações de Camassola & Dillon (2012), usando carboximetilcelulose (CMC) como substrato, em triplicata. A leitura em espectrofotômetro e determinação de atividade foram realizadas conforme descrito para FPA, e uma unidade de endoglicanase foi definida a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol.L⁻¹ de açúcar redutor por minuto.

Exoglicanases foram determinadas usando ρ -nitrofenil- β -D-celobiosídeo (ρ NPC) como substrato, usando metodologia adaptada de Deshpande et al. (1984). Uma curva padrão de ρ NPC foi construída, e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de exoglicanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ρ -nitrofenil por minuto.

Atividade de β -glicosidases foi determinada usando o substrato ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NPG), usando metodologia adaptada de Daroit et al. (2008), em triplicata. A absorbância foi mensurada em 405 nm, com a construção de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de ρ -nitrofenol (0 a 2 g.L^{-1}). Uma unidade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrofenol por minuto.

A determinação da atividade de xilanases foi realizada de acordo com Bailey et al. (1992), usando xilana como substrato, em triplicata. Absorbância foi mensurada a 545 nm e a concentração de xilanase foi determinada usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de xilose (0 a 10 g.L^{-1}). Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de xilose por minuto.

4.2.3.9 SDS-PAGE e géis de atividade

Utilizando o caldo enzimático produzido em biorreator, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Como padrões de massa molecular foi utilizado um marcador molecular *Precision Plus Protein Standards*, Bio Rad®. Após a corrida eletroforética, o gel foi revelado em solução *Coomassie Brilliant Blue* 0,2%, seguida de solução de 50% etanol/105 ácido acético.

Zimogramas foram realizados para determinar a massa molecular de endoglicanases, β -glicosidases e xilanases produzidas por *P. echinulatum* nas diferentes fontes de carbono. Endoglicanases foram determinadas segundo metodologia proposta por Sun et al. (2008) em um sistema semi-desnaturante (SDS-PAGE) e 0,15% de carboximetilcelulose (CMC) como substrato. O gel foi então lavado utilizando solução de triton (2,5%) em tampão citrato de sódio pH 4,8 (30 min), após foi incubado em tampão citrato de sódio (10 min, 40°C), e corado em solução de *Congo Red* (0,1%) por 30 minutos, com posterior lavagem em solução de NaCl 1 mol.L^{-1} . Xilanases foram avaliadas de maneira semelhante, porém com gel contendo xilana como substrato para ação da enzima. A massa molecular de β -glicosidases foi determinada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), que após a corrida foi submerso em solução de triton (2,5%) em tampão citrato de

sódio pH 4,8 (30 min) e lavado com tampão citrato de sódio, pH 4,8. Após a lavagem o gel foi incubado por 40 minutos, em solução de 0,2% (m/v) de esculina em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8 e, em seguida, revelado em solução de FeCl₃ 1% (Kwon *et al.*, 1994).

4.2.3.10 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada a partir de adaptação do método proposto por Adsul *et al.* (2005), em frascos Duran de 50 mL contendo 5% (m/v) de biomassa lignocelulósica, extrato enzimático em volume equivalente a 15 FPU por grama de biomassa, e tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 4,8) para completar 50 mL de reação. As misturas foram incubadas em banho agitado a 150 rpm e 50°C, condição ótima para a atividade enzimática de *P. echinulatum* (Camassola *et al.*, 2004), por 72 horas. Amostras foram coletadas a cada 24 horas e 20 µL foram filtrados (membrana com poro de 22µm) e analisados em HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector RID-10A, coluna Aminex® HPX-87H (30x7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), operando a 60 °C, com fase móvel contendo 5 mmol.L⁻¹ de H₂SO₄, com fluxo de 0.6 mL.min⁻¹.

4.2.3.11 Análise estatística

Análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (one-way ANOVA) e pós teste de Tukey com 95% de interval de confiança (p <0.05), com o auxílio do software GraphPad Prism 5.

4.2.4 Resultados e discussão

4.2.4.1 Composição das biomassas

A composição das três diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas foi avaliada quanto ao teor de cinzas, celulose, hemicelulose e lignina insolúvel presente nas mesmas, sendo que os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1. A determinação da composição química das biomassas se mostra importante, pois segundo relatado na literatura, as concentrações de celulose, hemicelulose e lignina presentes podem variar entre cultivares de diferentes regiões (Almeida *et al.*, 2019).

Dentre as biomassas avaliadas no presente trabalho, EG apresentou o maior teor de celulose, com cerca de 43% de sua composição baseada nesse carboidrato, seguido por SB, com cerca de 38%. Para estas biomassas não foi detectada presença de hemicelulose em sua composição, o que pode ser explicado pelo processo de pré-tratamento por explosão a vapor ao qual foram submetidas, relatado por retirar grandes quantidades deste sacarídeo

durante sua aplicação em diferentes biomassas, dentre elas o capim elefante (Grigorevski-Lima *et al.* 2013; Scholl *et al.* 2015a).

Tabela 1. Composição das diferentes biomassas lignocelulósicas pré-tratadas por explosão a vapor ou com peróxido em meio alcalino.

Biomassa	Cinzas (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina isolável (%)	Total
SB	3,28 ± 0,15	37,61 ± 0,7	ND	38 ± 0,83	78,89
EG	3,26 ± 0,61	42,86 ± 0,4	ND	32,11 ± 1,55	78,23
PEP	0,48 ± 0,2	32,84 ± 0,23	4,62 ± 0,13	27,44 ± 1,37	65,38

SB (bagaço de cana-de-açúcar); EG (capim elefante); PEP (polpa de eucalipto/pinus); ND (não detectado). Nota: os percentuais são menores que 100% devido aos demais componentes presentes nas biomassas e que não foram quantificados pelo método.

Já em PEP, cerca de 5% de hemicelulose foi detectada em sua composição, além dos menores percentuais de lignina insolúvel e celulose. Esse fato pode ser explicado devido à composição *in natura* já diferenciada da madeira em relação às gramíneas, bem como devido ao diferente pré-tratamento utilizado nesta biomassa, já que processos envolvendo presença de H₂O₂ em meio alcalino podem resultar em hidrólise da celulose e são utilizados principalmente com o objetivo de remoção da lignina durante a polpação (Zabed *et al.* 2016). Os dados obtidos na caracterização foram posteriormente utilizados para padronizar a concentração de celulose utilizada durante os cultivos.

4.2.4.2 Determinação da condição para o uso das biomassas pré-tratadas para produção enzimática

A diminuição do tamanho das partículas e consequente aumento da superfície de contato da celulose presente na biomassa é um requerimento importante para os processos de hidrólise da biomassa (Zabed *et al.* 2016), podendo também influenciar na produção enzimática. Com isso, a fim de determinar a melhor forma de utilização das biomassas pré-tratadas, foram realizados cultivos em frascos agitados contendo as biomassas úmidas, secas e secas e trituradas. Para os testes realizados com as biomassas úmidas, um ajuste no total de água adicionada ao meio foi realizado, considerando-se o percentual de umidade presente nas mesmas (64,67% para SB, 69,11% para EG e 48,69% para PEP). Para a biomassa úmida a granulometria não foi medida, sendo a mesma que para as biomassas secas.

Quanto às biomassas secas e secas trituradas, os resultados da granulometria são apresentados na Tabela 2, onde está descrito o percentual retido em cada mesh. Vale ressaltar que para o capim e a polpa triturados, a retenção de 60,4 e 50,4%, respectivamente, em M6 ocorreu devido a uma característica de aglomeração das partículas trituradas, que ambas as biomassas apresentam, e que não é observada no bagaço de cana-de-açúcar. Isso faz com que as partículas de tamanhos menores formem grumos, impedindo sua passagem pelas peneiras

Tabela 2. Percentual de retenção das biomassas pré-tratadas em peneiras da ASTM (mesh) devido a sua granulometria.

Mesh	Retenção (%)							
	M6	M8	M10	M16	M20	M28	M35	<
DSB	48,7	22,6	9,2	11,7	3,1	2,2	1,5	1,0
CSB	-	-	-	12,8	22,3	7,7	14,4	42,8
DEG	93,9	2,2	3,2	0,7	-	-	-	-
CEG	60,4	3,0	7,8	8,6	8,8	-	1,7	9,7
DPEP	93,1	3,7	1,4	1,0	-	0,4	0,5	-
CPEP	50,4	29,8	12,9	3,9	-	0,7	0,9	1,4

DSB (bagaço de cana-de-açúcar seco); CSB (bagaço de cana-de-açúcar triturado); DEG (capim elefante seco); CEG (capim elefante seco triturado); DPEP (polpa de eucalipto/pinus seca); CPEP (polpa de eucalipto/pinus triturada). Mesh – 6 (3.36 mm), 8 (2.38 mm), 10 (2 mm), 16 (1.19 mm), 20 (0.84 mm), 28 (0.59 mm), 35 (0.5 mm).

A Tabela 3 mostra os dados de atividade enzimática em cultivos com as diferentes biomassas pré-tratadas, em condições seca, triturada e úmida, utilizadas como fontes de carbono. Verifica-se que no meio formulado com a biomassa úmida os resultados foram, de uma forma geral, inferiores aos obtidos com as biomassas secas. Este fato, além de ser explicado pela estrutura da biomassa, que muda quando úmida ou seca, também pode ser devido à presença ou ausência de inibidores, sugerindo que o processo de secarem pode ser responsável pela evaporação destas substâncias, resultando, consequentemente, na produção de títulos enzimáticos mais elevados. Isto também explicaria o fato de que nenhuma substância inibitória foi detectada na composição das biomassas, que é determinada com as biomassas secas.

Tabela 3. Atividades enzimáticas em cultivos submersos em meio formulado com biomassas (bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante, polpa de eucalipto e pinus) úmidas, secas e secas e trituradas.

	FPA (U.mL ⁻¹)	β-glicosidases (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
Celulose	0,68 ± 0,05	2,84 ± 0,26	2,7 ± 0,54	2,84 ± 1,09	54,5 ± 7,98
MSB	-	0,58 ^b ± 0,04	0,44 ^a ± 0,02	1,13 ^b ± 0,04	6,45 ^b ± 1,91
DSB	0,011 ^a ± 0,004	1,14 ^a ± 0,10	0,45 ^a ± 0,01	1,31 ^{ab} ± 0,25	6,94 ^{ab} ± 3,67
CSB	0,017 ^a ± 0,016	1,33 ^a ± 0,11	0,56 ^a ± 0,10	1,94 ^a ± 0,39	10,5 ^a ± 1,30
MEG	0,013 ^e ± 0,005	0,29 ^c ± 0,03	0,18 ^e ± 0,001	0,11 ^d ± 0,02	9,71 ^c ± 1,35
DEG	0,073 ^d ± 0,023	0,35 ^c ± 0,01	0,52 ^d ± 0,04	0,34 ^c ± 0,02	10,0 ^c ± 1,16
CEG	0,14 ^c ± 0,033	0,47 ^c ± 0,28	0,58 ^c ± 0,001	0,45 ^c ± 0,28	13,1 ^c ± 1,39
MPEP	0,053 ^g ± 0,031	0,80 ^f ± 0,03	0,38 ^f ± 0,04	0,55 ^f ± 0,05	8,6 ^g ± 0,78
DPEP	0,047 ^g ± 0,017	0,55 ^g ± 0,04	0,28 ^g ± 0,02	0,15 ^g ± 0,02	8,65 ^g ± 1,12
CPEP	0,15 ^f ± 0,001	0,78 ^f ± 0,02	0,42 ^f ± 0,02	0,60 ^f ± 0,09	13,4 ^f ± 1,92

MSB (bagaço de cana-de-açúcar úmido), DSB (bagaço de cana-de-açúcar seco), CSB (bagaço de cana-de-açúcar triturado), MEG (capim elefante úmido), DEG (capim elefante seco), CEG (capim elefante triturado), MPEP (polpa de eucalipto e pinus úmida), DPEP (polpa de eucalipto e pinus seca), CPEP (polpa de eucalipto e pinus seca triturada). Os cultivos foram realizados em frascos agitados, mantidos a 28°C, por 72 e 120h. Análise estatística foi realizada em três grupos, cada um consistindo de uma biomassa, nos quais diferentes letras significam diferença estatística em 95% de intervalo de confiança ($p < 0.05$).

Com relação à utilização das biomassas secas, para o bagaço de cana-de-açúcar, não foi observada diferença significativa entre os resultados obtidos para DSB e CSB, assim, para a continuidade do trabalho a utilização de DSB foi mantida, uma vez que não haveria necessidade de mais uma etapa de processamento, o que implicaria em aumento de custos. Já para o capim elefante e polpa de eucalipto/pinus, os maiores títulos enzimáticos foram obtidos com a utilização das biomassas secas e trituradas, com diferença significativa em relação a sua utilização somente seca, provavelmente devido ao elevado percentual de partículas com granulometria maior (superior a 90%), o que dificulta o acesso do microrganismo a fonte de carbono. Com isso, para a continuidade do trabalho foram mantidas as biomassas CEG e CPEP.

4.2.4.3 Produção enzimática em regime descontínuo

Após as definições das melhores condições em frascos agitados, foram então realizados cultivos em STR, a fim de comparar as atividades enzimáticas produzidas com as diferentes biomassas. Em uma primeira etapa, os cultivos foram realizados em regime

descontínuo, com um cultivo padrão, utilizando celulose comercial como fonte de carbono e indutor, também realizado.

A Figura 1 mostra as atividades obtidas para a linhagem S1M29, onde o cultivo com SB mostrou os maiores valores de FPA, quando comparado com as demais biomassas, incluindo o controle. A atividade de 1 U.mL⁻¹ de FPA foi alcançada após 96h de cultivo, enquanto que para o controle o pico de 0,62 U.mL⁻¹ foi em 72h. Para EG, o pico de atividade foi 0,3 U.mL⁻¹ após 96h, sendo que o cultivo com polpa de eucalipto/pinus alcançou apenas 0,2 U.mL⁻¹ no mesmo período. Entretanto, as atividades enzimáticas foram inferiores as obtidas por Reis et al. (2013) utilizando as mesmas linhagens em concentrações de 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de celulose comercial, que alcançaram atividades de 2 e 4 U.mL⁻¹ de FPA. A menor atividade alcançada no presente trabalho, mesmo para o cultivo padrão, pode ser explicada pela menor concentração de celulose utilizada (10 g.L⁻¹). De acordo com os autores (Reis et al. 2013), a atividade enzimática é proporcional ao aumento da fonte de carbono.

A concentração mais baixa foi utilizada devido ao menor percentual de celulose presente nas biomassas lignocelulósicas, que tornaria inviável a realização de um cultivo submerso em concentrações muito superiores, visto a insolubilidade das biomassas. Dito isso, pode-se ressaltar que para SB, a diminuição da atividade de FPA observada é de certa forma proporcional à diminuição da concentração de celulose no meio, quando comparada aos resultados obtidos por Reis *et al.* (2013). A utilização de celulose (Avicell) em cultivo submerso de *Trichoderma reesei* RUT C30, microrganismo amplamente estudado na produção de celulasas, resultou em atividade de 1,8 U.mL⁻¹ de FPA (Singhania *et al.* 2010), pouco superior ao observado para SB neste estudo, reforçando a ideia de que esta biomassa no meio de cultivo pode sim resultar em atividades enzimáticas relevantes em um processo industrial com menor custo.

Para endoglicanases e exoglicanases, o mesmo padrão de FPA foi observado, com as maiores atividades obtidas para SB (6,2 U.mL⁻¹ em 72h de endoglicanases e 1,5 U.mL⁻¹ de exoglicanases em 96h), seguido do padrão com celulose (4,2 U.mL⁻¹ de endoglicanases em 96h e 1,2 U.mL⁻¹ de exoglicanases em 72h), de EG (2 U.mL⁻¹ de endoglicanases e 0,7 U.mL⁻¹ de exoglicanases, ambas em 96h) e PEP (0,7 U.mL⁻¹ de endoglicanases e 0,4 U.mL⁻¹ de exoglicanases, também em 96h).

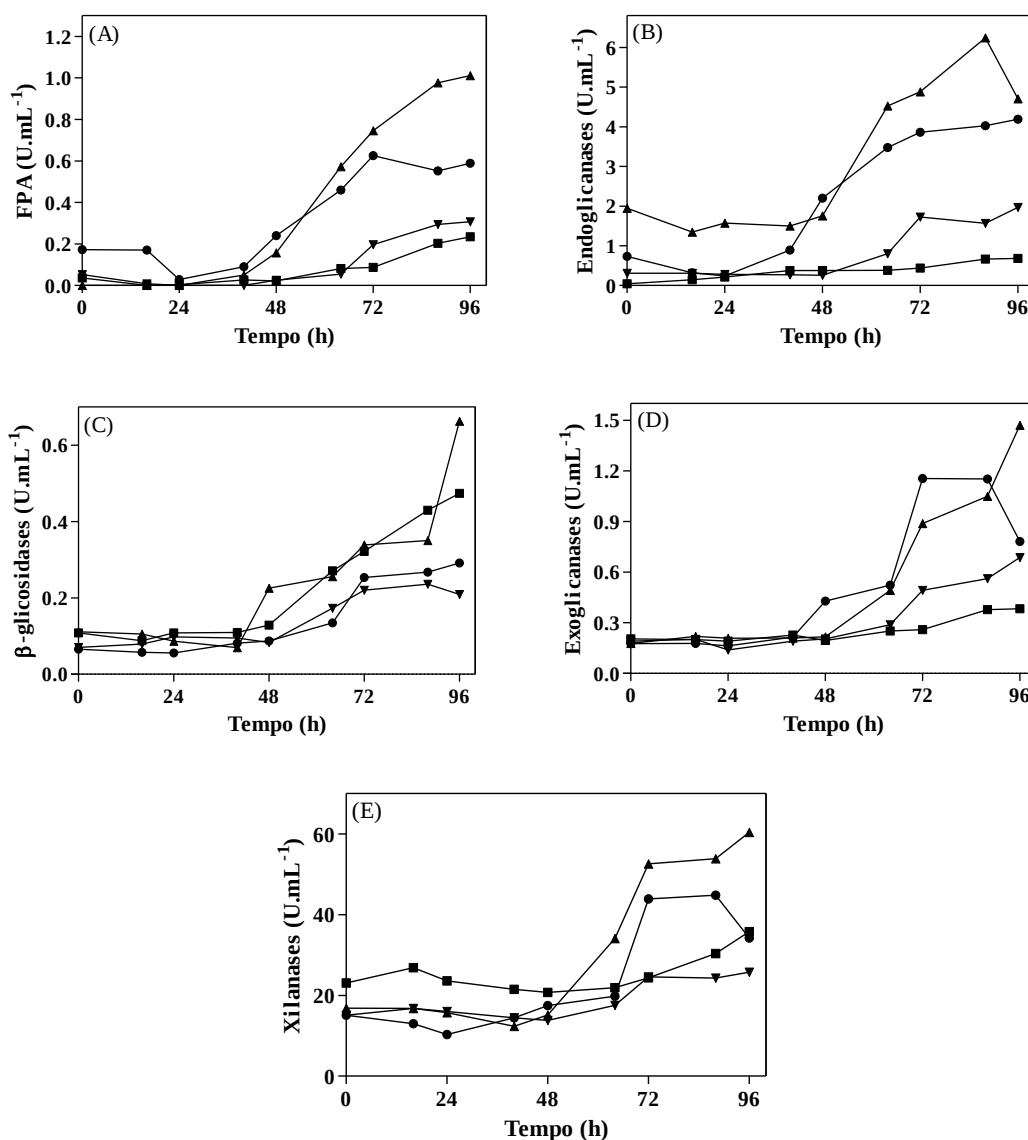


Figura 1. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E) obtidas em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo. (●) celulose, (▲) SB, bagaço de cana-de-açúcar, (▼) EG, capim elefante e (■) PEP. Os cultivos ocorreram a 28°C, por 96 horas.

Porém, ao analisar a atividade de β -glicosidases, foi observado que, apesar de SB continuar apresentando a maior atividade (cerca de 0,7 U.mL⁻¹), a segunda maior atividade foi observada para PEP, com cerca de 0,5 U.mL⁻¹. Já o controle com celulose e EG alcançaram valores de atividade de cerca de 0,3 e 0,2 U.mL⁻¹, respectivamente. Todos os maiores valores para a atividade de β -glicosidases foram alcançados após 96 horas de processo.

Reis *et al.* (2013) observaram atividades de endoglicanases em torno de 20 U.mL⁻¹ dependendo da concentração de celulose utilizada no meio, e β -glicosidases variando entre

1 e 2 U.mL⁻¹, em tempos de processos semelhantes aos do presente trabalho, com aumento da atividade em tempos superiores. Embora as atividades de endoglicanases tenham sido muito superiores às do presente trabalho, as atividades de β -glicosidases foram próximas, mesmo com a concentração inferior de celulose no meio. Considerando que Reis *et al.* (2013) observaram que concentrações superiores de celulose no meio resultam em incremento da atividade de β -glicosidases, a produção semelhante alcançada pode ser um indicativo de que estas enzimas são produzidas em maiores quantidades quando biomassas lignocelulósicas são empregadas no meio, em substituição a celulose comercial.

Quanto a atividade de xilanases, os maiores picos de atividade foram observados novamente para SB, seguido da celulose, de PEP, e por último, EG, com atividades de cerca de 60, 44, 36 e 24 U.mL⁻¹, respectivamente. Os picos foram atingidos após 96h para SB e PEP, 88h para EG, e 72h para a celulose.

Para biomassa micelial, verifica-se que quantidades superiores foram encontradas no cultivo com SB, com 5,7 g.L⁻¹ de massa de micélio após 88 horas de processo (Figura 2). Entretanto, o segundo maior crescimento foi observado para o capim elefante (4,7 g.L⁻¹), cujas atividades enzimáticas foram mais baixas, demonstrando que um maior crescimento não está necessariamente envolvido com uma maior produção das enzimas celulolíticas, sendo outros aspectos como a composição da biomassa e a facilidade com que o microrganismo pode acessar a fonte de carbono também relevantes. Para a celulose, cerca de 3 g.L⁻¹ de massa micelial foram mensurados após 88h de processo, enquanto que para a polpa, o pico de crescimento micelial foi de cerca de 2 g.L⁻¹ entre 64 e 72h de processo.

Quanto à sacarose presente no meio, é possível observar que a mesma é consumida nas primeiras 48 horas, quando se estabiliza próxima a 1 g.L⁻¹ até o final do cultivo (Figura 2). Esses dados diferem dos observados por Reis (2017), que observou que os níveis de sacarose chegavam próximos à zero já em 24 horas de processo, quando *P. ucsense* foi cultivado em meio contendo celulose. Diante disso, análise da concentração de glicose livre no meio também foi realizada, a fim de detectar se a mesma interferiu na determinação da sacarose (determinada após sua hidrólise a glicose e frutose). Os resultados encontrados demonstraram que a concentração de glicose livre permanece constante após 24 horas de processo, sendo proveniente da hidrólise da celulose presente no meio, o que explica a manutenção dos níveis de açúcares no meio até o final do cultivo, uma vez que a glicose não está somente sendo consumida, mas também sendo liberada através da hidrólise da biomassa.

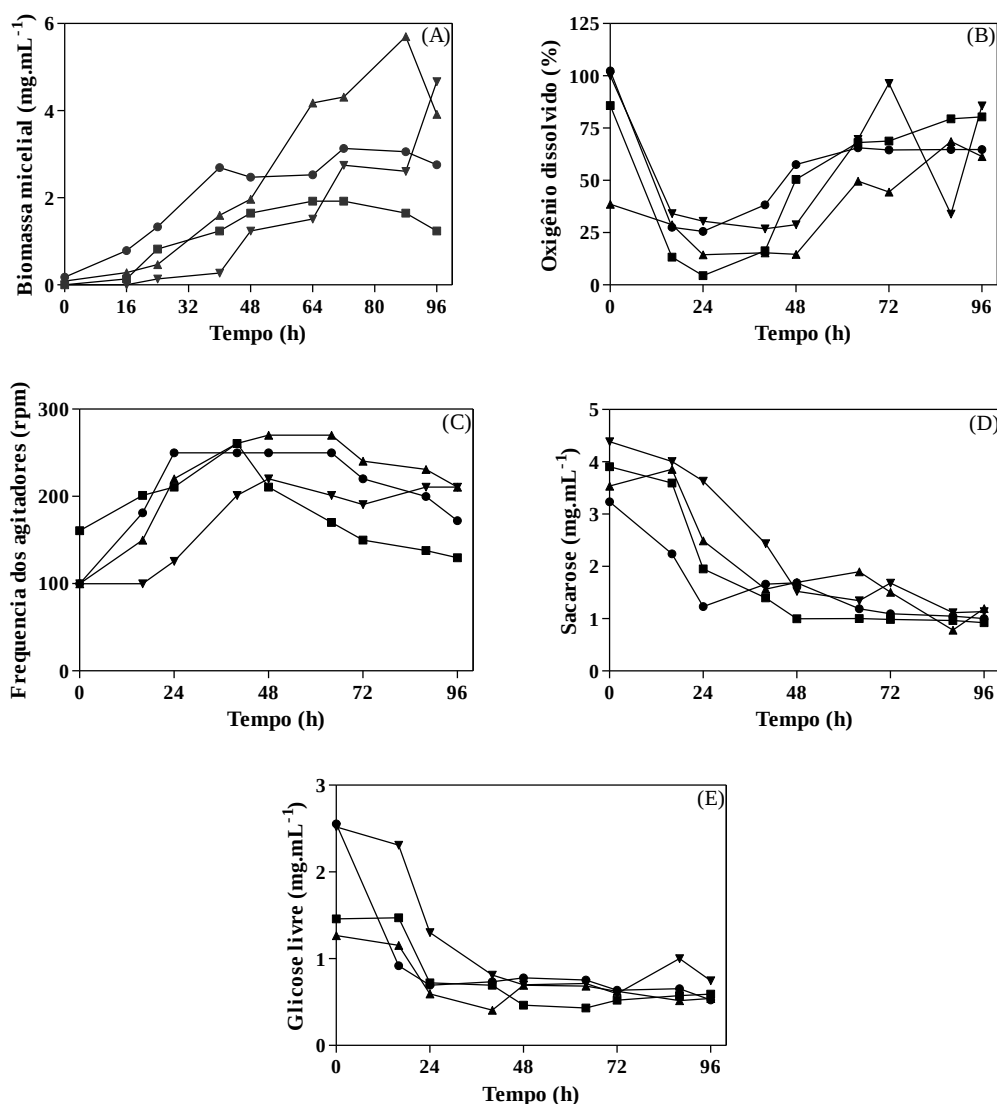


Figura 2. Crescimento micelial (A), oxigênio dissolvido (B), frequência dos impelidores (C), consumo de sacarose (D) e glicose livre no meio (E) durante os cultivos em regime descontínuo, em biorreator com agitação mecânica. (●) celulose, (▲) SB (bagaço de cana-de-açúcar), (▼) EG (capim elefante) e (■) PEP (polpa de eucalipto/pinus0. A temperatura foi mantida a 28°C e o tempo de cultivo foi de 96 horas.

Em relação ao oxigênio dissolvido (Figura 2), há uma queda brusca nas primeiras 16 horas do processo, mantendo-se níveis mais baixos até 48 horas, quando o mesmo volta a se elevar. Esses tempos condizem com a fase de consumo da sacarose, bem como com a fase de crescimento exponencial do microrganismo. Durante esse período, maiores velocidades de agitação são requeridas, sendo diminuídas posteriormente. A manutenção de apenas 30% de oxigênio até o final do cultivo, quando seu consumo diminui, não foi possível devido à viscosidade do meio. Ao diminuir a velocidade de agitação a fim de diminuir o percentual de oxigênio dissolvido, não foi possível manter o meio corretamente

homogeneizado, tendo sido optado por manter a mistura do meio e níveis superiores de O₂, sendo estes níveis diferentes para cada biomassa.

Outro dado importante é que para as maiores frequências de agitação empregadas, maiores crescimentos miceliais foram observados. Constatação semelhante foi feita por Patel *et al.* (2009), em estudos sobre o crescimento de *T. reesei* RUT-C30 em diferentes biorreatores utilizando meio com celulose, porém os autores observaram que para este microrganismo, o aumento da frequência dos agitadores também resultou em diminuição na atividade de FPA. Como pode ser observado no presente estudo, o mesmo não ocorreu para *P. ucsense*, demonstrando que maiores frequências de agitação, e o consequente aumento nas concentrações de oxigênio dissolvido, não resultam em diminuição da atividade enzimática.

4.2.4.4 Produção enzimática em regime descontínuo alimentado

Após os cultivos em regime descontínuo, cultivos em regime descontínuo alimentado também foram avaliados a fim de investigar seu efeito na produção enzimática na linhagem S1M29. A alimentação foi realizada de forma manual, com início da alimentação após 16 horas de processo, com a adição máxima de biomassa com equivalência a 6,24 g.L⁻¹ de celulose por dia, e início do cultivo com o equivalente a 5 g.L⁻¹ de celulose (Reis, 2017).

Conforme a Figura 3, o processo de alimentação incrementou a produção enzimática em relação aos dados obtidos anteriormente, para o controle com celulose, SB e EG, porém o mesmo efeito não foi observado para PEP. Para FPA, as maiores atividades enzimáticas em regime descontínuo alimentado foram observadas para SB, seguido de celulose comercial e EG, com cerca de 2,2 U.mL⁻¹ em 136 horas de processo, 1,3 U.mL⁻¹ também em 136h, e 1,1 U.mL⁻¹ em 160h, respectivamente. Estas atividades são semelhantes as observadas por Pereira *et al.* (2013), utilizando o mesmo microrganismo (com atividades de 1,4 U.mL⁻¹ em meio contendo 49 g.L⁻¹ de celulose, e 3,7 U.mL⁻¹ em meio contendo 46 g.L⁻¹ de bagaço de cana-de-açúcar), porém inferiores aos obtidos por Reis *et al.* (2013), que alcançou atividade de 8,3 U.mL⁻¹ utilizando 40 g.L⁻¹ de celulose.

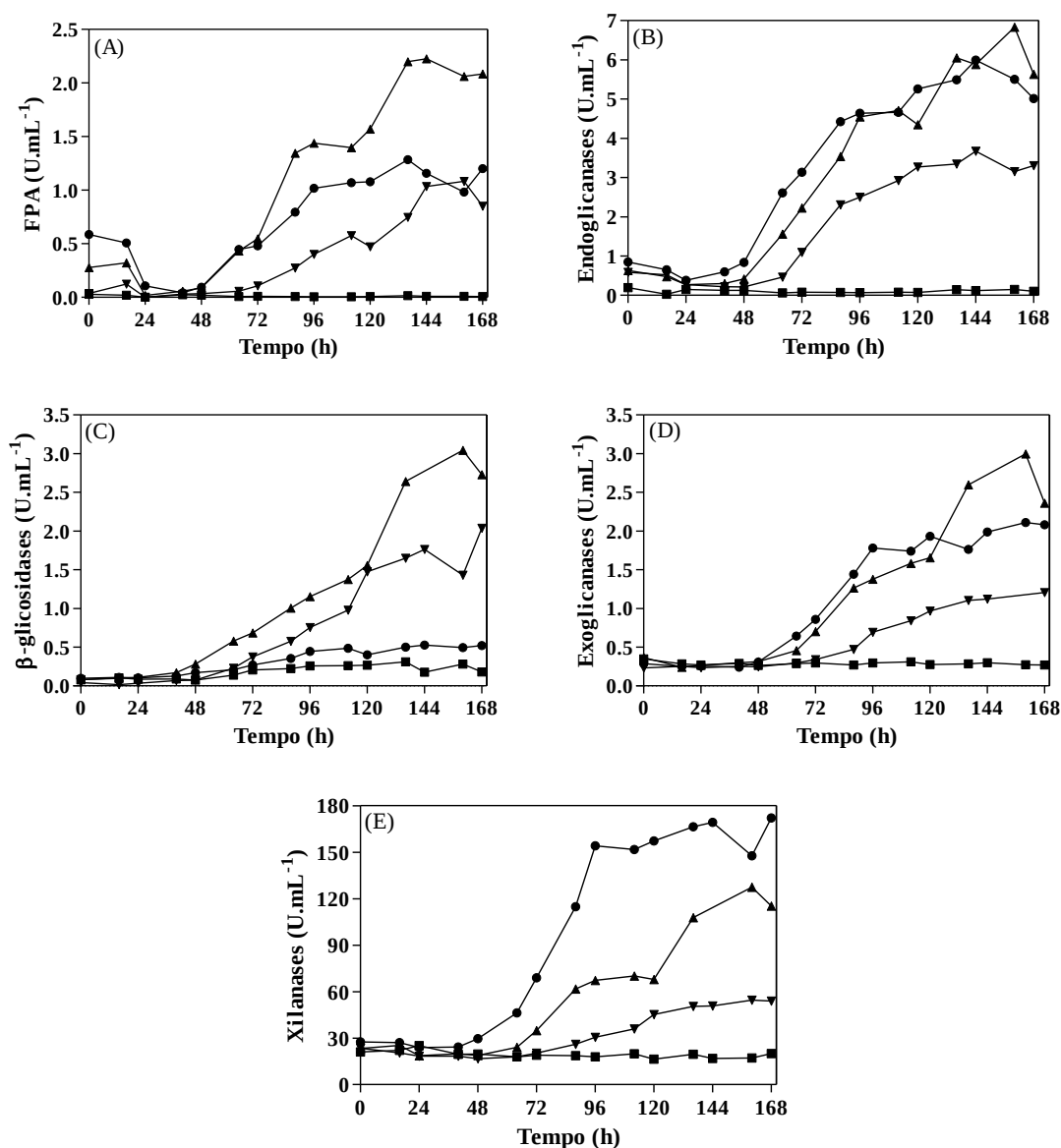


Figura 3. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β-glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E) obtidas em cultivo submerso conduzido em regime descontínuo alimentado, em biorreator com agitação mecânica. (●) Celulose, (▲) SB - bagaço de cana-de-açúcar, (▼) EG - capim elefante e (■) PEP - polpa de eucalipto/pinus. Os cultivos foram mantidos a 28°C, por 168 horas.

Os resultados também foram inferiores aos obtidos utilizando a linhagem RUT-C30 de *T. reesei* por diferentes autores: Hendy *et al.* (1984) obtiveram 26,2 U.mL⁻¹ de FPA utilizando 100 g.L⁻¹ de celulose, enquanto Ma *et al.* (2013) e Li *et al.* (2013) alcançaram, respectivamente, cerca de 19 e 16 U.mL⁻¹ de FPA em meio com 80 g.L⁻¹ de celulose no meio. Os resultados superiores alcançados por esses autores podem estar relacionados a concentração superior de celulose utilizada no meio. Entretanto, a utilização de altas concentrações de celulose, além de encarecer o processo, são difíceis de aplicar em cultivos

utilizando biomassas lignocelulósicas, devido à elevada quantidade de sólidos suspensos presentes, prejudicando assim a reologia do meio, tornando-se um fator limitante no processo.

Para endoglicanases e exoglicanases, SB também apresentou as maiores atividades, seguido da celulose e de EG, com atividades de $6,8 \text{ U.mL}^{-1}$ (160h), 6 U.mL^{-1} (144h) e $4,3 \text{ U.mL}^{-1}$ (136h), respectivamente, para endoglicanases, e 3 U.mL^{-1} (160h), $2,1 \text{ U.mL}^{-1}$ (160h) e $1,2 \text{ U.mL}^{-1}$ (168h) para exoglicanases. Atividades superiores de β -glicosidases foram observadas novamente para SB, com 3 U.mL^{-1} em 160 horas de processo. Para EG, atividade máxima dessas enzimas foi observada após 168h, com cerca de 2 U.mL^{-1} . Para o controle com celulose, apenas um leve incremento foi observado em relação ao regime descontínuo alimentado, alcançando $0,52 \text{ U.mL}^{-1}$ após 136 horas de cultivo.

Os resultados obtidos para endoglicanases se mostraram inferiores ao observados por Reis *et al.* (2013), porém as atividades de β -glicosidases foram semelhantes. A atividade de β -glicosidases alcançada no presente estudo também foi próxima a observada por Li *et al.* (2013), em cultivo de *T. reesei* em meio contendo concentração de 80 g.L^{-1} de celulose, que alcançaram atividade de $4,5 \text{ U.mL}^{-1}$.

O controle com celulose apresentou a maior atividade para xilanases, com 172 U.mL^{-1} no final do processo, valor muito próximo ao observado por Reis *et al.* (2013), que foi de 177 U.mL^{-1} na mesma condição. SB apresentou um pico de atividade de 127 U.mL^{-1} após 160h, enquanto que a máxima atividade de xilanases para EG também foi observada após 160h, com $54,5 \text{ U.mL}^{-1}$. Apesar do pico de atividade nos meios compostos pelas biomassas lignocelulósicas ter sido observado em menor tempo de processo, os valores ainda são bastante inferiores aos observados para o controle, necessitando maiores estudos sobre a formulação do meio para induzir uma maior produção desta enzima, bem como das demais enzimas avaliadas. Na Tabela 4 estão apresentados os aumentos de atividade de cada enzima em regime descontínuo alimentado, em relação ao regime descontínuo.

Tabela 4. Aumento ou declínio nas atividades enzimáticas em regime descontínuo alimentado, em relação ao regime descontínuo, para as diferentes biomassas e o controle com celulose.

	FPA	β -glicosidases	Endoglicanases	Exoglicanases	Xilanases
Cel	2x	1,8x	1,4x	1,8x	3,9x
SB	2x	4,6x	1,1x	2x	2,1x
EG	2,7x	8,6x	1,8x	1,7x	2,2x
PEP	0,03x	0,59x	0,22x	0,77x	0,77x

Cel (controle com celulose); SB (bagaço de cana-de-açúcar); EG (capim elefante); PEP (polpa de eucalipto/pinus). Para o cálculo foram utilizados os valores de pico de atividades.

A utilização do RDA favoreceu a produção enzimática para quase todas as biomassas testadas, exceto para PEP, como já mencionado (Figura 3, Tabela 4). Isso porque, a adição de celulose, ou seu equivalente, em pequenas parcelas durante o cultivo permite a utilização de maiores concentrações, diminuindo, entretanto a repressão catabólica que pode ocorrer em elevados níveis de celulose, bem como diminui os problemas com a dissolução de oxigênio do meio que ocorre quando há elevadas concentrações de sólidos suspensos (Reis, 2017; Reis *et al.* (2013); Esterbauer *et al.* (1991); Ganesh *et al.* (2000)). Entretanto, para PEP, atividades enzimáticas inferiores às observadas em regime descontínuo foram observadas, o que é demonstrado pela variação inferior à 1 na atividade enzimática. As máximas atividades alcançadas em regime descontínuo alimentado foram de 0,02 U.mL⁻¹ para FPA, 0,2 U.mL⁻¹ para endoglicanases e 0,3 U.mL⁻¹ para exoglicanases, todas observadas no tempo 0h, indicando que esta atividade estava presente no inóculo, e foi perdida durante o cultivo. Para β -glicosidases, atividade de 0,3 U.mL⁻¹ foi observada após 136 horas de processo, e 27 U.mL⁻¹ de xilanases após 144h.

O cultivo realizado com PEP apresentou problemas em sua reologia, mesmo que a concentração superior fosse adicionada em intervalos de tempo, devido a características da própria biomassa. Em RDA não foi possível realizar as alimentações regulares determinadas, sendo realizada somente entre 16 e 24h de processo, quando precisou ser interrompida devido à alta viscosidade e elevada presença de sólidos suspensos no meio, o que dificultava sua agitação e aeração. Novas alimentações só foram realizadas entre 120 e 136 horas de processo, e novamente foram interrompidas.

A ausência na produção de enzimas pode ser explicada pelos dados de crescimento micelial, oxigênio dissolvido, apresentados na Figura 4. Picos de biomassa foram observados em 48 e 136 horas, após as duas alimentações serem realizadas, sugerindo que possivelmente houve carência de algum nutriente no meio de cultivo. Além disso, a manutenção da velocidade dos impelidores elevada, juntamente com a reologia do meio, bastante densa se comparada aos demais meios, pode ter resultado no cisalhamento do micélio, contribuindo assim para a queda no seu crescimento e produção enzimática. Após a segunda alimentação, a frequência dos impelidores foi diminuída, podendo ter auxiliado no crescimento micelial, juntamente com a adição de novos nutrientes. Diante desses resultados, a utilização de PEP para produção enzimática em processos submersos parece não ser indicada, ao contrário das demais biomassas utilizadas, que se mostraram promissoras em RDA.

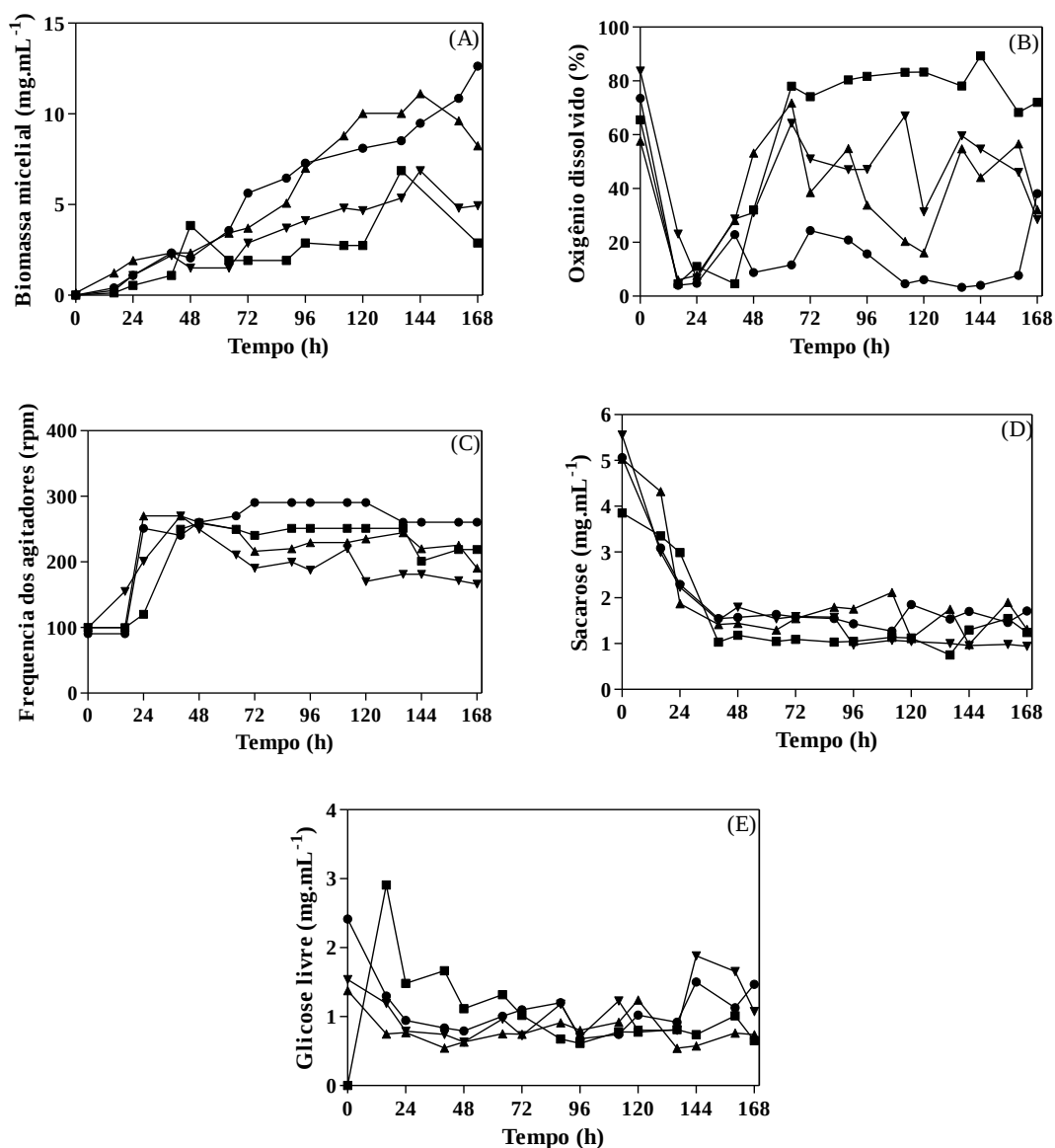


Figura 4. Crescimento micelial (A), oxigênio dissolvido (B), frequência dos impelidores (C), consumo de sacarose (D) e glicose livre no meio (E) durante cultivos em regime descontínuo alimentado. (●) celulose, (▲) SB – bagaço de cana-de-açúcar, (▼) EG – capim elefante e (■) PEP – polpa de eucalipto/pinus. Os cultivos foram conduzidos em biorreator com agitação mecânica (STR) a 28°C por 168 horas.

Quanto aos dados de crescimento das demais biomassas, concentrações superiores de micélio foram observadas em 144 horas tanto para SB, quanto para EG, com aproximadamente 11 e 7 g.L, respectivamente. Maior biomassa micelial em presença de celulose foi observada ao final do cultivo, com 12 g.L, sendo a maior concentração de micélio entre todas as condições avaliadas. Presença de sacarose também foi observada até o final do cultivo, e novamente a presença de glicose livre foi constatada no meio, podendo os açúcares detectados serem provenientes da sacarose ou da celulose presentes no meio.

4.2.4.5 SDS-PAGE e géis de atividade das enzimas produzidas com diferentes biomassas lignocelulósicas em RD e RDA

A atividade das enzimas β -glicosidases, endoglicanases e xilanases nos caldos também foram detectadas em zimogramas, com substratos específicos, em cujas corridas eletroforéticas também foram aplicadas amostras de padrões para massa molecular. Também foi produzido um gel SDS-Page para as proteínas totais presentes nos extratos. Para tanto, volume padrão de amostra foi utilizado para cada enzima, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5. Através dos zimogramas é possível observar que, para os cultivos realizados em RDA, há uma maior atividade enzimática em relação à RD, visto pela presença de bandas maiores e mais visíveis, devido a maior modificação dos substratos específicos pela presença da enzima, bem como maior concentração de proteínas, o que é evidenciado pela presença de bandas mais largas no SDS-PAGE. Outro fato que pode ser observado é a produção de diferentes isoformas de endoglicanases e xilanases, de acordo com a biomassa utilizada.

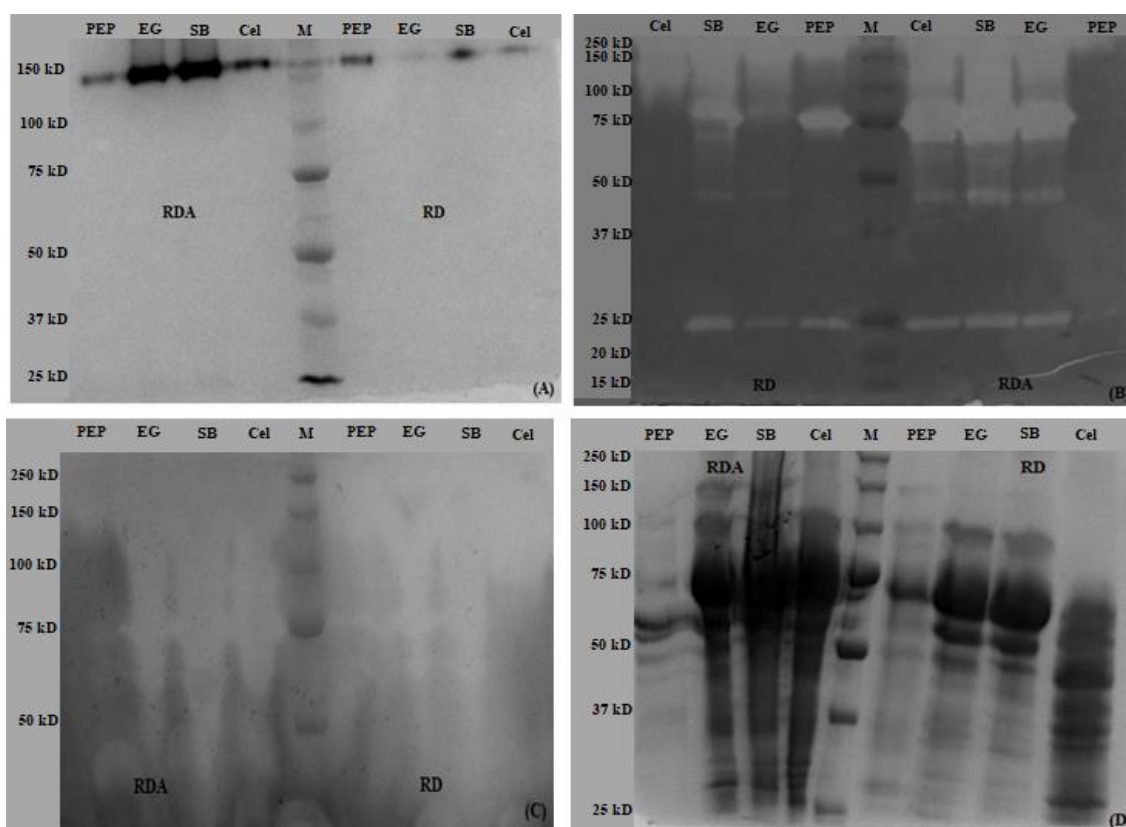


Figura 5. Zimogramas para a atividade de β -glicosidases (A), Endoglicanases (B) e Xilanases (C), e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas (D) produzidas por *P. ucsense* em cultivos submersos, conduzidos em biorreator com agitação mecânica, em regimes descontínuo (RD) e descontínuo alimentado (RDA).

Admitindo que bandas de atividade enzimática nos zimogramas representem as bandas de proteínas no SDS-PAGE é possível fazer uma estimativa da massa molecular das enzimas. Desta maneira, para endoglicanases, as isoformas com massa molecular entre 37 e 50 kD, bem como de 100 kD, não são produzidas em meio contendo PEP. A isoforma com tamanho variando entre 37 e 50 kD também não é produzida em RD em meio contendo celulose comercial, onde endoglicanases de 25 kD também não são produzidas. Estas constatações demonstram que não só os componentes do meio, mas também a forma de processo influencia no número de isoformas de endoglicanases presentes no extrato. As maiores bandas de atividade enzimáticas foram observadas para massas molares equivalentes a 250 e 75 kDa, para todas as biomassas. Essas massas são maiores que as observadas em cultivo de *P. oxalicum* GZ-2, onde endoglicanases com massas molares diferenciadas, variando entre 35 e 70 kDa foram obtidas, em meios contendo palha de milho e palha de arroz como substratos (Liao *et al.*, 2015). Endoglicanases produzidas por *T. atroviride* 676 em meios contendo biomassas residuais apresentaram massas molares mais próximas as obtidas no presente trabalho, variando entre 104 e 200 kDa (Grigorevskilima *et al.*, 2013).

Xilanases com massas molares variando entre 50 e 75 kD foram produzidas nos meios contendo SB e EG em ambos os regimes empregados, porém só foram produzidas em meio contendo celulose em RDA. Esses dados podem indicar que o aumento na atividade enzimática em RDA possa se dar não somente devido a uma maior atividade enzimática das isoformas produzidas em RD, mas também devido à produção de novas isoformas das diferentes enzimas.

B-glicosidases de uma única massa molecular foram produzidas em todas as condições testadas, sendo elas de 150 kD, sendo uma massa maior que a observada para β -glicosidases de *P. oxalicum* GZ-2 cultivado em palhas de milho e arroz, que também apresentou uma única isoforma dessa enzima, um pouco superior a 75 kD (Liao *et al.* (2015). No gel de proteínas totais, foi possível observar a presença de outras proteínas de diferentes massas molares produzidas por *P. ucsense*, podendo estas serem outras enzimas, como exoglicanases, ou diferentes proteínas produzidas pelo metabolismo do fungo.

4.2.4.6 Hidrólise enzimática

A fim de determinar a eficiência de hidrólise dos coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* utilizando as diferentes biomassas lignocelulósicas, bem como celulose, os mesmos foram aplicados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, do capim elefante e da

polpa de eucalipto/pinus, e comparados a um controle utilizando enzima comercial Celluclast®. Os resultados obtidos para liberação de glicose no meio estão apresentados na Figura 6.

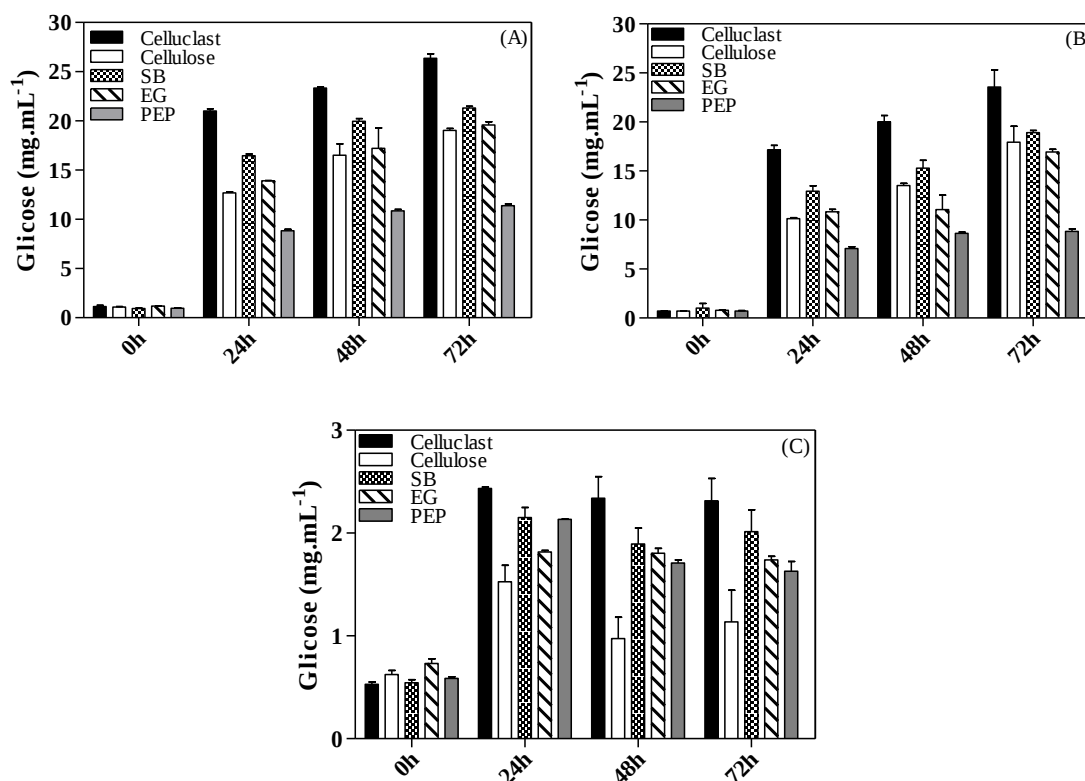


Figura 6. Glicose liberada da hidrólise de (A) Bagaço de cana-de-açúcar, (B) Capim elefante, (C) Polpa de eucalipto/pinus por diferentes soluções enzimáticas obtidas de *P. ucsense*. As soluções enzimáticas foram obtidas em meios de cultivo contendo diferentes fontes de carbono em regime descontínuo (celulose, bagaço de cana-de-açúcar - SB, capim elefante - EG, e polpa de eucalipto/pinus – PEP), Utilizou-se um volume de enzima para uma atividade total de 15 FPU/g do substrato a ser hidrolisado. Como controle foi utilizado o complexo enzimático comercial Celluclast®.

Os resultados obtidos demonstram que, para a hidrólise das três biomassas, a enzima Celluclast® foi capaz de liberar maiores concentrações de glicose, em intervalos de tempo menores. Porém vale ressaltar que, devido à padronização realizada para uma atividade de 15 FPU por grama de substrato, o volume de solução enzimática adicionado para a enzima comercial em comparação às demais enzimas foi muito menor, afetando assim o volume de tampão adicionado, e consequentemente, o pH da reação, que ficou próximo a 6,0 para as condições contendo os extratos brutos. Considerando que o controle de pH é de elevada importância no processo, se torna interessante investigar processos de concentração das enzimas obtidas, a fim de obter uma melhor comparação com as enzimas comerciais, onde os volumes adicionados sejam mais proporcionais, e com isso o pH seja

menos afetado.

Quanto às enzimas produzidas por *P. ucsense*, para a hidrólise das três biomassas avaliadas, as enzimas produzidas utilizando SB resultaram em maior liberação de glicose no meio quando comparadas às demais, sendo a que se aproximou mais dos resultados obtidos utilizando enzima comercial, alcançando cerca de 20 mg.mL⁻¹ de glicose após 24 horas na hidrólise do bagaço, e após 72 horas para a hidrólise do capim. Para a hidrólise do bagaço e o capim, as enzimas produzidas utilizando celulose comercial e EG como indutores apresentaram resultados semelhantes, um pouco inferiores aos observados para as enzimas produzidas com SB, e superior aos obtidos para as enzimas produzidas com PEP. Estes dados demonstram o potencial de uso da boagaço de cana-de-açúcar para produzir um eficiente complexo de celulasas para o etanol 2G.

Resultados semelhantes foram observados por Liao *et al* (2015), que avaliaram a eficiência de hidrólise de enzimas produzidas utilizando palha de arroz, de trigo, e Avicel como substratos, e constataram que enzimas produzidas em meio suplementado com palha de arroz foram as que apresentaram melhores resultados, seguido pelas enzimas produzidas com celulose comercial, e por fim, com palha de trigo. Já Reis *et al* (2013), obtiveram resultados distintos ao utilizarem enzimas produzidas por *P. echinulatum* em meio contendo celulose, e Cellic CTec2, onde as enzimas comerciais apresentaram liberação de açúcar 15% inferior ao extrato bruto. Entretanto, uma suplementação extra de β -glicosidases foi utilizada pelos autores, o que não foi realizado no presente trabalho.

Para a hidrólise da polpa de eucalipto/pinus, a segunda maior liberação de açúcares após 24 horas foi utilizando as enzimas produzidas na própria PEP. Este dado se mostra interessante, pois, para estas enzimas, a carga enzimática utilizada (5 FPU por grama de substrato) foi três vezes inferior que para as demais enzimas avaliadas, demonstrando que essas enzimas apresentam uma eficiência de hidrólise superior às demais, mesmo nas outras biomassas avaliadas. Uma explicação possível para este fato é a elevada produção de β -glicosidases em PEP. O fato de que a atividade de β -glicosidases é essencial para uma degradação eficiente de materiais lignocelulósicos é bastante conhecido, uma vez que a celobiose (seu substrato) é um inibidor da atividade de endoglicanases e exoglicanases (Almeida *et al*, 2019). A importância do equilíbrio entre as diversas enzimas e, portanto, em seu sinergismo durante a hidrólise, também foi evidenciada por Liao *et al* (2015), que observaram que quando misturas dos extratos enzimáticos obtidos com material lignocelulósico e com celulose comercial foram usados, os resultados de hidrólise foram superiores, mesmo que a carga enzimática em termos de FPA fosse a mesma,

demonstrando que um correto balanço no coquetel enzimático é necessário.

4.2.5 Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a utilização de bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante para a produção de celulasas por *P. ucsense* em processo submerso é uma alternativa viável e promissora, sendo necessários maiores estudos em relação ao processo, buscando sua otimização. Também foi possível observar que as enzimas produzidas nesses substratos são capazes de hidrolisar satisfatoriamente diferentes biomassas lignocelulósicas, porém a realização de processos de concentração, ou a utilização de extratos com maiores atividades podem resultar em resultados superiores em menores tempos de reação. Em vista disso, o presente trabalho contribuiu para o desenvolvimento de processos com custos de produção enzimática menores, tornando seu uso na produção de etanol 2G menos oneroso.

4.3 PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *Penicillium ucsense* EM BIORREATOR, UTILIZANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E CAPIM ELEFANTE COMO PRINCIPAIS FONTES DE CARBONO, MAIS ADITIVOS

4.3.1 Resumo

No presente trabalho, buscou-se aumentar a produção enzimática da linhagem S1M29 de *Penicillium ucsense*, utilizando bagaço de cana de açúcar e capim elefante como principais fontes de carbono. Para tanto, variações nas concentrações dos aditivos farelo de soja, farelo de trigo e sacarose foram primeiramente avaliadas em frascos agitados. Os resultados demonstraram que a presença de maiores concentrações de farelo de soja resultou em maiores atividades de FPA, exoglicanases e xilanases. Entre várias condições estudadas, a que utilizou 10 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 4 g.L⁻¹ de farelo de soja resultou em atividades enzimáticas 7,5 vezes superiores ao meio padrão para FPA e xilanases, 6,5 vezes para endoglicanases, 1,5 vezes para β -glicosidases e 8 vezes para exoglicanases, quando associada ao bagaço de cana de açúcar. Para capim elefante, a condição com 2 g.L⁻¹ de sacarose, 5 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 4 g.L⁻¹ de farelo de soja resultou em incremento de 3 vezes na atividade de FPA e β -glicosidases, mais de 6 vezes em exoglicanases e dobrou a atividade de xilanases. Ao avaliar a substituição parcial das biomassas com celulose comercial, foram observados aumentos significativos somente nas atividades de FPA e endoglicanases, em relação à utilização das biomassas puras, com queda nas atividades de xilanases. A substituição parcial ou suplementação das biomassas com lactose não resultou em efeito positivo na produção de nenhuma enzima. Em cultivos em biorreator agitado foram avaliadas as melhores condições observadas em frascos agitados para os aditivos, bem como meios compostos por 50% de biomassa e 50% de celulose comercial. Entretanto, em biorreator, apesar dos resultados positivos em frascos agitados, para bagaço de cana de açúcar, o meio padrão permaneceu com as maiores atividades em FPA e xilanases. Para as demais enzimas, apenas a condição em que ocorreu aumento da concentração dos aditivos apresentou incremento nas atividades, de 55% para endoglicanases, 54% para exoglicanases e 74% para β -glicosidases. No meio composto com capim elefante, também se observou que o meio padrão permaneceu com a maior atividade de FPA, enquanto que o meio alimentado com maiores concentrações de aditivos resultou em aumento de 39% na atividade de endoglicanases e cerca de 140% para β -glicosidases e exoglicanases. A presença de celulose comercial mostrou-se desnecessária para ser adicionada a biomassa para a produção da maioria das enzimas, desde que apresentou apenas incremento de 40%

para xilanases.

Palavras-chave: celulases, capim elefante, bagaço de cana-de-açúcar, *P. ucsense*, regime descontínuo alimentado.

4.3.2 Introdução

A sustentabilidade se tornou um tema central para a humanidade. O consumo de energia proveniente das fontes convencionais (combustíveis fósseis, que correspondem a cerca de 80% da energia global) está impactando o meio-ambiente, estando também as reservas se esgotando. Com isso, as mudanças para fontes renováveis são alternativas relevantes e necessárias (Zabed *et al.*, 2016; Vaishnav *et al.*, 2018). Uma maneira promissora de alcançar uma bioeconomia sustentável é a utilização de biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de combustíveis, produtos químicos, enzimas e também produtos de alto valor agregado (Verma *et al.*, 2020). Resíduos lignocelulósicos contêm 40 a 50% de celulose e podem ser utilizados como fonte de carbono para a produção de combustíveis renováveis. A biomassa obtida de indústrias agrícolas e florestais pode servir como matéria-prima adequada, pois está disponível em abundância ao longo do ano. Entretanto, a chave para sua utilização é a desconstrução do componente celulose em seus açúcares monoméricos, e sua subsequente transformação em produtos químicos e energia (Gao *et al.*, 2020; Bhardwaj *et al.*, 2021).

Celulases são um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise sequencial do polímero de celulose até sua unidade monomérica, a glicose. É composto por endoglicanases (EC 3.2.1.4), exoglicanases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21), sendo o fator chave para a produção de etanol de segunda geração (Vaishnav *et al.*, 2018; Ramamoorthy *et al.*, 2019). As ligações glicosídicas presentes na biomassa celulósica, nas regiões amorfas são hidrolisadas por endoglicanases, formando oligossacarídeos. Esses oligômeros são então clivados pelas exoglicanases nas extremidades redutoras e não redutoras para gerar celobiose, que é posteriormente hidrolisada por β -glicosidases liberando glicose (Bhardwaj *et al.*, 2021). Xilanases são as enzimas responsáveis pela degradação da xilana, polímero de pentoses também presente na biomassa lignocelulósica e sua indução em fungos filamentosos é complexa e varia em cada microrganismo (Salazar *et al.*, 2020).

Entretanto, as celulases e xilanases são responsáveis por cerca de 40% do custo total da produção do etanol de lignocelulósios, impulsionando pesquisadores, indústrias e governos na busca de novas fontes enzimáticas, uma vez que estes altos custos dificultam a

viabilidade comercial do etanol celulósico, ou etanol de segunda geração, como é chamado (Ramamoorthy et al., 2019; Verma et al, 2020). A baixa produtividade enzimática dos microrganismos empregados consiste em um dos maiores desafios que muitos pesquisadores vêm tentando resolver em diferentes frentes, como tecnologias eficientes de bioprocessos e sua otimização, uso de fontes de carbono mais baratas, como resíduos, melhoramento genético de linhagens, etc. Muitos trabalhos vêm sendo feitos com base no aprimoramento dos bioprocessos, sendo a maioria deles usando fermentação submersa usando *Trichoderma reesei*, a espécie fúngica mais utilizada para a produção comercial de celulasas (Vaishnav et al, 2018).

A produção de celulasas e hemicelulasas por fungos é fortemente afetada pelo meio e pelas condições de cultivo, sendo a fonte de carbono utilizada um dos fatores de maior importância (Costa et al., 2018). Diferentes fontes de carbono induzem a produção de diferentes grupos de enzimas no mesmo microrganismo. Para fungos do gênero *Aspergillus*, o uso de sorgo resulta em maiores produções de β -glicosidases em relação ao bagaço de cana de açúcar. Com isso a avaliação de diferentes biomassas como fonte de carbono é importante para a tentativa de induzir a produção de diferentes enzimas (Almeida et al., 2019), bem como o uso de diferentes fontes de carbono, em conjunto.

Embora muitas pesquisas tenham sido publicadas sobre a produção de celulasas em fermentação submersa, poucos falam sobre os desafios enfrentados para a transferência do processo de frascos agitados para reator de bancada, e deste para um volume maior, sendo alguns deles a formação de espuma, alta viscosidade, transferência de massa e manutenção do oxigênio dissolvido. Atenção especial também deve ser dada a composição do meio de cultivo, uma vez que cada microrganismo tem necessidades específicas para seu crescimento e indução para a produção de celulasas, visto que, por exemplo, indutores que funcionam bem para *Trichoderma* sp. geralmente não são aplicáveis para *Penicillium* sp., por exemplo (Vaishnav et al, 2018). Pesquisas com diferentes microrganismos têm enfatizado as vantagens de se utilizar farelo de trigo, um subproduto mundialmente disponível, como substrato para obter elevadas produções de celulasas (Costa et al., 2018). Outros estudos demonstraram que o farelo de trigo e a carboximetilcelulose como substratos produzem atividades semelhantes de CMCase e FPase, enquanto que palha de arroz, casca de arroz, palha de trigo e bagaço de cana-de-açúcar apresentaram baixas atividades quando comparadas a celulose comercial, para a *Schizophyllum commune* NAIMCC-F-03379s (Bhardwaj et al, 2021).

Após a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio é um dos parâmetros mais

importantes, influenciando no metabolismo e na produção enzimática pelos microrganismos. O nitrogênio pode ser adicionado no meio através de fontes inorgânicas, como sais de amônio, ou orgânicas, como o extrato de levedura e farelos de soja, milho e arroz (Vieira et al, 2020). Com isso, os substratos lignocelulósicos podem ser usados como uma alternativa adequada a celulose utilizada como um indutor comerciais por produzir uma série de enzimas que levam a uma melhor hidrólise da celulose (Bhardwaj et al, 2021). Gao et al, (2020) relataram que o uso de farelo de trigo, farelo de soja e leticina de soja resultaram nas atividades de FPA mais elevadas entre todos os meios e indutores avaliados inorgânicos comerciais avaliados.

Bactérias e fungos são capazes de produzir enzimas celulolíticas, embora os fungos tenham se mostrado mais adequados devido às suas propriedades de produzir secreções extracelulares (Bhardwaj et al, 2021). No presente, a maioria das celulasas comerciais é derivada de linhagens mutantes de *Trichoderma reesei*. Entretanto, estas linhagens apresentam baixa proporção na relação entre β -glicosidases e FPase, resultando em inibição das enzimas devido à alta concentração de celobiose, um inibidor enzimático, durante o processo de hidrólise. Para a completa hidrólise dos materiais lignocelulósicos, o coquetel de celulasas deve ser rico em todas as enzimas, sendo elas exoglicanases, endoglicanase, β -glicosidases, xilanases, entre outras enzimas acessórias. Diante disso, outros fungos filamentosos, incluindo os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium* e *Acremonium* têm sido avaliados também como alternativa para a produção destas enzimas (Gao et al, 2020; Vieira et al, 2020).

Linhagens de *Penicillium* spp. vêm sendo relatadas como capazes de produzir maiores títulos de β -glicosidases, se comparadas a *T. reesei* (Martins et al., 2008). Além disso, enzimas produzidas por *Penicillium* spp. são mais resistentes a repressão causada pelos derivados de lignina (Gusakov, 2011). Enzimas produzidas pelo *P. echinulatum* 9AO1 (atualmente classificado como *P. ucsense* – Lenz et al, 2022) apresentam percentuais de sacarificação superiores aos observados para enzimas comerciais, além de serem estáveis a temperatura de 50°C (sua temperatura ótima de atividade), na qual os processos de sacarificação são usualmente conduzidos (Camassola et al, 2004). Visando aumentar a produção de celulasas na linhagem S1M29 de *P. ucsense*, avaliou-se a presença de diferentes concentrações de fontes de carbono e de fontes de nitrogênio, farelo de trigo, farelo de soja e sacarose, bem como seu melhor regime de produção de celulasas, na produção enzimática durante o processo.

4.3.3 Materiais e métodos

4.3.3.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a linhagem S1M29 de *Penicillium ucsense* (Lenz et al, 2022), obtida da linhagem mutante 9A02S1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSM 18942) após mutagênese (Dillon et al., 2006; Dillon et al, 2011). Pertence à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

4.3.3.2 Biomassas lignocelulósicas

Duas biomassas foram utilizadas no presente trabalho: bagaço de cana-de-açúcar (cedido por Casa Buco - Destilados Artesanais, Bento Gonçalves/ RS, proveniente da moagem da cana e submetida à explosão a vapor), e capim elefante (cedido por um produtor de Nova Petrópolis/RS e submetido à moagem em moinhos de facas e a pré-tratamento por explosão a vapor).

4.3.3.3 Preparação do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo (5 g.L⁻¹ de celulose, 1 g.L⁻¹ de sacarose, 2 g.L⁻¹ de farelo de soja, 5 g.L⁻¹ de farelo de trigo, 0,5 g.L⁻¹ de *Prodex*®, 1 g.L⁻¹ de *Tween 80*®, 5 mL de solução mineral baseada em Mandels & Reese (1957) e água destilada qsq 100ml e inoculados com uma suspensão com 1x10⁷ conídios (Reis et al., 2013). Os frascos foram então mantidos a 28°C, em agitação recíproca de 180 rpm, por 72 horas (Capítulo 1).

4.3.3.4 Cultivo em frascos

O meio de cultivo utilizado para os testes em frascos agitados foi constituído das principais fontes de carbono - bagaço de cana-de-açúcar ou capim elefante - em massa equivalendo a 10 g.L⁻¹ de celulose, contendo 0,5 g.L⁻¹ de *Prodex*®, 1 g.L⁻¹ de *Tween 80*® e 5 mL de solução mineral (Mandels & Reese, 1957). As concentrações de sacarose, farelo de trigo e farelo de soja no meio de cultivo foram variadas, buscando aumentar a produção enzimática. Para sacarose, além da concentração padrão (1 g.L⁻¹), foram avaliadas as concentrações de 2 e 4 g.L⁻¹, para farelo de trigo 5 (padrão) e 10 g.L⁻¹, e para farelo de soja 2 (padrão) e 4 g.L⁻¹. Em todos os experimentos, foi avaliada a adição das diferentes concentrações no início do cultivo, ou através da alimentação, alcançando as concentrações finais após 72 horas.

Em uma segunda etapa, foram mantidas as concentrações de sacarose, farelo de trigo e farelo de soja que resultaram nas maiores atividades enzimáticas, enquanto que a

fonte de carbono foi variada. O equivalente em biomassa a 25, 50 e 75% de celulose foi substituído por celulose comercial, bem como ocorreu a adição de 2,5 e 5 g.L⁻¹ de celulose comercial a biomassa em massa equivalente a 10 g.L⁻¹ de celulose (totalizando concentrações de 12,5 e 15 g.L⁻¹ de celulose no meio). A adição de 2,5, 5, 7,5 e 10 g.L⁻¹ de lactose ao meio formulado somente com a biomassa como principal fonte de carbono também foi avaliada.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio, e inoculados com uma suspensão de 1×10^7 conídios. Os frascos foram mantidos sob agitação recíproca de 180 rpm, a 28°C, por 96 horas, com coletas diárias (Reis *et al.*, 2013). Os cultivos foram realizados em triplicata.

4.3.3.5 Cultivos em biorreator com agitação mecânica

O biorreator com agitação mecânica foi construído em um projeto financiado pela FINEP, envolvendo o SENAI e a UCS, possui volume operacional de 5L e agitação mecânica, com cuba em formato cilíndrico, com 28 cm de altura e 20 cm de diâmetro, e três chicanas distribuídas pelo sistema. A turbina possui forma de “U”, apresentando aletas no corpo e dimensões de 15,3 cm de altura e 12,6 cm de largura (Reis, 2017).

O meio de cultivo utilizado no regime descontínuo alimentado foi composto por 0,5 g.L⁻¹ de *Prodex*®, 1 g.L⁻¹ de Tween 80® e 100 mL de solução mineral. A concentração inicial da biomassa (principal fonte de carbono e de indução enzimática) no meio foi equivalente em massa a 5 g.L⁻¹ de celulose, com alimentação realizada manualmente, adicionando o equivalente a 6,24 g.L⁻¹.dia⁻¹ de celulose (Reis, 2017). A alimentação foi iniciada após 16 horas de processo e encerrada em 144 horas, com o cultivo mantido até 168 horas. Amostras foram retiradas diariamente com um intervalo mínimo de 8 horas.

Foram realizados cultivos com concentrações iniciais diferentes de sacarose, farelo de trigo e farelo de soja e também com alimentações ao longo do cultivo. Quando não houve alimentação dos aditivos (apenas da biomassa), utilizou-se 5 g.L⁻¹ de sacarose, 10 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 4 g.L⁻¹ de farelo de soja. No experimento com alimentação de aditivos e biomassa, iniciou-se com 2 g.L⁻¹ de sacarose, 4 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 1,6 g.L⁻¹ de farelo de soja, com alimentação de 1, 2 e 0,8 g.L⁻¹.dia⁻¹, respectivamente.

Cultivos com a alimentação mista de celulose (biomassa/comercial), também foram realizados, nas proporções percentuais de mistura que alcançaram os melhores resultados em frascos agitados (50/50 para capim elefante, e 75/25 para bagaço de cana de açúcar). A partir dos resultados obtidos em biorreator na etapa anterior, para o capim elefante, foi

mantida a alimentação dos aditivos juntamente as fontes de celulose, enquanto que para o bagaço, apenas as fontes de celulose foram alimentadas.

4.3.3.6 Determinação da biomassa micelial

A biomassa micelial foi determinada por método indireto, através da quantificação da concentração de ergosterol presente no meio de cultivo, segundo metodologia proposta por Heleno *et al.* (2016). A extração do ergosterol foi realizada com base na metodologia utilizada por Stoffel *et al.* (2019), onde 3 mL de amostra foram retirados do biorreator, liofilizados e então extraídos com 6 mL de metanol, com agitação de 10 seg em vórtex a cada 15 min, por 1 hora. Posteriormente, as amostras foram submetidas a 30 min de ultrassom (200 W, 40 kHz), centrifugadas (3220 g, 15 min, 4° C) e filtradas em filtros de nylon com poro de 0,2 µm para análise em HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan), com detector UV-Vis, coluna de fase reversa Inertsil ODS-3 (250 x 4.6 mm e tamanho de partícula de 5 µm, GL Science, Tokyo, Japan), operado a 35° C, com fase móvel acetonitrila/metanol (70:30, v/v), com fluxo de 1 mL/min e detecção em 282 nm (Barreira, Oliveira, & Ferreira, 2014). A identificação e concentração do analito na amostra foi baseada em curva de calibração com soluções padrão de ergosterol com concentrações entre 0,0039 e 1 mg/mL.

4.3.3.7 Determinação do consumo de sacarose

O consumo de sacarose foi determinado através da hidrólise ácida da sacarose contida no meio, de acordo com o método preconizado por Falcone & Marques (1965), com modificações. Para tanto, 0,5 mL da amostra foi hidrolisada com 0,5 mL de HCl 2 mol/L por 10 minutos a 65°C. Após resfriamento das amostras, acrescentou-se 1,25 mL de NaOH 1 mol/L para a neutralização e 0,75 mL de água destilada para obter uma diluição final de 1:6. Após, 20 µL foram filtrados em membrana com poro de 22 µm e analisadas em HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector RID-10A, coluna Aminex® HPX-87H (30x7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), operando a 60 °C, com fase móvel contendo 5 mmol.L⁻¹ de H₂SO₄, com fluxo de 0.6 mL.min⁻¹. Amostras não hidrolisadas também foram analisadas a fim de verificar a presença de glicose livre no meio.

4.3.3.8 Determinação das atividades enzimáticas

Atividade sobre papel filtro (FPA), foi determinada segundo metodologia proposta por Ghose (1987), com adaptação proposta por Camassola & Dillon (2012). As unidades de FPA foram definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol.L⁻¹ de açúcar redutor por minuto.

Atividade de endoglicanases também foi determinada a partir do método de Ghose (1987) com modificações de Camassola & Dillon (2012). Uma unidade de atividade de endoglicanases foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por minuto.

Exoglicanases foram determinadas utilizando ρ -nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (ρ NPC) como substrato, através de metodologia adaptada de Deshpande *et al.* (1984). Uma unidade de atividade de exoglicanases foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ρ -nitrofenil por minuto.

Atividade de β -glicosidases foi determinada através da utilização do substrato ρ -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (ρ NPG) através de metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). Uma unidade de atividade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrofenol por minuto.

A determinação da atividade de xilanases foi realizada de acordo com Bailey *et al.* (1992), usando xilana como substrato. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de xilose por minuto.

4.3.3.9 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada por meio da análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), com auxílio do software GraphPad Prism 5.

4.3.4 Resultados e discussão

4.3.4.1 Efeito de aditivos e misturas de componentes do meio de cultivo utilizando bagaço de cana-de-açúcar como principal fonte de carbono para a produção de celulasas

O efeito dos aditivos sacarose, farelo de trigo e farelo de soja foram avaliados na produção de celulasas e xilanases de *P. ucsense*, em frascos agitados, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como principal fonte de carbono, sendo os aditivos adicionados no início do cultivo ou com alimentações (Tabela1).

Quando analisados os resultados obtidos para os aditivos adicionados separadamente, a condição S4 (4 g.L^{-1} de farelo de soja) apresentou atividade de FPA significativamente superior a alcançada com meio padrão (0,06 e 0,02 U.mL^{-1} , respectivamente). Já para xilanases, a condição SF4 (alimentada, com concentração final de 4 g.L^{-1} de farelo de soja) e a condição WF10 (alimentada, com concentração final de 10 g.L^{-1} de farelo de trigo), bem como todas as condições com aumento de sacarose,

apresentaram incremento significativo em relação a atividade da condição padrão ($3,21 \text{ U.mL}^{-1}$). A alimentação de sacarose nas condições SuF2 e SuF4 (com concentração final de 2 e 4 g.L^{-1} de sacarose) dobrou a atividade de endoglicanases (aproximadamente $0,3 \text{ U.mL}^{-1}$) em relação a condição padrão, enquanto que para β -glicosidases, nenhuma das alterações no meio de cultivo e no processo resultou em aumento da atividade. Para exoglicanases, embora as médias de atividade das condições S4 e SF4 apresentaram-se superiores em relação ao controle, não foi possível realizar a análise estatística, uma vez que as análises não foram realizadas em triplicata. Costa et al. (2016) observaram resultados diferentes ao suplementar o meio de cultivo de *P. echinulatum*, visto que a atividade da β -glicosidases foi influenciada positivamente em presença de farinha de soja e sacarose, enquanto que a farinha de trigo teve efeitos negativos, enquanto que para a atividade de xilanases o efeito foi contrário.

Tabela 1. Efeito de aditivos - farelo de trigo, farelo de soja e sacarose - nas atividades enzimáticas de *P. ucsense* em cultivo em frasco agitado com bagaço de cana de açúcar como principal fonte de carbono.

	FPA (U.mL^{-1})	Endoglicanases (U.mL^{-1})	Betaglicosidases (U.mL^{-1})	Exoglicanases (U.mL^{-1})	Xilanases (U.mL^{-1})
P	$0,02 \pm 0,001$	$0,15 \pm 0,04$	$0,64 \pm 0,07$	0,11	$3,21 \pm 0,18$
W10	$0,02 \pm 0,012$	$0,15 \pm 0,02$	$0,70 \pm 0,04$	0,15	$4,00 \pm 0,25$
WF5	$0,01 \pm 0,007$	$0,11 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,08$	0,06	$3,21 \pm 0,43$
WF10	$0,001 \pm 0,001$	$0,20 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,03$	0,07	$5,58 \pm 0,98$
S4	$0,06 \pm 0,007$	$0,24 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,06$	0,58	$5,24 \pm 1,39$
SF2	$0,03 \pm 0,008$	$0,24 \pm 0,07$	$0,57 \pm 0,006$	0,47	$5,16 \pm 0,45$
SF4	$0,04 \pm 0$	$0,21 \pm 0,10$	$0,75 \pm 0,11$	0,72	$6,86 \pm 1,43$
Su2	$0,02 \pm 0,004$	$0,27 \pm 0,06$	$0,38 \pm 0,03$	0,13	$5,71 \pm 0,59$
Su4	$0,04 \pm 0,002$	$0,20 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,01$	0,26	$6,64 \pm 0,06$
SuF2	$0,03 \pm 0,008$	$0,30 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,09$	0,22	$5,50 \pm 0,41$
SuF4	$0,01 \pm 0,002$	$0,31 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,06$	0,17	$5,91 \pm 0,57$
B1	$0,07 \pm 0,014$	$0,63 \pm 0,09$	$0,72 \pm 0,06$	0,54	$23,6 \pm 0,82$
B2	$0,03 \pm 0,029$	$0,76 \pm 0,06$	$0,64 \pm 0,06$	0,45	$23,1 \pm 1,94$
B3	$0,15 \pm 0,006$	$0,71 \pm 0,10$	$0,88 \pm 0,06$	0,85	$24,3 \pm 1,14$
B4	$0,08 \pm 0,022$	$0,71 \pm 0,16$	$0,88 \pm 0,06$	0,86	$23,1 \pm 0,35$

Legenda: P – padrão (5 g.L^{-1} de farelo de trigo, 2 g.L^{-1} de farelo de soja e 1 g.L^{-1} de sacarose); W10 – 10 g.L^{-1} de farelo de trigo; WF5 – 2 g.L^{-1} de farelo de trigo inicial e alimentado com $1 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ até 72h; WF10 – 4 g.L^{-1} de farelo de trigo inicial e alimentado com $2 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ até 72h; S4 – 4 g.L^{-1} de farelo de soja; SF2 – $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de farelo de soja inicial e alimentado com $0,5 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ até 72h; SF4 – 1 g.L^{-1} de farelo de soja inicial e alimentado com $1 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ até 72h; Su2 – 2 g.L^{-1} de sacarose; Su4 – 4 g.L^{-1} de sacarose; SuF2 – $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose inicial e alimentado com $0,5 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ até 72h; SuF4 – 1 g.L^{-1} de sacarose inicial e alimentado com $1 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ até 72h; B1 – 5 g.L^{-1} de farelo de trigo, 4 g.L^{-1} de farelo de soja e 4 g.L^{-1} de sacarose; B2 – 10 g.L^{-1} de farelo de trigo, 2 g.L^{-1} de farelo de soja e 4 g.L^{-1} de sacarose; B3 – 10 g.L^{-1} de farelo de trigo, 4 g.L^{-1} de farelo de soja e 1 g.L^{-1} de sacarose; B4 – 10 g.L^{-1} de farelo de trigo, 4 g.L^{-1} de farelo de soja e 4 g.L^{-1} de sacarose. Cultivos foram mantidos a 28°C , por até 96 horas. Obs: em negrito estão as condições que apresentaram diferença significativa positiva em relação ao padrão, em intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

A utilização de farelo de trigo e farelo de soja como fontes de carbono e nitrogênio vem sendo testada para outras espécies, também com resultados positivos. *Penicillium citrinum* UFV1 foi crescido em frascos Erlenmeyer por 8 dias, com farelo de trigo como principal fonte de carbono, alcançando atividade específica de β -glicosidases de 4.3 U.mg^{-1} , enquanto que as atividades alcançadas para xilanases, endoglicanases e FPA, foram, respectivamente, 23 U.mL^{-1} , $0,84 \text{ U.mL}^{-1}$ e $1,26 \text{ U.mL}^{-1}$ (Costa et al., 2018), sendo estas atividades superiores as observadas no presente trabalho, porém em tempo maior de cultivo. A produção de celulasas por *Penicillium oxalicum* JG aumentou 1,7 vezes após a otimização do meio com farelo de trigo e de soja como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, passando de 0,22 para $0,366 \text{ U.mL}^{-1}$ em frascos agitados, após 7 dias de cultivo (Gao et al, 2020), sendo um incremento inferior ao observado no presente trabalho, com um tempo mais longo de cultivo. Esses resultados demonstram a importância dessas fontes de carbono e nitrogênio para a produção de celulasas, embora o efeito seja diferente em cada microrganismo e processo avaliado.

Como observado na Tabela 1, além dos estudos com sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos de forma isolada, estes aditivos também foram associados nas melhores concentrações avaliadas, constituindo 4 combinações, sendo estes componentes presentes na formulação do meio padrão, tendo em vista que sua alimentação não resultou em grandes alterações na atividade enzimática, em nível de frascos agitados. As condições avaliadas foram identificadas como B1 (4 g.L^{-1} de sacarose, 5 g.L^{-1} de trigo e 4 g.L^{-1} de soja), B2 (4 g.L^{-1} de sacarose, 10 g.L^{-1} de trigo e 2 g.L^{-1} de soja), B3 (1 g.L^{-1} de sacarose, 10 g.L^{-1} de trigo e 4 g.L^{-1} de soja) e B4 (4 g.L^{-1} de sacarose, 10 g.L^{-1} de trigo e 4 g.L^{-1} de soja).

Como pode ser observado, as combinações B3 e B4 apresentaram, a exceção de FPA, resultados semelhantes entre si e significativamente superior ao meio padrão, para todas as enzimas avaliadas. Para xilanases e endoglicanases, todas as combinações apresentaram aumento significativo na atividade enzimática. A condição B1 também foi superior ao padrão para FPA. Avaliando a condição B3 separadamente, a mesma apresentou aumento de 7,5 vezes na atividade de FPA e xilanases, em relação à condição padrão, cerca de 6,5 vezes para endoglicanases, 1,5 vezes para β -glicosidases, 8 vezes para exoglicanases. Esse aumento observado para exoglicanases é importante, uma vez que as mesmas são importantes enzimas na hidrólise da celulase, sendo, aparentemente, responsáveis pela clivagem da maioria das regiões cristalinas da celulose. Embora muitos microrganismos sejam reportados por produzir endoglicanases e β -glicosidases, dados

sobre a produção de exoglicanases são ainda escassos (Salazar et al, 2020).

Diante dos resultados obtidos, e considerando que a condição B3 utiliza uma concentração menor de sacarose, que é um repressor catabólico, a mesma foi escolhida para ser avaliada em biorreator com agitação mecânica e nos testes com misturas.

Na continuidade foram realizados testes com misturas ou suplementação do bagaço de cana de açúcar com celulose comercial ou lactose. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2. Nesta tabela, os dados mostram que a presença de lactose no meio de cultivo interfere negativamente na atividade da maioria das enzimas avaliadas, o que é corroborado por dados da literatura, que apontam que, embora a lactose seja um bom indutor para a produção de celulasas por fungos do gênero *Trichoderma*, o mesmo não acontece com *Penicillium* (Vaishnav et al, 2018). Já a substituição parcial do bagaço por celulose resultou em incrementos, porém apenas para FPA e endoglicanases, não havendo diferenças significativas para β -glicosidases e exoglicanases, e apresentando queda na atividade de xilanases.

Tabela 2. Efeito da mistura ou suplementação do bagaço de cana de açúcar com celulose ou lactose nas atividades enzimáticas de *P. ucsense* em cultivos em frascos agitados.

% dos componentes		FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	B-glicosidases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
SB	Cel					
100	0	0,15 ± 0,01	0,69 ± 0,06	0,88 ± 0,06	0,85	24,3 ± 1,1
75	25	0,16 ± 0,06	0,94 ± 0,01	0,85 ± 0,02	0,83	12,1 ± 1,8
50	50	0,26 ± 0,06	0,86 ± 0,04	0,89 ± 0,01	0,82	8,7 ± 0,7
25	75	0,25 ± 0,04	1,16 ± 0,11	0,88 ± 0,02	0,83	16,2 ± 1,6
0	100	0,27 ± 0,02	1,14 ± 0,03	0,83 ± 0,02	0,81	17,9 ± 2,2
100	25	0,01 ± 0	0,16 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,14	3,9 ± 0,2
100	50	0,01 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,14	2,8 ± 0,5
SB	Lac					
75	25	0,10 ± 0,06	0,51 ± 0,22	0,77 ± 0,15	0,85	9,6 ± 2,9
50	50	0,13 ± 0,10	0,52 ± 0,07	0,84 ± 0,01	0,86	9,6 ± 3,4
25	75	0,26 ± 0,22	0,44 ± 0,14	0,86 ± 0,04	0,86	10,5 ± 6,7
0	100	0,15 ± 0,02	0,58 ± 0,08	0,86 ± 0,04	0,85	12,0 ± 0,8
100	25	0,01 ± 0,01	0,43 ± 0,09	0,22 ± 0,07	0,08	2,8 ± 0,2
100	50	0,02 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,41 ± 0,32	0,36	4,0 ± 0,5
100	75	0,01 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,31 ± 0,19	0,09	3,2 ± 0,6
100	100	0,01 ± 0,01	0,50 ± 0,13	0,19 ± 0,16	0,09	2,2 ± 1,6

Legenda: SB – bagaço de cana de açúcar; Cel – celulose comercial; Lac – lactose comercial. **Obs:** padrão composto pelo equivalente a 10 g/L de celulose no meio, somente com bagaço de cana de açúcar, denominando como 100% SB. 100% equivale a 10g/L de celulose ou lactose presentes no meio. Os cultivos foram mantidos a 28°C, por 96 horas. Em negrito estão as condições que apresentaram diferença significativa positiva em relação ao padrão (100% SB), em intervalo de confiança de 95% (p<0,05).

A adição de 25 ou 50% de celulose, ao conteúdo de bagaço de cana-de-açúcar, equivalente a 10 g.L^{-1} de celulose alterou negativamente a atividade enzimática em relação ao padrão (100% SB). Uma vez que as maiores concentrações de celulose foram adicionadas no início do cultivo, e não gradativamente, como ocorre em processos descontínuos alimentados, pode ter ocorrido problemas de transferência de massa devido a reologia ou repressão catabólica, conforme explicado por Sternberg & Dorval (1979), para *Trichoderma reesei*, e Reis et al (2013), para *Penicillium echinulatum*. Com estes resultados, para os testes em biorreator, apenas a substituição de 50% de bagaço de cana de açúcar por celulose foi avaliada, e alimentação do mesmo foi realizada apenas com essa mistura.

Para o estudo dos aditivos em biorreator para o bagaço de cana de açúcar a concentração de sacarose foi mantida de acordo com o meio padrão, uma vez que sua modificação no meio padrão para frascos não se mostrou significativa, quando combinada com as alterações nas concentrações dos farelos. Duas concentrações do farelo de trigo e soja foram avaliadas (padrão e a melhor definida em frascos agitados, 10 e 4 g.L^{-1} , respectivamente). Em uma terceira condição foram feitas alimentações para os 3 aditivos, com concentrações iniciais de 2 , 4 e $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, farelo de trigo e soja, e alimentação de 1 , 2 e $0,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ dos mesmos aditivos, respectivamente. Para todos os cultivos, a concentração inicial de biomassa foi equivalente a 5 g.L^{-1} , com concentração final equivalente a 40 g.L^{-1} de celulose.

Os dados obtidos para atividades enzimáticas estão apresentados na Figura 1. O incremento nas atividades de FPA, com as modificações nos aditivos observado nos cultivos em frascos agitados, não foi mantido na etapa de escalonamento no biorreator, em nenhuma das condições testadas, tanto para FPA quanto para xilanases. As maiores atividades permaneceram as obtidas na condição padrão, com cerca de 2 U.mL^{-1} de FPA e 125 U.mL^{-1} de xilanases. Para FPA houve queda de 40% na atividade na condição BC2, 85% na BC2A e 83% na BC3. Para xilanases, as quedas foram de 39%, 65% e 79%, respectivamente. Já para as demais enzimas, aumento nas atividades foi observado, mas somente na condição BC2, onde aumentos de 55% na atividade de endoglicanases ($8,7 \text{ U.mL}^{-1}$), 54% da de exoglicanases ($3,9 \text{ U.mL}^{-1}$) e 74% na de β -glicosidases ($4,7 \text{ U.mL}^{-1}$) foram obtidos.

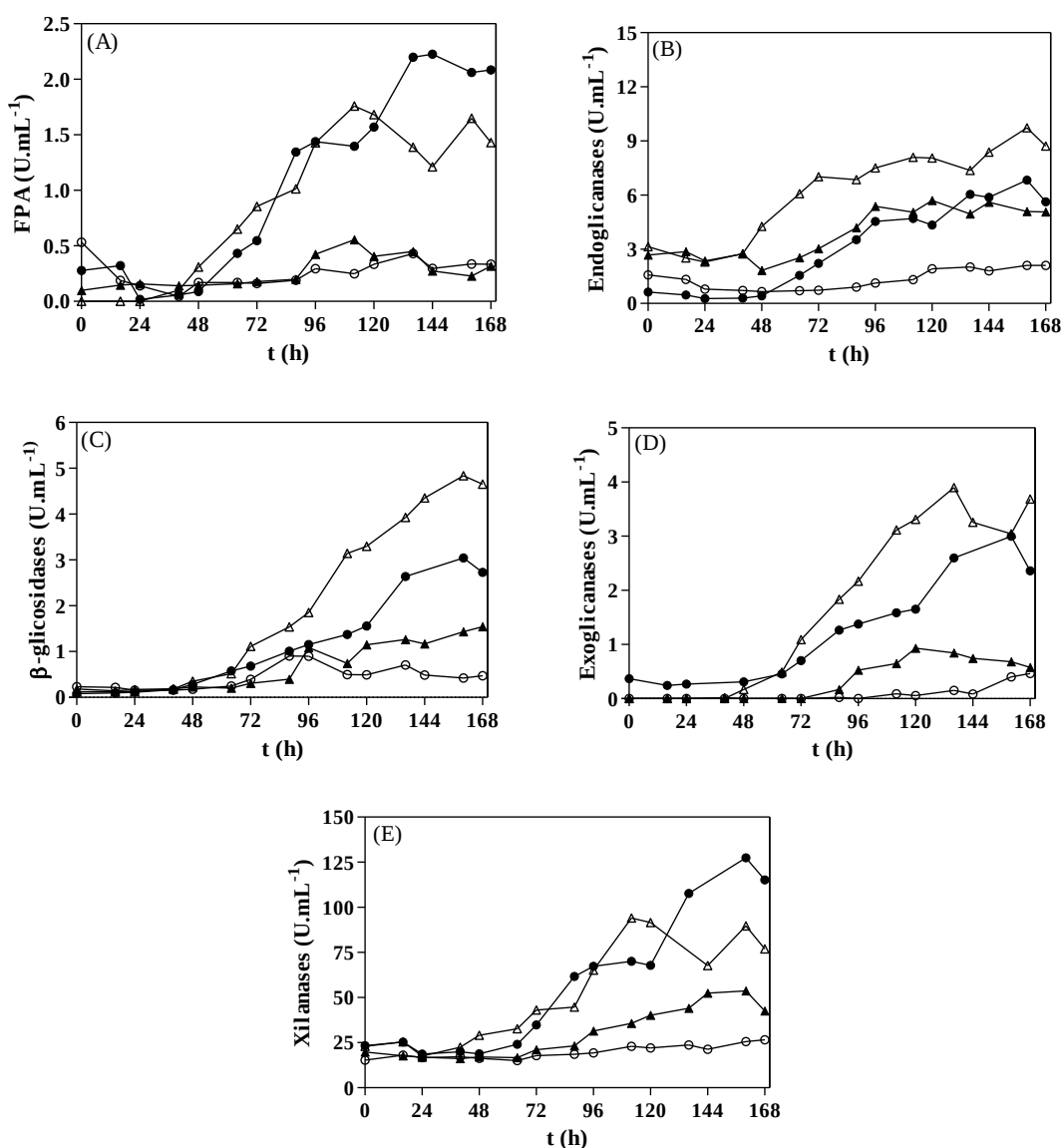


Figura 1. Efeito da sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar, em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo alimentado. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E). Concentrações de sacarose, farelo de trigo e farelo de soja em (g.L⁻¹), respectivamente em BC (5:5:2)(●); BC2 (5:10:4)(Δ); BC2A (2(1):4(2):1,6(0,8))(▲); BC3 (5:10:4)50%Cel(o). Obs: em BC2A, os valores entre parentes significam adições durante a alimentação. Os cultivos foram mantidos a 28°C, por 168 horas. A concentração de bagaço de cana-de-açúcar foi relativa a 10g/L de celulose.

Esses dados diferem dos obtidos por Gao et al (2020), que, ao escalonar o processo de frascos agitados para biorreator de 5L, aumentaram a atividade de FPA de *P. oxalicum* JG de 0,366 para 0,662 U.mL⁻¹, quando utilizou-se farelo de trigo e farelo de soja como substratos, enquanto que com a adição de leticina de soja a atividade chegou a 1,08 U.mL⁻¹. Já Vieira et al. (2020) avaliaram diferentes fontes de carbono e nitrogênio para produção de

celulases por *Aureobasidium pullulans* LB83, sendo que o bagaço de cana de açúcar e o farelo de soja atingiram as maiores atividades, com 2,27 U.mL⁻¹ de FPA e 7,42 U.mL⁻¹ CMCase para meio com bagaço, e 2,45 U.mL⁻¹ de FPA e 6,86 U.mL⁻¹ de CMCase para o meio com farelo de soja, sendo estas atividades semelhantes as obtidas no presente trabalho. O aprimoramento do complexo enzimático produzido por *P. echinulatum* cultivado em vários componentes de meio (bagaço de cana, farinha de soja, farinha de trigo, sacarose e extrato de levedura) foi estudado por Costa et al. (2016), os autores relatam que os meios de cultura compostos com 10 g.L⁻¹ de bagaço de cana-de-açúcar não tiveram influência em FPase, xilanases e β -glicosidases, com valores máximos de 2,68, 115,4 e 2,04 U.mL⁻¹, respectivamente, em relação ao meio com celulose. Entretanto, os meios suplementados com 5 g.L⁻¹ de farinha de soja, 1 g.L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g.L⁻¹ de sacarose atingiram 3,19 U.mL⁻¹ e 3,06 U.mL⁻¹ de FPase e β -glicosidases, respectivamente, mas sem alterações para xilanases.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que concentrações mais elevadas de farelo de trigo e farelo de soja são favoráveis a produção das enzimas responsáveis pela quebra da celulose, individualmente, sem, entretanto, gerar um incremento em sua atividade conjunta em FPA, para *P. ucsense*. Já a substituição de parte do bagaço por celulose, que havia alcançado resultados significativos para FPA e endoglicanases em frascos, não apresentou o mesmo padrão em biorreator, demonstrando novamente que o processo utilizado gera diferenças no comportamento do fungo, enfatizando a importância do estudo do escalonamento do processo em biorreator. A complexidade da composição dos meios testados e a interação entre eles, e a diversidade das rotas de regulação da biossíntese enzimática tornam difícil determinar a influência de cada componente nas atividades enzimáticas, podendo-se afirmar que materiais com alto teor de celulose/hemicelulose seriam indutores do complexo enzimático, enquanto que materiais com alto teor de proteína seriam interessantes para o crescimento celular (Costa et al., 2016).

Os demais dados obtidos durante os cultivos em biorreator estão apresentados na Figura 2. A sacarose foi quase completamente consumida nas primeiras 48h de processo, posteriormente permanecendo em concentração constante até o final do cultivo. A presença de açúcares residuais durante todo o cultivo se deve possivelmente a quebra dos mesmos, presentes na biomassa, pelas enzimas produzidas pelos fungos. A secreção de celulases no meio de cultivo pode causar sacarificação parcial da biomassa lignocelulósica e com isso resultar na acumulação de açúcares, como glicose livre, que podem causar a repressão

catabólica do fungo e prejudicar a biossíntese de celulases (Costa et al., 2016; Ramamoorthy et al., 2019).

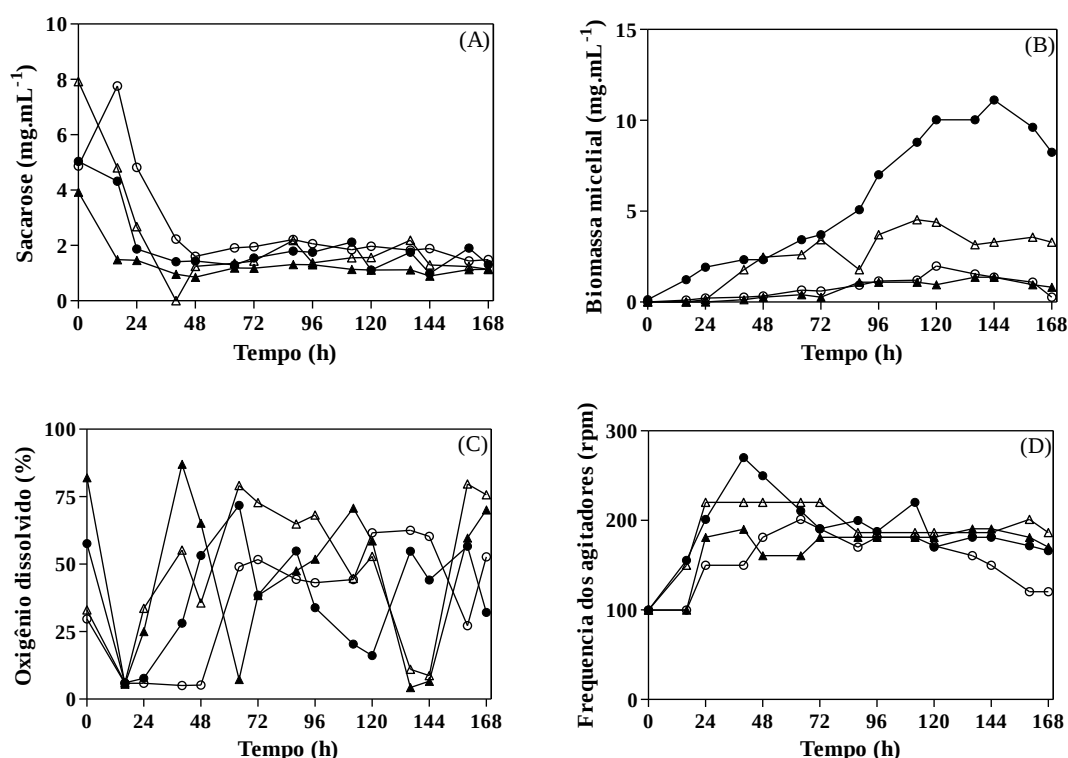


Figura 2. Parâmetros do processo fermentativo decorrentes da sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar, em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo alimentado. Consumo de sacarose (A), biomassa micelial (B), oxigênio dissolvido (C), frequência dos agitadores (D). Concentrações de sacarose, farelo de trigo e farelo de soja em (g.L⁻¹), respectivamente em BC (5:5:2)(●); BC2 (5:10:4)(Δ); BC2A (2(1):4(2):1,6(0,8))(▲); BC3 (5:10:4)50% Cel(o). Obs: em BC2A, os valores entre parentes significam adições. Os cultivos foram mantidos a 28°C, por 168 horas. A concentração de bagaço de cana-de-açúcar foi relativa a 10g/L de celulose.

Quanto ao crescimento micelial, as condições BC e BC2 apresentaram as maiores concentrações de biomassa, além das maiores atividades enzimáticas. Apesar da atividade enzimática não estar obrigatoriamente ligada a altas concentrações de biomassa, segundo Ramamoorthy et al. (2019) os fungos filamentosos produzem menos enzimas em processos submersos do que em processos em estado sólido devido a menor formação de micélio. O mesmo princípio pode ser aplicado aqui aos cultivos com menor formação de micélio, uma vez que as condições BC2A e BC3 podem ter desfavorecido o crescimento do fungo e consequentemente interferido na produção enzimática, ou vice e versa, uma vez que com baixas concentrações de enzimas, a celulose não é quebrada rapidamente, e o

microrganismo não tem acesso aos nutrientes para seu crescimento. Já a frequência dos agitadores foi ajustada a fim de manter oxigenação do meio em níveis favoráveis para a produção enzimática, sem, entretanto, alcançar valores superiores a 300 rpm, que causam danos ao crescimento do microrganismo. Segundo Vaishnav et al, (2018) fungos do gênero *Penicillium* precisam de níveis de oxigênio mantidos entre 30 e 20% para produção ótima de celulasas. Para *Penicillium echinulatum* 30% de oxigenação mostrou-se como a mais indicada na produção de celulasas (Reis et al. (2013). Esta oxigenação não pode ser mantida durante todo o processo, devido a limitações operacionais do biorreator, umavez que o mesmo não possui controles automatizados de fluxo de ar e agitação.

4.3.4.2 Efeito de aditivos e misturas no meio de cultivo com capim elefante como principal fonte de carbono para produção de celulasas

Tal como para o bagaço de cana-de-açúcar, também foram avaliadas diferentes concentrações de sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos ao meio de cultivo, com capim elefante, como principal fonte de carbono. O resumo dos resultados obtidos em frascos agitados é apresentado na Tabela 3, onde verifica-se que a condição WF5 (alimentada com farelo de trigo, com concentração final de 5 g.L⁻¹) apresentou atividades de FPA e endoglicanases superiores ao controle, enquanto que a condição WF10 apresentou um alto incremento em exoglicanases.

Nos testes realizados com diferentes concentrações de sacarose, a condição Su2 (2 g.L⁻¹) foi a que apresentou melhor resultado em relação a FPA, enquanto que a condição SuF4 (alimentada, com concentração final de 4 g.L⁻¹) foi significativamente melhor que o padrão para endoglicanases. Este fato se deve, possivelmente, as baixas concentrações de sacarose avaliadas no presente estudo, uma vez que altas concentrações podem gerar repressão catabólica no fungo, condição que poderia estar ocorrendo no meio padrão. Costa et al. (2016) observaram que concentrações de sacarose maiores do que 10 g.L⁻¹ apresentaram um efeito negativo na biossíntese da celulasas por *P. echinulatum* S1M29, e sugeriram que a liberação de glicose a partir dessa concentração de sacarose pode ter causado repressão da biossíntese de celulasas. Para as demais enzimas, de um modo geral, todas as diferentes concentrações de açúcar foram superiores ao controle. Diante disso, combinações com as concentrações de aditivos que apresentaram melhores resultados foram avaliadas, de modo semelhante ao realizado para o bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 3. Efeito de aditivos - farelo de trigo, farelo de soja e sacarose - nas atividades enzimáticas de *P. ucsense* em cultivo com capim elefante como principal fonte de carbono. Os cultivos em frascos agitados foram mantidos a 28°C, por até 96 horas.

	FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	Betaglicosidases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
P	0,03 ± 0,001	0,41 ± 0,06	0,23 ± 0,01	0,08	12,0 ± 0,14
W10	0,05 ± 0,004	0,50 ± 0,04	0,28 ± 0	0,19	15,8 ± 0,93
WF5	0,06 ± 0,009	0,60 ± 0,04	0,27 ± 0,01	0,15	15,9 ± 1,37
WF10	0,04 ± 0,005	0,46 ± 0,03	0,35 ± 0	0,21	16,5 ± 1,11
S4	0,06 ± 0,001	0,55 ± 0,09	0,26 ± 0,01	0,19	14,9 ± 1,55
SF2	0,05 ± 0,005	0,49 ± 0,04	0,26 ± 0,01	0,15	15,1 ± 1,13
SF4	0,05 ± 0,006	0,63 ± 0,08	0,29 ± 0,01	0,30	15,4 ± 0,08
Su2	0,04 ± 0	0,54 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,16	16,3 ± 1,25
Su4	0,02 ± 0,004	0,42 ± 0	0,29 ± 0,02	0,18	14,8 ± 1,22
SuF2	0,04 ± 0,006	0,54 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,25	15,3 ± 0,35
SuF4	0,04 ± 0,002	0,58 ± 0,04	0,29 ± 0,01	0,21	14,9 ± 1,01
C1	0,09 ± 0,024	0,52 ± 0,01	0,78 ± 0,02	0,51	22,2 ± 1,30
C2	0,07 ± 0,003	0,63 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,25	22,4 ± 0,26
C3	0,10 ± 0,010	0,56 ± 0,03	0,45 ± 0,06	0,34	22,5 ± 0,36
C4	0,09 ± 0,022	0,65 ± 0,09	0,36 ± 0,06	0,29	23,9 ± 0,22

Legenda: P – padrão (5 g.L⁻¹ de farelo de trigo, 2 g.L⁻¹ de farelo de soja e 1 g.L⁻¹ de sacarose); W10 – 10g.L⁻¹ de farelo de trigo; WF5 – 2 g.L⁻¹ de farelo de trigo inicial e alimentado com 1 g.L⁻¹.dia⁻¹ até 72h; WF10 – 4 g.L⁻¹ de farelo de trigo inicial e alimentado com 2 g.L⁻¹.dia⁻¹ até 72h; S4 – 4 g.L⁻¹ de farelo de soja; SF2 – 0,5 g.L⁻¹ de farelo de soja inicial e alimentado com 0,5 g.L⁻¹.dia⁻¹ até 72h; SF4 – 1 g.L⁻¹ de farelo de soja inicial e alimentado com 1 g.L⁻¹.dia⁻¹ até 72h; Su2 – 2 g.L⁻¹ de sacarose; Su4 – 4 g.L⁻¹ sacarose; SuF2 – 0,5 g.L⁻¹ de sacarose inicial e alimentado com 0,5 g.L⁻¹.dia⁻¹ até 72h; SuF4 – 1 g.L⁻¹ de sacarose inicial e alimentado com 1 g.L⁻¹.dia⁻¹ até 72h; C1 – 5 g.L⁻¹ de farelo de trigo, 4 g.L⁻¹ de farelo de soja e 2 g.L⁻¹ de sacarose; C2 – 10 g.L⁻¹ de farelo de trigo, 2 g.L⁻¹ de farelo de soja e 2 g.L⁻¹ de sacarose; C3 – 10 g.L⁻¹ de farelo de trigo, 4 g.L⁻¹ de farelo de soja e 1 g.L⁻¹ de sacarose; C4 - 10 g.L⁻¹ de farelo de trigo, 4 g.L⁻¹ de farelo de soja e 2 g.L⁻¹ de sacarose. Obs: em negrito estão as condições que apresentaram diferença significativa positiva em relação ao padrão, em intervalo de confiança de 95% (p<0,05).

Em outra etapa deste estudo , cujos dados também constam na Tabela 3, utilizaram-se 4 diferentes combinações de meio, que foram identificadas como C1 (2 g.L⁻¹ de sacarose, 5 g.L⁻¹ de trigo e 4 g.L⁻¹ de soja), C2 (2 g.L⁻¹ de sacarose, 10 g.L⁻¹ de trigo e 2 g.L⁻¹ de soja), C3 (1 g.L⁻¹ de sacarose, 10 g.L⁻¹ de trigo e 4 g.L⁻¹ de soja) e C4 (2 g.L⁻¹ de sacarose, 10 g.L⁻¹ de trigo e 4 g.L⁻¹ de soja), sendo estas concentrações presentes já na formulação inicial do meio para esta etapa. Consta-se que as condições C1, C3 e C4, com maior concentração de farelo de soja (4 g.L⁻¹) apresentaram incrementos significativos em relação a condição padrão nas atividades de FPA e β-glicosidases, alcançando um aumento de até 5 vezes em FPA. Esses dados corroboram os obtidos por Costa et al. (2016), que observaram que a presença de farinha de soja (até 5 g.L⁻¹), com seu alto teor de proteína (50,9 %) apresentaram efeito positivo na produção de celulasas, atuando como fonte de nitrogênio orgânico para o crescimento. Para endoglicanases, as condições C2 e C4

apresentaram aumento de 1,5 vezes em relação ao meio padrão, enquanto que para xilanases, todas as condições foram superiores a condição padrão. Já exoglicanases apresentaram maior atividade na condição C1, representando um aumento de 6,25 vezes em relação a condição o padrão. Com isso, a condição C1 foi escolhida para dar continuidade aos estudos, sendo utilizada nos cultivos em biorreator com agitação mecânica e nos testes com misturas.

Em outra etapa avaliou-se a mistura ou suplementação do meio padrão (P) contendo capim elefante, com celulose comercial (Tabela 4), onde foram observados aumentos somente nas atividades de FPA e endoglicanases, em relação ao padrão com capim elefante, assim como havia ocorrido para o bagaço de cana de açúcar. Todas as misturas, bem como a utilização apenas de celulose comercial, foram superiores ao padrão para FPA, bem como para exoglicanases, enquanto que para endoglicanases, a substituição de apenas 25% do capim por celulose não apresentou efeitos na atividade enzimática. Para β -glicosidases, a mistura não afetou a atividade enzimática, porém para xilanases, o efeito foi inverso, com queda nas atividades.

Tabela 4. Efeito da mistura, ou da suplementação, do capim elefante com celulose ou lactose nas atividades enzimáticas de *P. ucsense* em cultivos em frascos agitados, mantidos a 28°C, por 96 horas.

		FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	B-glicosidases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
EG	Cel					
100	0	0,09 ± 0	0,60 ± 0,07	0,88 ± 0,13	0,84	22,5 ± 0,4
75	25	0,20 ± 0,02	0,71 ± 0,03	0,89 ± 0,02	0,82	8,5 ± 1,1
50	50	0,26 ± 0,01	0,97 ± 0,10	0,90 ± 0,04	0,82	15,7 ± 3,9
25	75	0,27 ± 0,02	1,11 ± 0,01	0,87 ± 0,02	0,82	18,6 ± 0,4
0	100	0,27 ± 0,02	1,14 ± 0,03	0,83 ± 0,02	0,81	17,9 ± 2,2
100	25	0,01 ± 0	0,17 ± 0,03	0,34 ± 0,02	0,09	3,5 ± 0,1
100	50	0,01 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,33 ± 0,08	0,10	3,8 ± 0,7
EG	Lac					
75	25	0,10 ± 0,06	0,35 ± 0,12	0,45 ± 0,11	0,30	7,7 ± 0,3
50	50	0,13 ± 0,10	0,29 ± 0,02	0,49 ± 0,16	0,22	6,3 ± 0,2
25	75	0,26 ± 0,22	0,18 ± 0,07	0,49 ± 0,16	0,12	4,2 ± 0,9
0	100	0,15 ± 0,02	0,58 ± 0,08	0,86 ± 0,04	0,85	12,0 ± 0,8
100	25	0,005 ± 0,01	0,45 ± 0,05	0,15 ± 0	0,04	2,8 ± 0,9
100	50	0,02 ± 0,01	0,41 ± 0,07	0,09 ± 0,03	0,04	3,8 ± 0,7
100	75	0,01 ± 0,01	0,50 ± 0,07	0,06 ± 0,03	0,02	3,7 ± 0,2
100	100	0,01 ± 0,02	0,66 ± 0,11	0,03 ± 0,01	0,02	4,6 ± 1,3

Legenda: EG – capim elefante; Cel – celulose comercial; Lac – lactose comercial. **Obs:** padrão composto pelo equivalente a 10 g/L de celulose no meio, somente com capim elefante, denominando como 100% EG. 100% equivale a 10g/L de celulose ou lactose presentes no meio. Em negrito estão as condições que apresentaram diferença significativa positiva em relação ao padrão (100% EG), em intervalo de confiança de 95% (p<0,05).

Apesar dos resultados positivos observados nos testes com substituição parcial do capim elefante por celulose, a suplementação do meio não resultou no aumento de atividades enzimáticas. O aumento da concentração de celulose, já no início do cultivo, pode ter ocasionado a diminuição da secreção de enzimas, resultando em atividade enzimáticas muito inferiores ao padrão. Outro fato importante a ser destacado é que o meio contendo 100% de celulose comercial não resultou em diferença em relação ao meio composto por 100% de capim elefante, ou 100% de bagaço de cana de açúcar, na atividade de β -glicosidases, sugerindo novamente que meios compostos por biomassas lignocelulósicas possibilitam a produção dessa enzima (Capítulo 2), fato também observado para xilanases, no presente estudo. A substituição ou suplementação do meio com lactose não teve efeitos positivos na produção de qualquer uma das enzimas, exceto no meio composto por 100% de lactose, que resultou em uma atividade de FPA com valores um pouco maiores aos apresentados pelo controle, com as demais enzimas com atividades semelhantes.

A partir destes resultados, foi dado seguimento aos testes em biorreator com agitação mecânica (Figura 3), sendo comparadas a condição padrão (CE), a melhor condição em frascos alimentada somente com capim elefante (CE2) e alimentada também com os nutrientes (concentrações iniciais de 2, 4 e 1,6 g.L⁻¹ de sacarose, farelo de trigo e soja, respectivamente, com alimentação de 1, 2 e 0,8 g.L⁻¹.dia⁻¹) (CE2A), bem como a mistura de 50% de capim elefante com 50% de celulose (CE3). Para todos os cultivos, a concentração inicial de biomassa foi equivalente a 5 g.L⁻¹, com concentração final equivalente a 40 g.L⁻¹ de celulose. Verifica-se queda na atividade FPA, com redução entorno de 22% de atividade na condição CE2, 44% nas condições CE2A e CE3, em relação ao padrão CE, onde 0,9 U.mL⁻¹ de FPA foram obtidas. Já para endoglicanases, aumento de 39% na atividade foi observada em CE2A e 13% em CE3, enquanto que em CE2 houve queda na atividade de 85%, quando comparadas ao controle (3,3 U.mL⁻¹). Para β -glicosidases, cuja atividade no controle foi cerca de 2 U.mL⁻¹, a atividade foi mantida na condição CE2, apresentando queda (22%) em CE3 e incremento de 141% na condição CE2A, atingindo 4,8 U.mL⁻¹.

Exoglicanases apresentaram comportamento semelhante a β -glicosidases, com aumento de 140% na atividade na condição CE2A (2,8 U.mL⁻¹), enquanto que as demais condições apresentaram resultados semelhantes entre si, com aproximadamente 1,2 U.mL⁻¹. Para xilanases, as condições CE2 e CE2A apresentaram queda de 65 e 59%, respectivamente, em relação ao controle (54 U.mL⁻¹), enquanto que a condição CE3

apresentou incremento na atividade de 40%. Estes dados demonstram que, para o capim elefante, o cultivo em biorreator apresentou menos impacto na repetição dos resultados, em relação aos obtidos nos frascos agitados. Para uma maior atividade de endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases, a condição CE2A se mostrou mais indicada, confirmando o resultado obtido em frascos agitados. Já para uma maior produção de xilanases, os resultados foram contraditórios aos obtidos em frascos, uma vez que a condição com 50% de celulose se mostrou a mais favorável para a produção desta enzima.

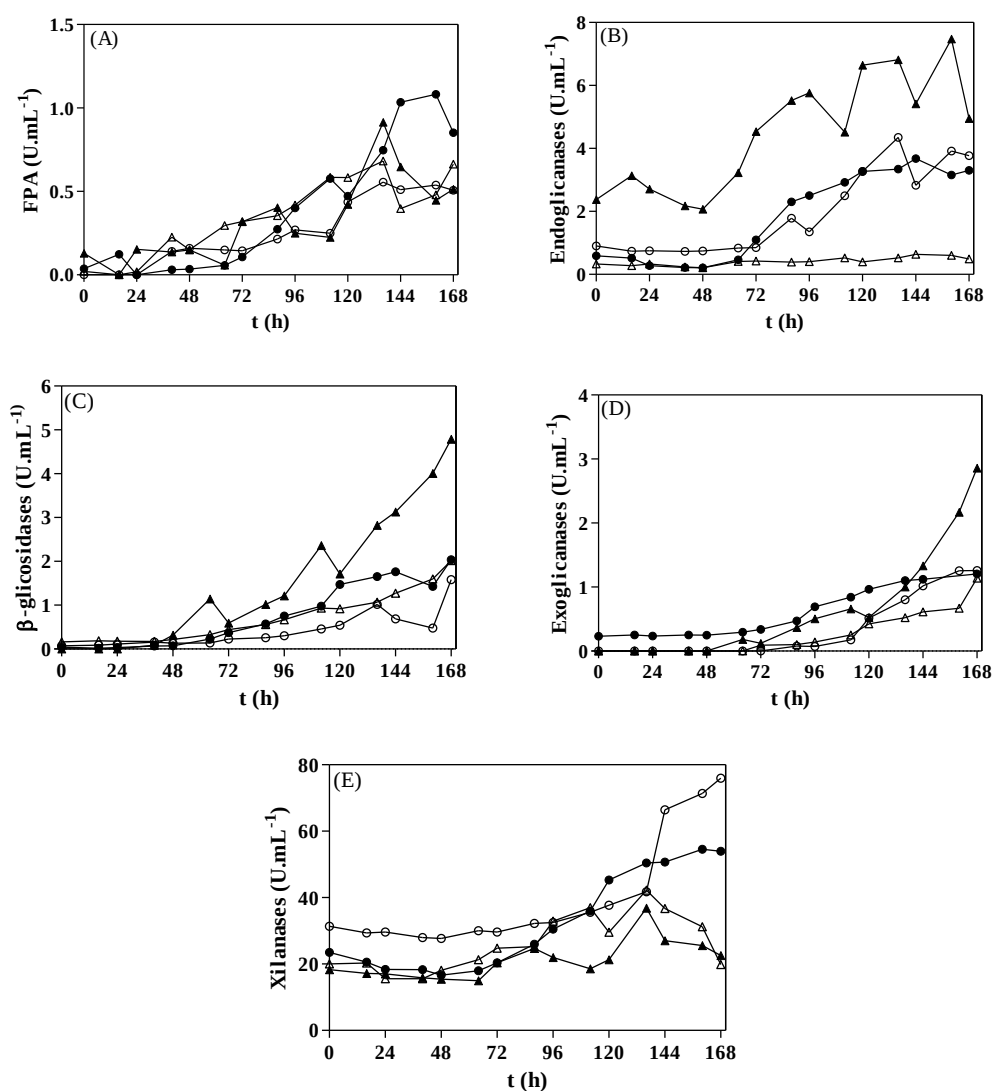


Figura 3. Efeito da sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos em cultivo com capim elefante em STR, em regime descontínuo alimentado. Atividades de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), Exoglicanases (D) e Xilanases (E). Concentrações de sacarose, farelo de trigo e farelo de soja em (g.L⁻¹), respectivamente CE(5:5:2)(●); CE2(5:10:4)(Δ); CE2A(2(1):4(2):1,6(0,8))(▲); CE3(5:10:4)50%Cel(o). Obs: em CE2A, os valores entre parentes significam adições. Os cultivos foram mantidos a 28°C, por 168 horas. A concentração de capim elefante foi relativa a 10g/L de celulose.

Ramamoorthy et al. (2019) alcançaram atividades máximas de FPA e de endoglicanases de $1,9 \text{ U.mL}^{-1}$ e $12,47 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente, em cultivos submersos de *Trichoderma harzanium*, contendo misturas de matérias lignocelulósicas, sendo um dos principais a casca de soja. *Trichoderma reesei* NCIM 1186 foi utilizado em fermentação submersa contendo casca de romã, e as melhores composições de meio foram utilizando avicel e farinha de torta de soja como suplementação, com produção de celulase em $9,3 \text{ IU/mL}$ em condições ótimas de meio, após 5 dias de processo (Baskaran et al, 2022). Estes dados corroboram os obtidos no presente trabalho, demonstrando que a mistura de diferentes fontes de carbono pode resultar em incremento das atividades enzimáticas, dependendo da fonte utilizada.

Os demais parâmetros observados durante os cultivos em biorreator estão apresentados na Figura 4. Novamente a agitação foi ajustada para manter a oxigenação no meio, sem ultrapassar os 300 rpm. Os maiores crescimentos miceliais foram observados na condição padrão (CE) e na condição CE2A, que também apresentaram as maiores atividades enzimáticas, exceto para xilanases.

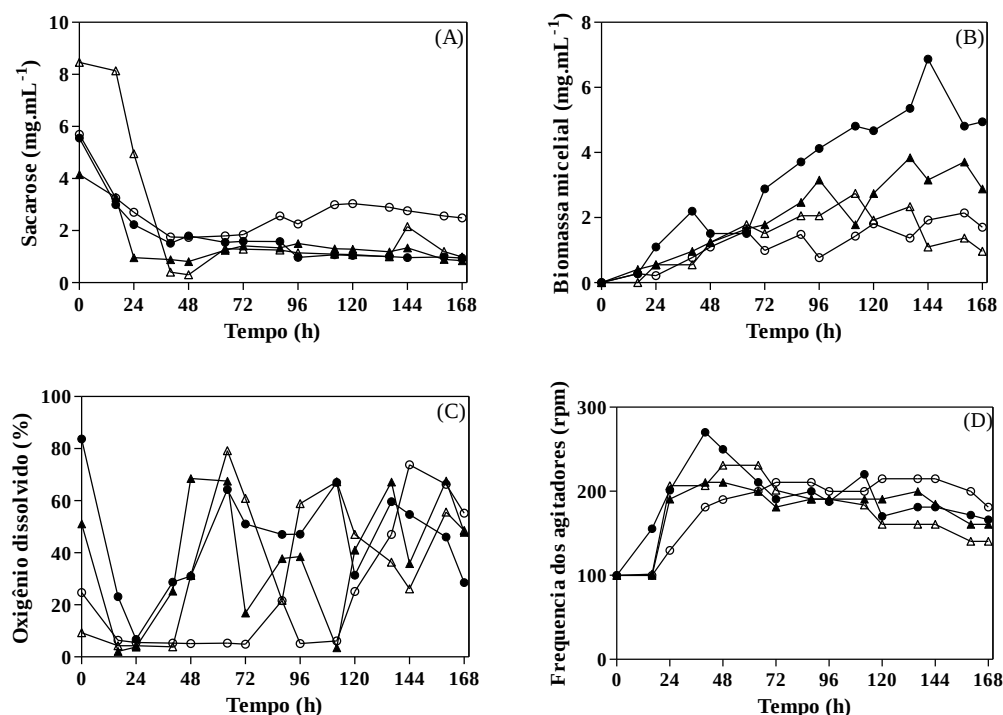


Figura 4. Parâmetros do processo decorrentes da sacarose, farelo de trigo e farelo de soja como aditivos em cultivo com capim elefante em STR, em regime descontínuo alimentado. Consumo de sacarose (A), biomassa micelial (B), oxigênio dissolvido (C), frequência dos agitadores (D). Concentrações de sacarose, farelo de trigo e farelo de soja em (g.L^{-1}), respectivamente CE(5:5:2)(●); CE2(5:10:4)(Δ); CE2A(2(1):4(2): 1,6(0,8))(▲); CE3 (5:10:4)50%Cel(o). Obs: em CE2A, os valores entre parentes significam adições. Cultivos mantidos a 28°C , por 168h. Concentração de capim elefante relativa a 10g/L de celulose.

O consumo de sacarose também se deu nas primeiras 48h de processo, exceto para a condição CE3, onde uma concentração superior a 2 g.L⁻¹ de sacarose foi mantida até o final do cultivo, não sendo, entretanto, a condição que apresentou o menor crescimento. Este dado sugere que havia mais sacarose presente no meio do que o microrganismo necessita para seu crescimento e produção de xilanases.

4.3.5 Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a utilização de maiores concentrações de farelo de soja e farelo de trigo, juntamente ao bagaço de cana-de-açúcar e/ou capim elefante, para a produção de celulasas por *P. ucsense* em processo submerso, resultam em incremento nas atividades de endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases. Com isso, para a produção destas enzimas, não há necessidade da adição de celulose comercial para atingir altas atividades. Entretanto, para maiores atividades de FPA, a mistura entre as biomassas e celulose é benéfica. A partir destes resultados, o presente trabalho auxilia no desenvolvimento de processos buscando a produção das diferentes enzimas separadamente, bem como em conjunto, de acordo com as necessidades do produto final desejado, utilizando a linhagem M29 de *P. ucsense*.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E XILANASES PRODUZIDAS POR *Penicillium ucsense* S1M29 EM PROCESSO SUBMERSO UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS

4.4.1 Resumo

No presente trabalho, a estabilidade e atividade ótima de extratos enzimáticos brutos de *P. ucsense* produzidos utilizando bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante e um padrão com celulose como principais fontes de carbono e indutores enzimáticos foram avaliadas, bem como um coquetel enzimático comercial Celluclast® como padrão geral. Para a atividade ótima, foram avaliadas temperaturas variando entre 40°C e 70°C, e pH entre 4 e 6, para FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases, sendo considerada a atividade de 100% em pH 4,8 e 50°C, condições padrão de avaliação dessas enzimas. As maiores atividades relativas para bagaço de cana-de-açúcar foram observadas em 65°C (130%) e pH 5,5 (114%) para FPA, 65°C (113%) e pH 4 (111%) para endoglicanases, e 70°C (209% e 117%) para β -glicosidases e xilanases, respectivamente, sendo que para essas enzimas o pH padrão 4,8 apresentou a atividade mais elevada. Já para capim elefante, as maiores atividades observadas foram em 60°C (115%) e pH 4 (118%) para FPA, 65°C (134%) e pH 4,5 (132%) para endoglicanases, 70°C (150% e 121%) para β -glicosidases e xilanases, respectivamente, sendo que novamente o pH padrão 4,8 foi o melhor para estas enzimas. Em relação à termoestabilidade e estabilidade em diferentes valores de pH, as mesmas faixas de temperaturas e pH foram avaliadas por 72h. As enzimas produzidas com bagaço de cana-de-açúcar foram mais estáveis, após 72h, em pH: 4,5 e 4,8 (115% de atividade para FPA); 4,0 e 5,0 (120% para endoglicanases); 4 (117% para β -glicosidases); 6 (78% para xilanases). Já as temperaturas que resultaram em maior estabilidade após 72h foram: 50°C (115% para FPA); 55°C (126% para endoglicanases); 45°C (143% para β -glicosidases e 267% para xilanases). As enzimas produzidas com capim elefante foram mais estáveis após 72h em pH: 4,5 (94% e 110% de atividade para FPA e endoglicanases, respectivamente); 4,5 e 4,8 (109% para β -glicosidases); e sem controle de pH para xilanases (67% de atividade). Já as temperaturas que resultaram em maior estabilidade durante este mesmo período foram: 40°C (120% de atividade para FPA); 45°C (103% para endoglicanases e 137% para β -glicosidases); 50 e 55°C para xilanases (44% de atividade). Em todos os parâmetros avaliados, os resultados obtidos para o extrato produzido com celulose e para o coquetel comercial, de uma forma geral, se mostraram semelhantes ou inferiores aos obtidos para os coquetéis brutos produzidos com as biomassas lignocelulósicas,

demonstrando que a utilização de tais substratos é viável para a manutenção ou melhora das características enzimáticas desejáveis para uma futura utilização comercial destes coquetéis.

Palavras-chave: celulasas, atividade, estabilidade, biomassa lignocelulósica, *P. ucsense*.

4.4.2 Introdução

A atual demanda energética da humanidade depende, principalmente, dos combustíveis fósseis para ser suprida, porém, o crescente aumento populacional e industrialização convergirão para seu esgotamento, sendo a utilização de biomassas lignocelulósicas uma opção para sua substituição (Zabed et al., 2016). Biomassas lignocelulósicas, que compreendem resíduos agroindustriais e florestais, bem como culturas energéticas, representam o maior percentual da biomassa do planeta, sendo o recurso orgânico mais abundante e de baixo custo da natureza, além de ser renovável (Singhania et al. 2010; Maleki et al, 2020). Essas biomassas consistem principalmente de três biopolímeros: lignina, celulose e hemicelulose. A celulose é o principal componente estrutural da lignocelulose, sendo um homopolissacarídeo linear formado por unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas, enquanto que a hemicelulose, composta principalmente por xilana, é o segundo principal componente polimérico das paredes celulares das plantas, atuando como barreira para a hidrólise enzimática e um reticulador entre os diferentes componentes da parede celular (Li et al. 2020; Maleki et al. 2020). Já a lignina é um polímero aromático altamente ramificado e composto basicamente por três compostos fenólicos: cumaril, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Zabed et al., 2016).

Entre as principais abordagens desenvolvidas para a conversão de materiais lignocelulósicos em produtos químicos, a baseada em enzimas é vantajosa em relação aos tratamentos químicos, devido às suas condições operacionais moderadas, maior eficiência e por não haver formação de produtos tóxicos (Almeida et al. 2019). Houve um aumento considerável no interesse em explorar comercialmente os resíduos lignocelulósicos, utilizando-os como fonte para rações, combustíveis, energia e produtos químicos (Li et al., 2020). Entretanto, a aplicação industrial da biomassa lignocelulósica ainda apresenta muitos desafios, entre eles as etapas de pré-tratamento do mesmo, o isolamento de microrganismos que produzam elevados títulos enzimáticos, a produção de extratos enzimáticos com elevados títulos, o aumento no rendimento da hidrólise e a utilização de enzimas com menor inibição em variadas faixas de pH e em temperaturas elevadas (Singhania et al. 2010; Maleki et al, 2020).

A degradação eficiente e completa dos polissacarídeos encontrados na lignocelulose requer várias enzimas trabalhando em sinergia, sendo que a hidrólise da celulose tem entre suas principais enzimas as endoglicanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.176), exoglicohidrolases (EC 3.2.1.74) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21). Já a hidrólise da fração de hemicelulose requer um grupo mais complexo de enzimas, entre elas as xilanases (Almeida et al., 2019; Maleki et al, 2020). Além disso, para uma ampla gama de aplicações industriais, possuir termoestabilidade e temperatura ótima relativamente altas é uma característica atraente e desejável de uma enzima (Camassola et al, 2004; Sulyman et al, 2020). Geralmente, a hidrólise enzimática da celulose ocorre em temperaturas variando entre 40 e 50°C, consideradas como apresentando taxas lentas de hidrólise e baixo rendimento de açúcares, além de serem suscetíveis à contaminação microbiana. Uma maneira de contornar estas limitações é o uso de enzimas termoestáveis produzidas por microrganismos termofílicos ou termotolerantes (Patel et al, 2019).

Considerando estes fatores, a estabilidade térmica de celulasas e xilanases é um fator que deve ser estabelecido, uma vez que apresenta influência significativa em sua aplicação e armazenamento (Ezeilo et al. 2019). Além disso, industrialmente há exigência de enzimas que apresentam maior atividade e estabilidade em elevadas temperaturas e diferentes valores de pH, oferecendo assim alternativas mais robustas como catalisadores, sendo capazes de suportar as condições relativamente severas de processo, resultando no aumento da utilização econômica de celulasas, que é um dos principais custos à tecnologia de bioetanol (Singhanía et al. 2010; Vaishnav et al., 2018; Patel et al, 2019). As celulasas produzidas em estado sólido por *P. echinulatum* apresentam boa estabilidade térmica, sendo este um fator importante para a sacarificação da celulose (Camassola et al., 2004).

Diante disso, uma avaliação mais aprofundada das características dos extratos enzimáticos produzidos por este microrganismo (agora renomeado como *P. ucsense* - Lenz et al., 2022) utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas em sua produção, foi conduzido neste trabalho, buscando avaliar sua atividade e estabilidade em diferentes temperaturas e pH, visando assim auxiliar no desenvolvimento de processos que possam vir a ser aplicados industrialmente para estas enzimas.

4.4.3 Materiais e métodos

4.4.3.1 Produção dos extratos enzimáticos

Para a produção dos extratos enzimáticos avaliados foi utilizado o microrganismo

Penicillium ucsense S1M29, obtido da linhagem mutante 9A02S1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSM 18942) e pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (Dillon et al., 2006; Dillon et al., 2011; Lenz et al., 2022).

A produção ocorreu em processo submerso em biorreator STR, em regime descontínuo alimentado, em meios contendo celulose comercial (Cel), bagaço de cana-de-açúcar (SB) ou capim elefante (EG) como principais fontes de carbono e indutores (Capítulo 2). Após os cultivos, o micélio foi separado por filtração, e a fração líquida foi utilizada para a caracterização do complexo enzimático produzido, em função de sua atividade e estabilidade em diferentes temperaturas e pH.

4.4.3.2 Determinação das atividades enzimáticas

A dosagem da atividade total de celulasas foi realizada através da análise de atividade sobre papel filtro (FPA), segundo metodologia proposta por Ghose (1987), com adaptação proposta por Camassola & Dillon (2012), utilizando tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ pH 4,8. A mistura reacional foi mantida a 50°C por 1 hora e uma curva padrão foi construída a partir de concentrações conhecidas de glicose e a leitura de absorbância foi realizada a 545 nm. As unidades de FPA foram definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol.L⁻¹ de açúcar redutor por minuto.

Atividade de endoglicanases também foi determinada a partir do método de Ghose (1987) com modificações de Camassola & Dillon (2012). O substrato utilizado foi carboximetilcelulose 2% (m/v), e a mistura reacional foi mantida a 50°C por 30 minutos em presença de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ pH 4,8. A leitura em espectrofotômetro e a determinação da atividade foram realizadas conforme descrito pra FPA, sendo que uma unidade de atividade de endoglicanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol.L⁻¹ de açúcar redutor por minuto.

Atividade de β-glicosidases foi determinada através da utilização do substrato p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo 4 mmol.L⁻¹ (pNPG) em tampão citrato de sódio (0,05 mol.L⁻¹ pH 4,8), através de metodologia adaptada de Daroit et al. (2008). A mistura reacional foi incubada a 50°C por 30 minutos. A leitura da absorbância foi a 405 nm e para a determinação da atividade foi construída curva de calibração com soluções de p-nitrofenol com concentrações conhecidas. Uma unidade de atividade de β-glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol.L⁻¹ de nitrofenol por minuto.

A determinação da atividade de xilanases foi realizada de acordo com Bailey et al. (1992), usando xilana 1% (m/v) em tampão citrato de sódio ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 4,8) como substrato. A mistura reacional foi mantida a 50°C por 5 minutos, a absorbância foi mensurada a 545 nm e a concentração de xilanases determinada através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de xilose. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de xilose por minuto.

4.4.3.3 Temperatura ótima de reação

A temperatura ótima de reação para FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases foi avaliada variando-se a temperatura de 40 a 70°C (Camassola et al., 2004), sendo essas temperaturas próximas a utilizada em processos de hidrólise, de 50°C . Os demais parâmetros das análises enzimáticas foram mantidos conforme protocolos anteriormente citados. Os resultados foram apresentados como atividade relativa em relação à temperatura de 50°C .

4.4.3.4 pH ótimo de reação

O pH ótimo de reação para FPA e endoglicanases foi avaliado através da utilização de tampão citrato de sódio ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$) nos seguintes valores de pH: 4; 4,5; 4,8; 5; 5,5 e 6 (Camassola et al., 2004). Para β -glicosidases e xilanases, os substratos pNPG e xilana foram diluídos nos diferentes tampões, para posterior uso na análise enzimática. Todas as análises foram realizadas a 50°C , conforme protocolos anteriormente citados. Os resultados foram apresentados como atividade relativa em relação ao pH 4,8.

4.4.3.5 Estabilidade em diferentes pH

A estabilidade das enzimas produzidas em processo submerso utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas foi avaliada em valores de pH variando entre 4 e 6, bem como sem a adição de tampão. As enzimas foram mantidas a 50°C por até 72 horas, com coletas de amostras nos tempos 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas. As atividades enzimáticas foram então mensuradas conforme os protocolos padrão e os resultados foram apresentados como atividade relativa em relação à atividade inicial.

4.4.3.6 Termoestabilidade

A termoestabilidade das enzimas produzidas utilizando as diferentes biomassas foi avaliada por um período de 72h, em temperaturas variando entre 40 e 70°C . Amostras foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas, e as análises de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases foram conduzidas conforme protocolos padrão anteriormente citados. Os resultados foram apresentados como atividade relativa em relação à atividade

inicial.

4.4.3.7 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada por meio da análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), com auxílio do software GraphPad Prism 5.

4.4.4 Resultados e discussão

4.4.4.1 Temperatura ótima de reação

As condições ótimas de reação das enzimas produzidas utilizando bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante foram avaliadas. Na Figura 1 estão apresentados os dados referentes à temperatura ótima de reação para FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases produzidas com essas biomassas, bem como para essas enzimas produzidas utilizando celulose comercial e a enzima Celluclast®, utilizadas como controles. Os mesmos estão expressos como atividades relativas à condição padrão de avaliação (50°C), a qual foi considerada 100%.

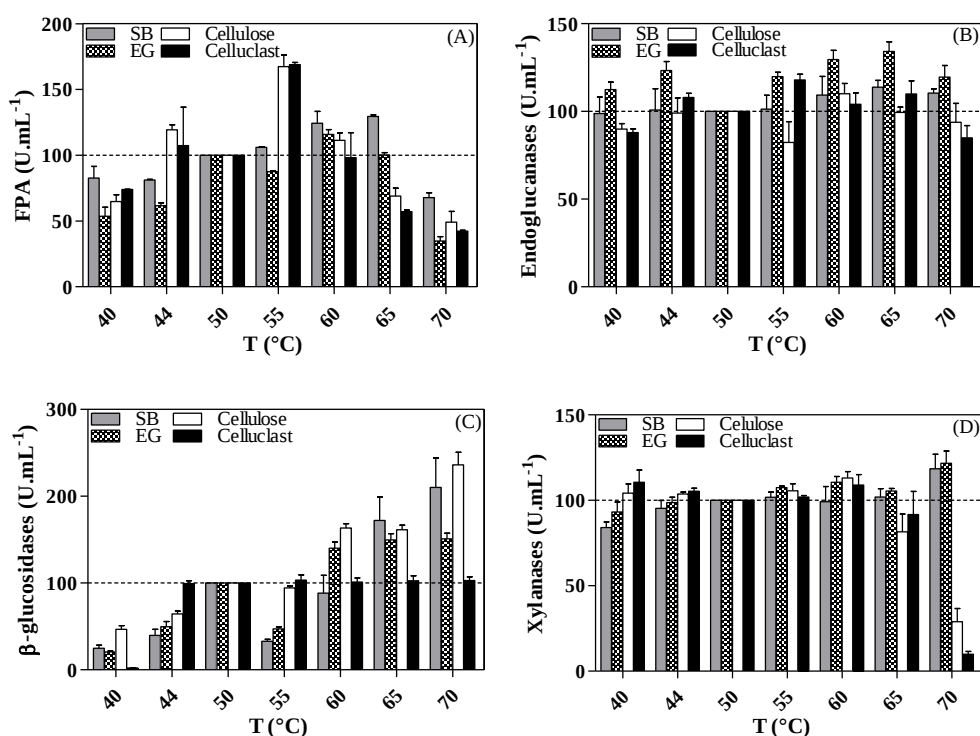


Figura 1. Atividades relativas de FPA (A), Endoglicanases (B), β -glicosidases (C), e Xilanases (D) observadas em diferentes temperaturas de reação.

Em relação à FPA, os ensaios demonstraram que as enzimas produzidas utilizando as biomassas lignocelulósicas são mais ativas em temperaturas mais elevadas, entre 55 e

65°C, enquanto que as enzimas produzidas utilizando celulose e a enzima comercial são mais ativas na temperatura de 55°C, seguido das temperaturas de 45 e 60°C. Tanto em temperaturas mais brandas quanto mais elevadas, as enzimas produzidas utilizando SB se mostraram as mais ativas entre todas as avaliadas. Esses resultados corroboram os obtidos por Camassola et. al. (2004), que observaram que a atividade de FPA produzidas em biomassa lignocelulósica em estado sólido, por *P. echinulatum*, aumentou em temperaturas acima de 60°C, sugerindo que o processo utilizado para a produção enzimática possui menor influência em atividade de FPA do que o substrato utilizado para sua produção. Para endoglicanases, as enzimas produzidas utilizando EG se mostraram mais ativas em todas as temperaturas avaliadas, quando comparadas a temperatura padrão de 50°C. As demais endoglicanases apresentaram atividades relativas muito próximas entre si e próximas a 100%, o que sugere que a temperatura de reação não possui grande efeito sobre esta atividade enzimática.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos para celulase purificada do fungo extremófilo *Aspergillus flavus* que apresentou atividades relativas superiores, usando CMC como substrato, em temperaturas mais elevadas, aumentando entre 30 e 60°C (temperatura ótima), porém decaindo em temperaturas superiores (Bano et al, 2019). Dados semelhantes também foram obtidos por Maleki et al (2020) para duas celulases isoladas, PersiCel1 e PersiCel2, onde a temperatura ótima (em seus pH ótimos) foram, respectivamente, a 50°C e 60°C. Zhao et al (2021) obtiveram temperatura ótima de reação a 55°C para o gene isolado de celulase Cel1029, utilizando CMC como substrato, retendo 85% desta atividade a 4 °C e 68% a 80 °C, demonstrando uma ampla faixa de atividade. Os dados obtidos sugerem que as enzimas produzidas por *P. ucsense*, principalmente em biomassas lignocelulósicas, apresentam certa tendência termófila, mesmo em seu extrato bruto. Este comportamento difere, por exemplo, das endoglicanases purificadas de *Aspergillus niger* produzidas em casca de amendoim, cuja temperatura ótima foi observada em 40 °C por Sulyman et al (2020), com queda de 64% de atividade em variações de 5°C, acima ou abaixo.

B-glicosidases produzidas por *P. ucsense*, tanto com biomassas lignocelulósicas quanto com celulose comercial, se mostraram mais ativas em temperaturas mais elevadas, entre 60 e 70°C. Já a enzima comercial mostrou atividade relativa próxima a 100% para quase todas as temperaturas avaliadas, com exceção de 40°C, onde a enzima foi praticamente inativa. Novamente, os resultados se mostram condizentes aos obtidos para as enzimas produzidas em estado sólido por *P. echinulatum*, cuja atividade de β -glicosidases foi incrementada em temperaturas mais elevadas (Camassola et. al., 2004). O mesmo

comportamento foi observado para β -glicosidases produzidas por *Monascus purpureus* em meio contendo resíduos de uva, com a máxima atividade observada em 50°C e queda a partir de 80°C, indicando desnaturação (Dairot et al., 2008). Já a temperatura ótima de atividade de β -glicosidase de *Chaetomella* sp. BBA70074 foi ainda maior, 70°C em pH 6,0, indicando uma enzima termofílica (Singh et al, 2023). Temperatura tão elevada (70°C) só foi observada como ótima para xilanases produzidas utilizando biomassas lignocelulósicas por *P. ucsense*, temperatura na qual as enzimas produzidas com celulose e a comercial se mostraram menos ativas. Nas demais temperaturas avaliadas, as atividades enzimáticas permaneceram próximas a 100%, demonstrando uma ampla faixa de atividade e novamente uma tendência termófila. Esse comportamento difere completamente do observado para xilanases clonadas de uma cepa de *Fusarium* sp. 21 (Xyn11A, Xyn11B e Xyn11C), cuja temperatura ótima foi de 45°C (Li et al., 2020). A queda de atividades em temperaturas mais elevadas pode ser derivada da desnaturação da enzima, com a destruição de ligações fracas e pontes de hidrogênio, que ajudam a manter sua estrutura tridimensional (Sulyman et al, 2020). As elevadas temperaturas ótimas observadas para o complexo celulolítico de *P. ucsense* sugere que essas ligações são mais estáveis em suas enzimas quando produzidas com biomassas lignocelulósicas.

4.4.4.2 pH ótimo de reação

Os dados relativos ao pH ótimo de atuação destas mesmas enzimas estão apresentados na Figura 2. Novamente, a atividade de 100% foi considerada no pH padrão de avaliação (4,8) e as demais atividades em relação a este valor. Para FPA, as enzimas produzidas por *P. ucsense* se mostraram mais ativas em pH mais ácidos, de 4 e 4,5. Para pH 5, atividades relativas menores de FPA foram observadas no extrato produzido com SB, enquanto que os demais extratos e a enzima comercial apresentaram atividades superiores ao padrão com pH 4,8. Em pH 5,5 as enzimas de *P. ucsense* novamente apresentaram atividades superiores ao padrão e a enzima comercial, enquanto que em pH 6, todas apresentaram queda na atividade de FPA. Novamente os dados corroboram os obtidos em cultivo em estado sólido para *P. echinulatum*, onde as atividades em FPA também foram superiores em valores de pH ácidos, porém a atividade ótima foi observada no pH 4,8 (Camassola et al., 2004).

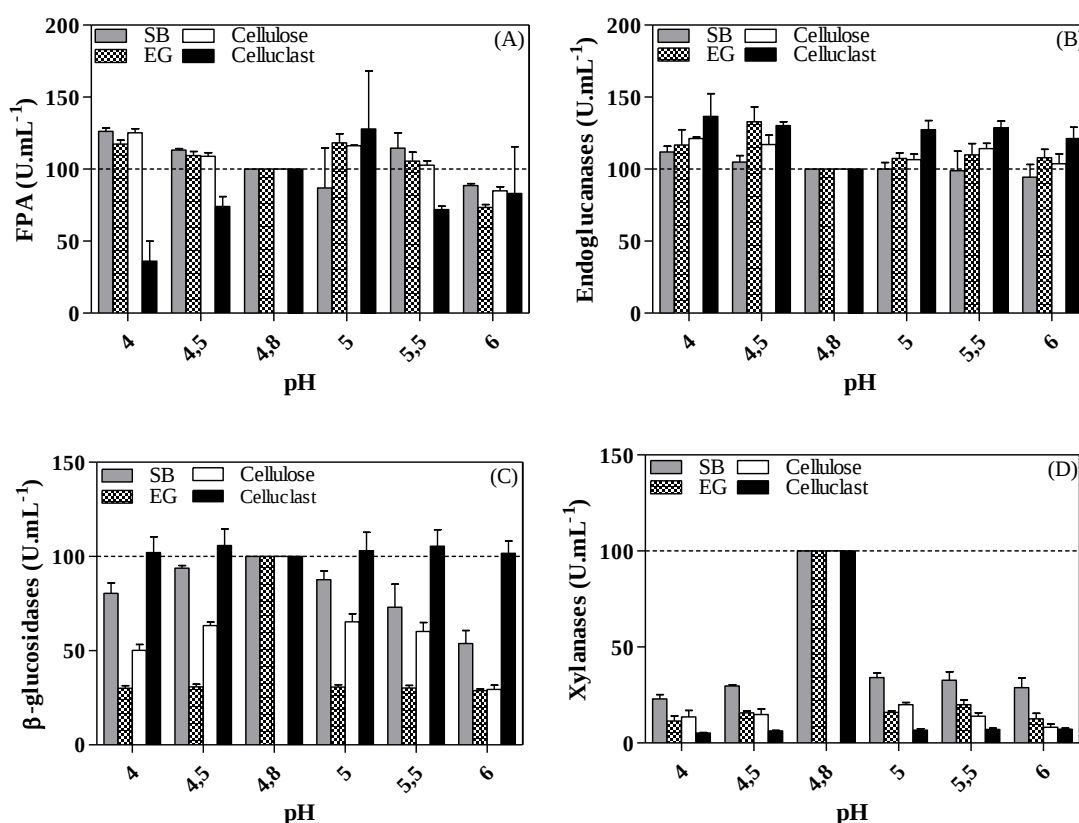


Figura 2. Atividades relativas de FPA (A), Endoglucanases (B), β-glicosidases (C), e Xilanases (D) observadas em diferentes valores de pH.

Para endoglucanases, novamente os valores de pH mais ácidos resultaram em atividades superiores, para todos os extratos avaliados. Diversos estudos demonstram a tendência mais ácida dessas enzimas, como a atividade de endoglucanase purificada de *A. niger*, que foi ótima em pH 4, com quedas superiores a 50% em valores acima ou abaixo (Sulyman et al, 2020), e de do gene isolado Cel1029 que manteve 40% de sua atividade mesmo em pH 2,0 e permaneceu estável entre 5,0 e 7,0 (Zhao et al, 2021). Entretanto, a celulase purificada do fungo extremófilo *A. flavus*, avaliada utilizando CMC como substrato, apresentou pH ótimo em 10 (Bano et al, 2019), enquanto que os genes PersiCel1 e PersiCel2 demonstraram maiores atividades em 8 e 6, respectivamente, em temperatura ambiente Maleki et al, (2020). Isso demonstra que enzimas produzidas por diferentes microrganismos, sejam elas isoladas, purificadas ou em estado bruto, apresentam diferentes afinidades ao pH, algumas delas sendo extremófilas, o que não foi observado para *P. ucsense*. Este fato foi corroborado pelas atividades de β-glicosidases, onde apenas as enzimas comerciais mantiveram atividade próxima ao padrão em todos os pH avaliados. Entre os extratos de *P. ucsense*, o produzido com SB demonstrou as maiores atividades relativas em todas as

condições avaliadas, demonstrando, entretanto, quedas mais acentuadas conforme o aumento do pH, conforme havia sido observado para as β -glicosidases produzidas em estado sólido, onde a máxima atividade enzimática foi obtida entre pH 4 e 4,5, com queda de atividade com o aumento de pH (Camassola et al., 2004). Mesmo comportamento foi observado para β -glicosidases de *M. purpureus*, cujo pH ótimo foi 5,5 (Dairot et al., 2008) e de *Chaetomella* sp. BBA70074, com faixa de pH ótimo entre 4,0 e 6,0 (Singh et al, 2023). A queda nas atividades enzimáticas quando há a aproximação das regiões neutra e alcalina pode ser explicada devido à destruição do sítio ativo, ou novamente por alterações nas estruturas secundária ou terciária da enzima (Sulyman et al, 2020).

Xilanases apresentaram, em todos os extratos avaliados, atividades relativas extremamente baixas em relação ao controle, para todos os valores de pH, demonstrando que estas enzimas são as mais dependentes do pH para sua atuação. Entretanto, as xilanases presentes no extrato enzimático produzido com SB se mostraram as mais ativas entre todas as avaliadas, nos diferentes pH utilizados. Este problema não foi enfrentado para três xilanases clonadas de uma cepa de *Fusarium* sp. 21, uma vez que duas delas (Xyn11A e Xyn11B) apresentaram sua máxima atividade em pH 6,0, restando percentual de atividade superior a 90% na faixa de pH entre 5 e 10,5, enquanto que a terceira (Xyn11C) apresentou atividade máxima em pH 5,0, com baixa perda de atividade na faixa entre 2,0 e 10,5, após 24h (Li et al., 2020), demonstrando assim sua afinidade com amplas faixas de pH.

4.4.4.3 Estabilidade em diferentes valores de pH

A efetiva degradação do material lignocelulósico para o uso em biorrefinarias é dependente da utilização de enzimas com elevada atividade e estabilidade em amplas faixas de pH e temperatura (Maleki et al, 2020). Diante disso, a estabilidade dos extratos enzimáticos produzidos por *P. ucsense* utilizando diferentes fontes de carbono foi avaliada em diferentes valores de pH, utilizando a enzima Celluclast[®] como padrão. Os dados obtidos para FPA estão apresentados na Figura 3. Para o extrato produzido com SB, maior estabilidade foi observada nos valores de pH de 4,5, 4,8 e 6 após 72h de avaliação, com atividades relativas superiores a 100%. Já para enzimas produzidas com EG, as atividades relativas permaneceram superiores a 100% apenas nas primeiras 24h no pH 4,8, caindo ainda mais rapidamente nos demais pH avaliados. Entretanto, para ambos os extratos enzimáticos produzidos com biomassa, mesmo após 72h de avaliação, as atividades relativas permaneceram superiores a 50% em todos os valores de pH. Já para as enzimas produzidas em celulose comercial e para Celluclast[®], as atividades caíram abaixo de 100%

já em 24h, ficando próximas ou inferiores a 50% de atividade relativa após 72h, em todos os valores de pH avaliados. A estabilidade do extrato enzimático bruto de *P. ucsense* observada no presente estudo se mostrou superior a observada para o extrato bruto de *Trichoderma asperellum* UC1, que se manteve estável em uma faixa de pH de 3,0 a 8,0 por 1h, apresentando tempos de meia vida de aproximadamente 10, 25 e 26h nos pH 3,0, 4,0 e 5,0, respectivamente (Ezeilo et al, 2019), e de *Rhizopus oryzae* UC2, estável entre pH 3,0 e 12,0, retendo 58 a 88% de atividade após 1h, com meia vida aproximada de 12h em pH 4,0, e 25h em pH 5,0 (Ezeilo et al, 2020). Estes resultados se mostram promissores, tendo em vista uma futura aplicação comercial.

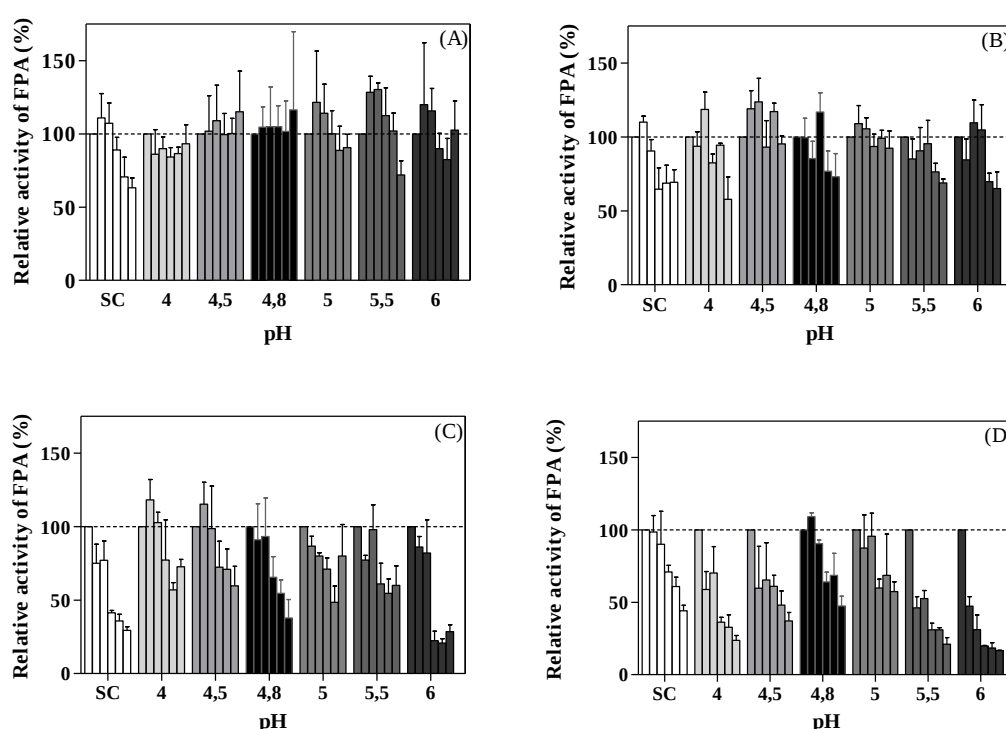


Figura 3. Estabilidade de FPA ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D), mantidos a 50°C. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Os dados obtidos para endoglicanases estão apresentados na Figura 4, e demonstram que, para as enzimas produzidas com SB e EG, as atividades relativas permanecem superiores ou muito próximas a 100% após 72h em todos os pHs avaliados. Entretanto, as enzimas produzidas com celulose apresentaram valores próximos a 100% de atividade, após 72h, apenas nos valores de pH de 4,8 e 5, porém, mesmo assim, endoglicanases se

mostraram mais estáveis que FPA para este extrato, com valores permanecendo próximos a 75% em todos os pH. Comportamento semelhante foi observado para o controle com Celluclast®, demonstrando novamente a maior estabilidade dos extratos produzidos com biomassas lignocelulósicas. Novamente, as enzimas produzidas por *P. ucsense* se mostraram mais estáveis que as produzidas por *R. oryzae* UC2 onde os autores observaram atividade residual de CMCase de 54%, 60% e 53% após 20 h de incubação em pH 3,0, 4,0 e 5,0, respectivamente (Ezeilo et al, 2020), e similares as de *T. asperellum* UC1, com atividade residual de CMCase de 57%, 82% e 83% em pH 3,0, 4,0 and 5,0, respectivamente, após 20h (Ezeilo et al, 2019).

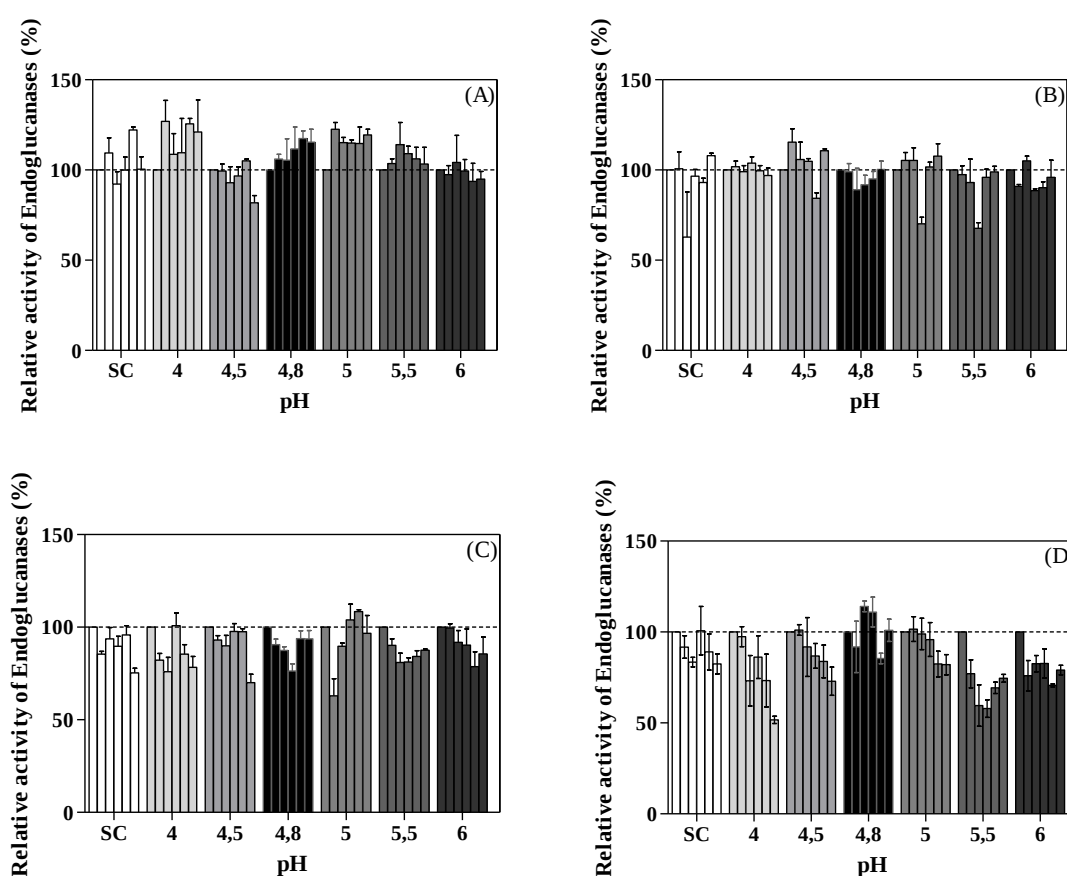


Figura 4. Estabilidade de endoglicanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) mantidos a 50°C. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

A Figura 5 apresenta os dados observados para a estabilidade de β -glicosidases. Entre todos os extratos avaliados, o produzido com EG apresentou a maior estabilidade, com atividade relativa levemente superior a 100% em toda a faixa de pH avaliada (4,0 a

6,0), bem como no padrão sem controle de pH, um comportamento muito semelhante ao controle com Celluclast[®], onde as atividades também ficaram em torno de 100%. Já para o extrato produzido com SB, os valores de pH 4,5 e 6,0 resultaram na menor estabilidade, entretanto sem haver perda superior a 25% de atividade após 72h de incubação. Por outro lado, β -glicosidases produzidas com celulose comercial perderam mais que 75% de sua atividade relativa após as mesmas 72h em pH 6,0, demonstrando uma menor estabilidade desta enzima. Este dado pode ser explicado pelo fato de que a expressão enzimática nos fungos é fortemente influenciada pela natureza, composição química e estado físico da fonte de carbono, o que faz com que o mesmo microrganismo expresse uma gama de diferentes isoenzimas (Ezeilo et al., 2019), resultando assim em enzimas com diferentes níveis de estabilidade dependendo do substrato. Os resultados observados para β -glicosidases também foram mais estáveis que os observados por Ezeilo et al (2020), que obtiveram tempos de meia-vida de 12 h (pH 3,0), 18h (pH 4,0) e 16h (pH 5,0) para as enzimas produzidas por *R. oryzae* UC2, bem como por Singh et al (2023), que observaram que β -glicosidases produzidas por *Chaetomella* sp. BBA70074 retiveram apenas 50% da atividade após 240 minutos em pH 6,0. Os dados obtidos se assemelharam aos observados por Ezeilo et al (2019) para β -glucosidase de *T. asperellum* UC1 em um fator – essas se apresentaram entre as enzimas mais estáveis no extrato produzido pelo microrganismo – com tempos de meia-vida de 25h, 68h e 72h em pH 3,0, 4,0 e 5,0, respectivamente.

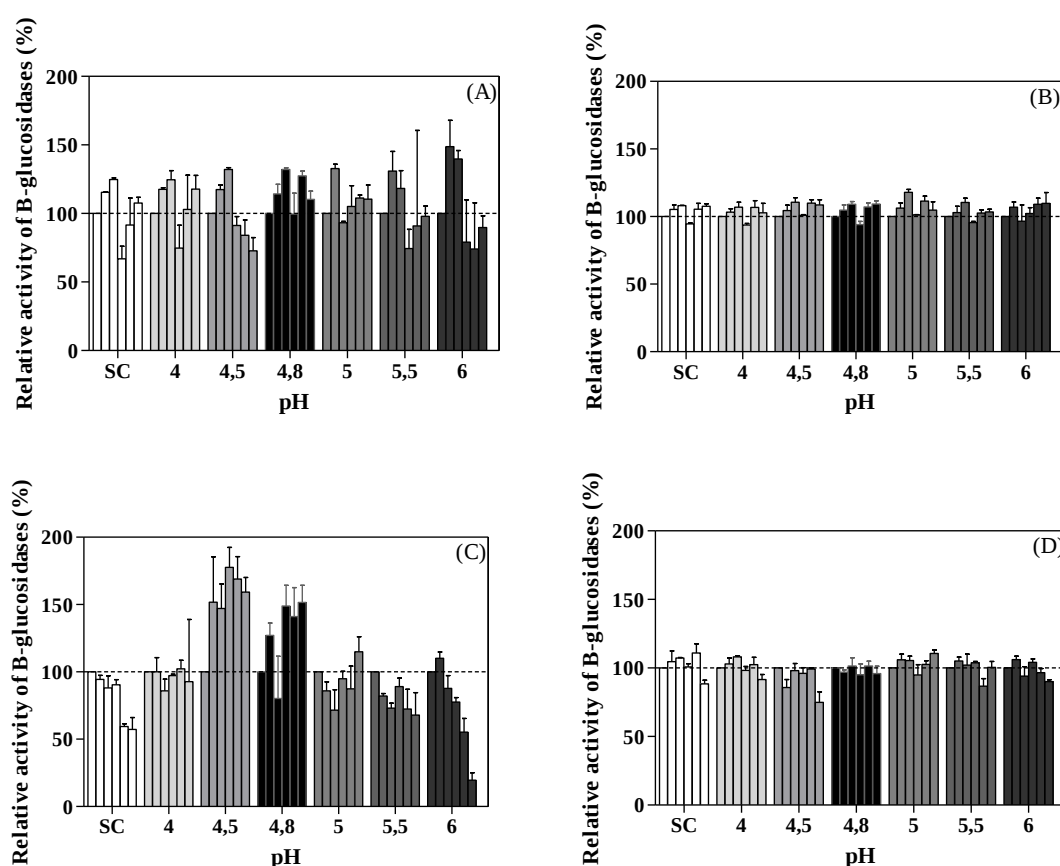


Figura 5. Estabilidade de β -glicosidases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) mantidos a 50°C. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Enquanto as β -glicosidases se mostraram de um modo geral, as enzimas mais estáveis avaliadas para *P. ucsense*, xilanases foram o oposto (Figura 6). Nenhum dos extratos avaliados apresentou atividade relativa próxima a 100% após 72h de incubação, em nenhum pH avaliado. Dentre os extratos produzidos por *P. ucsense*, SB apresentou os melhores resultados, com atividade relativa residual de 67% após 72h em pH 6,0, sendo este percentual superior ao observado para a enzima comercial (60% de atividade relativa em pH 5,5), e EG (66% de atividade relativa sem controle de pH). Quanto ao extrato produzido com celulose comercial, houve queda na atividade relativa superior a 50% em toda a faixa de pH avaliada, novamente demonstrando uma menor estabilidade deste extrato enzimático em relação aos produzidos com biomassas lignocelulósicas. Os presentes dados são similares aos observados por Ezeilo et al (2020), cujos dados demonstraram um tempo de meia-vida de 2h (pH 3,0), 4h (pH 4,0) e 9h (pH 5,0),

aproximadamente, para xilanases de *R. oryzae* UC2, sendo inferiores aos observados para as demais enzimas do mesmo microrganismo. Já xilanases produzidas por *T. asperellum* UC1 não demonstraram o mesmo problema, permanecendo estáveis por tempos mais longos, com meia-vida de 18h e 33h em pH 4,0 e 5,0, respectivamente (Ezeilo et al, 2019), demonstrando uma maior estabilidade das xilanases produzidas por este microrganismo.

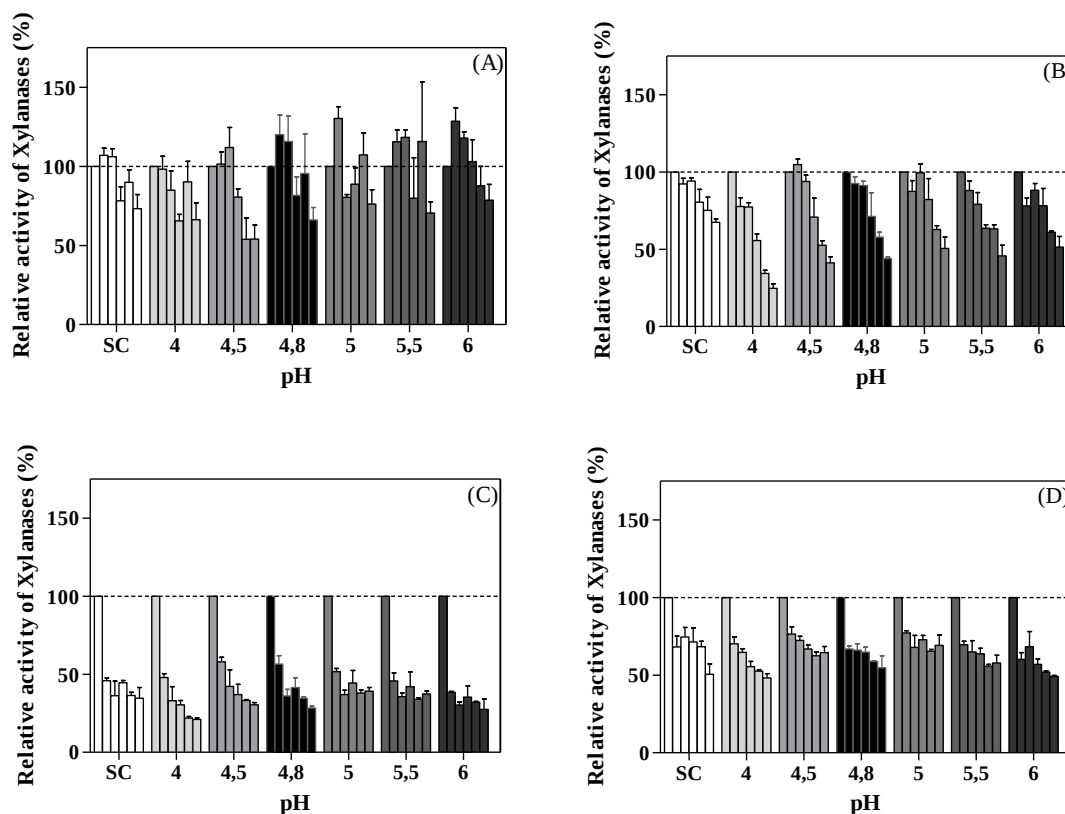


Figura 6. Estabilidade de xilanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) mantidos a 50°C. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Os dados obtidos no presente estudo demonstram que as enzimas produzidas utilizando biomassas lignocelulósicas são mais estáveis ao longo do tempo do que as enzimas produzidas com celulose, sendo similares ou superiores também ao preparo comercial. Além disso, os dados também sugerem que os extratos enzimáticos produzidos por *P. ucsense* são mais e/ou igualmente estáveis a diferentes valores de pH quando comparados a outras espécies, sendo estes dados importantes para uma futura utilização comercial.

4.4.4.4 Termoestabilidade

Assim como a estabilidade em diferentes faixas de pH, a estabilidade em diferentes temperaturas também é um fator importante para a possível aplicação de uma enzima em processos de biorrefinaria. A atividade relativa de FPA (Figura 7) se manteve estável na temperatura de 50°C, e superior ou igual a 70% nas temperaturas de 40, 45, 55 e 70°C, após 72h, para o extrato produzido em SB. Mesmo as temperaturas de 60 e 65°C permaneceram com mais de 50% de sua atividade para esse extrato. Já para o extrato EG, a estabilidade só foi mantida na temperatura de 40°C, com atividades relativas superiores a 70% após 72h até a temperatura de 55°C. Em temperaturas mais elevadas, houve rápida queda de atividade, sendo inferior a 50% da atividade inicial já em 24h de incubação.

Para o extrato produzido com celulose comercial, a enzima não reteve 100% de sua atividade em nenhuma das temperaturas avaliadas, apresentando quedas drásticas após 1h de incubação em 65 e 70°C. A enzima comercial também apresentou quedas drásticas em sua atividade relativa já na primeira hora em temperaturas a partir de 60°C, permanecendo estável por 72h em 40 e 45°C.

Resultados similares foram obtidos por Camassola et al (2004) em cultivo sólido de *P. echinulatum*, onde queda na atividade foi observada na primeira hora para FPA a 60°C, sendo que os autores sugerem que esta queda possa ser devido a presença de proteases no meio, que perderam sua atividade nesta primeira hora, uma vez que quedas futuras na atividade não foram observadas. Este fato também foi observado no presente estudo, onde após a drástica queda inicial, as atividades permaneceram praticamente constantes. Os resultados também são similares aos observados por Almeida et al (2019) para FPase de *Fusarium verticillioides*, que manteve 42% de sua atividade a 50°C após 120h de incubação. A atividade relativa de FPA de *R. oryzae* UC2 apresentou tempos de meia-vida de 17h (30°C), 10h (40°C e 50°C) e 1,5h (60°C) (Ezeilo et al, 2020), enquanto que para *T. asperellum* reteve 50% de atividade residual após 4h de incubação a 60°C (Ezeilo et al, 2019). Estes dados demonstram uma termoestabilidade razoavelmente baixa para FPA em diferentes microrganismos e meios de cultura, sendo este um gargalo a ser solucionado para uma eficiente aplicação em processos industriais.

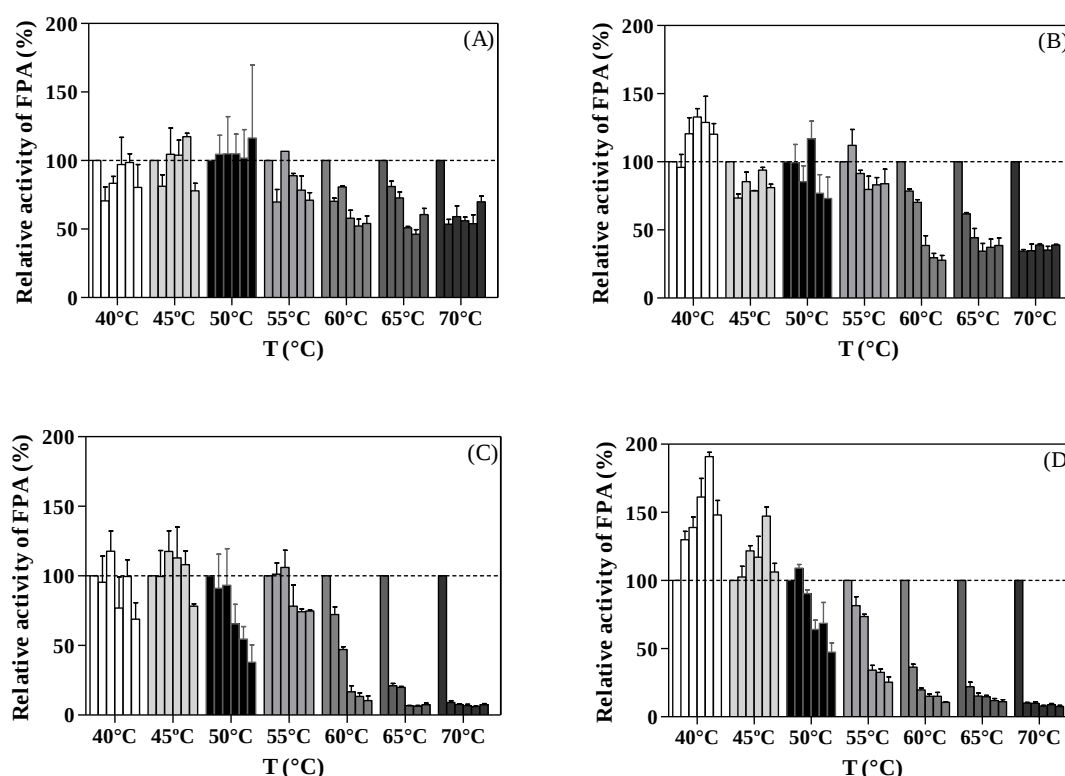


Figura 7. Termoestabilidade de FPA ao longo do tempo observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) em pH 4,8. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Por outro lado, endoglicanases se mostraram relativamente mais estáveis em temperaturas até 60°C, para todos os extratos avaliados, sendo destaque a temperatura de 55°C, tanto para o extrato SB quanto para celulose, que mantiveram atividades relativas superiores a 100% após 72h de incubação (Figura 8). Entretanto, em temperaturas mais elevadas (65 e 70°C), quedas drásticas de atividade foram observadas após 24h, permanecendo inferiores a 50%. Endoglicanases produzidas por *F. verticillioides* retiveram 56% de sua atividade inicial após 120h de incubação a 50°C (Almeida et al., 2019), um pouco inferior a observada no presente estudo. Endoglicanases de *R. oryzae* UC2 exibiu meia-vida de 20h a 30°C, 15h a 40 e 50°C, e 5h a 60°C (Ezeilo et al, 2020), enquanto que as enzimas produzidas por *T. asperellum* retiveram 50% de sua atividade até 15h a 60°C (Ezeilo et al, 2019), também demonstrando estabilidade inferior as endoglicanases produzidas por *P. ucsense*. Os genes isolados PersiCel1 e PersiCel2, por outro lado, se mostraram altamente estáveis, sendo que PersiCel1 reteve 70% de sua atividade após 384h

a 50°C, e PersiCel2 manteve 52% de sua atividade neste mesmo tempo e temperatura (Maleki et al, 2020), enquanto que o gene clonado Cel1029 permaneceu com 86% de atividade após 24h em temperaturas de 4°C a 60°C (Zhao et al, 2021). Entretanto, vale ressaltar que estes genes foram especificamente isolados e clonados para obter estabilidades e atividades altas em amplas faixas de temperatura e pH, ao contrário das endoglicanases aqui estudadas, que são provenientes de um coquetel bruto, e mesmo assim apresentam boa estabilidade em determinadas temperaturas. A alta estabilidade apresentada demonstra que as enzimas podem sofrer baixa inativação por pH e temperatura, o que favorece os processos de sacarificação, uma vez que endoglicanases termoestáveis tem grande potencial de diminuir os custos de produção ao aumentar a produtividade do processo (Almeida et al., 2019).

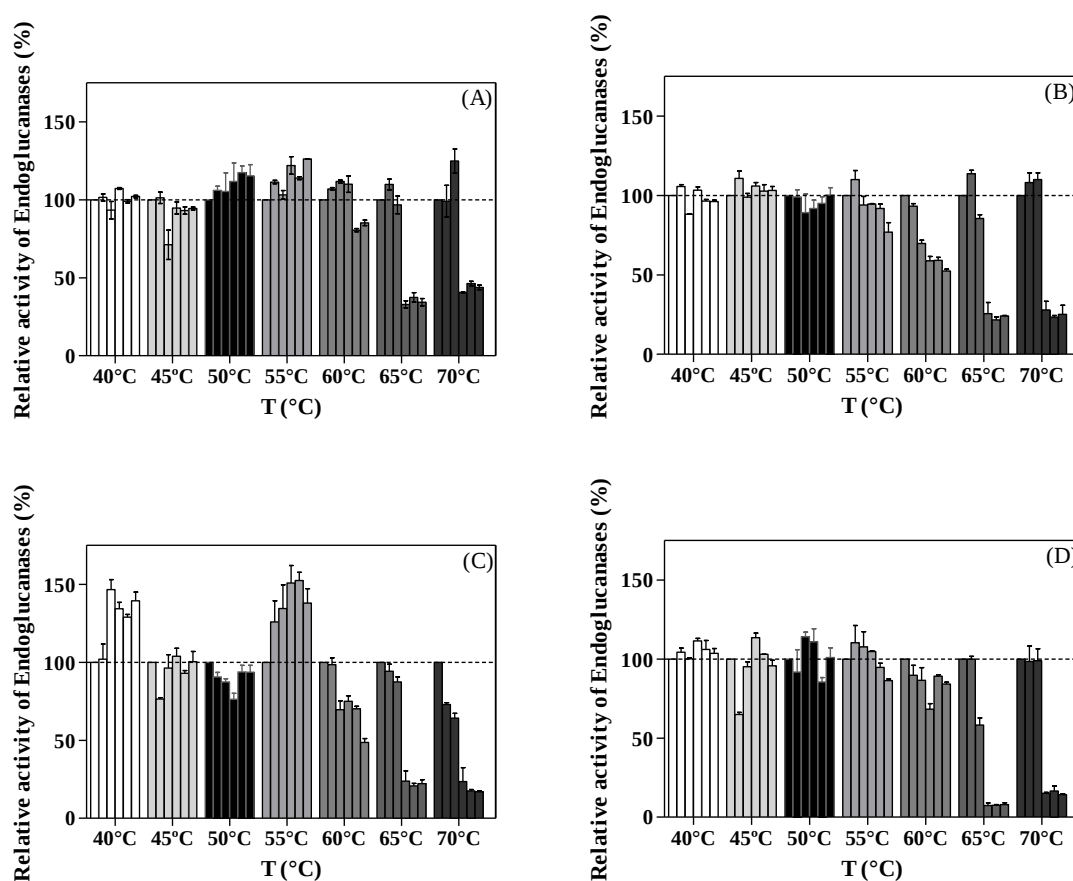


Figura 8. Termoestabilidade de endoglicanases ao longo do tempo observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) em pH 4,8. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Para β -glicosidases (Figura 9), maior estabilidade foi observada em temperaturas mais amenas, até 50°C, para todos os extratos avaliados. Para os extratos produzidos com EG e celulose, a estabilidade se mantém superior ou próxima aos 50% de atividade relativa em temperaturas até 65°C, enquanto que o extrato produzido com SB e a enzima comercial apresentam quedas mais drásticas em sua estabilidade. Em temperatura de 70°C, nenhum dos extratos avaliados permaneceu com atividade relativa superior a 50% na primeira hora de processo, perdendo completamente sua atividade, ou quase, após decorridas 72h. Esses resultados diferem dos obtidos por Camassola et al. (2004) que observaram atividade constante de β -glicosidases de *P. echinulatum* em todo o experimento.

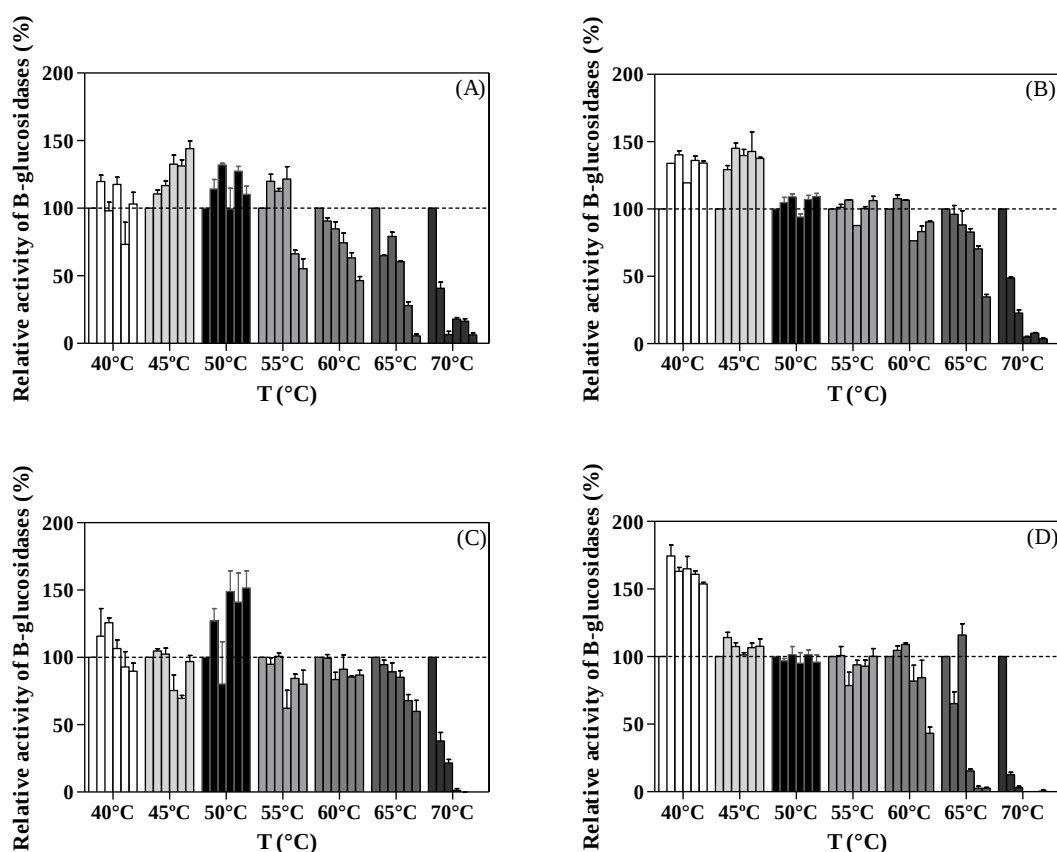


Figura 9. Termoestabilidade de β -glicosidases ao longo do tempo observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) em pH 4,8. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Entretanto, resultados similares foram obtidos por Singh et al (2023), onde β -glicosidases de *Chaetomella* sp. também se mostraram instáveis a 70°C, com perda de 40% da atividade após 30 minutos e 90% após 240 minutos, enquanto que para 55°C a enzima

reteve 60% de atividade após 240 min. As enzimas de *Monascus purpureus* também apresentaram baixa estabilidade em temperaturas elevadas, com tempos de meia vida de 1,8 minutos em 70°C e 57 minutos em 65°C (Dairot et al., 2008), sendo ainda mais sensíveis a temperatura que as produzidas por *P. ucsense* no presente trabalho. Ezeilo et al (2020) observaram tempos de meia vida de 19,2h a 60°C, 63,3h a 50°C e 23,4h a 40°C para β -glicosidases de *R. oryzae* UC2, um comportamento similar ao observado neste estudo, onde também, em temperaturas mais baixas, a estabilidade foi levemente inferior a observada em 50°C. Esses dados sugerem que, embora temperaturas mais elevadas (60-70°C) favoreçam uma maior atividade de β -glicosidases, temperaturas impedindo assim a perda de sua atividade logo no início do processo.

Enquanto que as demais enzimas de *P. ucsense* se demonstraram estáveis em faixa ampla de temperatura, o mesmo não foi observado para xilanases (Figura 10). Exceto para os extratos produzidos com SB (onde a atividade enzimática foi estimulada ao longo do tempo nas temperaturas de 40 e 45°C, aumentando sua atividade relativa) e com celulose (que manteve atividades relativas próximas a 100% nestas mesmas temperaturas), as atividades relativas apresentaram quedas acentuadas durante o período de avaliação. Para as enzimas de *P. ucsense*, atividades relativas ainda superiores a 50% foram observadas após 2h de incubação em temperaturas até 65°C, entretanto, após 24h, as atividades relativas se mostraram inferiores a 30%. a 70°C, a queda para valores inferiores a 25% da atividade relativa inicial já ocorreu na primeira hora de incubação. Comportamento similar foi observado no padrão com enzima comercial.

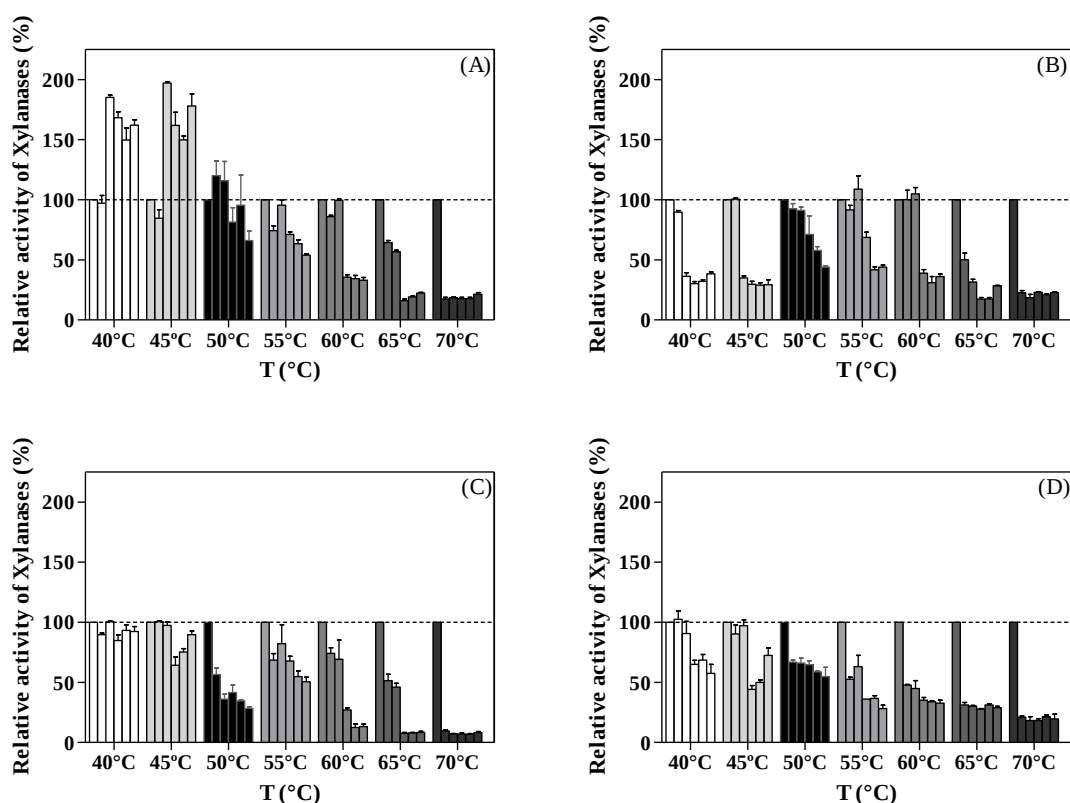


Figura 10. Termoeestabilidade de xilanases ao longo do tempo observada para três coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* com diferentes substratos – Bagaço de cana-de-açúcar (A), Capim elefante (B) e celulose (C) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (D) em pH 4,8. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Os resultados do presente trabalho são similares aos obtidos para β -glicosidases de *F. verticillioides*, que reteve 18% de sua atividade inicial a 50°C após 120 h de incubação (Almeida et al., 2019). Já xilanases de *R. oryzae* UC2 se mostraram muito mais estáveis, com tempos de meia vida 27,6 h e 9,2 h quando incubadas a 50°C e 60°C, respectivamente (Ezeilo et al, 2020), enquanto que as enzimas de *T. asperellum* mostraram 50% de atividade residual após cerca de 15 h de incubação a 60°C (Ezeilo et al. 2019). Esses resultados sugerem que, para alcançar uma maior termoeestabilidade de xilanases de *P. ucsense*, estudos sobre etapas posteriores de purificação e formulação do extrato produzido são necessárias, não sendo indicada sua utilização direta em processos, considerando produções *on site*, como poderia ser realizado com as demais enzimas presentes no coquetel enzimático produzido pelo microrganismo.

4.4.5 Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que as enzimas produzidas por *P. ucsense* utilizando biomassas lignocelulósicas, são, em sua maioria, estáveis em uma ampla faixa de temperaturas e pH, mesmo em seu estado bruto. Além disso, apresentam atividades ótimas em temperaturas e pH que condizem aos necessários em processos de biorrefinaria. Essas características se mostram relativamente importantes para viabilizar processos em que essas enzimas possam ser produzidas e utilizadas *on site*, não havendo, portanto, a necessidade de purificação e formulação das mesmas. Este fato, juntamente a sua produção utilizando resíduos agroindustriais, podem vir a ser uma alternativa para baratear os custos de sua utilização, um dos maiores gargalos enfrentados para o estabelecimento da tecnologia enzimática na produção de etanol de segunda geração, bem como de outros insumos químicos. Com estes resultados, o presente estudo auxilia no desenvolvimento de processos do gênero, tal como produção de açúcares, combustíveis e químicos através de biomassas, viabilizando assim a implementação das tecnologias enzimáticas em escala industrial.

4.5 PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES POR *Penicillium ucsense* UTILIZANDO RESÍDUOS DA COLHEITA DE MILHO COMO SUBSTRATO

4.5.1 Resumo

No presente trabalho, foi buscada a otimização do uso da biomassa residual da colheita do milho (palhas, talos e folhas) para produção de enzimas celulolíticas por *Penicillium ucsense*. Para tanto, diferentes pré-tratamentos foram avaliados (hidrotérmico, NaOH, H₂SO₄ e imidazol), tanto na composição química da biomassa posteriormente a sua aplicação, quanto no crescimento e produção enzimática nas biomassas pré-tratadas. Os resultados obtidos demonstraram que os pré-tratamento ácido e alcalino apresentaram o melhor percentual de recuperação de celulose. Entretanto, nos resultados obtidos em frascos agitados, as biomassas pré-tratadas com NaOH e hidrotérmica, na concentração de 10 g.L⁻¹ de celulose equivalente, apresentaram as melhores atividades enzimáticas. Com isso, o pré-tratamento hidrotérmico foi mantido como padrão, uma vez que demanda de menos insumos químicos em seu processo. Posteriormente, a otimização dos aditivos presentes no meio de cultivo (sacarose, farelo de trigo e farelo de soja) foi realizada, chegando-se as concentrações de 7,5 g.L⁻¹ de farelo de soja, 0,5 g.L⁻¹ de sacarose e 1 g.L⁻¹ de farelo de trigo, com atividades preditas de 0,12 U.mL⁻¹ para FPA, 0,67 U.mL⁻¹ para endoglicanases, 0,57 U.mL⁻¹ para β -glicosidases, 0,32 U.mL⁻¹ para exoglicanases e 16 U.mL⁻¹ para xilanases. Definidas as concentrações do meio, a utilização do pré-tratamento na íntegra, ou de misturas com volumes percentuais de licor proveniente do mesmo, foi avaliada, observando-se que a utilização do pré-tratamento na íntegra resulta em atividades superiores de FPA, endoglicanases e xilanases, enquanto que a adição de licores, em concentrações variando entre 25% e 100% do volume, estimulam a produção de β -glicosidases e exoglicanases, podendo prejudicar a produção das demais enzimas em diferentes graus. Ao escalonar o processo, atividades enzimáticas de 1,5 U.mL⁻¹ para FPA, 10,2 U.mL⁻¹ para endoglicanases, 7,8 U.mL⁻¹ para β -glicosidases, 6,3 U.mL⁻¹ exoglicanases, e 22 U.mL⁻¹ xilanases foram alcançadas em regime descontínuo em biorreator com agitação mecânica. Em regime descontínuo alimentado, o aumento nas atividades enzimáticas foi de 11%, 34%, 9%, 22% e 32%, respectivamente. Os resultados obtidos no presente trabalho se mostram promissores para o desenvolvimento de processos de produção enzimática em larga escala utilizando resíduos da colheita do milho, *on site*, o que pode auxiliar na diminuição dos custos das enzimas celulolíticas, e de outro insumos de interesse industrial.

Palavras-chave: celulases, resíduos de milho, pré-tratamento, *P. echinulatum*, regime descontínuo alimentado.

4.5.2 Introdução

O contínuo aumento da industrialização tem feito com que sejam buscadas cada vez mais formas econômicas e sustentáveis de atender as crescentes demandas energéticas, pois ainda há grande dependência dos combustíveis fósseis para fornecer a energia necessária para manter os padrões de vida atuais (Zabed et al., 2016; Bhardwaj et al, 2021). Neste contexto, surgiu em 1970 a ideia da conversão de biomassas lignocelulósicas em biocombustíveis, entretanto, devido ao custo-benefício e viabilidade econômica ainda serem baixos, numerosas estratégias vem sendo estudadas para sua produção utilizando abordagens mais sustentáveis, como a biorrefinaria (Kuhad et al., 2016; Bhardwaj et al, 2021).

A biorrefinaria de materiais lignocelulósicos refere-se ao processamento sustentável dessa biomassa em um amplo espectro de produtos de interesse (Maleki et al, 2020). As biomassas lignocelulósicas são abundantes e amplamente geradas anualmente, sendo a principal matéria prima de baixo custo para processos biotecnológicos (Vieira et al, 2021). Atualmente, sua utilização está sendo considerada crucial para o desenvolvimento de uma economia de baixo carbono, buscando elevado potencial ambiental, social e econômico. Isso porque possibilita investimentos no setor industrial, reduz a dependência de combustíveis fósseis e a produção de resíduos, bem como estimula o desenvolvimento regional e rural, gerando mais empregos (Yamakawa et al, 2018).

Desde sua domesticação a cerca de 9.000 anos, o milho (*Zea mays*) vem apresentando um papel cada vez mais importante, sendo que sua produção global é crescente, ocupando cerca de 197 milhões de hectares, espalhados entre os continentes (Erenstein et al, 2022). A cultura do milho ocupa posição de destaque na agricultura brasileira, sendo o segundo cereal mais produzido no país, atrás apenas da soja (Embrapa, 2024e). As frações do resíduo de milho são classificadas em colmo (medula e casca) e folha, e apresentaram diferentes tecidos, morfologia celular e composições químicas (Li et al, 2012). Sua colheita gera grandes quantidades destes resíduos, sendo, entretanto os sabugos os mais estudados, possuindo um percentual considerável de xilana e relativamente menor presença de cinzas que outras biomassas, permitindo uma gama maior de possibilidades de pré-tratamento (Kumar et al., 2023).

A natureza recalcitrante das biomassas lignocelulósicas torna sua aplicação um desafio, uma vez que prejudica a acessibilidade a celulose, sendo necessário para sua conversão em biocombustíveis e outros commodities, a exploração de diferentes fontes adequadas e de etapas de pré-tratamento que facilitem sua degradação enzimática (Jönson & Martín, 2016; Yamakawa et al, 2018; Bhardwaj et al, 2021).

O pré-tratamento é a etapa chave para uma eficiente utilização da biomassa lignocelulósica. Os pré-tratamentos mais conhecidos e utilizados são a hidrólise ácida, a explosão a vapor e os processos hidrotérmicos, que apresentam uma boa eficiência e aplicabilidade industrial, mas que em contrapartida resultam em custos elevados, devido à construção dos reatores que necessitam ser resistentes a altas pressões e a corrosão, bem como pelo gasto energético gerado pelas altas temperaturas utilizadas. Outros métodos que vem sendo desenvolvidos são em meio alcalino, processos oxidativos, e a utilização de organosolv e líquidos iônicos (Jönson & Martín, 2016; Yamakawa et al, 2018).

Com a disponibilidade de tantos pré-tratamentos conhecidos, sua escolha depende principalmente das características físico-químicas da matéria prima a ser utilizada. O pré-tratamento físico-químico pode originar produtos secundários que podem ser tóxicos para os microrganismos e dificultar a utilização dos açúcares obtidos a partir de biomassa. Entre os principais inibidores gerados estão o furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), que podem prejudicar o crescimento dos microrganismos posteriormente aplicados para produção de enzimas, combustíveis e outros químicos (Nichols et al, 2008; Bhardwaj et al, 2021).

As enzimas celulolíticas são indispensáveis para a manutenção do ciclo global do carbono, uma vez que catalisam a degradação da celulose, e, portanto, desempenham um papel vital na resolução dos problemas de gerenciamento de resíduos e energia da humanidade (Verma et al, 2021). O potencial das enzimas celulolíticas tem sido amplamente estudado e explorado para processos de bioconversão e desempenha um papel fundamental em diversas aplicações industriais. Neste sentido, a produção de celulasas utilizando substratos alternativos para redução de seus custos é indicada, uma vez que seu processo de produção contribui com 50% do custo total da hidrólise (Salazar et al, 2020; Bhardwaj et al, 2021).

As celulasas são um complexo enzimático chave para a biorrefinaria baseada em materiais lignocelulósicos e tem demanda crescente em diversos setores, entretanto, outras enzimas também apresentam papéis cruciais. As xilanases são as principais enzimas envolvidas na degradação da xilana, um dos principais componentes da hemicelulose de

resíduos agrícolas, como farelo de trigo, palha de trigo e palha de milho, constituindo um terço do carbono orgânico renovável total na Terra. Já exoglicanases são responsáveis pela remoção das extremidades não redutoras dos oligossacarídeos produzidos pelas endoglicanases, auxiliando na completa degradação da celulose e hemicelulose (Li et al. 2020; Salazar et al, 2020; Bhardwaj et al, 2021).

A hidrólise completa da hemicelulose resulta na liberação de outros componentes da lignocelulose. Portanto, a quebra melhorada da hemicelulose é um fator chave para aumentar a utilização da biomassa (Li et al. 2020). As exoglicanases tem demonstrado potencial de aplicação em bioconversão de resíduos agroindustriais em combustíveis e rações animais. Entretanto, embora haja diversos relatos de microrganismos que produzem celulasas, endoglicanases e β -glicosidases, a produção de exoglicanase ainda é escassamente reportada (Salazar et al, 2020).

Atualmente, as principais fontes para produção de celulasas e xilanases na indústria são os fungos, sendo que sua habilidade de crescer em substratos de baixo custo é que os torna atrativos (Almeida et al., 2019; Costa et al., 2018), uma vez que substratos como celulose pura e carboximetilcelulose vem sendo utilizados comercialmente, porém com custos elevados (Bhardwaj et al, 2021). A variedade e a proporção de enzimas produzidas variam de acordo com os diferentes materiais lignocelulósicos utilizados para o crescimento fúngico, e sua ação em sinergia é responsável pela despolimerização da celulose (Almeida et al., 2019). A indução de xilanases, por exemplo, é complexa, e responde de forma diferente em cada microrganismo, sendo que determinados substratos que são indutores para certas espécies, são inibidores em outras. Já exoglicanases são normalmente produzidas juntamente com as demais celulasas, entretanto o efeito de diferentes substratos em sua atividade de acordo com o microrganismo utilizado também é um ponto a ser estudado (Salazar et al, 2020).

Estudos relataram que os secretomas de *Penicillium echinulatum*, *Trichoderma harzianum* e *Neurospora crassa* variam de acordo com a fonte de carbono utilizada, de modo que é hipoteticamente possível modular o coquetel enzimático ajustando composição do meio de cultura (Costa et al., 2016). O fungo *Aureobasidium pullulans* apresenta habilidade de crescimento em diversos substratos lignocelulósicos, com rápido crescimento e produção de uma gama diversa de enzimas celulolíticas (Vieira et al, 2021). Já *Trichoderma reesei*, o fungo mais utilizado industrialmente, é conhecido por sua deficiência na produção de β -glicosidase, enquanto que as celulasas produzidas por fungos do gênero *Penicillium* são reconhecidamente ricas nestas enzimas, tendo maior eficiência

na sacarificação com menores concentrações e, portanto, diminuído os custos (Vaishnav et al, 2018). Enzimas produzidas por *P. echinulatum* S1M29 apresentaram sacarificação superior a enzimas comerciais, além de serem estáveis a temperatura de 50°C, que também é sua temperatura ótima de atividade, sendo uma vantagem, uma vez que esta é a temperatura na qual os processos de sacarificação são usualmente conduzidos (Camassola et al, 2004).

A degradação eficiente da lignocelulose requer várias enzimas trabalhando em sinergia e o aumento da produtividade biocatalítica dos coquetéis enzimáticos em processos de biorrefinaria é necessário. Portanto, a busca por coquetéis enzimáticos melhores e com bom desempenho e estabilidade é o objetivo geral a ser alcançado (Maleki et al, 2020). A fermentação submersa é um tipo de fermentação onde o microrganismo se desenvolve em excesso de água. Nela, os controles de temperatura e pH são facilitados, sendo a forma mais utilizada comercialmente (Vaishnav et al, 2018). A mesma pode ser descontínua ou descontínua alimentada, sendo que esse sistema resultou em incrementos relevantes na atividade enzimática obtida para *P. echinulatum* S1M29, podendo auxiliar no desenvolvimento de um processo que resulte em enzimas com preços mais acessíveis (Reis et al., 2013).

Diversas espécies de microrganismos vêm sendo estudadas a fim de produzir elevadas concentrações de enzimas, entretanto, a maioria dos estudos realizados em biorreator utiliza celulose comercial como indutor e fonte de carbono, sendo necessários maiores estudos que empreguem materiais lignocelulósicos (Kuhad et al, 2016). Estudos em nível de reator são importantes uma vez que podem posteriormente serem replicados nas indústrias, bem como conseguem monitorar certos parâmetros que não podem ser estudados em frascos agitados (Vaishnav et al, 2018).

Diante disso, a realização desses estudos utilizando materiais lignocelulósicos como indutores em processos conduzidos em sistema descontínuo e descontínuo alimentado se tornam interessantes na busca por um processo de produção mais eficiente e economicamente viável. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de enzimas celulolíticas por *P. ucsense* S1M29, anteriormente classificado erroneamente como *P. echinulatum* (Lenz et al, 2022), utilizando resíduos da colheita do milho como principal fonte de carbono, bem como o melhor regime de produção dessas enzimas, buscando aumentar a produção enzimática, bem como obter um coquetel enzimático variado.

4.5.3 Materiais e métodos

4.5.3.1 Microrganismo e manutenção da linhagem

Foi utilizada a linhagem *Penicillium ucsense* S1M29, obtida da linhagem mutante 9A02S1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSM 18942) e pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (Dillon et al., 2006; Dillon et al, 2011; Lenz et al., 2022). A linhagem foi mantida em tubos contendo 100 mL de ágar-celulose, consistindo de 40 mL de celulose intumescida, 10 mL de solução mineral, 0,1 g proteose peptona, 2 g ágar e 50 mL de água destilada. O crescimento ocorreu a 28°C, até a formação de conídios e então estocada a 4°C (Dillon *et al.*, 2006)

4.5.3.2 Biomassa lignocelulósica

Para a realização do presente trabalho foram utilizados os resíduos da colheita do milho (palhas, folhas e talos), cedidos por um produtor de Veranópolis/RS, recolhidos após a colheita e submetido à moagem através de moinho de facas.

A biomassa foi submetida a diferentes pré-tratamentos, para análise de seus efeitos na biomassa e posterior aplicação. Os pré-tratamentos foram realizados utilizando uma proporção 1:10 de sólido/líquido, devido a consistência da biomassa, sendo os demais parâmetros também ajustados para a biomassa utilizada. A temperatura e o tempo utilizados foram padronizados para todos os pré-tratamento em 125°C e 1h, e os mesmos foram realizados em autoclave em frascos Duran de 1L. Após, os frascos foram retirados da autoclave, resfriados a temperatura ambiente por 30 min e então filtrados e lavados com 1L de água morna, exceto para imidazol (Toscan et al, 2019).

Os pré-tratamentos avaliados foram: hidrotérmico (H₂O), NaOH 2% (m/v), H₂SO₄ 1% (m/v), e imidazol 50% (m/v). Para os tratamentos foram utilizados 75g de biomassa e 750mL de H₂O, que foi aquecida a 50°C e adicionada aos frascos com a biomassa, que ficou imersa *overnight*. Os demais agentes foram adicionados no momento do pré-tratamento. No tratamento com imidazol, após a retirada da autoclave, foram adicionados mais 750mL de H₂O e agitado por 1h, e então lavado com etanol até pH inferior a 7 (Liao et al, 2015; Toscan et al, 2019).

4.5.3.3 Caracterização do material lignocelulósico

A determinação do teor de cinzas foi realizada utilizando 300 mg da biomassa lignocelulósica acondicionada em cadinhos de porcelana, previamente calcinados e tarados, que foram então novamente calcinados em mufla a uma temperatura de 575°C *overnight*,

com base no relatório técnico NREL/TP-510-42622 (National Renewable Energy Laboratory) (Sluiter *et al.*, 2008a). O teor de cinzas foi quantificado através da diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, sendo expressa em relação à quantidade de amostra inicial.

A determinação do teor de compostos extraíveis foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Sluiter *et al* (2005) no protocolo NREL/TP-510-42619, onde 1 g de biomassa *in natura* foi suspensa em envelopes de papel filtro, e colocada em extrator com frascos previamente pesados, por 24 horas, utilizando etanol como solvente, a 75°C. Posteriormente, o etanol foi evaporado, e o procedimento foi repetido utilizando água como solvente, a temperatura de 100°C. A água foi então evaporada e os frascos do extrator foram secos em estufa para nova pesagem, enquanto que a biomassa foi seca para posterior utilização nos procedimentos de determinação da composição química.

A composição química da biomassa lignocelulósica foi determinada conforme a metodologia do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL/TP-510-42618) (Sluiter *et al.*, 2008b). Para tanto, 300 mg de biomassa foram mantidos em tubos de ensaio por uma hora, a 30°C, em presença de H₂SO₄ 72%. Após, a mistura foi transferida para frascos Duran contendo 84 mL de água, sendo estes autoclavados por uma hora. A biomassa foi então filtrada em cadinhos de vidro, utilizando bomba a vácuo, sendo a parte líquida analisada em HPLC, para determinação dos sacarídeos (Shimadzu, Japan, com detector RID-10A, coluna Aminex® HPX-87H, 30x7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, USA) e a parte sólida seca em estufa por 24 horas para determinação da lignina insolúvel. Após decorrido este tempo, os cadinhos foram pesados e levados a mufla (575°C) por 3 horas para calcinação da lignina, a fim de avaliar a presença de cinzas na mesma.

4.5.3.4 Preparação do inóculo

O meio de cultivo para a produção do inóculo continha 5 g.L⁻¹ de celulose, 1 g.L⁻¹ de sacarose, 2 g.L⁻¹ de farelo de soja, 5 g.L⁻¹ de farelo de trigo, 0,5 g.L⁻¹ de *Prodex*®, 1 mL.L⁻¹ de *Tween 80*®, 5 mL de solução mineral baseada em Mandels & Reese (1957) e água destilada para completar o volume final de 100 mL (Reis *et al.*, 2013).

A preparação do inóculo foi realizada em frascos Erlenmeyer de 500 mL, inoculados com uma suspensão com 1x10⁷ conídios e mantidos a 28°C, em agitação recíproca de 180 rpm, por 72 horas.

4.5.3.5 Cultivo em frascos

O meio de cultivo padrão utilizado para os testes em frascos agitados foi composto

pela biomassa proveniente do resíduo de milho em uma quantidade equivalente a 10 g.L^{-1} de celulose, bem como 1 g.L^{-1} de sacarose, 5 g.L^{-1} de farelo de trigo, 2 g.L^{-1} de farelo de soja, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de *Prodex*[®], 1 g.L^{-1} de Tween 80[®] e 5 mL da solução mineral adaptada de Mandels & Reese (1957). Posteriormente, foi realizada a otimização do meio de cultivo, através de um delineamento composto central rotacional (DCCR), onde foram otimizadas as concentrações dos principais aditivos do meio de cultivo (sacarose, farelo de trigo e farelo de soja) levando-se em consideração a produção de todas as enzimas avaliadas.

Posteriormente a otimização, a utilização do licor proveniente do pré-tratamento também foi avaliada, bem como a utilização do pré-tratamento na íntegra, sem as etapas de lavagem e secagem da biomassa. Para tanto, foram realizados oito cultivos, com volume final ajustado para 100 mL com água, concentração equivalente de biomassa pré-tratada a 10 g.L^{-1} de celulose (exceto quando indicado ao contrário) $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de *Prodex*[®], 1 g.L^{-1} de Tween 80[®] e 5 mL da solução mineral adaptada de Mandels & Reese (1957) e demais composição conforme descrito: A – utilização do pré-tratamento na íntegra, com concentração equivalente de 10 g.L^{-1} de celulose na biomassa *in natura*; B – utilização do pré-tratamento na íntegra, com concentração equivalente de 10 g.L^{-1} de celulose na biomassa *in natura*, 1 g.L^{-1} de farelo de trigo e $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de farelo de soja; C – utilização do pré-tratamento na íntegra; D – utilização do pré-tratamento na íntegra, 1 g.L^{-1} de farelo de trigo e $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de farelo de soja; E – 100 mL de licor; F – 100 mL de licor, 1 g.L^{-1} de farelo de trigo e $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de farelo de soja; G – 50 mL de licor (equivalente a 50% de licor), 1 g.L^{-1} de farelo de trigo e $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de farelo de soja; H – 25 mL de licor (equivalente a 25% de licor), 1 g.L^{-1} de farelo de trigo e $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de farelo de soja.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio autoclavados a 1 atm por 15 minutos, e posteriormente inoculados com uma suspensão de 1×10^7 conídios ou 10 mL de pré-inóculo. Os frascos foram mantidos sob agitação recíproca de 180 rpm, a 28°C, por 96 horas, com coletas diárias (Reis *et al.*, 2013).

4.5.3.6 Cultivos em biorreator com agitação mecânica

Os meios de cultivo para os cultivos em biorreator sofreram alterações de acordo com a fração da biomassa utilizada (sólida ou líquida), baseado nos resultados obtidos em frascos agitados. O meio de cultivo para os biorreatores cultivados apenas com a fração sólida foi composto pela biomassa avaliada em uma quantidade equivalente a 10 g.L^{-1} de celulose, e pelos demais componentes obtidos no processo de otimização ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose, $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de farelo de soja, 1 g.L^{-1} de farelo de trigo), além de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de

Prodex[®], 1 mL.L⁻¹ de Tween 80[®], 500 mL da solução mineral adaptada de Mandels & Reese (1957), 500 mL de inóculo e água destilada para completar 5 litros (Reis, 2017). Estes cultivos foram nomeados como M0, onde o inóculo foi crescido em celulose comercial, e M1, onde o inóculo foi crescido na biomassa lignocelulósica.

Para os cultivos em biorreator que foram crescidos utilizando licor, a sacarose foi removida da composição do meio, devido à alta concentração de diferentes açúcares já presentes no mesmo. As demais concentrações permaneceram as mesmas. Todos os cultivos foram inoculados com pré-inóculo crescido em celulose comercial. O cultivo nomeado M2 foi composto com o meio principal, porém com substituição de 50% do volume total por licor proveniente do pré-tratamento, enquanto que no cultivo M3, 25% do volume foi substituído por licor. Já para o cultivo denominado M4, o tratamento da biomassa lignocelulósica foi realizado diretamente no biorreator, e os demais nutrientes e água para completar o volume foram adicionados posteriormente, sem que as etapas de lavagem e secagem de biomassa ocorressem. Todos os cultivos descritos foram conduzidos em regime descontínuo.

Para os cultivos realizados em regime descontínuo alimentado, a concentração equivalente inicial de celulose no meio, proveniente da biomassa lignocelulósica, foi de 5 g.L⁻¹, com os demais componentes mantidos conforme cultivos em regime descontínuo. A concentração final equivalente após a alimentação foi de 20 g.L⁻¹ de celulose. O cultivo M5 foi realizado utilizando apenas a fração sólida da biomassa, enquanto que o cultivo M6 foi realizado com substituição de 25% do volume inicial por licor. A alimentação foi realizada diariamente, de forma manual. Amostras foram retiradas diariamente com um intervalo mínimo de 8 horas e mantidas sob refrigeração (Reis, 2017).

O biorreator utilizado foi construído através de parceria entre a Universidade de Caxias do Sul e o Senai/Mecatrônica, apresentando um volume operacional de 5 L e agitação mecânica. A cuba possui formato cilíndrico, tendo 28 cm de altura e 20 cm de diâmetro, e possui três chicanas distribuídas pelo sistema. A turbina possui forma de “U”, apresentando aletas no corpo e dimensões de 15,3 cm de altura e 12,6 cm de largura (Reis, 2017).

4.5.3.7 Determinação das atividades enzimáticas

A dosagem da atividade total de celulasas foi realizada através da análise de atividade sobre papel filtro (FPA), segundo metodologia proposta por Ghose (1987), com adaptação proposta por Camassola & Dillon (2012). Uma curva padrão foi construída a

partir de concentrações conhecidas de glicose a fim de determinar a atividade sobre o papel filtro, com leitura de absorbância realizada a 545 nm. As unidades de FPA foram definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por minuto.

Atividade de endoglicanases também foi determinada a partir do método de Ghose (1987) com modificações, sendo empregado 1 μL da solução enzimática e 49 μL de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L^{-1} pH 4,8, adicionados a placa de 96 poços, juntamente com 50 μL de solução de carboximetilcelulose 2% (m/v), e mantida sob aquecimento a 50°C por 30 minutos. Posteriormente a reação foi interrompida com a adição de 300 μL do reagente DNS e a mistura foi então submetida a temperatura de 100°C por 5 minutos. A leitura em espectrofotômetro e a determinação da atividade foram realizadas conforme descrito pra FPA, sendo que uma unidade de atividade de endoglicanase será definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por minuto.

A determinação de atividade de exoglicanases foi realizada utilizando *p*-nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (*p*NPC) como substrato, através de metodologia adaptada de Deshpande *et al.* (1984), enquanto que a atividade de β -glicosidases foi determinada através da utilização do substrato *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (*p*NPG) com metodologia adaptada de Daroit *et al.* (2008). As misturas reacionais foram compostas por 10 μL de solução enzimática e 90 μL do substrato, em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L^{-1} , em pH 4,8, e incubada a 50°C por 30 minutos em placa de 96 poços. A reação foi interrompida através da adição de 200 μL de uma solução de Na_2CO_3 100 g.L^{-1} . Foi construída uma curva padrão de *p*NPC, e a leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade de exoglicanase e/ou de β -glicosidases foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de *p*-nitrofenil, ou nitrofenol, respectivamente, por minuto.

A determinação da atividade de xilanases foi realizada de acordo com Bailey *et al.* (1992), usando xilana como substrato. Foram adicionados a uma placa de 96 poços 10 μL de caldo enzimático e 90 μL de solução de xilana 1% (m/v) e mantida a 50°C por 5 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 300 μL de DNS e a placa foi então mantida em banho a 100°C por 5 minutos. A absorbância foi mensurada a 545 nm e a concentração de xilanases determinada através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de xilose. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de xilose por minuto.

4.5.3.8 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada por meio da análise de variância (one-

way ANOVA) e pós-teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$), com auxílio do software GraphPad Prism 5[®]. A análise dos dados para otimização do meio de cultivo através do delineamento composto central rotacional (DCCR) e da metodologia de superfície de resposta foi realizada com o auxílio do software Statistica 10.0[®].

4.5.4 Resultados e discussão

4.5.4.1 Caracterização do resíduo do milho *in natura* e submetido a diferentes pré-tratamentos

A palha de milho é composta por talos (casca e medula), folhas e sabugos, sendo que todas essas frações possuem diferentes estruturas de tecidos, propriedades de fibras e composições químicas (Li et al, 2012). Cerca de 70% da palha de milho é composta por materiais lignocelulósicos, que compreendem celulose, hemicelulose, pectina e lignina (Mihajlovski et al, 2021). Sendo assim, a biomassa utilizada foi caracterizada *in natura* e após os diferentes pré-tratamentos a que foi submetida: hidrotérmico, ácido, básico e em presença de imidazol. Foram avaliados os sólidos, e no caso da biomassa pré-tratada, também foram avaliados os licores provenientes dos diferentes tratamentos, bem como a primeira água de lavagem, a fim de avaliar seu potencial de utilização. A caracterização da parte sólida da biomassa está apresentada na Tabela 1. É possível observar que a soma percentual dos componentes mostrou variações ao esperado (100%) em todas as condições avaliadas. Este fato pode ter ocorrido devido a erros relacionados a pesagem e manuseio da biomassa durante os procedimentos analíticos, bem como a perdas durante os processos de lavagem, que podem carregar pequenas partículas de sólidos.

Tabela 1. Caracterização da biomassa proveniente de resíduos da colheita de milho, *in natura*, e após ser submetida a diferentes pré-tratamentos. Os valores estão apresentados em fração percentual na composição da biomassa lignocelulósica.

	Lignina				Cinzas	Extraíveis	Total
	Celulose	Hemicelulose	Arabinose	Insolúvel			
In natura	47,52	21,09	3,58	23,78	7,94	12,47	116,38
NaOH							
2%	62,74	24,23	3,2	1,22	8,85	-	100,23
H₂SO₄							
1%	56,05	8,36	0,82	26,33	10,79	-	102,35
H₂O	39,91	24,96	4,52	17,67	7,63	-	94,68
Imidazol	46,59	25,56	3,88	3,5	8,38	-	87,91

Os extraíveis incluem todos os materiais vegetais que não fazem parte da estrutura tridimensional da parede celular, podendo ser solúveis em água ou benzeno-etanol (Li et al, 2012). No presente trabalho, cerca de 12% da composição *in natura* da biomassa foi detectada como sendo composta por extraíveis. Quanto aos demais componentes presentes na biomassa anteriormente ao pré-tratamento, (cerca de 47% de celulose, 21% de hemicelulose e 23% de lignina), os valores são muito próximos aos observados por Berchem et al (2017), que verificaram uma variação na presença de glucanos (principais componentes da celulose) entre 33 e 41%, de xilanos (principais componentes da hemicelulose) de 13 a 28% e variação de lignina entre 10 e 15% quando diferentes frações anatômicas de diferentes variedades de milho foram avaliadas (talos, folhas, espigas e cascas).

Diversos relatos na literatura indicam uma grande variação na composição química dos resíduos do milho, dependendo da fração utilizada, cultivar escolhido ou região de plantio. Li et al (2012) observaram que a xilose foi o açúcar predominante na hemicelulose da palha de milho, sendo que o maior teor foi observado na medula do caule, enquanto que a casca do mesmo apresentou o mais baixo. Já Mourtzinis et al (2016) observaram que o conteúdo de carboidratos na biomassa do milho foi altamente variável entre as diferentes porções da planta, enquanto que nos diferentes locais de plantio as distribuições de glucano (41-45%), xilana (22%) e arabinanose (2%) foram semelhantes, sendo próximas as obtidas no presente trabalho. Tais dados sugerem que a fração a ser utilizada pode ser escolhida de acordo com a aplicação desejada, sendo que a utilização dos resíduos como um todo parece apresentar uma composição promissora para a produção enzimática.

Quanto aos dados de pré-tratamento apresentados na Tabela 1, estes demonstram que houve incremento no percentual de celulose em relação a biomassa *in natura* nos tratamentos ácido e básico, enquanto que para o tratamento hidrotérmico houve redução. Já em relação ao percentual de hemicelulose e arabinose, a maior variação em relação a biomassa não tratada foi observada no tratamento ácido. Visto que a celulose e hemicelulose são as frações mais desejáveis da biomassa lignocelulósica, visando seu uso em biorrefinaria (Mourtzinis et al, 2016), os resultados sugerem que seria indicado a utilização dos pré-tratamentos ácido e básico, entretanto o crescimento e produção enzimática também precisam ser avaliados.

As maiores remoções de lignina insolúvel foram observadas nos tratamentos com NaOH e imidazol, porém uma boa remoção também ocorreu no tratamento hidrotérmico. Não foi observada a presença dos compostos HMF e furfural em nenhuma das amostras

analizadas, facilitando assim seu uso no crescimento de microrganismos, uma vez que tais compostos podem ser inibidores para a atividade microbiana. A remoção de compostos fenólicos foi relatada como melhoria para processos fermentativos posteriores, uma vez que os mesmos são conhecidos como potenciais inibidores para produção de celulasas (Bhardwaj et al, 2021). Compostos potencialmente problemáticos incluem furano-aldeídos formados na degradação de açúcares, ácidos orgânicos liberados pela hemicelulose e aldeídos e fenólicos provenientes da lignina (Nichols et al, 2008).

A fim de verificar seu uso potencial no processo, bem como as perdas ocorridas, os licores e a água de lavagem, também tiveram suas composições avaliadas em HPLC, sendo os resultados apresentados na Tabela 2. Foi possível observar que o licor proveniente do tratamento com H_2SO_4 apresentou maior concentração de açúcares que os demais, corroborando a queda no percentual de hemicelulose e arabinose observadas na biomassa sólida. Já o licor proveniente do tratamento com NaOH apresentou alta concentração de ácidos acético e láctico.

Tabela 2. Caracterização dos licores e da água de lavagem da biomassa proveniente dos diferentes pré-tratamentos de resíduos da colheita de milho. Os valores estão apresentados em mg.mL^{-1} .

Licores	Celobiose	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido Láctico	Ácido Acético	Xilitol	Glicerol	Etanol
NaOH 2%	0,33	0,825	0,657	-	2,373	4,563	1,419	0,381	0,312
H_2SO_4 1%	1,501	2,546	18,995	4,331	0,169	3,162	-	0,081	0,075
H_2O	0,219	0,492	0,387	-	0,353	0,909	0,305	0,057	0,228
Imidazol	-	0,801	0,534	0,084	0,108	1,515	0,117	0,057	0,201
H_2O lavagem									
NaOH 2%	0,088	0,088	0,36	-	2,02	4,276	1,044	0,328	0,264
H_2SO_4 1%	0,308	0,516	3,744	0,807	0,058	0,658	-	0,026	-
H_2O	0,022	0,111	0,088	-	0,147	0,339	0,06	0,037	-

As quantidades de açúcares presentes nos licores sugerem que os mesmos poderiam ser utilizados de maneira a suplementar o meio de cultivo para produção enzimática, desde que os ajustes de nutrientes e pH necessários sejam feitos.

4.5.4.2 Efeito dos diferentes pré-tratamentos na produção de celulases e xilanases em cultivos submersos em frascos agitados

Após a caracterização das biomassas, foram realizados cultivos em frascos agitados, com a concentração de celulose no meio ajustada para 10 g.L^{-1} de acordo com o percentual presente na biomassa após cada tratamento. Foram avaliadas as biomassas secas e úmidas, onde o percentual de umidade também foi considerado para o cálculo da massa de resíduos de milho utilizada. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos para a produção de diferentes enzimas avaliadas, utilizando resíduos de milho *in natura* e pré-tratados em diferentes métodos, secos e úmidos, como principal fonte de carbono. Os cultivos foram realizados em frascos agitados, contendo 100 mL de meio, mantidos sob agitação recíproca, a 28°C por 96h.

	FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	β -glicosidases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
<i>In natura</i> seco	$0,13 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,11$	$0,33 \pm 0,29$	$0,25 \pm 0,19$	$19,7 \pm 2,3$
NaOH seco	$0,23 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,10$	$0,49 \pm 0,23$	$0,54 \pm 0,07$	$16,5 \pm 2,4$
NaOH úmido	$0,23 \pm 0,04$	$0,63 \pm 0,04$	$0,81 \pm 0,03$	$0,77 \pm 0,03$	$17,2 \pm 4,6$
H ₂ SO ₄ seco	$0,07 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,03$	$0,17 \pm 0,05$	$10,1 \pm 1,2$
H ₂ SO ₄ úmido	$0,04 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,02$	$8,3 \pm 0,8$
H ₂ O seco	$0,14 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,24$	$0,38 \pm 0,09$	$25,6 \pm 1,9$
H ₂ O úmido	$0,22 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,15$	$0,37 \pm 0,03$	$22,6 \pm 1,1$
Imidazol seco	$0,02 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,09$	$0,37 \pm 0,03$	$11,5 \pm 1,2$
Imidazol úmido	-	$0,24 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,07$	$0,19 \pm 0,04$	$8,3 \pm 0,4$

Os resultados demonstraram que, para FPA, endoglicanases e xilanases, a biomassa submetida a pré-tratamento com NaOH e hidrotérmico, resultou em atividades superiores, a despeito do fato de que o tratamento com ácido apresentou uma maior recuperação de celulose. Já para β -glicosidases e exoglicanases, o tratamento com imidazol também se mostrou eficiente. Estes resultados de atividades enzimáticas podem ser considerados consequência dos pré-tratamentos utilizados, pois sabe-se que processos de pré-tratamento da biomassa tendem a aumentar a produção enzimática, uma vez que modifica a estrutura do complexo lignocelulósico, aumentando a acessibilidade da celulose para o ataque enzimático microbiano (Bhardwaj et al, 2021). Entretanto, o pré-tratamento ácido apresentou os piores resultados em atividades enzimáticas, inclusive inferiores a utilização da biomassa *in natura*. Uma vez que não foram detectados HMF e furfural na análise da biomassa pré-tratada, acredita-se que os resultados sejam devido a maneira que o pré-tratamento modificou a estrutura da biomassa, visto que diminuiu o conteúdo de hemicelulose,

podendo ter tornado a celulose mais recalcitrante.

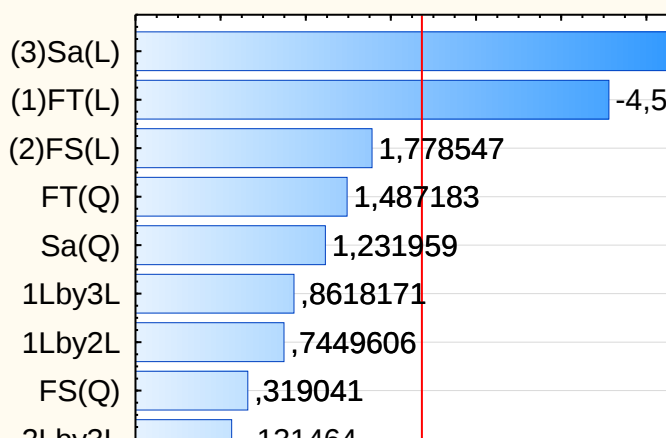
Embora o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica possibilita a esta torna-se mais porosa e mais facilmente acessível, tanto para o crescimento fúngico quanto para a hidrólise, Legodi et al (2023) também não observaram incremento na atividade em todo o complexo enzimático produzido por espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus*, quando crescidos em biomassa proveniente de bananeiras, posteriormente ao seu pré-tratamento. Entretanto, o mesmo auxiliou a atividade de enzimas específicas, principalmente β -glicosidases.

Já resultados observados por Brijwani & Vadlani (2011) diferem dos obtidos no presente trabalho. Os autores reportaram redução na atividade enzimática de *A. oryzae* e *T. reesei* quando crescidos em casca de soja submetida a pré-tratamento alcalino, em relação ao seu crescimento na biomassa pré-tratada em ácido e vapor. Por outro lado, Sarkar & Aikat (2012) observaram que a utilização de pré-tratamento alcalino (2% NaOH) em palha de arroz resultou em incremento na produção de celulasas e endoglicanases por *A. fumigatus*, corroborando os resultados do presente estudo. Diante dos resultados, apesar da maior porcentagem de celulose obtida nos pré-tratamentos utilizando H_2SO_4 e NaOH, o pré-tratamento hidrotérmico foi mantido, uma vez que minimiza o uso de químicos, facilitando o processo, em relação ao tratamento alcalino, e apresenta melhores resultados em produção enzimática em relação ao tratamento ácido. Entretanto, apesar de seu uso úmido apresentar melhores resultados, devido as dificuldades de armazenamento em grande escala deste material, a biomassa seca foi mantida para a continuidade do estudo.

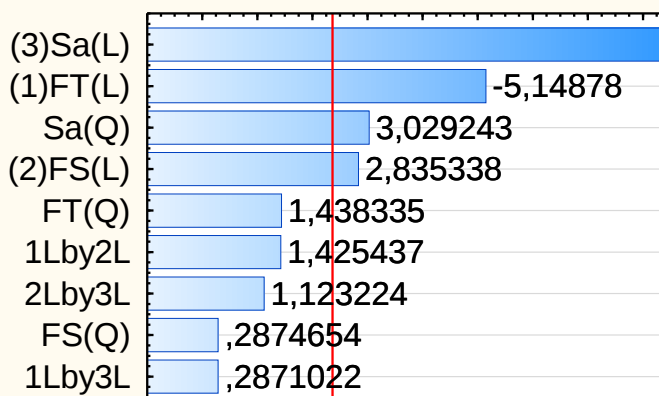
4.5.4.3 Otimização do meio de cultivo

Definido o pré-tratamento, o próximo passo foi a otimização do meio de cultivo. Uma vez que não é possível aumentar a concentração de celulose, devido ao volume ocupado pela biomassa, foram otimizados os principais aditivos que compõem o meio: sacarose, farelo de trigo e farelo de soja. Os efeitos positivos e negativos originados pelos diferentes componentes podem ser observados nos gráficos de pareto, apresentados na Figura 1, com significância $p=0,05$. Sacarose apresentou significância negativa para todas as enzimas avaliadas, enquanto que o farelo de trigo apresentou variações positivas e negativas.

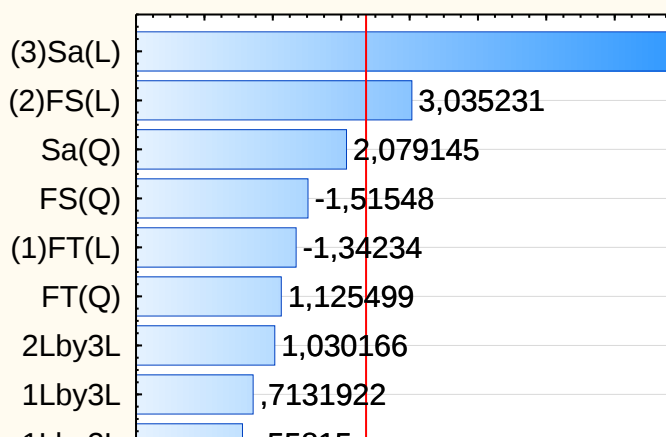
Pareto Chart of Standardized Effects; Variabl
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=,0
DV: FPA



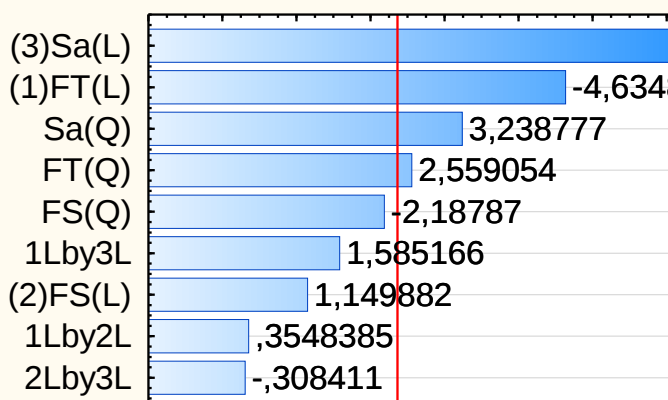
Pareto Chart of Standardized Effects; Variat
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=,
DV: Endo



Pareto Chart of Standardized Effects; Variabl
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=,0
DV: Beta



Pareto Chart of Standardized Effects; Varia
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=
DV: Exo



Pareto Chart of Standardized Effects; Variat
3 factors, 1 Blocks, 17 Runs; MS Residual=,
DV: Xil

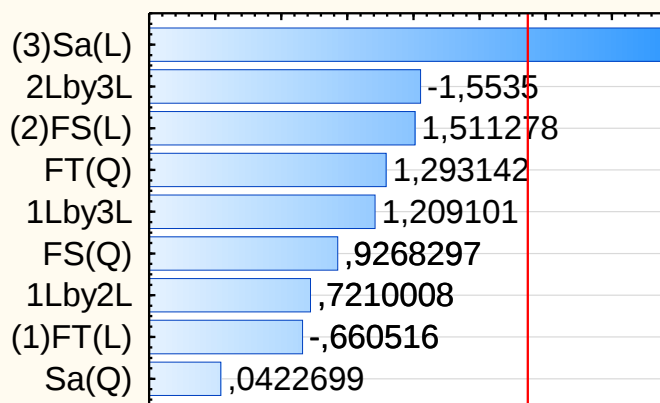


Figura 1. Gráficos de pareto para o efeito dos indutores sacarose (As), farelo de trigo (FT) e farelo de soja (FS) na produção de enzimas celulolíticas por *P. ucsense* cultivado em resíduos de milho em estado submerso.

Considerando-se que diferentes concentrações ótimas foram encontradas para cada enzima avaliada, ajustes arbitrários precisaram ser feitos para abranger uma boa produção para todas as enzimas. A concentração ótima de farelo de soja foi a que apresentou menores variações entre as diferentes enzimas, variando entre 7 e 8 g.L⁻¹, sendo então a concentração 7,5 g.L⁻¹ a concentração utilizada para plotar os gráficos de superfície de resposta. Essa ação foi tomada a fim de encontrar concentrações satisfatórias para os demais componentes que permitissem boas atividades enzimáticas no geral. Os gráficos de superfície de resposta plotados considerando-se esta concentração estão apresentados na Figura 2.

As concentrações escolhidas foram de 0,5 g.L⁻¹ de sacarose e 1 g.L⁻¹ de farelo de trigo, com atividades preditas de 0,12 U.mL⁻¹ para FPA, 0,67 U.mL⁻¹ para endoglicanases, 0,57 U.mL⁻¹ para β -glicosidases, 0,32 U.mL⁻¹ para exoglicanases e 16 U.mL⁻¹ para xilanases. Esses resultados são inferiores aos obtidos para um meio otimizado composto por 5% de palha de milho em cultivo de *Hymenobacter* sp. CKS3, que atingiu atividades de 1,11 U.mL⁻¹ de endoglicanases e 0,92 U.mL⁻¹ de avicelases (Mihajlovski et al, 2021). Entretanto, considerando-se que a estratégia utilizada foi para obter o melhor meio para todas as enzimas, as concentrações foram aplicadas nos demais testes realizados.

Além disso, os valores preditos são próximos aos observados para o meio sem a otimização, demonstrando que o mesmo já apresentava um bom balanceamento de nutrientes para a produção de todo o complexo enzimático. Quando comparados aos resultados anteriormente obtidos no presente estudo (Capítulo 2), para bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante, os dados são ainda mais relevantes. As atividades alcançadas em bagaço (0,07 U.mL⁻¹ para FPA, 12 U.mL⁻¹ para xilanases, 0,5 U.mL⁻¹ para endoglicanases e β -glicosidases e 0,3 U.mL⁻¹ para exoglicanases) foram inferiores ou próximas as preditas para os resíduos do milho, demonstrando a capacidade dessa biomassa. Já quando comparados aos resultados obtidos para capim elefante (Capítulo 2) (FPA - 0,3 U.mL⁻¹; endoglicanases - 0,8 U.mL⁻¹; exoglicanases - 0,6 U.mL⁻¹; xilanases 15 U.mL⁻¹; β -glicosidases - 0,5 U.mL⁻¹), os resultados do resíduo de milho são levemente inferiores para algumas das enzimas avaliadas, permanecendo porém, no mesmo nível de atividade para as demais.

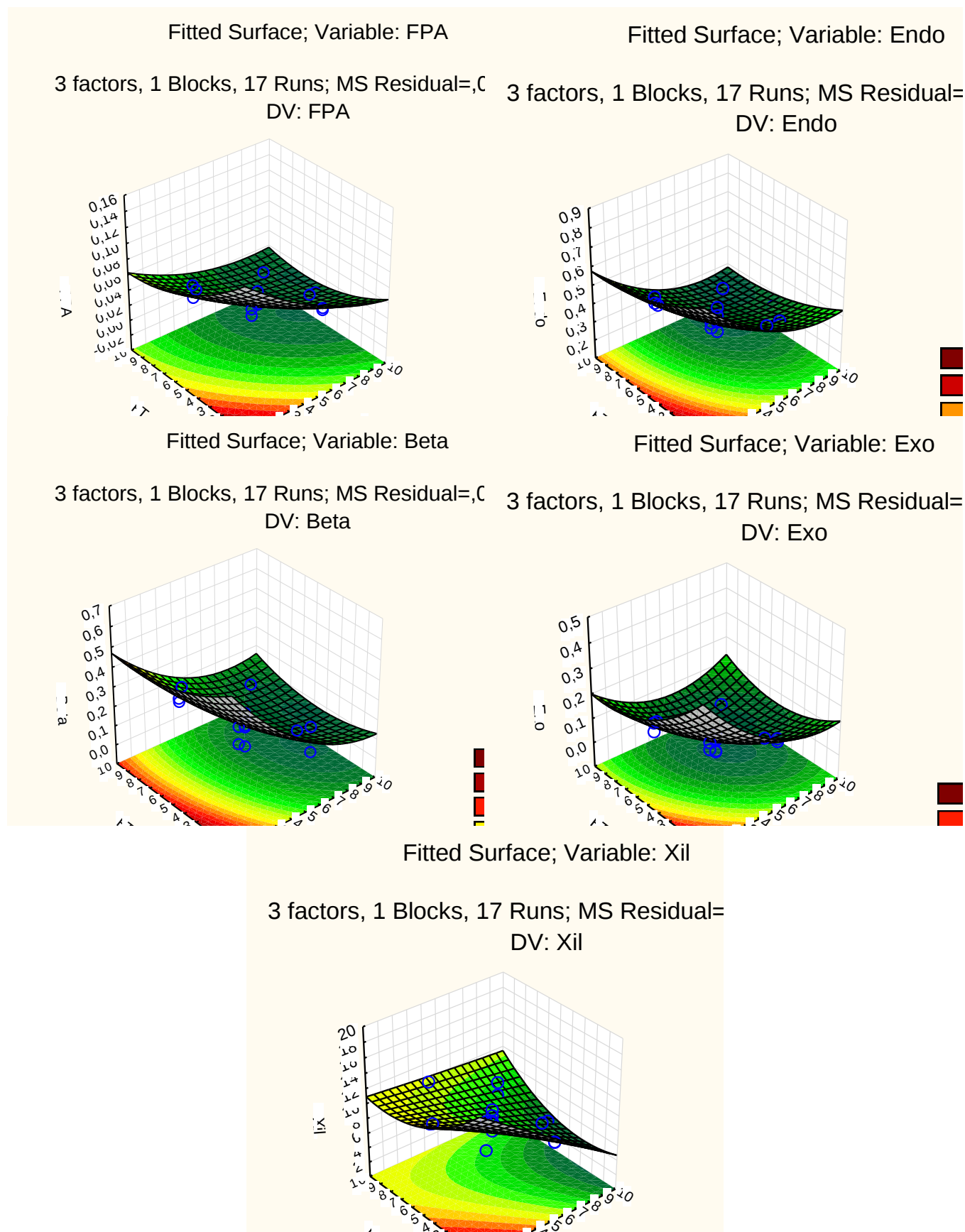


Figura 2. Gráficos de superfície de resposta para as diferentes enzimas celulolíticas produzidas por *P. ucsense* S1M29, em regime submerso, utilizando resíduos da colheita do milho como principal fonte de carbono e considerando o uso de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de farelo de soja.

4.5.4.4 Avaliação da produção de celulasas e xilanases utilizando o licor proveniente do pré-tratamento

Com as concentrações de aditivos estabelecidas, o próximo passo foi verificar a possibilidade da utilização do licor proveniente do pré-tratamento, evitando assim seu descarte, bem como da possibilidade de realizar o pré-tratamento e imediatamente iniciar o cultivo, sem que houvesse a necessidade de separação, lavagem e secagem da biomassa, uma vez que compostos mais nocivos ao crescimento de microrganismos, como HMF e furfural, não foram detectados. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Atividades enzimáticas obtidas nas diferentes condições de cultivo avaliadas, utilizando licor proveniente do pré-tratamento, ou o pré-tratamento na íntegra. Os cultivos foram realizados em frascos agitados, contendo 100 mL de meio, mantidos sob agitação recíproca, a 28°C por 96h.

Condição	FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	β-glicosidases (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
A	0,14 ± 0,03	0,61 ± 0,07	0,30 ± 0,06	0,24 ± 0,01	24,4 ± 1,91
B	0,15 ± 0,02	0,62 ± 0,06	0,35 ± 0,04	0,34 ± 0,03	24,3 ± 1,33
C	0,13 ± 0,03	0,47 ± 0,13	0,28 ± 0,04	0,28 ± 0,03	20,1 ± 1,74
D	0,12 ± 0,03	0,58 ± 0,02	0,27 ± 0,01	0,38 ± 0,04	23,7 ± 3,26
E	0,03 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,23 ± 0,07	0,68 ± 0,08	5,6 ± 0,25
F	0,08 ± 0,02	0,40 ± 0,07	0,25 ± 0,06	0,52 ± 0,02	8,5 ± 0,43
G	0,10 ± 0,03	0,40 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,40 ± 0,03	8,8 ± 0,83
H	0,10 ± 0,02	0,45 ± 0,08	0,28 ± 0,06	0,36 ± 0,01	11,7 ± 0,95

Nota: A – utilização do pré-tratamento na íntegra, com concentração equivalente de 10 g.L⁻¹ de celulose na biomassa *in natura*; B – utilização do pré-tratamento na íntegra, com concentração equivalente de 10 g.L⁻¹ de celulose na biomassa *in natura*, 1 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 7,5 g.L⁻¹ de farelo de soja; C – utilização do pré-tratamento na íntegra; D – utilização do pré-tratamento na íntegra, 1 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 7,5 g.L⁻¹ de farelo de soja; E – 100 mL de licor; F – 100 mL de licor, 1 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 7,5 g.L⁻¹ de farelo de soja; G – 50 mL de licor (equivalente a 50% de licor), 1 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 7,5 g.L⁻¹ de farelo de soja; H – 25 mL de licor (equivalente a 25% de licor), 1 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 7,5 g.L⁻¹ de farelo de soja.

Para FPA, apenas a condição E (com 100% da água substituída por licor) apresentou diferença significativa em relação as demais condições, com atividade enzimática inferior, sendo as maiores atividades observadas nas condições com pré-tratamento utilizado na íntegra, com cerca de 0,15 U.mL⁻¹ de atividade. Já para endoglicanases, diferença foi observada para as condições E, F e G, todas caracterizadas por alta concentração de licor no meio, sendo novamente a condição E a com menor atividade enzimática observada. As maiores atividades para endoglicanases também foram obtidas utilizando-se todo o pré-tratamento, com cerca de 0,62 U.mL⁻¹. Para xilanases, a

presença de licor, em qualquer quantidade, apresentou queda significativa na atividade enzimática, sendo as atividades maiores obtidas de 24 U.mL⁻¹.

Uma das hipóteses para a não interferência do licor presente no pré-tratamento utilizado na integra, em relação ao licor adicionado ao meio de cultivo, é que o mesmo se encontra em menor percentual no meio, nestes casos. Apenas cerca de 21% do líquido contido do meio seria proveniente do licor, percentual inferior aos avaliados nas demais condições. Este fato se mostra interessante pois a produção *on site* de enzimas, sem que haja necessidade de diversas etapas de preparação, pode vir a reduzir seu custo entre 30-70% (Legodi et al; 2023).

Quanto aos resultados obtidos, os mesmos são inferiores ao observados por Vieira et al (2021), que obtiveram atividade enzimática de 2,24 U.mL⁻¹ de FPA e 6,14 U.mL⁻¹ de endoglicanases quando *A. pullulans* foi crescido em sabugo de milho. *P. funiculosum* e *Cladosporium cladosporioides* foram crescidos em meio mineral suplementado com diversas biomassas lignocelulósicas, em cultivo sólido e submerso. As máximas atividades de FPA e endoglicanases para *C. Cladosporioides* foram observadas para os meios suplementados com palha de milho, em ambos os processos, sendo as atividades alcançadas em cultivo submerso, respectivamente, de 0,22 U.mL⁻¹ e 1,6 U.mL⁻¹. Essa biomassa também apresentou os melhores resultados para *P. Funiculosum*, com atividade de 1,5 U.mL⁻¹ de endoglicanases e 0,39 U.mL⁻¹ de FPA (Castro-Ochoa et al, 2023). Novamente, os resultados se mostram superiores ao do presente estudo, mas demonstram o potencial para o emprego desta biomassa para a produção do complexo celulolítico.

Para β -glicosidases e exoglicanases, a presença de altas concentrações de licor não interferiu ou, pelo contrário, aumentou a atividade enzimática, sendo a condição E a com maior atividade de β -glicosidases, com 0,68 U.mL⁻¹. Este resultado foi superior ao observado par o cultivo de *P. funiculosum* e *C. Cladosporioides*, que apresentaram atividade máxima de β -glicosidases de 0,13 e 0,10 U.mL⁻¹, respectivamente, no cultivo submerso suplementado com palha de milho (Castro-Ochoa et al, 2023).

Para dar prosseguimento aos testes em biorreator com agitação mecânica, a condição B (contendo os aditivos em suas concentrações definidas) foi mantida para o estudo da utilização do pré-tratamento integral, enquanto que para o estudo com licores, as condições G e H (com 50% e 25% de licor, mais os aditivos) foram selecionadas, devido ao melhor desempenho em relação a β -glicosidases, apresentando menores perdas em relação a FPA e endoglicanases.

4.5.4.5 Produção de celulases e xilanases em STR em regime descontínuo e descontínuo alimentado

Como forma de validar os resultados obtidos em frascos agitados, cultivos em biorreator com agitação mecânica foram realizados. Primeiramente foram realizados ensaios em regime descontínuo, onde foram avaliados a utilização do meio padrão com apenas a parte sólida da biomassa, e a utilização de licor e/ou do pré-tratamento na íntegra, realizado diretamente no biorreator. Também foi avaliada a utilização de um pré-inóculo crescido na biomassa lignocelulósica, em substituição a celulose comercial, a fim de verificar se o mesmo se adaptaria mais rapidamente ao meio principal, resultando em maiores atividades enzimáticas.

Os dados obtidos para as diferentes enzimas avaliadas estão apresentados na Figura 3. Pode-se observar que para FPA e endoglicanases, em regime descontínuo, a condição M1 (onde apenas a parte sólida da biomassa lignocelulósica foi utilizada e o pré-inóculo foi crescido na mesma biomassa) apresentou as maiores atividades enzimáticas, chegando a 1,5 U.mL⁻¹ e 10,2 U.mL⁻¹, respectivamente. Já para as enzimas β -glicosidases e exoglicanases, as maiores atividades foram obtidas em M3 (onde 25% do volume líquido foi composto por licor), com 7,8 U.mL⁻¹ e 6,3 U.mL⁻¹, respectivamente. Xilanases apresentaram sua maior atividade alcançada também no cultivo M1, com 22 U.mL⁻¹, resultado próximo ao alcançado no cultivo M0 (19 U.mL⁻¹) e superior ao alcançado nos demais meios avaliados para o regime descontínuo, demonstrando que a presença de licor afeta negativamente esta enzima.

Os dados obtidos corroboram em sua maioria os observados para frascos agitados, onde a presença de licor também apresentou interferência negativa para xilanases e endoglicanases, e positiva para β -glicosidases e exoglicanases. Já o uso do pré-tratamento na íntegra (M4), realizado diretamente no biorreator, apresentou resultados intermediários para a maioria das enzimas, com atividades mais elevadas para endoglicanases (8,4 U.mL⁻¹), β -glicosidases (6,7 U.mL⁻¹) e xilanases (14 U.mL⁻¹). Apesar dos resultados inferiores às condições M1 e M3, a estratégia ainda poderia ser usada para a produção das enzimas em escala industrial, onde a necessidade de rapidez no processo e a falta de possibilidade de secagem e armazenamento da biomassa possam existir.

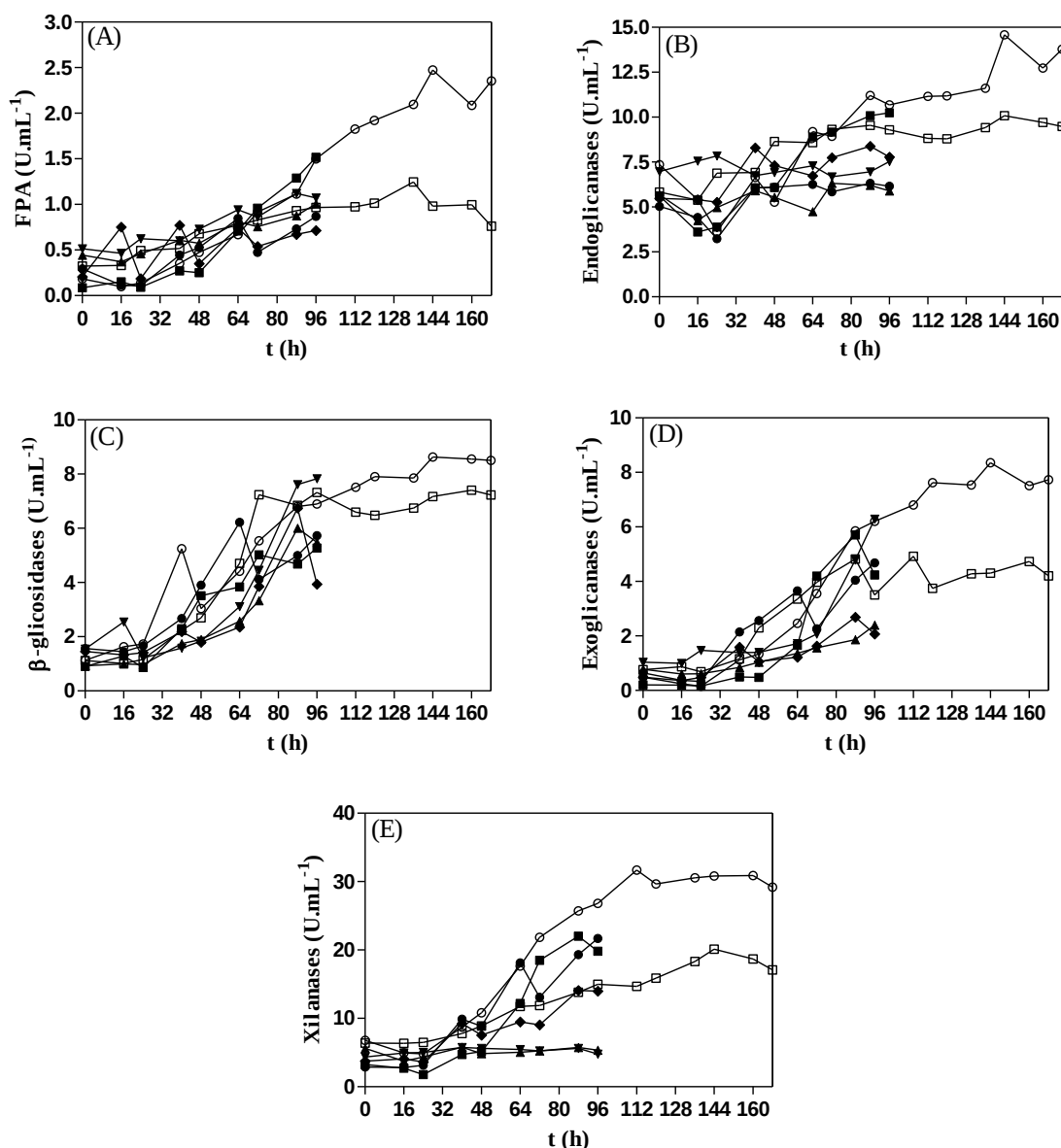


Figura 3. Atividades enzimáticas observadas em cultivo com resíduos da colheita do milho, em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo e descontínuo alimentado. Atividades de FPA (A), Endoglucanases (B), β -glicosidases (C), Exoglucanases (D) e Xilanases (E). M0 (RD meio padrão) ($\bullet$); M1 (RD meio padrão, inóculo crescido em resíduos do milho) ($\blacksquare$); M2 (RD meio padrão, com substituição de 50% do volume líquido por licor do pré-tratamento) ($\blacktriangle$); M3 (RD meio padrão, com substituição de 25% do volume líquido por licor do pré-tratamento) ($\blacktriangledown$); M4 (RD pré-tratamento da biomassa lignocelulósica realizado diretamente no biorreator e utilizado na íntegra) ($\blacklozenge$); M5 (RDA meio padrão) ($\circ$); M6 (RDA meio padrão com substituição de 25% do volume líquido por licor do pré-tratamento) ($\square$). Os cultivos foram mantidos a 28°C, por 96 ou 168 horas, com pH controlado em 6,0.

Um fato importante a ser ressaltado é que as atividades alcançadas para o regime descontínuo, utilizando resíduos de milho como principal fonte de carbono foram superiores aos obtidos neste mesmo estudo, utilizando a mesma linhagem de *P. Ucsense*,

porém utilizando bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante e polpa de eucalipto e pinus como substratos. Para FPA ($1,5 \text{ U.mL}^{-1}$ neste trabalho), as maiores atividades alcançadas haviam sido de 1 U.mL^{-1} , $0,62 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,3 \text{ U.mL}^{-1}$ respectivamente (Capítulo 2), sendo portanto 1,5 vezes superior a maior atividade anteriormente alcançada. Entretanto as unidades enzimáticas obtidas foram inferiores aos resultados para FPA obtidos por Reis *et al.* (2013) utilizando o mesmo microrganismo em concentrações de 20, 40 e 60 g.L^{-1} de celulose comercial, que atingiram atividades variando entre 2 e 4 U.mL^{-1} de FPA.

Quanto a endoglicanases, aumento semelhante (cerca de 1,6 vezes) em relação as demais biomassas também foi observado, considerando-se que a maior atividade alcançada havia sido para bagaço de cana-de-açúcar, com $6,2 \text{ U.mL}^{-1}$. Já para exoglicanases, cuja maior atividade havia sido também em bagaço de cana-de-açúcar ($1,5 \text{ U.mL}^{-1}$) o aumento foi de 4,2 vezes, quando cultivado em resíduos de milho, e para β -glicosidases ($0,7 \text{ U.mL}^{-1}$), de 11 vezes (Capítulo 2). Entretanto, a atividade de endoglicanases alcançada ainda é inferior a obtida por Reis *et al.* (2013) utilizando a mesma linhagem e celulose comercial como substrato (20 U.mL^{-1}), mas é superior a atividade de β -glicosidases alcançada pelos autores, de 2 U.mL^{-1} . Para xilanases, entretanto, os resíduos de colheita do milho não se mostraram eficientes indutores, uma vez que todas as demais biomassas anteriormente avaliadas (Capítulo 2) apresentaram atividades superiores a atual.

No regime descontínuo alimentado (Figura 3), a condição M5 (composta apenas pela fração sólida da biomassa e alimentada com biomassa) se mostrou superior a condição M6 (com 25% de licor no meio e alimentada com biomassa). Entretanto, o ganho em relação ao regime descontínuo não foi tão elevado, alcançando atividades enzimáticas de: FPA $1,68 \text{ U.mL}^{-1}$ (11% superior ao RD), endoglicanases $13,7 \text{ U.mL}^{-1}$ (34% superior), β -glicosidases $8,5 \text{ U.mL}^{-1}$ (9% superior), exoglicanase $7,7 \text{ U.mL}^{-1}$ (22% superior) e xilanases 29 U.mL^{-1} (32% superior). Estes dados diferem dos obtidos para as outras biomassas estudadas para esta mesma linhagem (Capítulo 2), onde o uso do regime descontínuo alimentado incrementou em elevados percentuais a atividade enzimática. Uma das causas que pode explicar esse comportamento é que apenas 50% da concentração equivalente de celulose foi alimentada no presente estudo, em relação aos estudos com as demais biomassas. Isso ocorreu devido a estrutura fibrosa da biomassa proveniente dos resíduos do milho, que não permitiu a adição de maiores volumes da mesma no cultivo líquido.

Devido a isso, os resultados obtidos em regime descontínuo alimentado foram inferiores ou próximos as demais biomassas avaliadas anteriormente, para *P. ucsense*. Para FPA as maiores atividades alcançadas haviam sido de $2,2 \text{ U.mL}^{-1}$ para bagaço de cana-de-

açúcar e $1,1 \text{ U.mL}^{-1}$ para capim elefante (Capítulo 2).

Para endoglicanases, β -glicosidases e exoglicanases, cujas maiores atividades alcançadas haviam sido com bagaço de cana-de-açúcar ($6,8 \text{ U.mL}^{-1}$, 3 U.mL^{-1} e 3 U.mL^{-1} , respectivamente), entretanto, as atividades alcançadas utilizando os resíduos de milho se mostraram bastante superiores, mesmo em regime descontínuo alimentado (Capítulo 2). A atividade de β -glicosidases alcançada no presente estudo também foi superior a observada por Li *et al.* (2013), em cultivo de *T. reesei* em meio contendo concentração de 80 g.L^{-1} de celulose, com atividade de $4,5 \text{ U.mL}^{-1}$.

Os dados obtidos podem ser explicados pelo fato de que a variação da atividade enzimática entre diferentes fungos, bem como na mesma linhagem, depende fortemente de diversos fatores. Vários parâmetros físicos, tais como a fonte de carbono, pH, temperatura, tempo de crescimento do inóculo e seu tamanho influenciam na atividade celulolítica das diferentes espécies de fungos Vieira et al (2021). Em vista disso, pode se afirmar pelos dados apresentados no presente estudo, que a linhagem S1M29 de *P. ucsense* pode ser empregada na produção das enzimas celulolíticas endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases, em meios formulados com resíduos da colheita do milho.

4.5.5 Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a utilização de resíduos provenientes da colheita de milho para a produção de celulasas por *P. ucsense* em processo submerso é uma alternativa viável e promissora, sendo necessários maiores estudos em relação ao processo, buscando sua otimização e melhoria na produção do grupo enzimático das xilanases. Além disso, o estudo demonstra a possibilidade da produção enzimática *on site*, uma vez que a utilização dos resíduos do pré-tratamento na íntegra não afetaram a produção das enzimas desejadas. Diante disto, o presente trabalho colabora para o desenvolvimento de um processo com menores custos de produção para as enzimas, tornando menos onerosa sua utilização em biorrefinaria.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DE CELULASES E XILANASES PRODUZIDAS POR *Penicillium ucsense* S1M29 EM PROCESSO SUBMERSO UTILIZANDO RESÍDUOS DA COLHEITA DE MILHO

4.6.1 Resumo

No presente trabalho, a estabilidade, atividade ótima e capacidade de hidrólise de extratos enzimáticos brutos de *P. ucsense* produzidos utilizando resíduos da colheita do milho foram avaliadas. Também foi avaliado se diferenças no processo de produção - regime descontínuo (RD) e descontínuo alimentado (RDA) - e com a utilização de licor proveniente do pré-tratamento (RDL), haveria a produção de diferentes isoformas enzimáticas. Entretanto, o uso de RD ou RDA, bem como a adição de licor, não resultou na produção de diferentes isoformas, afetando apenas a concentração enzimática. Quanto a atividade ótima, foram avaliadas temperaturas variando entre 40°C e 70°C, e pH entre 4 e 6, para FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases, sendo considerada a atividade de 100% em pH 4,8 e 50°C, condições padrão de avaliação dessas enzimas. Dentre as enzimas produzidas com os resíduos da colheita de milho, as maiores atividades relativas de FPA, β -glicosidases e exoglicanases foram observadas para enzimas produzidas em RD, sendo em 65°C para FPA e 60 °C para β -glicosidases e exoglicanases, e pH 4 para todas as enzimas. Já para endoglicanases, as maiores atividades foram em 65°C e pH 5, ambas para enzimas produzidas em RDL. Atividades superiores de xilanases foram observadas em 65°C para enzimas produzidas em RDL e pH 5,5 para enzimas produzidas em RDA. Em relação à termoestabilidade e estabilidade em diferentes valores de pH, as mesmas faixas de temperaturas e pH foram avaliadas por 72h. Para FPA, maior estabilidade foi observada na faixa de pH entre 4 e 5,5 para as enzimas produzidas nas três condições, com destaque para RDL, enquanto que a faixa de temperatura com maior estabilidade foi entre 40 e 60 °C, com destaque para RDA. Endoglicanases se mostraram estáveis em todos os pH avaliados e em temperaturas variando até 60°C, enquanto que β -glicosidases foram mais estáveis em pH entre 4 e 5,5 e temperaturas até 65°C. Exoglicanases foram mais estáveis em pH variando entre 4 e 5, e em temperaturas até 55°C. Somente xilanases produzidas em RDL apresentaram certa estabilidade a variação de pH, sendo esta estabilidade mantida em toda a faixa avaliada, o mesmo ocorrendo para sua termoestabilidade. Quanto a hidrólise, as enzimas mostraram grande capacidade de hidrólise de resíduos de milho *in natura*, e com pré-tratamento ácido e hidrotérmico, e de polpa de eucalipto/pinus. Os resultados demonstram que a utilização de resíduos da colheita de milho na produção de coquetéis

enzimáticos por *P. ucsense* resulta em enzimas com características desejáveis para uma possível aplicação comercial destes coquetéis.

Palavras-chave: celulases, atividade, estabilidade, resíduos do milho, *P. echinulatum*

4.6.2 Introdução

O contínuo aumento da industrialização mundial tem feito com que pesquisadores encontrem formas econômicas de atender à crescente demanda energética e de químicos gerada por essas indústrias, podendo citar entre elas a automobilística, têxtil, detergentes, papel e celulose, ração animal, processamento de alimentos, vinificação e gerenciamento de resíduos (Bhardwaj et al, 2021). Uma das alternativas para produção de combustíveis é o uso de biomassas lignocelulósicas e resíduos agroindustriais. Biomassas lignocelulósicas são produzidas anualmente em grandes quantidades, sendo o recurso orgânico mais abundante e de baixo custo da natureza, além de serem renováveis e o principal substrato de baixo custo em processos fermentativos (Maleki et al, 2020; Vieira et al, 2021). As biomassas lignocelulósicas são formadas principalmente por três biopolímeros: lignina, celulose e hemicelulose. A celulose é o principal componente estrutural da lignocelulose, sendo formada por unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas, enquanto que a hemicelulose, composta principalmente por xilana, é o segundo principal componente polimérico das paredes celulares das plantas, atuando como barreira para a hidrólise enzimática (Li et al. 2020; Maleki et al. 2020). Já a lignina é um polímero aromático altamente ramificado e composto basicamente por três compostos fenólicos: cumaril, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Zabed et al., 2016). Entretanto, o principal desafio relacionado à produção de bioquímicos e biocombustíveis renováveis é a conversão econômica desses materiais lignocelulósicos em açúcares, com rendimento adequado (Vieira et al, 2021).

No contexto dessas biomassas, o potencial das enzimas celulolíticas tem sido amplamente estudado e explorado para processos de bioconversão e desempenha um papel fundamental em diversas aplicações industriais (Bhardwaj et al, 2021). Essas enzimas são indispensáveis para a manutenção do ciclo global do carbono, uma vez que catalisam a degradação da celulose, e, portanto, desempenham um papel vital na resolução dos problemas de gerenciamento de resíduos e energia da humanidade (Verma et al, 2021). A degradação eficiente dos polissacarídeos encontrados na lignocelulose requer várias enzimas trabalhando em sinergia, sendo, portanto, necessário melhorar os coquetéis enzimáticos para obter um bom desempenho a longo prazo, em temperaturas elevadas e

amplas faixas de pH, bem como com boa capacidade de hidrólise (Maleki et al, 2020). A variedade de enzimas produzidas varia de acordo com os diferentes materiais lignocelulósicos utilizados para o crescimento fúngico (Almeida et al., 2019). Trabalhos relataram que os secretomas de *P. echinulatum*, *Trichoderma harzianum* e *Neurospora crassa* variam de acordo com a fonte de carbono utilizada, sendo, portanto, hipoteticamente possível modular o coquetel enzimático ajustando a composição do meio (Costa et al., 2016). Assim sendo, selecionar uma biomassa/substrato adequado é fundamental para aumentar o potencial de sacarificação do coquetel enzimático, levando a produção de enzimas que levam a uma melhor hidrólise da celulose (Bhardwaj et al, 2021). Como uma espécie de resíduo agrícola abundante e renovável, a palha de milho (*Zea mays* L.) poderá ser uma fonte sustentável e de baixo custo de energia e produtos químicos no futuro, sendo que para ampliar sua utilização como fonte de fibra, biocombustível e produtos bioquímicos, uma compreensão mais abrangente de suas características químicas é necessária (Li et al, 2012).

A hidrólise enzimática é considerada um processo ambientalmente benigno, uma vez que a reação é realizada em condições amenas e não gera compostos tóxicos, e os hidrolisados podem ser facilmente utilizados no processo de fermentação ou conversão química em combustíveis e produtos químicos (Vieira et al, 2021). As etapas mais críticas da bioconversão de lignocelulose são diminuir as quantidades de carga requeridas de enzimas, aumentar o rendimento da hidrólise e omitir ou diminuir o pré-tratamento (Maleki et al, 2020). Celulases são enzimas chave para a biorrefinaria baseada em matéria-prima de resíduos lignocelulósicos, tendo demanda crescente em vários setores (Bhardwaj et al, 2021). Os custos e a eficiência de conversão associados às preparações de celulases foram identificados como fatores que impedem o desenvolvimento de tecnologias baseadas na hidrólise da celulose, além de que a suplementação de enzimas para coquetéis fúngicos tem sido também praticada (Mule et al. 2022). As celulases comerciais disponíveis atualmente apresentam baixos níveis de β -glicosidases, enzimas responsáveis por hidrolisar a celobiose em glicose (Ganesan et al, 2020). Celulases produzidas por fungos do gênero *Penicillium* tem demonstrado eficiências maiores na sacarificação, quando comparadas as do gênero *Trichoderma*, sendo necessárias menores concentrações e diminuindo os custos, devido a maior concentração de β -glicosidases (Vaishnav et al, 2018). As celulases produzidas por *P. echinulatum* apresentam boa estabilidade térmica, sendo este um fator importante para a sacarificação da celulose (Camassola et al., 2004). Diante do exposto, foram conduzidos no presente trabalho estudos com extratos enzimáticos produzidos por este microrganismo

(agora classificado como *P. ucsense* - Lenz et al., 2022) utilizando resíduos da colheita de milho para a sua produção, buscando avaliar as isoformas produzidas, sua atividade e estabilidade em diferentes temperaturas e pH, e sua capacidade de hidrólise, informações relevantes com o intuito de auxiliar no desenvolvimento de processos que possam vir a ser aplicados na indústria.

4.6.3 Materiais e métodos

4.6.3.1 Produção dos extratos enzimáticos

A produção dos extratos enzimáticos foi realizada através do microrganismo *Penicillium ucsense* S1M29 obtido da linhagem mutante 9A02S1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSM 18942) e pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (Dillon et al., 2006; Dillon et al., 2011; Lenz et al., 2022).

A produção das enzimas ocorreu em processo submerso em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo e descontínuo alimentado, em meios contendo celulose comercial e resíduos da colheita de milho submetidos a pré-tratamento hidrotérmico (biomassa sólida e/ou licor) como principais fontes de carbono e indutores (Capítulo 2; Capítulo 5). Após os cultivos, o micélio foi separado por filtração, e a fração líquida foi utilizada para a caracterização do complexo enzimático produzido.

4.6.3.2 Determinação das atividades enzimáticas

Atividade total de celulasas foi dosada através da análise de atividade sobre papel filtro (FPA), segundo metodologia proposta por Ghose (1987), com adaptações Camassola & Dillon (2012), utilizando tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ pH 4,8. A mistura reacional foi mantida a 50°C por 1 hora e uma curva padrão foi construída a partir de concentrações conhecidas de glicose, com leitura de absorbância em 545 nm. As unidades de FPA foram definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol.L⁻¹ de açúcar redutor por minuto.

Atividade de endoglicanases também foi determinada a partir do método de Ghose (1987) com modificações de Camassola & Dillon (2012). O substrato utilizado foi carboximetilcelulose 2% (m/v), e a mistura reacional foi mantida a 50°C por 30 minutos em presença de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ pH 4,8. A leitura em espectrofotômetro e a determinação da atividade foram realizadas conforme descrito pra FPA, sendo que uma unidade de atividade de endoglicanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de

liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de açúcar redutor por minuto.

Atividade de β -glicosidases foi determinada através do substrato p -nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo 4 mmol.L^{-1} (pNPG) em tampão citrato de sódio (0,05 mol.L^{-1} pH 4,8), através de metodologia adaptada de Daroit et al. (2008). A mistura reacional foi incubada a 50°C por 30 minutos. A leitura da absorbância foi a 405 nm e para a determinação da atividade foi construída curva de calibração com soluções de p -nitrofenol com concentrações conhecidas. Uma unidade de atividade de β -glicosidase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de nitrofenol por minuto.

A determinação de atividade de exoglicanases foi realizada utilizando p -nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (pNPC) em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L^{-1} , em pH 4,8, como substrato, através de metodologia adaptada de Deshpande et al. (1984). A mistura reacional foi incubada a 50°C por 30 minutos e a leitura em espectrofotômetro foi realizada em 405 nm. Foi construída uma curva padrão de pNPC, e uma unidade de atividade de exoglicanase foi definida como a quantidade de enzima requerida para a hidrólise de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de p -nitrofenil por minuto.

A determinação da atividade de xilanases foi realizada de acordo com Bailey et al. (1992), usando xilana 1% (m/v) em tampão citrato de sódio (0,05 mol.L^{-1} pH 4,8) como substrato. A mistura reacional foi mantida a 50°C por 5 minutos, a absorbância foi mensurada a 545 nm e a concentração de xilanases determinada através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de xilose. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de xilose por minuto.

4.6.3.3 Caracterização molecular das enzimas celulolíticas

Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) no caldo enzimático produzido em biorreator, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). Como padrão de massa molecular foi utilizado o marcador molecular Precision Plus Protein Standards, Bio Rad®. Após a corrida eletroforética, o gel foi revelado em solução Coomassie Brilliant Blue 0,2%, seguida de solução de 50% etanol/10% ácido acético.

Também foram realizados zimogramas para determinar a massa molecular de endoglicanases, β -glicosidases e xilanases produzidas por *P. ucsense* nas diferentes fontes de carbono. Endoglicanases foram determinadas segundo metodologia proposta por Sun et al. (2008) em um sistema semi-desnaturante (SDS-PAGE) e 0,15% de carboximetilcelulose (CMC) como substrato. O gel foi então lavado utilizando solução de triton (2,5%) em tampão citrato de sódio pH 4,8 (30 min), após foi incubado em tampão citrato de sódio (10

min, 40°C), e corado em solução de Congo Red (0,1%) por 30 minutos, com posterior lavagem em solução de NaCl 1 mol.L⁻¹. Xilanases foram avaliadas de maneira semelhante, porém com gel contendo xilana como substrato para ação da enzima. A massa molecular de β -glicosidases foi determinada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), que após a corrida foi submerso em solução de triton (2,5%) em tampão citrato de sódio pH 4,8 (30 min) e lavado com tampão citrato de sódio, pH 4,8. Após a lavagem o gel foi incubado por 40 minutos, em solução de 0,2% (m/v) de esculina em tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹, pH 4,8 e, em seguida, revelado em solução de FeCl₃ 1% (Kwon et al., 1994).

4.6.3.4 Temperatura ótima de reação

A temperatura ótima de reação para FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases foi avaliada variando-se a temperatura de 40 a 70°C (Camassola et al., 2004), sendo essas temperaturas próximas a utilizada em processos de hidrólise (50°C). Os demais parâmetros das análises enzimáticas foram mantidos conforme protocolos anteriormente citados. Os resultados foram apresentados como atividade relativa em relação à temperatura de 50°C.

4.6.3.5 pH ótimo de reação

O pH ótimo de reação para FPA e endoglicanases foi avaliado através da utilização de tampão citrato de sódio (0,05 mol.L⁻¹) nos seguintes valores de pH: 4; 4,5; 4,8; 5; 5,5 e 6 (Camassola et al., 2004). Para β -glicosidases, exoglicanases e xilanases, os substratos ρ NPG, ρ NPC e xilana foram diluídos nos diferentes tampões, para posterior uso na análise enzimática. Todas as análises foram realizadas a 50°C, conforme protocolos anteriormente citados. Os resultados foram apresentados como atividade relativa em relação ao pH 4,8.

4.6.3.6 Estabilidade em diferentes pH

A estabilidade das enzimas produzidas em processo submerso foi avaliada em valores de pH variando entre 4 e 6, bem como sem a adição de tampão. As enzimas foram mantidas a 50°C por até 72 horas, com coletas de amostras nos tempos 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas. As atividades enzimáticas foram então mensuradas conforme os protocolos padrão anteriormente citados e os resultados foram apresentados como atividade relativa em relação à atividade inicial.

4.6.3.7 Termoestabilidade

A termoestabilidade foi avaliada por um período de 72h, em temperaturas variando entre 40 e 70°C. Amostras foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas, e as análises de FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases foram conduzidas conforme

protocolos padrão anteriormente citados. Os resultados foram apresentados como atividade relativa em relação à atividade inicial.

4.6.3.8 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada a partir de adaptação do método proposto por Adsul *et al.* (2005), em frascos Duran de 50 mL contendo 5% (m/v) de biomassa lignocelulósica, extrato enzimático em volume equivalente a 15 e/ou 10 FPU por grama de biomassa, e tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 4,8) para completar 50 mL de reação. As misturas foram incubadas em banho agitado a 150 rpm e 50°C, condição ótima para a atividade enzimática de *P. ucsense* (Camassola *et al.*, 2004), por 72 horas. Amostras foram coletadas a cada 24 horas e 20 µL foram filtrados (membrana com poro de 22µm) e analisados em HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) com detector RID-10A, coluna Aminex® HPX-87H (30x7.8 mm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), operando a 60 °C, com fase móvel contendo 5 mmol.L⁻¹ de H₂SO₄, com fluxo de 0.6 mL.min⁻¹.

4.6.3.9 Análise estatística dos dados

A análise estatística dos dados foi realizada por meio da análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95% (p<0,05), com auxílio do software GraphPad Prism 5.

4.6.4 Resultados e discussão

4.6.4.1 Caracterização das enzimas celulolíticas

A fim de avaliar se os diferentes meios de cultivo (com presença ou ausência de licor proveniente do pré-tratamento) e as diferentes condições de crescimento (RD e RDA) influenciam nas isoformas das enzimas produzidas por *P. ucsense*, β-glicosidases, endoglicanases e xilanases foram avaliadas quando a sua massa molecular, através de zimogramas. Para tanto, nas corridas eletroforéticas, substratos específicos foram utilizados, além de serem aplicadas amostras de padrões para massa molecular. Também foi produzido um gel SDS-Page para as proteínas totais presentes nos extratos. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1.

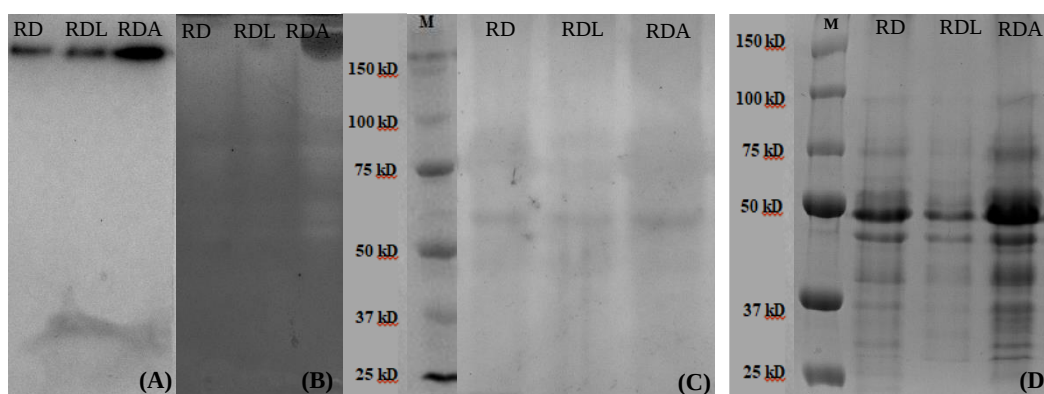


Figura 1. Zimogramas para a atividade de β -glicosidases (A), Endoglicanases (B) e Xilanases (C), e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas (D) produzidas por *P. ucsense* em cultivos submersos utilizando resíduos da colheita do milho, conduzidos em biorreator com agitação mecânica, em regime descontínuo (RD), regime descontínuo com adição de licor proveniente do pré-tratamento (RDL) e regime descontínuo alimentado (RDA).

Através dos zimogramas é possível observar que, para os cultivos realizados em RDA, há uma maior expressão enzimática em relação à RD, visto pela presença de bandas maiores e mais visíveis, devido a maior modificação dos substratos específicos pela presença da enzima. Também há uma maior concentração de proteínas, o que é evidenciado pela presença de bandas mais largas no SDS-PAGE. Por outro lado, a presença do licor no meio de cultivo não resultou na produção de diferentes isoformas das enzimas avaliadas, afetando somente sua atividade.

Admitindo que bandas de atividade enzimática nos zimogramas representem as bandas de proteínas no SDS-PAGE, é possível fazer uma estimativa da massa molecular das enzimas. Para β -glicosidases, apenas uma isoforma é produzida, com massa molecular próxima a 150 kDa. Esse fato já havia sido observado anteriormente para a produção dessa enzima por *P. ucsense* (Capítulo 2), onde a utilização de variadas fontes de carbono não resultou em diferentes isoformas de β -glicosidases. Esse fato sugere que a linhagem S1M29 de *P. ucsense* pode ser produtora de uma única isoforma desta enzima, independentemente da fonte de carbono ou tipo de processo utilizado.

Já para endoglicanases, isoformas com massa molecular entre 50 e 150 kDa foram observadas nas três condições avaliadas, sem diferirem entre si em tamanho, apenas na intensidade da banda formada. Este fato corrobora estudos anteriores com a mesma linhagem (Capítulo 2), onde foi observado que diferentes isoformas da enzima são produzidas, sendo que as mesmas variaram de acordo com o substrato e a forma de condução do processo, tendo sido observadas isoformas entre 25 e 250 kDa em diferentes biomassas lignocelulósicas e celulose comercial.

Para xilanases, isoformas com massas molares variando entre 50 e 75 kD foram produzidas em todas as condições avaliadas, sendo estes dados também condizentes com os estudos anteriores para a mesma linhagem (Capítulo 2), onde essa mesma variação de massas molares foi observada em meios contendo bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante e celulose comercial. No gel de proteínas totais, foi possível observar a presença de outras proteínas de diferentes massas molares produzidas por *P. ucsense*, podendo indicar outras enzimas, como as exoglicanases, ou diferentes proteínas produzidas pelo metabolismo do fungo durante seu crescimento.

4.6.4.2 Temperatura ótima de reação

As condições ótimas de reação das enzimas produzidas utilizando resíduos da colheita do milho foram avaliadas. A Figura 2 apresenta os dados referentes à temperatura ótima de atividade para FPA, endoglicanases, β -glicosidases e xilanases, utilizando enzimas produzidas com celulose comercial e a enzima Celluclast® como padrões de comparação. Os mesmos estão expressos como atividades relativas à condição padrão de avaliação (50°C), a qual foi considerada 100%.

Para FPA, as enzimas produzidas em regime descontínuo, utilizando apenas os resíduos sólidos da colheita do milho (RD), foram as que apresentaram atividade relativa mais elevada em uma maior faixa de temperaturas, estando próximo aos 100% (temperatura de 50°C) nas faixas de temperatura entre 40 e 65°C, apresentando queda na atividade apenas em 70°C. Já as condições RDL (regime descontínuo com adição de licor) e RDA (regime descontínuo alimentado) apresentaram atividades relativas superiores a 100% nas temperaturas de 60 e 65°C, enquanto que as enzimas produzidas utilizando celulose comercial e a enzima Celluclast® são mais ativas na temperatura de 55°C. Esses dados se assemelham aos obtidos em estudos anteriores para a mesma linhagem de *P. ucsense*, onde foi observado que enzimas produzidas utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas são mais ativas em temperaturas mais elevadas, entre 55 e 65°C, sendo as mais ativas as produzidas em bagaço de cana-de-açúcar (cerca de 150% de atividade relativa na temperatura de 65°C) (Capítulo 4). Essa atividade relativa é superior a obtida para RD com resíduos de milho, que chegou a cerca de 125% na mesma temperatura. Esses resultados também se assemelham aos obtidos por Camassola et. al. (2004), que observaram que a atividade de FPA produzidas em biomassa lignocelulósica em cultivo sólido, por *P. echinulatum*, aumentou em temperaturas acima de 60°C. Estes dados indicam que FPAs produzidas utilizando biomassas lignocelulósicas se mostram mais ativas em faixas mais

amplas de temperatura, se comparadas as produzidas em celulose comercial.

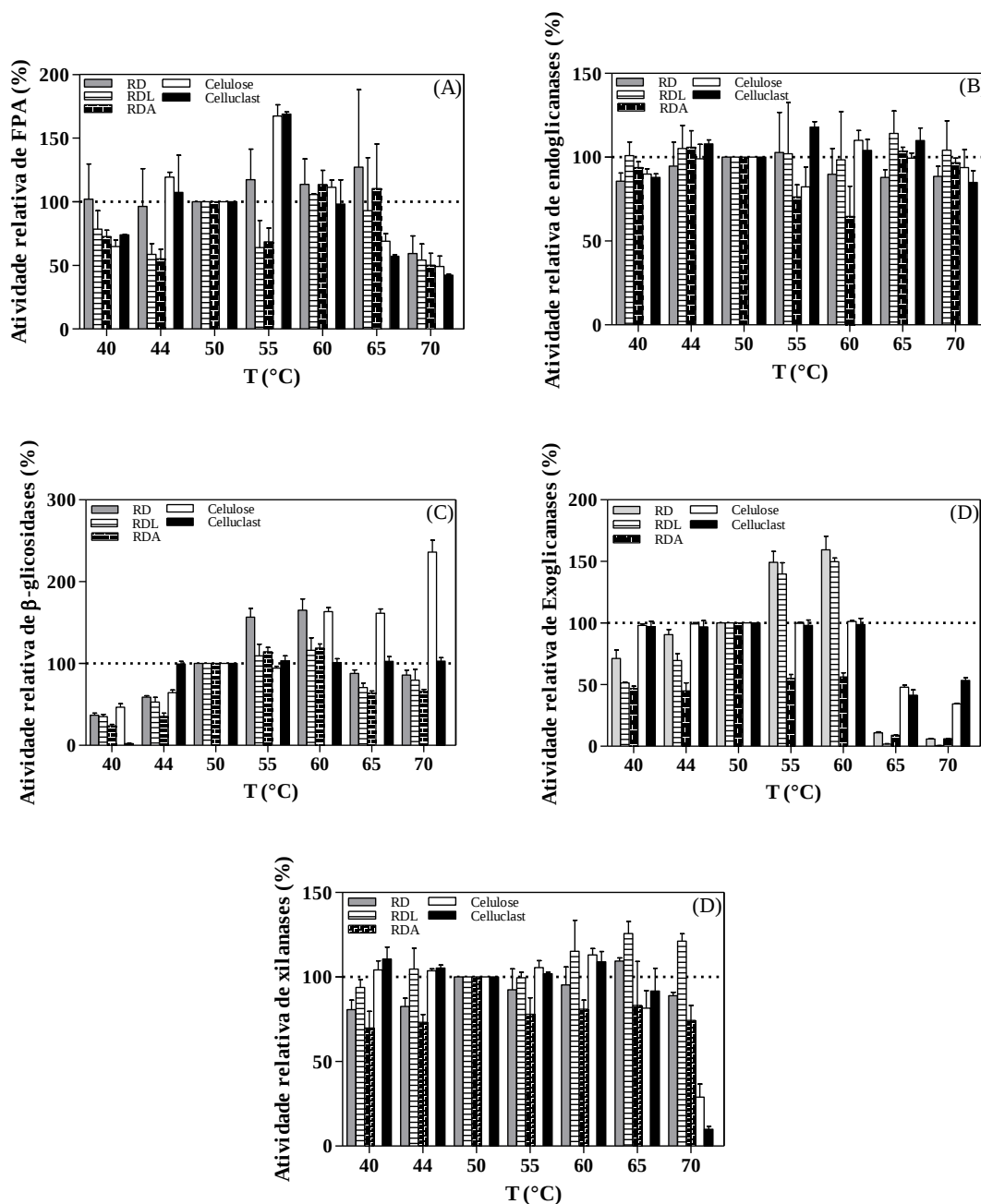


Figura 2. Atividades relativas de FPA (A), Endoglucanases (B), β-glicosidases (C), exoglucanases (D) e Xilanases (E) observadas em diferentes temperaturas de reação.

Entretanto, para endoglucanases, as enzimas produzidas em RDL foram as que apresentaram as melhores atividades relativas, seguidas de RDa e RD, o oposto do que ocorreu para FPA. Entretanto, as diferenças nas atividades relativas foram pequenas, tanto entre as três condições produzidas a partir de resíduos do milho, quanto em relação aos controles utilizados. O mesmo comportamento havia sido observado anteriormente, para

endoglicanases produzidas utilizando bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante e polpa de eucalipto e pinus e a mesma linhagem de *P. ucsense* (Capítulo 4), sugerindo que a temperatura de reação não possui grande efeito sobre essas enzimas. Estes resultados se assemelham aos obtidos para endoglicanases de *Aspergillus niger* (Zohri et al, 2022) e para celulasas purificadas do fungo extremófilo *Aspergillus flavus* (Bano et al, 2019), que apresentaram sua temperatura ótima de reação em 60°C. Já CMCases da bactéria extremófila *Bacillus aerius* CMCP51 apresentaram uma faixa de temperatura ótima entre 50 e 90°C, com pico em 70°C (Ganesan et al, 2020). Estes dados novamente sugerem que endoglicanases produzidas por *P. ucsense* apresentam certa tendência termófila, mesmo em seu extrato bruto, diferindo de endoglicanases purificadas de *Aspergillus niger*, cuja temperatura ótima foi observada em 40°C com queda de 64% de atividade em variações de 5°C, acima ou abaixo (Sulyman et al, 2020).

B-glicosidases e exoglicanases produzidas por *P. ucsense* em resíduos da colheita do milho apresentaram maiores atividades em temperaturas variando entre 50 e 60°C, não apresentando diferenças entre os meios e regime de produção. Esses resultados diferem do padrão, produzido com celulose comercial, onde β -glicosidases apresentaram maior atividade em temperaturas entre 60 e 70 °C, e exoglicanases entre 40 e 60°C. Entretanto, também demonstram que ambas as enzimas possuem atividades mais elevadas nas mesmas faixas de temperatura quando produzidas na biomassa, o que é um ponto positivo em sua utilização em processos de hidrólise, onde sua atuação precisa ocorrer em sinergia (Almeida *et al*, 2019). Os dados obtidos no presente estudo diferem dos observados para β -glicosidases produzidas por *P. ucsense* utilizando diferentes biomassas lignocelulósicas em cultivo submerso (Capítulo 4), onde as mesmas se mostraram mais ativas em temperaturas entre 60 e 70°C, e em cultivo sólido, onde a atividade de β -glicosidases foi incrementada em temperaturas mais elevadas (Camassola *et. al.*, 2004). Isto sugere que a fonte de carbono utilizada tem forte influência no perfil de temperatura ótima das enzimas produzidas, mesmo que não sejam produzidas diferentes isoformas de β -glicosidases pelo microrganismo. Os dados para exoglicanases, no entanto, se assemelham aos observados por Zohri et al (2022), que determinaram 60°C como sendo a temperatura ótima das enzimas produzidas por *A. niger*, demonstrando certa similaridade entre as enzimas destes microrganismos. Por outro lado, endoglicanases e exoglicanases produzidas por um fungo filamentoso BS1 isolado do intestino de *Nausitora fusticula* apresentaram maior atividade em temperatura mais branda, de 40°C, enquanto que a atividade de suas β -glicosidases foram semelhantes as produzidas por *P. ucsense* no presente estudo, atingindo picos de

atividade em 60°C (Kronemberger et al, 2021).

Xilanases apresentaram boa atividade enzimática em todas as temperaturas testadas, para todas as condições avaliadas utilizando resíduos da colheita do milho como fonte de carbono, com picos de atividade em 65°C. As enzimas produzidas na biomassa lignocelulósica apresentaram maior afinidade a altas temperaturas se comparadas a enzima produzida em celulose e a enzima comercial, que perderam grande percentual de atividade em 70°C. Estes resultados corroboram os obtidos anteriormente para xilanases produzidas por *P. ucsense* em diferentes biomassas lignocelulósicas, onde a temperatura ótima de reação foi de 70°C (Capítulo 4). Novamente, esses resultados sugerem uma certa tendência termófila das enzimas produzidas por *P. ucsense* em biomassas lignocelulósicas, podendo ser um indicativo que seu crescimento nestes substratos torna as ligações responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional das enzimas mais fortes. Isso dificultaria sua desnaturação através da destruição de ligações fracas e pontes de hidrogênio, que ajudam a manter a estrutura tridimensional (Sulyman et al, 2020).

4.6.4.3 pH ótimo de reação

Os dados relativos ao pH ótimo de atuação das mesmas enzimas estão apresentados na Figura 3. Assim como para temperatura, atividade de 100% foi considerada no pH padrão de avaliação (4,8). Para FPA, todos os extratos enzimáticos produzidos por *P. ucsense* S1M29 apresentaram atividades próximas ou superiores a 100% na faixa de pH variando entre 4 e 5,5, apresentando atividades inferiores em pH 6. Os resultados demonstram que FPAses produzidas com resíduos de milho apresentam atividade mais estável em pH mais próximo da neutralidade, se comparada as produzidas em bagaço de cana-de-açúcar, que já apresentou queda na atividade em pH 5 (Capítulo 4). As enzimas de *P. ucsense* também demonstraram ser mais tolerantes em relação a variação do pH em relação ao complexo comercial Celluclast[®], cujos picos de atividade foram em pH 4,8 e 5. Os dados se assemelham aos obtidos por Camassola et al., (2004), onde as atividades em FPA foram superiores em pH ácidos, entretanto, os autores constataram que a atividade ótima foi observada no pH 4,8, enquanto que no presente estudo a atividade ótima foi em pH 4 para RD e RDA e pH 4,5 para RDL.

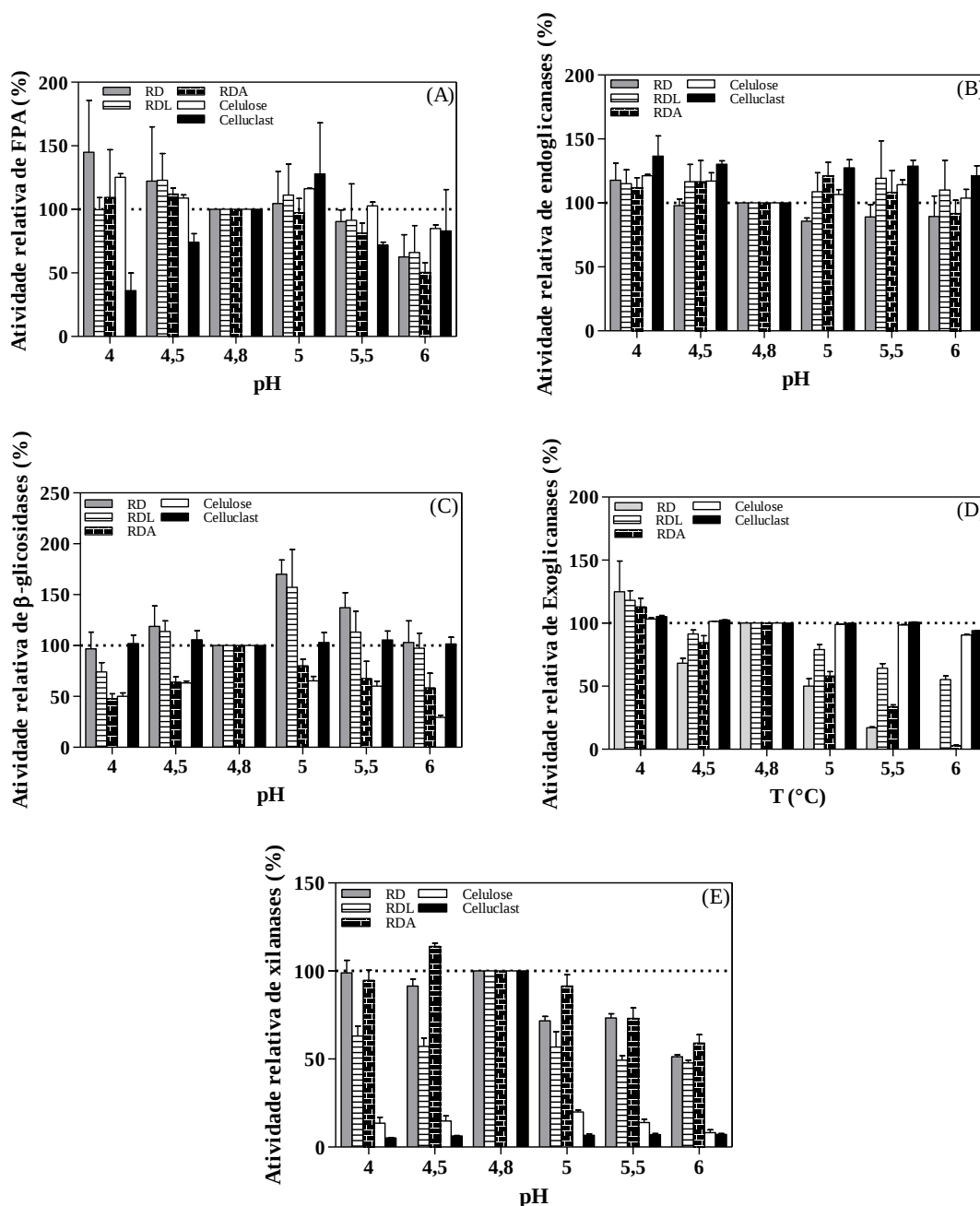


Figura 3. Atividades relativas de FPA (A), Endoglicanases (B), β-glicosidases (C), exoglicanases (D) e Xilanases (E) observadas em diferentes valores de pH.

A variação do pH, assim como ocorreu com a temperatura, não apresentou grande efeito nas atividades de endoglicanases produzidas em resíduos da colheita de milho, permanecendo sempre muito próximas a 100%. Os resultados diferem levemente dos obtidos em estudos anteriores utilizando extratos produzidos em outras biomassas lignocelulósicas, onde pH mais ácidos resultaram em atividades superiores, decaindo em pH próximos a neutralidade (Capítulo 4). Diversos autores reportaram uma maior afinidade

das enzimas celulolíticas para pH mais ácidos: Kronemberger et al. (2021), relataram que o pH ótimo de atividade de uma endoglicanase produzida pela cepa BS1 de um fungo filamentoso foi 4, enquanto que para exoglicanase foi entre 4 e 5,4; Sulyman et al. (2020), observaram que a atividade ótima de endoglicanase purificada de *A. niger* foi em pH 4, com quedas superiores a 50% em valores acima ou abaixo; já Zhao et al. (2021) relatou que o gene isolado Cel1029 manteve 40% de sua atividade mesmo em pH 2. Outros autores, entretanto, relataram o oposto, com a celulase purificada do fungo extremófilo *A. flavus* apresentando pH ótimo em 10 (Bano et al, 2019), e os genes PersiCel1 e PersiCel2 em valores de pH 8 e 6, respectivamente Maleki et al, (2020), demonstrando um certo comportamento extremófilo dessas enzimas, algo não observado para *P. ucsense*.

Para β -glicosidases, atividades muito próximas ao padrão (pH 4,8) foram observadas em toda a faixa de pH avaliada, para os extratos produzidos em regime descontínuo, seja o meio acrescido ou não de licor. Já o extrato produzido em regime descontínuo alimentado apresentou atividade ótima de β -glicosidases em pH 5, seguido de 5,5, com quedas nos demais valores de pH. Esse fato difere de observações anteriores para esta mesma linhagem, nos estudos de temperatura ótima e em estudos anteriores (Capítulo 4) onde a composição do meio de cultivo apresentou maior influência na atividade e estabilidade das enzimas em relação ao regime de cultivo utilizado. Isto demonstra a complexidade das enzimas produzidas por um mesmo microrganismo, e como pequenas mudanças na composição de meio e no processo de produção podem acarretar em mudanças em seu comportamento previamente já conhecido, fazendo com que seus estudos sejam de grande importância para uma possível aplicação comercial. Outra evidência são os dados obtidos por Camassola et al. (2004), onde queda de atividade de β -glicosidases produzidas em estado sólido foram observadas com o aumento do pH a partir de seu pH ótimo (entre pH 4 e 4,5). Quanto a exoglicanases, as maiores atividades foram observadas em pH 4, apresentando quedas acentuadas em pH superiores a 4,8, apresentando uma faixa de atividade menor a observada por Kronemberger et al. (2021), de 4 a 5,4.

Para xilanases, os extratos produzidos em resíduos da colheita de milho, de um modo geral, apresentaram atividades muito superiores as observadas para o extrato produzido em celulose e ao complexo comercial, sendo as maiores atividades observadas em pH 4 e 4,5. Estes dados se opõem aos observados anteriormente para extratos produzidos em outras biomassas lignocelulósicas, onde as atividades relativas foram baixas em relação ao controle em todos os valores de pH avaliados. Novamente, os dados obtidos demonstram as diferenças obtidas na produção dos complexos enzimáticos de *P. ucsense* de

acordo com o meio de cultivo utilizado e o processo de produção empregado, demonstrando a importância de mais estudos a fim de elucidar o processo ideal para produção de extratos enzimáticos mais estáveis e ativos em amplas faixas de temperatura e pH, para assim abrir caminho para uma futura aplicação industrial do mesmo.

4.6.4.4 Estabilidade em diferentes valores de pH

A estabilidade dos extratos enzimáticos produzidos por *P. ucsense* utilizando resíduos da colheita de milho e celulose comercial como fonte de carbono e indutores foi avaliada em diferentes valores de pH, utilizando a enzima Celluclast® como padrão, a uma temperatura de 50°C. Os dados obtidos para FPA estão apresentados na Figura 4. Os extratos produzidos por *P. ucsense* apresentaram maior estabilidade na faixa de pH entre 4 e 5,5, mantendo 50% de sua atividade inicial após 72h de incubação. Já nas misturas sem controle de pH e em pH 6, a queda da atividade foi mais acentuada após 24h. A estabilidade foi maior que as enzimas comerciais, que apresentaram atividade relativa superior a 50% apenas nos valores de pH 4,8 e 5. Entretanto, foi menor que a observada para extratos enzimáticos crescidos em bagaço de cana-de-açúcar, onde, após 72h de incubação, as atividades relativas permaneceram superiores a 100% nos valores de pH de 4,5, 4,8 e 6 (Capítulo 4).

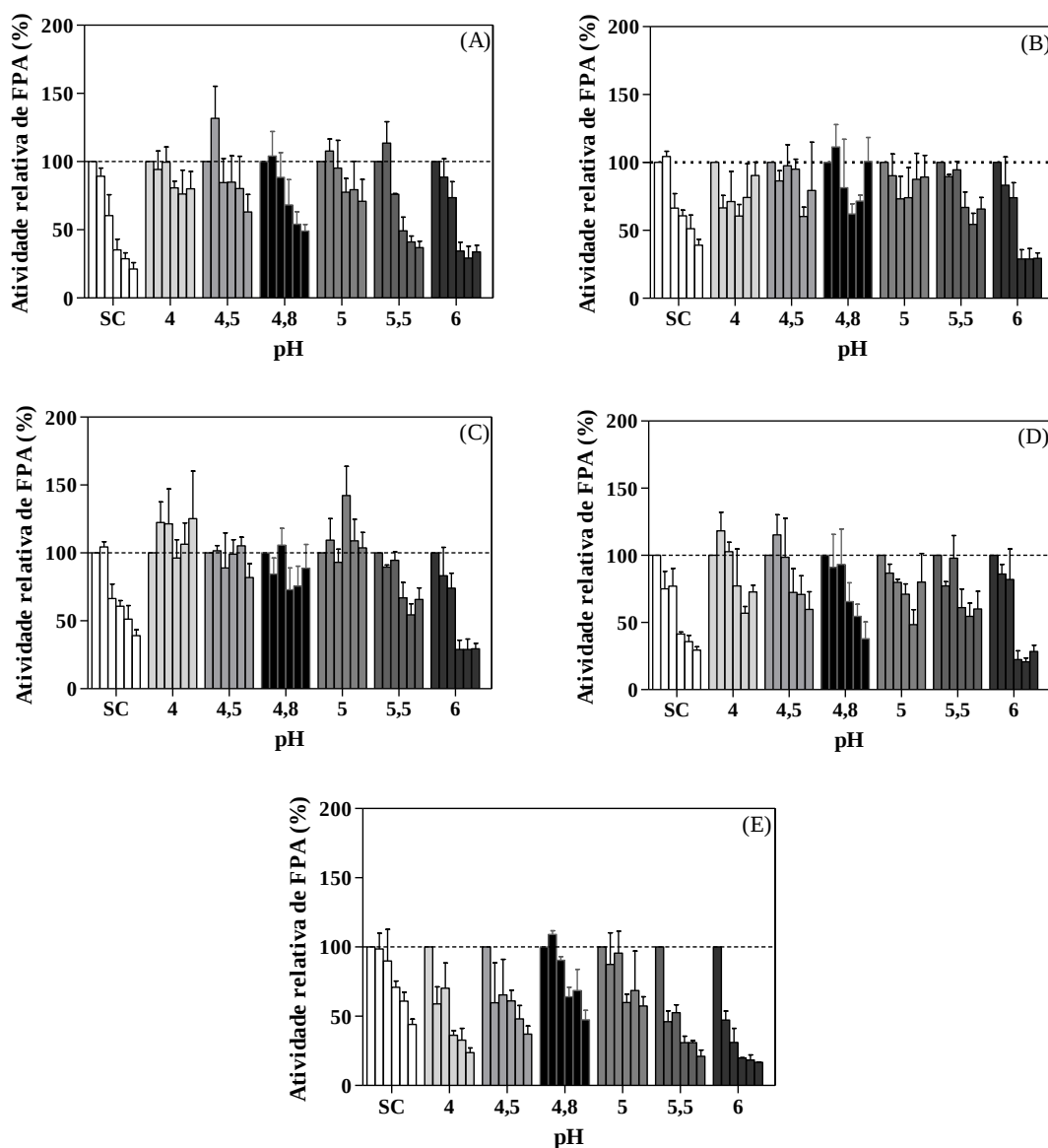


Figura 4. Estabilidade de FPA ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E), mantidos a 50°C. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Os dados da estabilidade de endoglicanases estão apresentados na Figura 5. Novamente, os extratos enzimáticos produzidos por *P. echinulatum* se mostraram mais estáveis que o complexo comercial, mantendo atividades relativas superiores a 75% após 72h de incubação, para todos os extratos enzimáticos avaliados. O extrato enzimático produzido em RDA apresentou atividade relativa superior a 100% em pH 4,5 e 5,5, após 72h, enquanto que o extrato produzido com adição de licor apresentou atividades relativas próximas a 150%, no mesmo período, em pH 5,5. Os dados assemelham-se aos anteriormente observados, para enzimas produzidas em bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante, onde as atividades relativas permanecem superiores ou próximas a 100% após 72h em todos os pHs avaliados (Capítulo 4). Entretanto, as enzimas se mostraram muita mais estáveis que as produzidas pela bactéria extremófila *B. aerius* CMCP51, cuja maior atividade relativa foi observada em pH 7, com cerca de 80%, após apenas 5h de incubação (Ganesan et al, 2020), demonstrando novamente a adaptabilidade das enzimas produzidas por *P. ucsense* em biomassas lignocelulósicas.

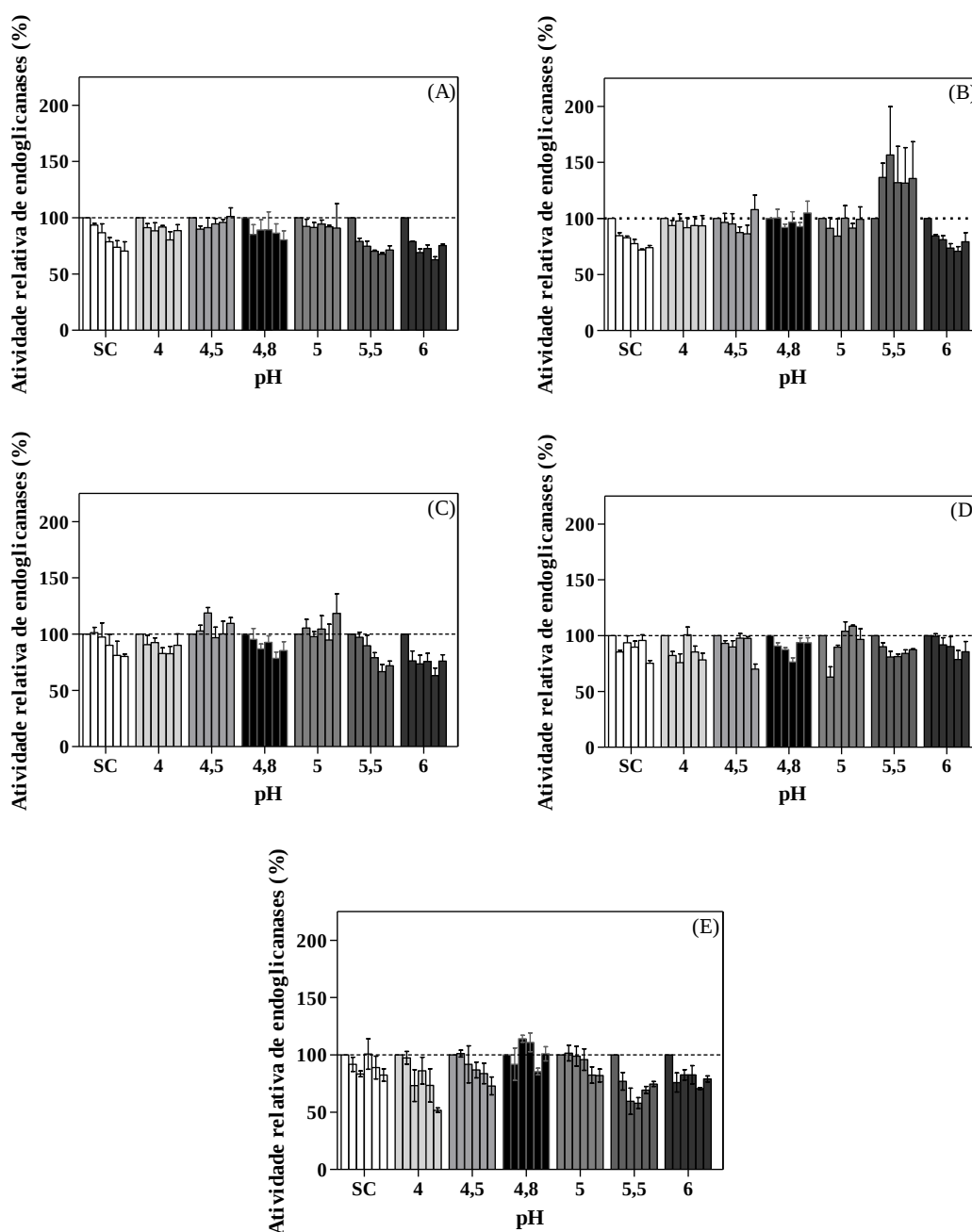


Figura 5. Estabilidade de endoglicanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) mantidos a 50°C. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Os dados obtidos para β -glicosidases estão apresentados na Figura 6, onde observa-se que as enzimas produzidas em RD e RDL são mais estáveis em pH variando entre 4 e 5, enquanto que as produzidas em RDA são estáveis também no extrato sem controle de pH. Entretanto, apesar da estabilidade próxima a 100% após 72h de incubação apresentada pelas enzimas produzidas na biomassa lignocelulósica, as enzimas produzidas em celulose apresentaram atividades relativas superiores a 100% nesse mesmo período, em pH variando de 4 a 5, demonstrando uma ativação da atividade da enzima durante o período de exposição a aquela condição. Já o complexo enzimático comercial apresentou estabilidade para todas as variações de pH avaliadas, permanecendo com sua atividade próxima a 100%. A estabilidade das β -glicosidases produzidas em resíduos da colheita do milho se mostrou um pouco inferior a observada para o extrato produzido com capim elefante, que manteve atividade relativa levemente superior a 100% em toda a faixa de pH avaliada (4,0 a 6,0), bem como no padrão sem controle de pH, enquanto que os extratos produzidos com bagaço de cana-de-açúcar apresentaram resultados semelhantes aos do presente estudo (Capítulo 4).

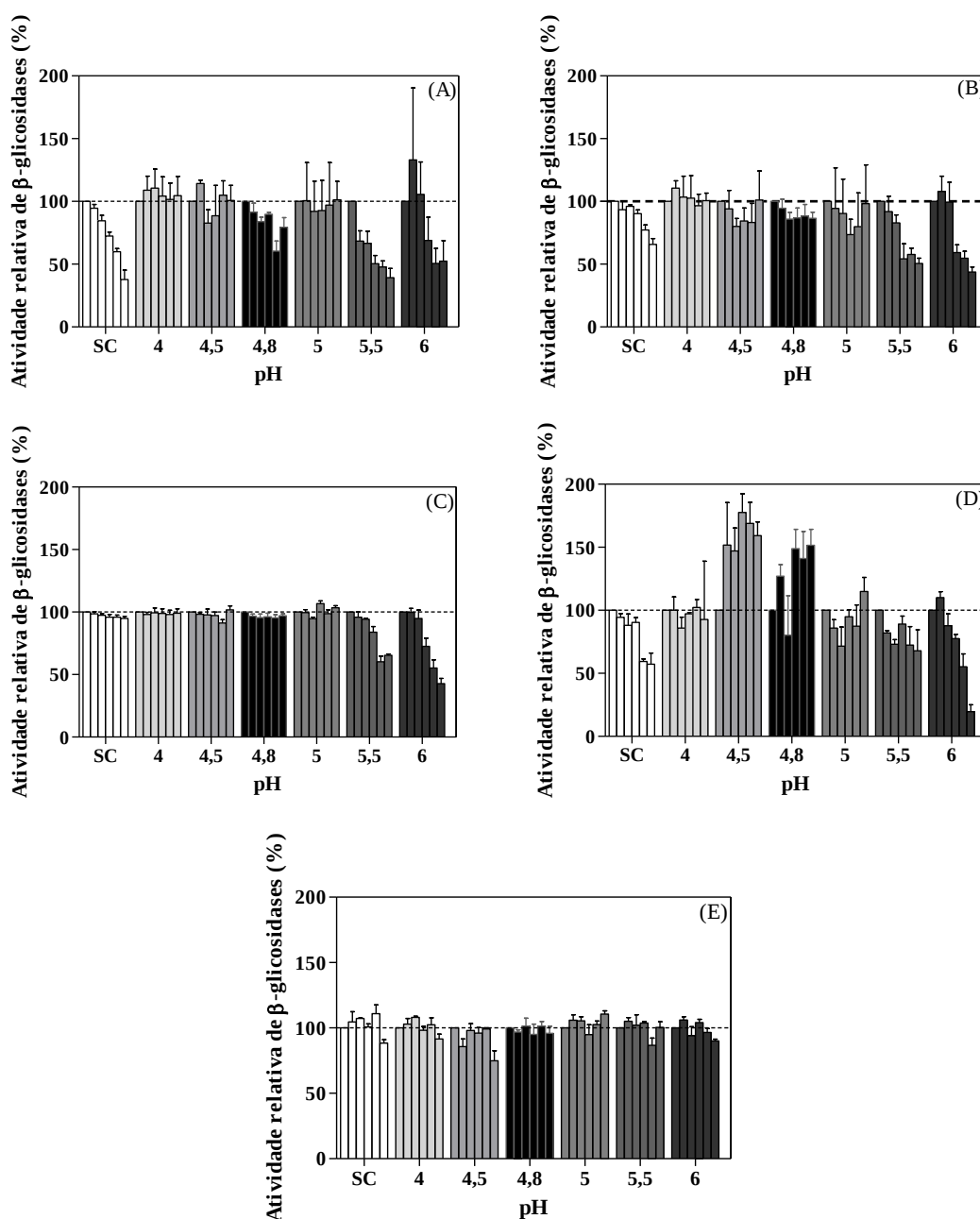


Figura 6. Estabilidade de β -glicosidases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) mantidos a 50°C. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Já a avaliação da estabilidade de exoglicanases em diferentes pH demonstrou que as enzimas produzidas em resíduos da colheita do milho são mais estáveis na faixa entre 4 e 5, de maneira muito semelhante as β -glicosidases. As maiores atividades relativas foram observadas em pH 4,5 após 48h de incubação, para RD e em pH 4,5 e 5 para RDA, após 72h de incubação. As enzimas produzidas em celulose mostraram um perfil mais semelhante ao do complexo Celluclast[®], onde as atividades permaneceram muito próximas a 100% em todo o período avaliado, exceto para o pH 6, onde o extrato enzimático de *P. ucsense* apresentou queda de cerca de 50% de sua atividade. Contudo, de um modo geral, os resultados demonstram uma boa estabilidade da enzima exoglicanase no complexo produzido por *P. ucsense* em meio contendo resíduos de milho, sendo a mais estável de todas as enzimas avaliadas, o que pode favorecer sua utilização em diferentes processos industriais.

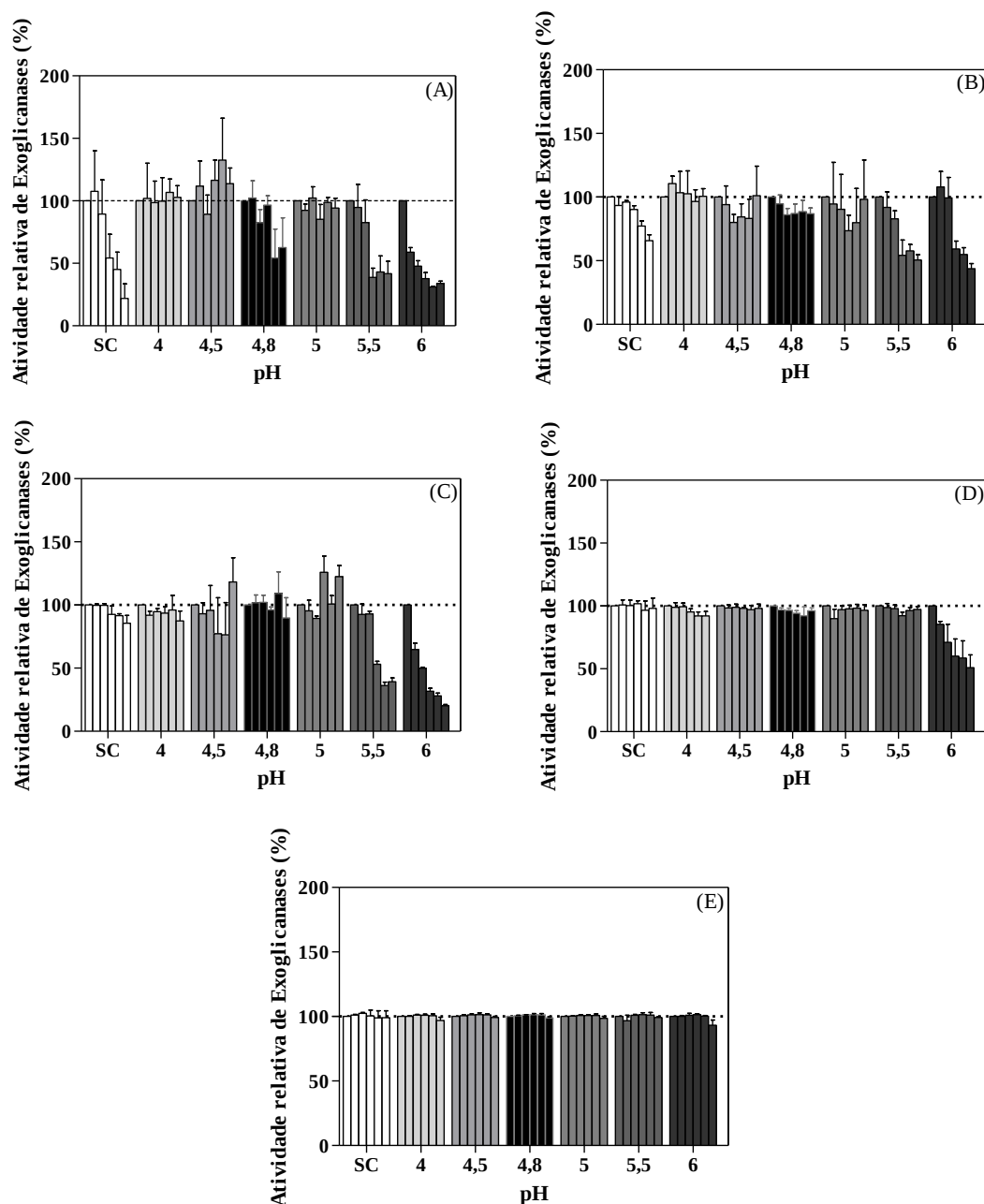


Figure 7. Estabilidade de exoglicanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) mantidos a 50°C. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Se as exoglicanases foram as enzimas mais estáveis dentre as avaliadas, as xilanases foram as que apresentaram as maiores perdas de atividade relativa, de um modo geral (Figura 8). Nenhum dos extratos avaliados apresentou atividade relativa próxima a 100% após 72h de incubação, em nenhum pH avaliado. Dentre os extratos produzidos por *P. ucsense*, o que apresentou as melhores atividades relativas, sendo estas superiores também a enzima comercial, foi o produzido em RDL, demonstrando que a adição do licor no meio de cultivo favoreceu de alguma forma a estabilidade dessas enzimas. Após 72h de incubação, o extrato apresentava atividades próximas a 75% em pH variando entre 4 e 6. Resultados semelhantes já haviam sido observados quando a mesma linhagem de *P. ucsense* foi crescida em diferentes biomassas lignocelulósicas (Capítulo 4), demonstrando que xilanases são as enzimas menos estáveis produzidas pelo microrganismo, independentemente da fonte de carbono utilizada ou do pH avaliado. Problema similar foi observado por Ezeilo et al (2020), cujos dados demonstraram um tempo de meia-vida de 2h (pH 3,0), 4h (pH 4,0) e 9h (pH 5,0), aproximadamente, para xilanases de *R. oryzae* UC2, sendo inferiores aos observados para as demais enzimas do mesmo microrganismo.

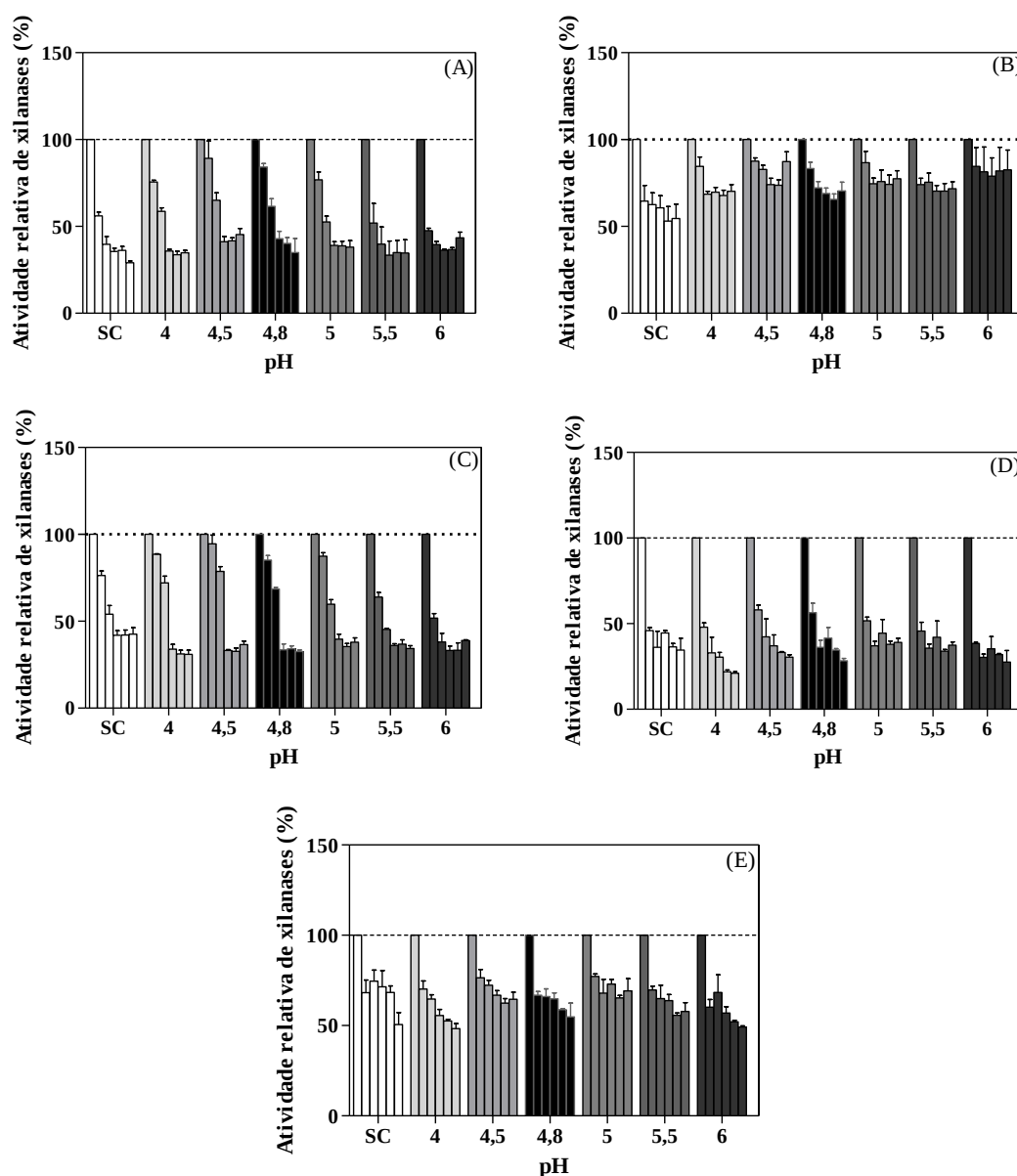


Figura 8. Estabilidade de xilanases ao longo do tempo em diferentes valores de pH observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) mantidos a 50°C. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Os dados obtidos no presente estudo demonstram que há divergências entre a estabilidade das diferentes enzimas produzidas por *P. ucsense*, apresentando-se por vezes mais estáveis ao serem produzidas em biomassa lignocelulósica (como para xilanase e FPA) e às vezes se mostrando menos estáveis, ou com estabilidade semelhante as produzidas em celulose comercial. Esse fato, entretanto, pode ser explicado pela expressão enzimática nos fungos, que é fortemente influenciada pela natureza, composição química e estado físico da fonte de carbono, fazendo com que o mesmo microrganismo expresse uma gama de diferentes isoenzimas (Ezeilo et al., 2019), resultando assim em enzimas com diferentes níveis de estabilidade dependendo do substrato. Além disso, os dados também mostraram que os extratos brutos produzidos a partir dos resíduos da colheita de milho apresentam estabilidade semelhante a preparação comercial, já submetida a processos de purificação e formulação, evidenciando mais uma vez a capacidade das enzimas produzidas por *P. ucsense*, mesmo em seu estado bruto.

4.6.4.5 Termoestabilidade

A termoestabilidade, assim como a estabilidade em diferentes faixas de pH, é um fator importante para a possível aplicação de uma enzima em processos de biorrefinaria. As atividades relativas de FPA (Figura 9) das enzimas produzidas por *P. ucsense* utilizando resíduos da colheita de milho, demonstraram uma maior estabilidade em 55°C para as três condições de crescimento do fungo. Entretanto, as enzimas produzidas em RDA apresentaram valores mais próximos a 100% na faixa de temperatura de 40 a 55°C, sendo mais estável que as demais, incluído o extrato produzido em celulose comercial. Os extratos enzimáticos produzidos por *P. ucsense* também se mostraram mais tolerantes a temperaturas mais elevadas, quando comparados ao complexo Celluclast®, cuja estabilidade se manteve somente nas temperaturas de 40 e 45°C, decaindo rapidamente em temperaturas mais elevadas. Os dados para RDA são semelhantes aos obtidos em cultivo com bagaço de cana-de-açúcar, que se manteve estável a 50°C, mas diferem dos observados em cultivos com capim elefante, onde a estabilidade só foi mantida a 40°C (Capítulo 4). Resultados similares foram obtidos por Camassola et al (2004) em cultivo sólido de *P. echinulatum*, onde queda na atividade foi observada na primeira hora para FPA a 60°C, e por Ezeilo et al. (2020), para FPA de *Risosporus oryzae* UC2, que apresentou tempos de meia-vida de 10h a 40°C e 50°C, e de 1,5h a 60°C. Os dados demonstram uma baixa termoestabilidade de FPA em diferentes meios de cultivo e para diferentes microrganismos, sendo este um gargalo para sua aplicação em processos industriais.

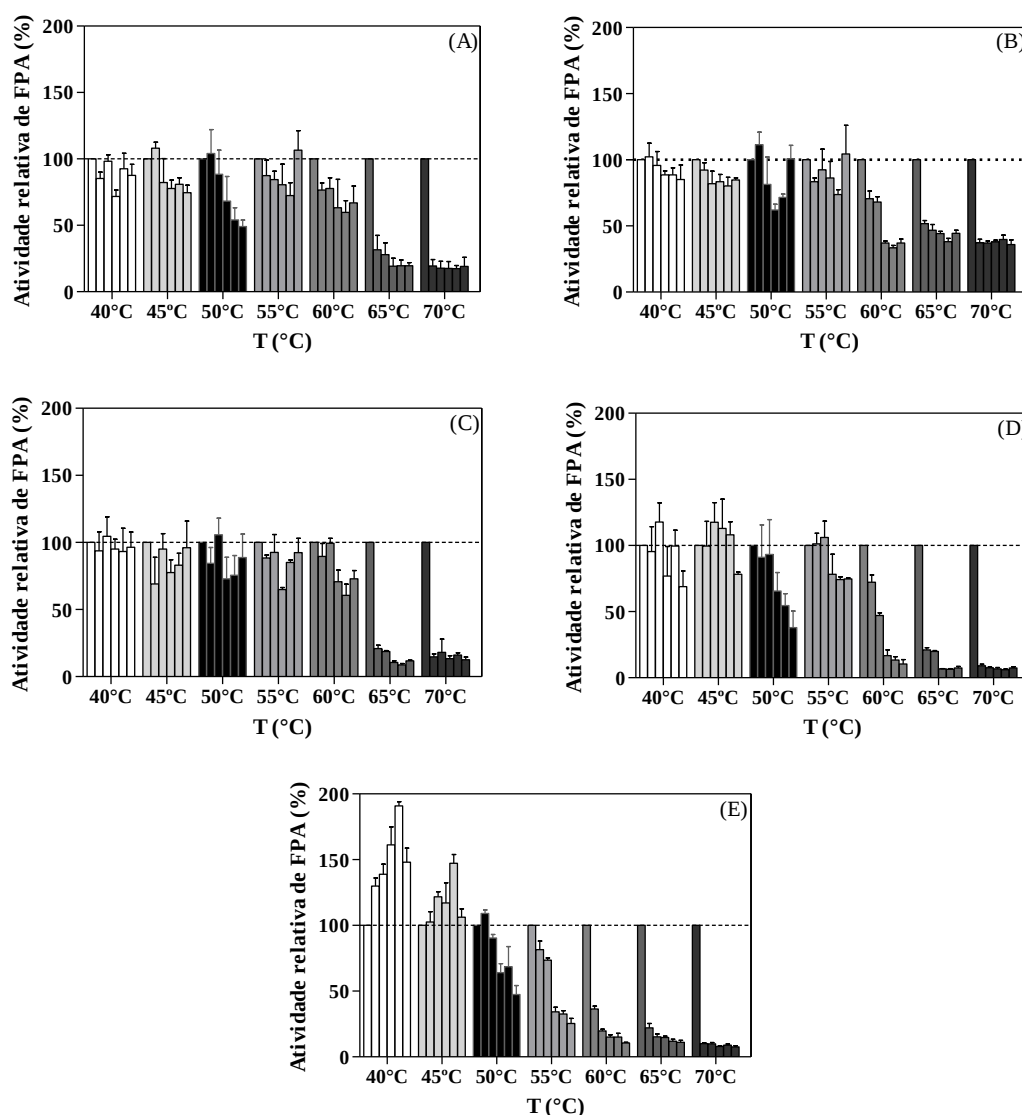


Figura 9. Termoestabilidade de FPA ao longo do tempo observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Os dados para a termoestabilidade de endoglicanases estão apresentados na Figura 10. As atividades relativas se mantiveram próximas a 100% para os extratos produzidos utilizando as biomassas lignocelulósicas, após 72h de incubação, para temperaturas até 55°C, enquanto que o extrato produzidos com celulose comercial chegou a atividades relativas próximas a 150% nas temperaturas de 40 e 55°C. Entretanto, em temperaturas superiores a 60°C, novamente foi constatada queda na atividade já nas primeiras horas, como havia ocorrido com FPA. As enzimas comerciais apresentaram termoestabilidade um pouco superior em 60°C, quando comparada aos extratos enzimáticos de *P. ucsense*, mantendo cerca de 50% de sua atividade após 72h nesta temperatura, porém, em temperaturas superiores, o comportamento não foi observado. Os resultados corroboram os obtidos anteriormente para outras biomassas lignocelulósicas, onde, em temperaturas superiores a 65°C, quedas drásticas de atividade foram observadas (Capítulo 4). Os resultados foram semelhantes aos obtidos para CMCases produzidas pela bactéria extremófila *B. aerius* CMCPs1, cuja maior termoestabilidade foi alcançada na temperatura de 50°C, com cerca de 80% de sua atividade relativa após 5h de incubação (Ganesan et al, 2020). Entretanto, vale ressaltar que esta é uma cepa extremófila, e, portanto, adaptada a altas temperaturas, o que não é o caso de *P. ucsense* S1M29. Já Zohri et al. (2022) observaram que endoglicanases produzidas por *A. niger* são estáveis em temperaturas mais altas, de 60°C, mantendo sua atividade por 90 minutos nestas condições, sendo superior a observada para as enzimas do presente estudo.

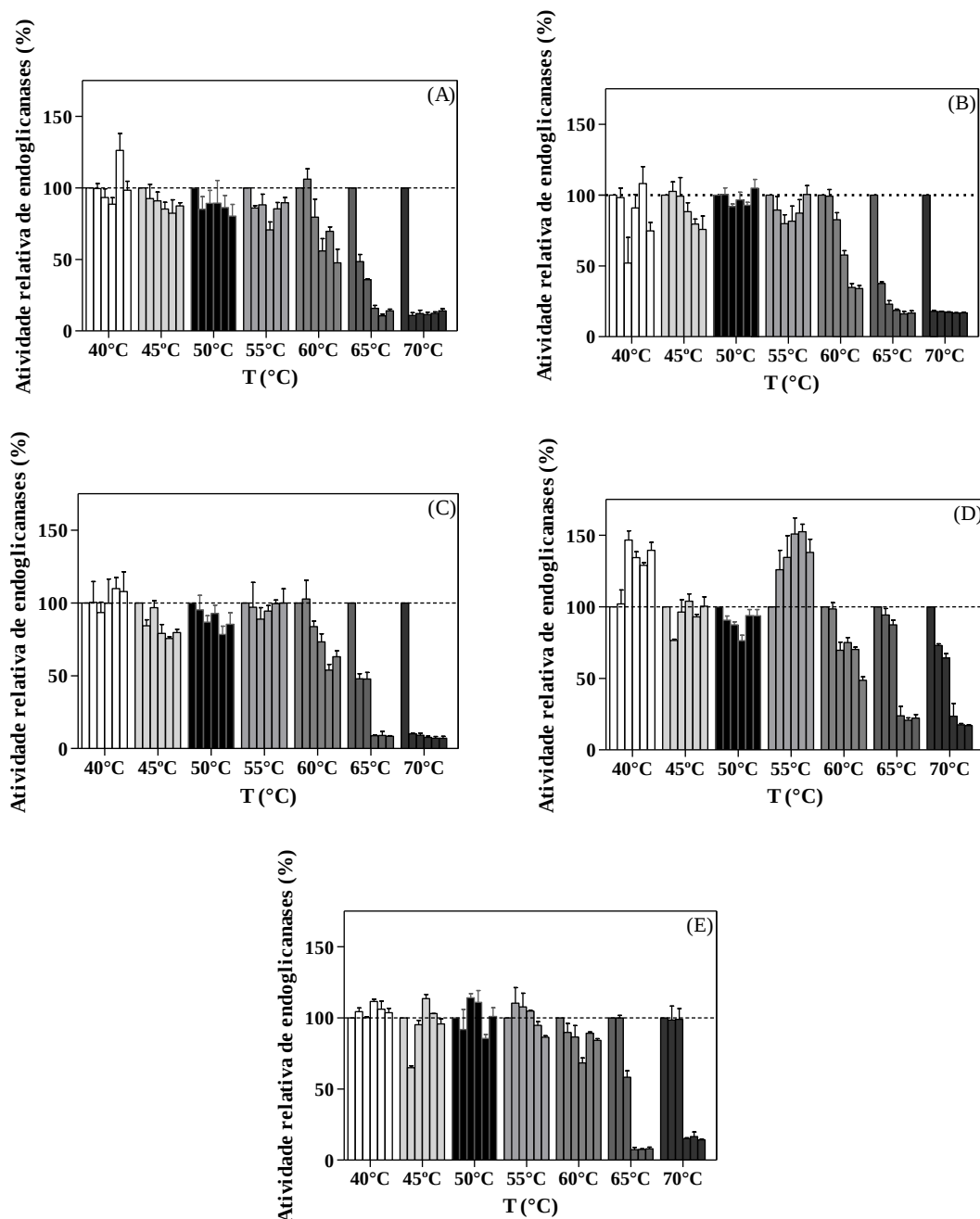


Figura 10. Termoestabilidade de endoglucanases ao longo do tempo observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Para β -glicosidases (Figura 11), foi observada diferença na estabilidade dos diferentes extratos produzidos por *P. ucsense* S1M29. O extrato produzido em RD apresentou maior estabilidade e atividades relativas superiores a 100% após 72h de incubação, nas temperaturas de 40 e 45°C, enquanto que o extrato produzido em regime descontínuo, porém com adição de licor (RDL) apresentou atividades superiores a 100% em 45 e 55°C. Nas demais temperaturas, seu comportamento foi similar, com atividades superiores a 50% após 72h para temperaturas até 65°C. Já o extrato produzido em RDA apresentou atividades muito próximas, iguais ou superiores a 100% em toda a faixa de temperatura avaliada entre 40 e 65°C, sendo a mais termoestável das β -glicosidases avaliadas, uma vez que a mesma estabilidade não foi observada para o extrato produzido com celulose, nas temperaturas de 55 e 65°C. Já o complexo enzimático Celluclast® apresentou queda em sua atividade em temperatura igual ou superior a 60°C. Em 70°C, todos os extratos apresentaram quedas abruptas na atividade enzimática já nas primeiras horas de processo, sendo novamente o extrato RDA que manteve atividades relativas de até 50% por mais tempo. O extrato produzido em RDA se mostrou mais estável que os extratos produzidos em estudos anteriores, utilizando bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante, cuja maior estabilidade foi observada em temperaturas mais amenas, até 50°C, com perfis semelhantes aos observados para RD e RDL (Capítulo 4). Esses resultados diferem dos obtidos por Camassola et al. (2004) que observaram atividade constante de β -glicosidases de *P. echinulatum* em todo o experimento, bem como do relatado por Kronemberger et al. (2021), onde β -glicosidases de um fungo filamentoso BS1, isolado do intestino de *Nausitora fusticula* se mostraram as enzimas mais resistentes ao calor, com apenas pequenos declínios de atividade em 70°C. Entretanto, Singh et al (2023) obtiveram resultados semelhantes, onde β -glicosidases de *Chaetomella* sp. também se mostraram instáveis a 70°C, com perda de 40% da atividade após 30 minutos e 90% após 240 minutos. Esses dados sugerem que, embora temperaturas mais elevadas favoreçam uma maior atividade de β -glicosidases, dependendo do microrganismo empregado em sua produção, quando mantidas por longos períodos de tempo, as mesmas podem desnaturar a enzima, prejudicando sua ação.

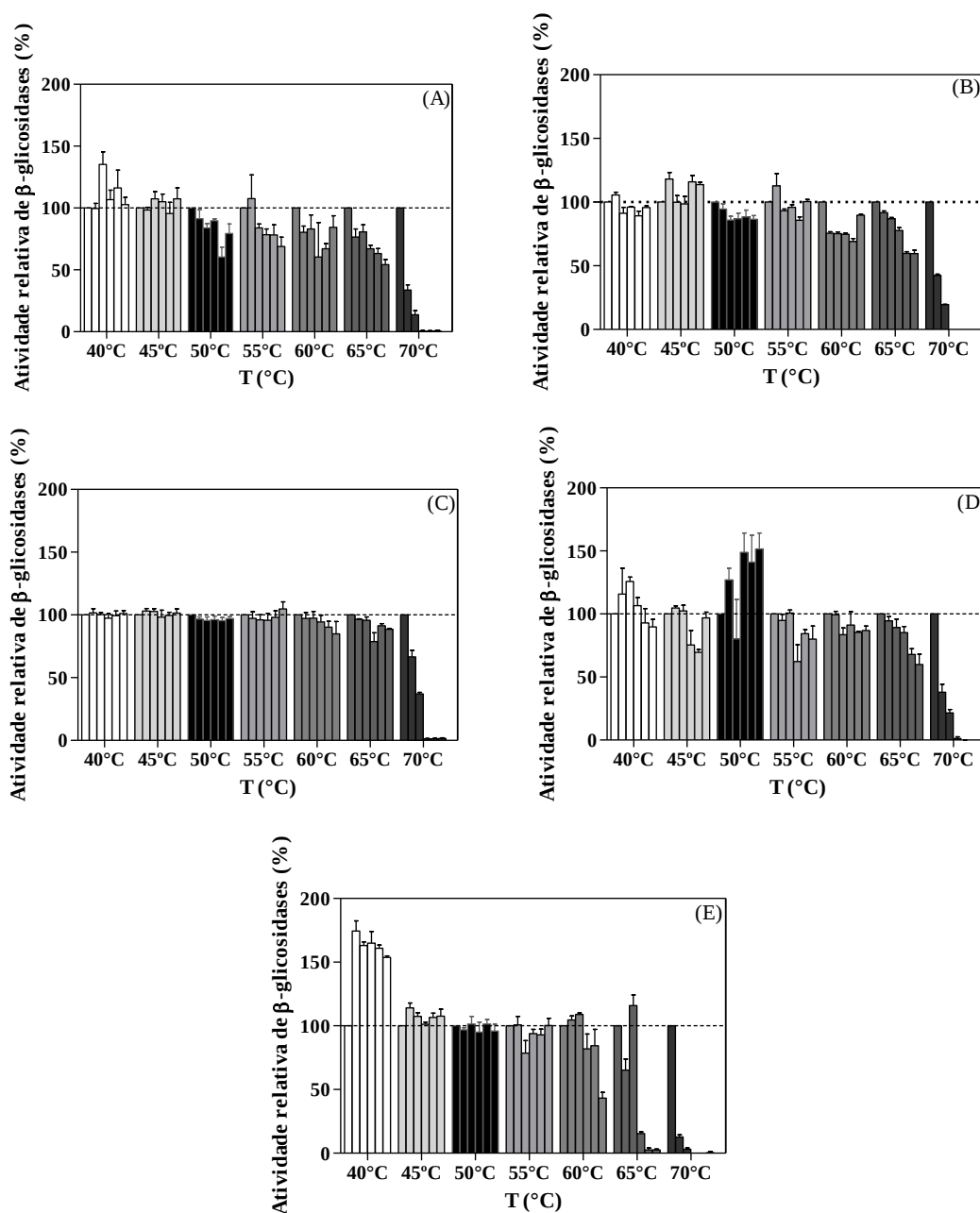


Figura 11. Termoestabilidade de β -glicosidases ao longo do tempo observada para quatro coquetés enzimáticos produzidos por *P. ucsense ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Os resultados para exoglicanases se assemelharam aos obtidos para β -glicosidases para os extratos RD e RDL, com atividades relativas superiores nas temperaturas de 40 e 45°C, respectivamente, mantendo, entretanto, boa estabilidade em temperaturas até 55°C. Já o extrato RDA apresentou atividades relativas superiores a 100% mesmo em temperatura de 55°C, decaindo com o aumento da temperatura. Para exoglicanases, o extrato enzimático produzido em celulose comercial se mostrou mais estável, permanecendo em 100% até 60°C, e superior a 50% mesmo em 65°C, resultado superior ao observado para o coquetel enzimático comercial. Em temperatura de 70°C, nenhum dos extratos apresentou estabilidade, perdendo suas atividades já nas primeiras horas. Uma maior sensibilidade a mudanças de temperatura, em comparação a β -glicosidases, também foi observada para a cepa fúngica BS1, isolada do intestino de *Nausitora fusticula* (Bivalvia: Teredinidae) que apresentou grandes variações no percentual de atividade a 52°C após 300 min de incubação, chegando próximo a zero (Kronemberger et al, 2021). Já Zohri et al. (2022) observaram que exoglicanases de *A. niger* apresentaram boa estabilidade em temperatura de 60°C por até 90 minutos, sendo esses resultados mais próximos aos observados no presente estudo.

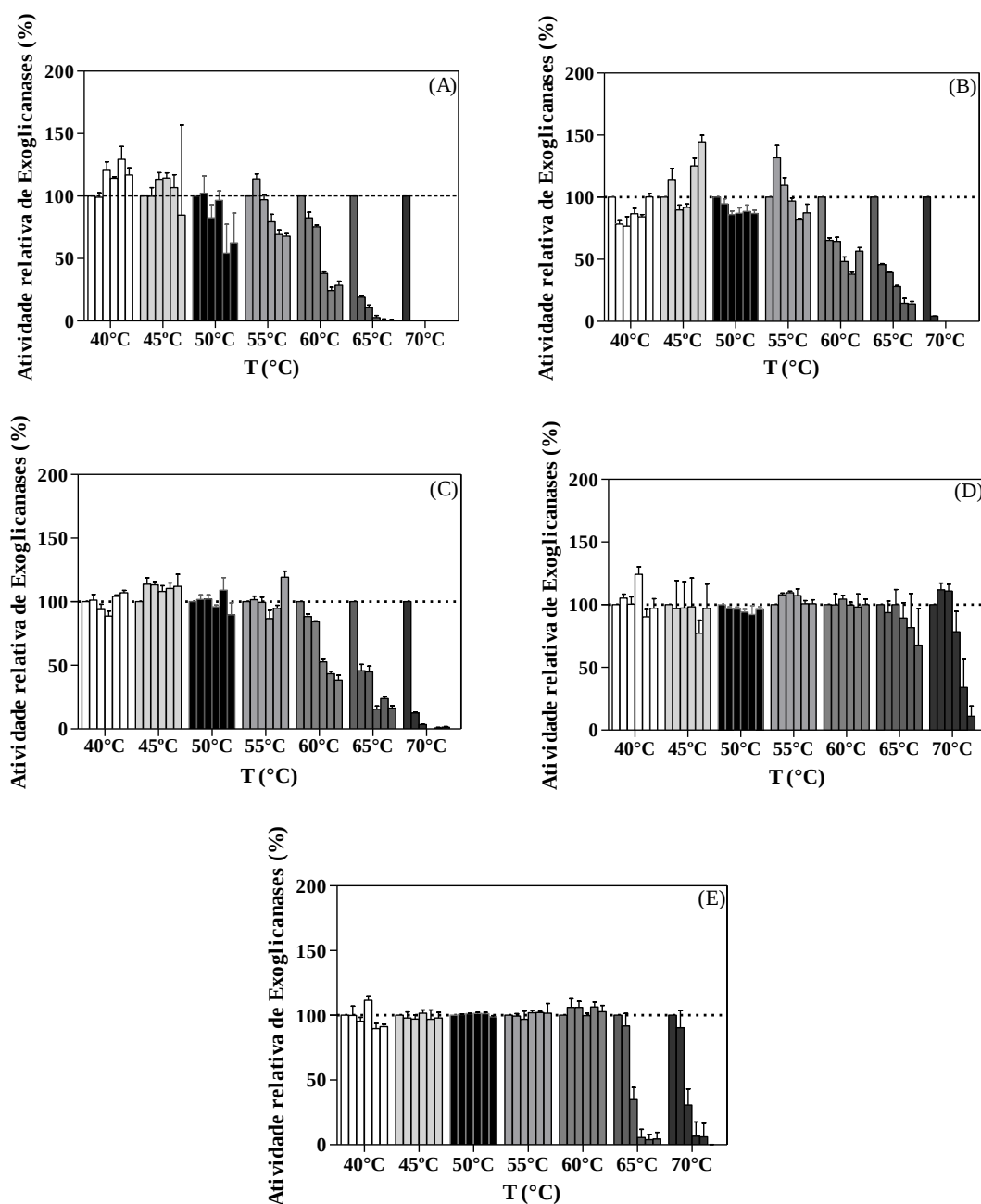


Figura 12. Termoestabilidade de exoglucanases ao longo do tempo observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

Assim como ocorreu para a estabilidade em diferentes pH, de um modo geral, xilanases se mostraram menos estáveis que as demais enzimas avaliadas (Figura 13). Para os extratos enzimáticos produzidos em RD e RDA, apenas com os resíduos sólidos provenientes da colheita do milho, atividades relativas superiores a 100% só foram observadas em 40°C, após 72h de incubação, sendo que a partir de 50°C, quedas de atividade superiores a 50% já foram observadas nas primeiras horas de incubação. Comportamento semelhante foi observado para o extrato produzido utilizando celulose como fonte de carbono e indutor. Já o extrato produzido em meio com adição de licor proveniente do pré-tratamento dos resíduos lignocelulósicos, uma maior estabilidade foi observada, indicando que o meio de cultivo pode ter interferido na estrutura da enzima formada, tornando-a mais estável a desnaturação. Para este extrato, atividades relativas superiores a 70% foram mantidas em todas as temperaturas avaliadas, mesmo após 72h de incubação. OS resultados foram superiores aos observados para o coquetel comercial, que foi capaz de manter cerca de 50% de sua atividade somente nas temperaturas de 40 e 45°C. Os resultados obtidos para RDL diferem dos observados para extratos enzimáticos produzidos em diferentes biomassas por *P. ucsense*, onde quedas de até 75% foram observadas já na primeira hora de incubação, em temperatura de 70°C (Capítulo 4). Por outro lado, os resultados se assemelham aos observados para xilanases de *R. oryzae*, que apresentaram tempos de meia vida de cerca de 27h e 9h, quando incubadas a 50°C e 60°C, respectivamente (Ezeilo et al, 2020). Esses resultados sugerem que a adição do licor ao meio de cultivo foi benéfica para a estabilidade das xilanases produzidas por *P. ucsense*, sendo necessários maiores estudos para entender quais mecanismos da enzima foram modificados pela presença do substrato, e como comportamentos semelhantes poderiam ser induzidos nas demais enzimas avaliadas, permitindo assim ampliar sua gama de aplicação em processos biotecnológicos.

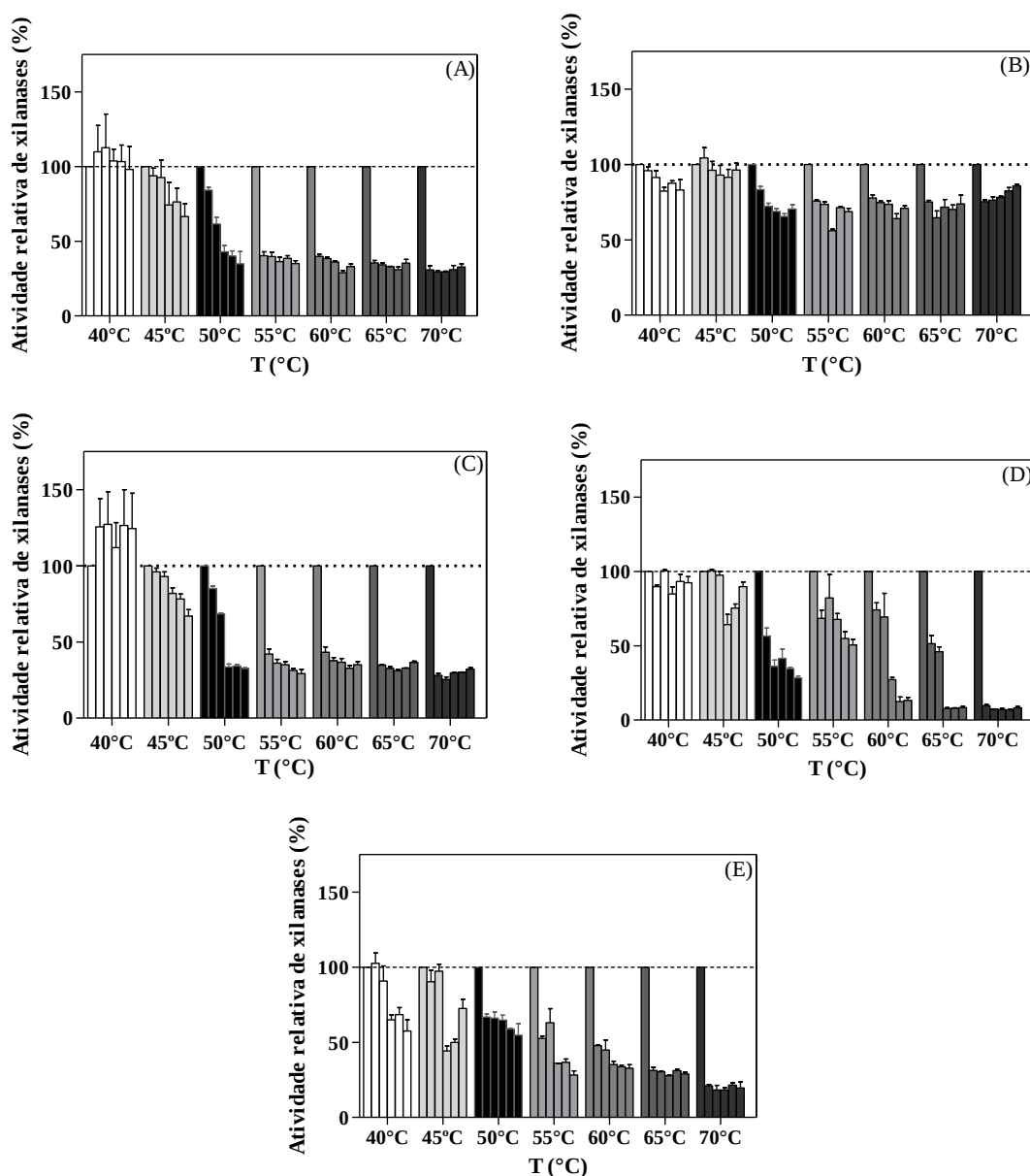


Figura 13. Termoestabilidade de xilanases ao longo do tempo observada para quatro coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense ucsense* em diferentes condições – regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (A), regime descontínuo utilizando resíduos da colheita de milho e licor proveniente de seu pré-tratamento como substratos (B), regime descontínuo alimentado utilizando resíduos da colheita de milho como substrato (C) e celulose (D) – e um controle com enzima comercial Celluclast® (E) em pH 4,8. Os valores nas colunas são referentes à atividade nos tempos de 0, 1, 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo essas atividades apresentadas como relativas ao tempo 0h (100%).

4.6.4.6 Hidrólise

A fim de determinar a eficiência de hidrólise dos coquetéis enzimáticos produzidos por *P. ucsense* utilizando os resíduos da colheita do milho como fonte de carbono e indutor,

em diferentes regimes de produção, os mesmos foram aplicados na hidrólise dos mesmos resíduos de milho submetidos a diferentes pré-tratamentos – hidrotérmico, NaOH 2% e H₂SO₄ 1% - e *in natura*, bem como as biomassas bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante pré-tratados por explosão a vapor, e da polpa de eucalipto/pinus tratada em processo com peróxido alcalino. Como controle, foram utilizadas uma enzima comercial - Celluclast® - e um extrato enzimático produzido por *P. ucsense* em meio contendo celulose. Os resultados obtidos para liberação de glicose no meio estão apresentados na Figura 14.

Os resultados obtidos demonstram que, quando aplicados na hidrólise de resíduos do milho, os extratos enzimáticos de *P. ucsense* se mostraram capazes de liberar quantidades de glicose similares ao preparo comercial Celluclast®, no mesmo intervalo de tempo, para três condições de biomassa: *in natura*, pré-tratada com H₂SO₄ 1% e com pré-tratamento hidrotérmico. Dentre os pré-tratamentos aplicados na biomassa, os pré-tratamentos ácido e hidrotérmico não ocasionaram mudanças físicas visíveis na estrutura da biomassa, quando comparada a biomassa *in natura*, enquanto que o pré-tratamento alcalino transformou o material fibroso em filamentos aparentemente mais macios e quebradiços. Considerando-se isso, percebe-se que as enzimas foram capazes de hidrolisar com maior facilidade o material que se assemelhava ao de seu crescimento, mesmo que nenhum pré-tratamento tenha sido aplicado, e não demonstraram aptidão para hidrolisar o material pré-tratado que apresentava a maior remoção de lignina e maior percentual de celulose (Capítulo 5).

Dois fatores podem ter influenciado neste resultado, o primeiro deles sendo referente a padronização realizada para uma atividade de 10 ou 15 FPU por grama de substrato, dependendo do extrato enzimático. Com isso, para chegar a esta atividade o volume de solução enzimática de *P. ucsense* foi grande e o adicionado para a enzima comercial Celluclast® em comparação às demais enzimas foi muito menor, afetando assim o volume de tampão adicionado, e consequentemente, o pH da reação, um fator muito importante para o processo de hidrólise enzimática. Uma vez que o pré-tratamento com NaOH deixa a biomassa com pH mais básico, a presença de menor volume de tampão não foi capaz de manter o pH ácido do processo, o que explicaria o fato que nenhum dos extratos brutos foi capaz de hidrolisar a biomassa com sucesso. O outro fator que pode ser considerado, é que as enzimas tenham maior afinidade com o substrato em que foram produzidas e com substratos semelhantes, quando consideramos os resultados obtidos para as demais biomassas avaliadas.

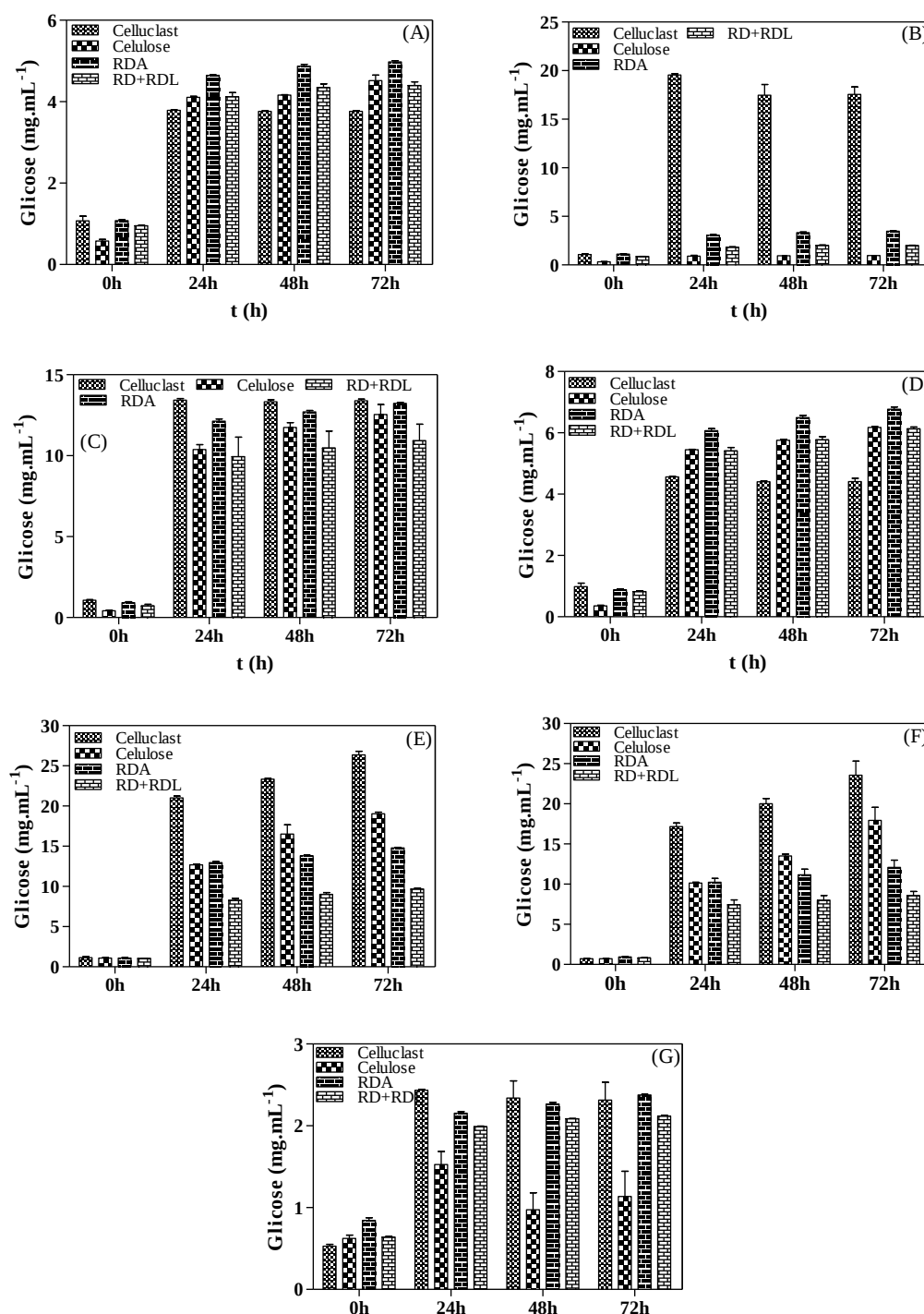


Figura 14. Glicose liberada da hidrólise de resíduos da colheita do milho (A) *in natura*, (B) pré-tratado com NaOH 2%, (C) pré-tratado com H₂SO₄ 1%, (D) pré-tratado hidrotérmico, e das biomassas (E) bagaço de cana-de-açúcar, (F) capim elefante e (G) polpa de eucalipto/pinus, por diferentes soluções enzimáticas obtidas de *P. ucsense*. As soluções enzimáticas foram obtidas em meios de cultivo contendo resíduos da colheita de milho submetidos a pré-tratamento hidrotérmico em RDA, e/ou RD, acrescidos ou não de licor proveniente de pré-tratamento (RDL). Utilizou-se volume de enzima para atividade total de 15 FPU.g⁻¹ do substrato a ser hidrolisado (exceto RD+RDL – 10 FPU.g⁻¹). Como controle foi utilizado o complexo enzimático comercial Celluclast® e enzimas produzidas por *P. ucsense* em RD utilizando celulose comercial como fonte de carbono.

Para bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante, o preparo comercial foi muito mais eficiente na liberação de açúcares do que os extratos enzimáticos de *P. ucsense* crescidos em resíduos do milho. Esses dados são similares aos obtidos para a hidrólise dessas biomassas por enzimas produzidas em meios contendo as mesmas, embora nesse caso as enzimas produzidas em bagaço de cana de açúcar alcançaram resultados muito próximos as enzimas comerciais (Capítulo 2). Já para a polpa de eucalipto/pinus, os extratos crescidos em resíduos do milho alcançaram resultados similares ao preparo comercial. O bom desempenho dos extratos enzimáticos de *P. ucsense* pode ser explicado pela presença de bons níveis de β -glicosidases (Capítulo 5), uma vez que a importância do papel destas enzimas para a degradação eficiente de materiais lignocelulósicos é bastante conhecida, uma vez que a celobiose, por ela hidrolisada, é um inibidor da atividade de endoglicanases e exoglicanases (Almeida *et al*, 2019). Estes dados demonstram o grande potencial das enzimas produzidas por *P. ucsense*, mesmo em seu estado bruto, e a importância de maiores investigações a respeito de seu processo de *downstream* ou de produção *in situ*, para sua aplicação em processo de biorrefinaria.

4.6.5 Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que as enzimas produzidas por *P. ucsense* utilizando resíduos da colheita do milho, são, em sua maioria, estáveis em uma ampla faixa de temperaturas e pH, mesmo em seu estado bruto e apresentam boa atividade em temperaturas e pH que condizem aos utilizados para processos de biorrefinaria. Essas características se mostram relativamente importantes para viabilizar processos em que essas enzimas possam ser produzidas e utilizadas *in situ*, não havendo, portanto, a necessidade de purificação e formulação das mesmas, barateando assim os custos de sua utilização, um dos maiores gargalos enfrentados para o estabelecimento da tecnologia enzimática na indústria.

5 DISCUSSÃO GERAL

O estudo da influência do tempo de crescimento do pré-inóculo de *P. ucsense* revelou que diferentes tempos de crescimento resultam em variação na concentração enzimática no cultivo inoculado, sendo que tempos mais longos de cultivo de pré-inóculo resultam em maiores atividades enzimáticas em períodos de tempo mais curtos. Para FPA e xilanases, atividades superiores foram observadas em cultivos inoculados com pré-inóculos crescidos por 48 e 72 horas. Já para exoglicanases e β -glicosidases, as maiores atividades foram obtidas com pré-inóculos de 72h, enquanto que para endoglicanases, as maiores atividades enzimáticas foram obtidas para o pré-inóculo de 96 horas.

Quanto as diferentes biomassas lignocelulósicas utilizadas, capim elefante e bagaço de cana-de-açúcar foram avaliados para produção de celulasas e xilanases em seu estado *in natura* e pré-tratados por explosão a vapor, em frascos agitados. Foi observado que, para bagaço de cana-de-açúcar, o pré-tratamento por explosão a vapor não influenciou significativamente a produção da maioria das enzimas, exceto para exoglicanases. Já nos cultivos com capim elefante, as atividades enzimáticas foram superiores na biomassa pré-tratada para a maioria das enzimas, exceto para β -glicosidases, onde não apresentou influência significativa. Com isso, a biomassa pré-tratada foi mantida para a continuidade do trabalho. Os dados obtidos diferem dos observados por Grigorevski-Lima *et al.* (2013), que observaram que o pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar influenciou negativamente a produção de xilanases, endoglicanases e β -glicosidases por *T. atroviride* 676.

Em relação aos resíduos da colheita de milho, diferentes pré-tratamentos foram aplicados a mesma, sendo eles hidrotérmico, ácido, básico e com imidazol. A avaliação da composição da biomassa *in natura* e após ser submetida aos pré-tratamentos demonstrou que houve incremento no percentual de celulose nos tratamentos ácido (devido a perda de hemicelulose) e básico (devido a perda de lignina), enquanto que para o tratamento hidrotérmico houve redução. Quanto a lignina insolúvel, maiores remoções foram observadas nos tratamentos com NaOH e imidazol, porém uma boa remoção também ocorreu no tratamento hidrotérmico. Já as quantidades de açúcares presentes nos licores provenientes dos pré-tratamentos possibilitam sua utilização na suplementação do meio de cultivo para produção enzimática, desde que os ajustes de nutrientes e pH necessários sejam feitos.

Quando avaliados na produção enzimática em frascos agitados, os resultados demonstraram que para FPA, endoglicanases e xilanases, a biomassa submetida a pré-

tratamento com NaOH e hidrotérmico, resultou em atividades superiores, a despeito do fato de que o tratamento com ácido apresentou uma maior recuperação de celulose. Já para β -glicosidases e exoglicanases, o tratamento com imidazol também se mostrou eficiente. Novamente, os dados observados diferem da literatura, onde Brijwani & Vadlani (2011) reportaram redução na atividade enzimática de *A. oryzae* e *T. reesei* quando crescidos em casca de soja submetida a pré-tratamento alcalino, em relação ao seu crescimento na biomassa pré-tratada em ácido e vapor. Enquanto que os dados obtidos por Sarkar & Aikat (2012) corroboram o do presente estudo, uma vez que a utilização de pré-tratamento alcalino em palha de arroz resultou em incremento na produção de celulasas e endoglicanases por *A. fumigatus*. A comparação dos dados demonstra que diferentes microrganismos podem reagir de forma diferenciada à presença de biomassas *in natura* e a seus diferentes pré-tratamentos, quanto à produção de enzimas do complexo celulolítico. Diante dos resultados, o pré-tratamento hidrotérmico foi mantido, uma vez que minimiza o uso de químicos e apresenta bons resultados em produção enzimática quando comparado aos demais pré-tratamentos.

O efeito dos aditivos sacarose, farelo de trigo e farelo de soja também foi avaliado, quando utilizados em conjunto com as biomassas lignocelulósicas. Para bagaço de cana-de-açúcar, a combinação das concentrações de 1 g.L⁻¹ de sacarose, 10 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 4 g.L⁻¹ de farelo de soja, apresentou aumento de 7,5 vezes na atividade de FPA e xilanasas, cerca de 6,5 vezes para endoglicanases, 1,5 vezes para β -glicosidases e 8 vezes para exoglicanases, quando comparado ao meio padrão proposto por Reis *et al.* (2013). Tal aumento observado para exoglicanases é importante, uma vez que as mesmas são importantes enzimas na hidrólise da celulase, encontradas em maior proporção em preparados comerciais e aparentemente, responsáveis pela maioria das clivagens de ligações das regiões cristalinas da celulose.

Para o capim elefante, as concentrações de 2 g.L⁻¹ de sacarose, 5 g.L⁻¹ de farelo de trigo e 4 g.L⁻¹ de farelo de soja se mostrou a mais indicada, com incrementos significativos em relação a condição padrão (proposta por Reis *et al.* 2013) nas atividades de FPA, xilanasas e β -glicosidases, alcançando um aumento de 6,25 vezes para exoglicanases. Esses dados corroboram os obtidos por Costa *et al.* (2016), que observaram que a presença de farinha de soja (até 5 g.L⁻¹), com seu alto teor de proteína apresentaram efeito positivo na produção de celulasas, atuando como fonte de nitrogênio orgânico para o crescimento.

Para bagaço de cana de açúcar e capim elefante, a suplementação do meio com celulose comercial e lactose também foi avaliada. A presença de lactose no meio de cultivo

interfere negativamente na atividade da maioria das enzimas avaliadas, o que é corroborado por dados da literatura, que apontam que, embora a lactose seja um bom indutor para a produção de celulasas por fungos do gênero *Trichoderma*, o mesmo não acontece com *Penicillium* (Vaishnav et al, 2018). Já a substituição parcial das biomassas por celulose resultou em incrementos, porém apenas para FPA e endoglicanases, não havendo diferenças significativas para β -glicosidases e exoglicanases, e apresentando queda na atividade de xilanases. Um fato importante a ser destacado é que o meio contendo 100% de celulose comercial não resultou em diferença em relação aos meios compostos por 100% de capim elefante ou 100% de bagaço de cana de açúcar, na atividade de β -glicosidases, sugerindo que meios compostos por biomassas lignocelulósicas favorecem a produção dessa enzima.

Quanto aos resíduos da colheita do milho, a otimização do meio de cultivo, em relação aos aditivos anteriormente citados, resultou nas seguintes concentrações finais: 7,5 g.L⁻¹ de farelo de soja, 0,5 g.L⁻¹ de sacarose e 1 g.L⁻¹ de farelo de trigo. Com as concentrações de aditivos estabelecidas, a possibilidade da utilização do licor proveniente do pré-tratamento foi avaliada para esta biomassa. Para FPA, não foi observado incremento na atividade enzimática, enquanto que para endoglicanases, condições com alta concentração de licor no meio apresentaram diferença significativa na atividade da enzima. Para xilanases, a presença de licor, em qualquer quantidade, apresentou queda significativa na atividade enzimática, sendo as atividades maiores obtidas de 24 U.mL⁻¹. Para β -glicosidases e exoglicanases, a presença de altas concentrações de licor não interferiu ou, pelo contrário, aumentou a atividade enzimática.

Com as condições e concentrações de biomassas e aditivos definidas em frascos agitados, a próxima etapa do trabalho foi realizada em biorreator de agitação mecânica, em regime descontínuo e descontínuo alimentado. Analisando-se os resultados obtidos para bagaço de cana-de-açúcar, capim elefante e polpa de eucalipto/pinus em regime descontínuo, o cultivo com bagaço de cana-de-açúcar destacou-se na atividade de FPA, com 1 U.mL⁻¹ pós 96h de cultivo, enquanto que para o controle com celulose comercial ocorreu um pico de 0,62 U.mL⁻¹ em 72h. Para o capim-elefante, o pico de atividade foi de 0,3 U.mL⁻¹ após 96h, sendo que o cultivo com polpa de eucalipto/pinus alcançou somente 0,2 U.mL⁻¹ neste mesmo tempo. As atividades enzimáticas foram inferiores as observadas por Reis *et al.* (2013) utilizando o mesmo microrganismo em concentrações de 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de celulose comercial. A atividade menor observada no presente trabalho, mesmo para o cultivo padrão, pode ser explicada pela menor concentração de celulose utilizada (10 g.L⁻¹

¹⁾ no presente trabalho, que foi limitada pelo menor percentual de celulose presente nas biomassas lignocelulósicas, que tornaria inviável a realização de um cultivo submerso em concentrações muito superiores, visto a insolubilidade das mesmas. Ainda de acordo com Reis *et al.* (2013), a atividade enzimática é proporcional ao aumento da fonte de carbono indutora.

Para endoglicanases e exoglicanases, foi observado um comportamento semelhante ao de FPA, com as maiores atividades obtidas para o bagaço de cana (6,2 U.mL⁻¹ e 1,5 U.mL⁻¹ respectivamente), seguidas das atividades obtidas com celulose, capim elefante e polpa de eucalipto/pinus. Porém, para β -glicosidases, foi observado que, apesar do bagaço de cana-de-açúcar continuar apresentando a maior atividade (cerca de 0,7 U.mL⁻¹), a segunda maior atividade foi observada para a polpa de eucalipto e pinus, com cerca de 0,5 U.mL⁻¹. Quanto a atividade de xilanases, os maiores picos de atividade foram observados também para o bagaço de cana-de-açúcar, seguido da celulose, da polpa de eucalipto/pinus, e por último, o capim elefante, com atividades de cerca de 60, 44, 36 e 24 U.mL⁻¹, respectivamente.

Quanto aos cultivos em regime descontínuo alimentado para estas mesmas biomassas, o mesmo mostrou incrementos na produção enzimática por *P. ucsense* para o controle com celulose, bagaço de cana-de-açúcar e capim elefante, porém o mesmo efeito não foi observado para a polpa de eucalipto/pinus. O cultivo realizado com PEP apresentou problemas em sua reologia devido a características da própria biomassa, não tendo sido possível realizar as alimentações regulares determinadas, resultando em queda nas atividades enzimáticas em relação ao regime descontínuo. Diante desses resultados, a utilização da polpa de eucalipto/pinus para produção enzimática em processos submersos parece não ser indicada, ao contrário das demais biomassas utilizadas, que se mostraram promissoras em RDA.

Para FPA, o aumento de atividade enzimática observado em RDA para capim elefante foi de 237%, para bagaço de cana-de-açúcar foi de 121% e para o controle com celulose de 106%, enquanto que para β -glicosidases, os aumentos foram de 783%, 362% e 79%, respectivamente. Já para endoglicanases e exoglicanases, os aumentos foram menos expressivos. Endoglicanases alcançaram 121%, 43% e 9,5% de incremento utilizando capim elefante, celulose e bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente. Já os incrementos de exoglicanase foram de 104% em bagaço de cana-de-açúcar, 83% em celulose e 76% em capim elefante. Em xilanases, o maior aumento percentual na atividade enzimática foi observado para o controle com celulose, com 292%, seguido de 124% em capim elefante e

111% em bagaço de cana-de-açúcar. Os incrementos observados nas atividades enzimáticas em RDA podem ser explicados pelo fato de que a adição de celulose, ou seu equivalente, em pequenas parcelas durante o cultivo, permite a utilização de maiores concentrações, diminuindo, entretanto a repressão catabólica que pode ocorrer em elevados níveis de celulose, bem como os problemas com a dissolução de oxigênio do meio que ocorre quando há elevadas concentrações de sólidos suspensos (Reis, 2017; Reis *et al.* (2013); Esterbauer *et al.* (1991); Ganesh *et al.* (2000).

O estudo dos aditivos em biorreator para o bagaço de cana de açúcar e capim elefante não apresentou incrementos elevados nas atividades enzimáticas. Para bagaço de cana de açúcar, houve queda nas atividades de FPA e xilanases em todas as condições testadas, enquanto que para as demais enzimas, aumento nas atividades foi observado na condição com o aumento da concentração de aditivos no meio no início do cultivo, com 55% na atividade de endoglicanases, 54% na de exoglicanases e 74% na de β -glicosidases, sendo a condição com alimentação dos aditivos, juntamente com a biomassa lignocelulósica, não favorável. Já a substituição de parte do bagaço por celulose, que havia alcançado resultados significativos para FPA e endoglicanases em frascos, não apresentou o mesmo padrão em biorreator.

Para capim elefante, também houve queda na atividade FPA em todas as condições avaliadas. Já para endoglicanases, aumento de 39% na atividade foi observada quando as novas concentrações propostas de aditivos foram alimentadas juntamente com a biomassa lignocelulósica, e de 13% quando 50% da biomassa lignocelulósica foi substituída por celulose comercial. Para β -glicosidases, houve queda de 22% na atividade quando 50% do capim elefante foi substituído por celulose e incremento de 141% quando as novas concentrações de aditivos foram alimentadas juntamente com a biomassa. Exoglicanases apresentaram comportamento semelhante a β -glicosidases, com aumento de 140% na atividade nesta mesma condição, enquanto que as demais condições apresentaram resultados semelhantes entre si. Para xilanases, a condição com substituição de parte da biomassa apresentou incremento na atividade de 40%. Estes dados demonstram que, para o capim elefante, o cultivo em biorreator apresentou menos impacto na repetição dos resultados, em relação aos obtidos nos frascos agitados.

Os resíduos da colheita do milho, ao serem avaliados em biorreator com agitação mecânica, apresentaram resultados relevantes em relação as demais biomassas avaliadas. Para FPA, endoglicanases e xilanases, em regime descontínuo, a condição onde apenas a parte sólida da biomassa lignocelulósica foi utilizada, e o pré-inóculo foi crescido na

mesma biomassa, apresentou as maiores atividades enzimáticas, chegando a 1,5 U.mL⁻¹, 10,2 U.mL⁻¹ e 22 U.mL⁻¹, respectivamente. Já para as enzimas β -glicosidases e exoglicanases, as maiores atividades foram obtidas no cultivo onde 25% do volume líquido foi composto por licor, com 7,8 U.mL⁻¹ e 6,3 U.mL⁻¹, respectivamente. Estes resultados foram superiores aos obtidos para as demais biomassas avaliadas no crescimento de *P. ucsense*, sendo 1,5 vezes superior a maior atividade anteriormente alcançada para FPA, cerca de 1,6 vezes para endoglicanases, 4,2 vezes para exoglicanases 11 vezes para β -glicosidases. Entretanto, as atividades de FPA e endoglicanases alcançadas ainda são inferiores as obtidas por Reis *et al.* (2013) utilizando a mesma linhagem e celulose comercial como substrato, mas é superior a atividade de β -glicosidases alcançada pelos autores. Para xilanases, entretanto, os resíduos de colheita do milho não se mostraram eficientes indutores, uma vez que todas as demais biomassas anteriormente avaliadas apresentaram atividades superiores a atual.

Em relação ao regime descontínuo alimentado, para os resíduos da colheita do milho, o ganho em atividade enzimática não foi tão elevado quanto o observado para as demais biomassas, com a mudança de processo. As atividades enzimáticas alcançadas foram 11% superiores ao RD para FPA, 34% para endoglicanases, 9% para β -glicosidases, 22% para exoglicanases, e 32% para xilanases. Uma das causas que pode explicar esse comportamento é que apenas 50% da concentração equivalente de celulose foi alimentada no presente estudo, em relação aos estudos com as demais biomassas. Isso ocorreu devido a estrutura fibrosa da biomassa proveniente dos resíduos do milho, que não permitiu a adição de maiores volumes da mesma no cultivo líquido.

Através de zimogramas foi possível observar que houve produção de diferentes isoformas de endoglicanases e xilanases, de acordo com a biomassa utilizada. As isoformas de endoglicanases produzidas também foram afetadas pela forma de condução do processo (RD e RDA), enquanto que apenas uma isoforma de β -glicosidases foi produzida por *P. ucsense* em todas as condições avaliadas. Os dados podem indicar que o aumento na atividade enzimática em RDA possa se dar não somente devido a uma maior atividade enzimática das isoformas produzidas em RD, mas também devido à produção de novas isoformas de algumas das enzimas avaliadas. As enzimas produzidas também foram caracterizadas por suas atividades ótimas e estabilidade, além de sua eficiência de hidrólise.

Quanto a atividade ótima, em relação à FPA, as enzimas produzidas utilizando as biomassas lignocelulósicas são mais ativas em temperaturas mais elevadas, entre 55 e 65°C, enquanto que as enzimas produzidas utilizando celulose e a enzima comercial são

mais ativas na temperatura de 55°C. Esses resultados corroboram os obtidos por Camassola *et al.* (2004), que observaram que a atividade de FPA produzidas em biomassa lignocelulósica por *P. echinulatum*, aumentou em temperaturas acima de 60°C. Para endoglicanases, foi observado que a temperatura de reação não possui grande efeito sobre sua atividade, uma vez que foi semelhante em todas as condições avaliadas.

B-glicosidases e exoglicanases se mostraram mais ativas em temperaturas mais elevadas, entre 50 e 70°C. Novamente, os resultados se mostram condizentes aos obtidos para as enzimas produzidas em estado sólido por *P. echinulatum*, cuja atividade de β -glicosidases foi incrementada em temperaturas mais elevadas (Camassola *et al.*, 2004). Temperaturas tão elevadas (65-70°C) só foram observadas como ótimas para xilanases produzidas utilizando biomassas lignocelulósicas por *P. ucsense*, temperatura na qual as enzimas produzidas com celulose e a comercial se mostraram menos ativas. As elevadas temperaturas ótimas observadas para o complexo celulolítico de *P. ucsense* sugerem uma certa tendência termófila das enzimas produzidas em biomassas lignocelulósicas, podendo ser um indicativo que seu crescimento nestes substratos torna as ligações responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional das enzimas mais fortes. Isso dificultaria sua desnaturação através da destruição de ligações fracas e pontes de hidrogênio, que ajudam a manter a estrutura tridimensional (Sulyman *et al.*, 2020).

Quanto ao pH ótimo, para FPA, as enzimas produzidas por *P. ucsense* se mostraram mais ativas em pH mais ácidos, de 4 e 5,5. Novamente os dados corroboram os obtidos em cultivo sólido para *P. echinulatum*, onde as atividades em FPA também foram superiores em valores de pH ácidos, porém a atividade ótima foi observada no pH 4,8 (Camassola *et al.*, 2004). Para endoglicanases, novamente os valores de pH mais ácidos resultaram em atividades superiores, exceto para os extratos produzidos em resíduos da colheita de milho, onde permaneceram próximas a 100% em toda a faixa de pH avaliada. Para β -glicosidases, apenas as enzimas comerciais e as produzidas em regime descontínuo em resíduos da colheita do milho mantiveram atividade próxima ao padrão em todos os pH avaliados, sendo que os demais extratos de *P. ucsense* demonstraram quedas mais acentuadas na atividade conforme o aumento do pH, conforme havia sido observado por Camassola *et al.* (2004), onde a máxima atividade enzimática foi obtida entre pH 4 e 4,5. Xilanases apresentaram, na maioria dos extratos avaliados, atividades relativas extremamente baixas em relação ao controle, para todos os valores de pH, demonstrando que estas enzimas são as mais dependentes do pH para sua atuação. Entretanto, vale destacar os extratos produzidos em resíduos da colheita de milho, que apresentaram atividades muito superiores

as observadas para o extrato produzido em celulose e ao complexo comercial, sendo as maiores atividades observadas em pH 4 e 4,5, opondo-se aos dados obtidos para as demais biomassas avaliadas. Novamente, os dados obtidos demonstram as diferenças obtidas na produção dos complexos enzimáticos de *P. ucsense* de acordo com o meio de cultivo utilizado e o processo de produção empregado.

A efetiva degradação do material lignocelulósico para o uso em biorrefinarias é dependente da utilização de enzimas com elevada atividade e estabilidade em amplas faixas de pH e temperatura (Maleki *et al.*, 2020). Os extratos enzimáticos produzidos por *P. ucsense* utilizando diferentes fontes de carbono apresentaram diferentes comportamentos em relação a sua estabilidade na faixa de pH avaliada. Para FPA, o extrato produzido com bagaço de cana-de-açúcar foi mais estável nos valores de pH 4,5, 4,8 e 6 após 72h de avaliação. Já para enzimas produzidas com capim elefante, as atividades relativas permaneceram superiores a 100% apenas nas primeiras 24h no pH 4,8. Os extratos crescidos em resíduos do milho apresentaram maior estabilidade entre 4 e 5,5, mantendo 50% de sua atividade inicial após 72h de incubação. Estes resultados foram superiores aos observados para as enzimas produzidas em celulose comercial e para Celluclast®, que caíram abaixo de 100% já em 24h, ficando próximas ou inferiores a 50% de atividade relativa após 72h, em todos os valores de pH avaliados.

Os dados obtidos para endoglicanases demonstram que, para as enzimas produzidas com biomassas lignocelulósicas, as atividades relativas permanecem superiores ou muito próximas a 100% após 72h em todos os pHs avaliados, mostrando-se mais estáveis que o complexo comercial. Entretanto, as enzimas produzidas com celulose apresentaram valores próximos a 100% de atividade, após 72h, apenas nos valores de pH de 4,8 e 5. Já β -glicosidases se mostraram as enzimas mais estáveis produzidas nas diferentes biomassas lignocelulósicas avaliadas, com atividades relativas próximas a 100% em toda a faixa de pH avaliada, bem como no padrão sem controle de pH, um comportamento muito semelhante ao controle com Celluclast®. Por outro lado, β -glicosidases produzidas com celulose comercial se mostraram menos estáveis. Este dado pode ser explicado pelo fato de que a expressão enzimática nos fungos é fortemente influenciada pela natureza, composição química e estado físico da fonte de carbono, o que faz com que o mesmo microrganismo expresse uma gama de diferentes isoenzimas (Ezeilo *et al.*, 2019), resultando assim em enzimas com diferentes níveis de estabilidade dependendo do substrato.

A avaliação da estabilidade de exoglicanases em diferentes pH demonstrou que as enzimas produzidas em resíduos da colheita do milho são mais estáveis na faixa entre 4 e 5,

de maneira muito semelhante as β -glicosidases, enquanto que as enzimas produzidas em celulose mostraram um perfil mais semelhante ao do complexo Celluclast[®], onde as atividades permaneceram muito próximas a 100% em todo o período avaliado. Se β -glicosidases e exoglicanases se mostraram, de um modo geral, as enzimas mais estáveis avaliadas para *P. ucsense*, xilanases foram o oposto. Nenhum dos extratos avaliados apresentou atividade relativa próxima a 100% após 72h de incubação, em nenhum pH avaliado, demonstrando uma menor estabilidade desta enzima em relação as demais.

Assim como a estabilidade em diferentes faixas de pH, a termoestabilidade também é um fator importante para a possível aplicação de uma enzima em processos de biorrefinaria. A atividade de FPA se manteve estável na temperatura de 50°C quando produzida em meio contendo bagaço de cana de açúcar, enquanto que em meio contendo capim elefante, a estabilidade foi mantida na temperatura de 40°C. Utilizando resíduos da colheita de milho, FPA apresentou maior estabilidade em 55°C, enquanto que para o extrato produzido com celulose comercial, a enzima não reteve 100% de sua atividade em nenhuma das temperaturas avaliadas. A enzima comercial também apresentou quedas drásticas em sua atividade relativa já na primeira hora em temperaturas a partir de 60°C, permanecendo estável por 72h em 40 e 45°C. Resultados similares foram obtidos por Camassola *et al.* (2004) em cultivo sólido de *P. echinulatum*, que sugerem que a queda na atividade enzimática possa ser devido a presença de proteases no meio, que perderam sua atividade nesta primeira hora.

Por outro lado, endoglicanases se mostraram relativamente mais estáveis em temperaturas até 60°C, para todos os extratos avaliados. Entretanto, em temperaturas superiores a 60°C, novamente foi constatada queda na atividade já nas primeiras horas, como havia ocorrido com FPA. Para β -glicosidases, maior estabilidade foi observada em temperaturas mais amenas, até 55°C, para os extratos avaliados. Esses resultados diferem dos obtidos por Camassola *et al.* (2004) que observaram atividade constante de β -glicosidases de *P. echinulatum* em todo o experimento. Esses dados sugerem que, embora temperaturas mais elevadas favoreçam uma maior atividade de β -glicosidases, quando mantidas por longos períodos de tempo, as mesmas podem desnaturar a enzima, prejudicando sua ação. Exoglicanases produzidas em resíduos do milho apresentaram boa estabilidade em temperaturas até 55°C, enquanto que o extrato enzimático produzido em celulose comercial se mostrou mais estável, permanecendo em 100% até 60°C, resultado superior ao observado para o coquetel enzimático comercial.

Enquanto que as demais enzimas de *P. ucsense* se demonstraram estáveis em faixa

ampla de temperatura, o mesmo não foi observado para xilanases, que apresentou quedas acentuadas nas atividades relativas durante o período de avaliação. Apenas os extratos produzidos em resíduos da colheita do milho apresentaram atividades relativas superiores a 100% após 72h de incubação, em 40°C, sendo que o extrato produzido com adição de licor proveniente do pré-tratamento apresentou atividades relativas superiores a 70% em todas as temperaturas avaliadas, após 72h de incubação. Para as demais xilanases de *P. ucsense*, após 24h, as atividades relativas se mostraram inferiores a 30%. Comportamento similar foi observado no padrão com enzima comercial. Esses resultados sugerem que a adição do licor ao meio de cultivo foi benéfica para a estabilidade das xilanases produzidas por *P. ucsense*, sendo necessários maiores estudos para entender quais mecanismos da enzima foram modificados pela presença do substrato, e como comportamentos semelhantes poderiam ser induzidos nas demais enzimas avaliadas.

A última característica avaliada para as enzimas produzidas por *P. ucsense* foi sua eficiência de hidrólise, que requer a ação conjunta de diversas enzimas (Almeida *et al*, 2019). Os resultados obtidos demonstram que, para a hidrólise de bagaço de cana de açúcar, capim elefante e polpa de eucalipto e pinus, as enzimas produzidas utilizando bagaço resultaram em maior liberação de glicose no meio quando comparadas às demais enzimas de *P. ucsense*, embora ainda seja inferior ao preparo comercial Celluclast®. Já em relação aos resíduos da colheita do milho, os resultados demonstram que os extratos enzimáticos de *P. ucsense* produzidos na mesma biomassa se mostraram capazes de liberar quantidades de glicose similares ao preparo comercial Celluclast®, no mesmo intervalo de tempo, para três condições de biomassa: *in natura*, pré-tratada com H₂SO₄ e com pré-tratamento hidrotérmico. O desempenho dos extratos enzimáticos de *P. ucsense* em seu estado bruto pode ser explicado pela presença das β-glicosidases, uma vez que a importância do papel destas enzimas para a degradação eficiente de materiais lignocelulósicos é bastante conhecida, uma vez que a celobiose, por ela hidrolisada, é um inibidor da atividade de endoglicanases e exoglicanases (Almeida *et al*, 2019).

Considerando os dados obtidos no presente estudo, observa-se que a produção de celulasas em diferentes biomassas, por *P. ucsense*, é bastante variada, sendo as biomassas bagaço de cana-de-açúcar e resíduos da colheita de milho as mais indicadas para a obtenção de elevados títulos enzimáticos. Além disso, os extratos produzidos utilizando essas biomassas se mostraram estáveis em amplas gamas de temperaturas, bem como faixas de pH variadas, características importantes para sua aplicação industrial.

6 CONCLUSÕES

- A produção de celulasas e xilanases em frascos agitados por *P. ucsense* S1M29 utilizando as diferentes biomassas, em diferentes condições de pré-tratamento, apresentou grande variação para todas as enzimas avaliadas, demonstrando que o pré-tratamento utilizado também tem grande importância na produção enzimática, e não somente a fonte de carbono escolhida;
- As diferentes biomassas avaliadas apresentaram respostas variadas na produção enzimática por *P. ucsense*, sendo que os resíduos da colheita do milho e o bagaço de cana-de-açúcar resultaram nas maiores atividades enzimáticas, próximas e/ou superiores ao meio contendo celulose cristalina, quando em regime descontínuo e/ou descontínuo alimentado. Já o capim elefante, apesar dos resultados um pouco inferiores, também se mostrou propício a produção enzimática em regime descontínuo alimentado, enquanto que a polpa de eucalipto/pinus apresentou dificuldades em sua utilização em cultivo submerso;
- As enzimas produzidas em processo submerso, utilizando as diferentes biomassas lignocelulósicas, demonstraram atividades ótimas em amplas faixas de pH e temperatura, bem como boa estabilidade térmica e em diferentes faixas de pH. Os resultados foram semelhantes, ou superiores, as enzimas produzidas com celulose cristalina, bem como ao coquetel enzimático comercial, utilizados como controles, demonstrando que a utilização das biomassas lignocelulósicas produz enzimas estáveis para possível utilização comercial;
- As enzimas produzidas sobre as diferentes biomassas se mostraram eficientes em processos de hidrólise, mesmo em seu estado bruto, quando comparadas ao coquetel enzimático comercial utilizado como controle.
- Visando uma aplicação industrial, a utilização de bagaço de cana-de-açúcar e dos resíduos da colheita de milho se mostram os mais promissores, resultando em altos títulos e estabilidade das enzimas produzidas. Além disso, essas duas biomassas são amplamente produzidas no Brasil, o que facilita sua disponibilidade em diversas regiões.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a utilização de outras biomassas lignocelulósicas na produção de enzimas celulolíticas por *P. ucsense* S1M29, buscando as biomassas mais indicadas para este microrganismo, de acordo com a disponibilidade na região de produção, a fim de possibilitar sua produção comercial *in situ*;
- Avaliar diferentes métodos de pré-tratamento para estas biomassas, buscando o melhor cenário para sua utilização pelo microrganismo *P. ucsense* S1M29;
- Avaliar o escalonamento do processo para biorreator piloto, ajustando os parâmetros conforme as necessidades apresentadas pelo aumento nos volumes operacionais;
- Avaliar métodos de concentração e formulação do extrato enzimático produzido utilizando as biomassas lignocelulósicas, possibilitando sua produção e comercialização, em casos em que a produção *in situ* não é possível.

8 REFERÊNCIAS

- Adsul, M.G.; Ghule, J.E.; Singh, R.; Shaikh, H.; Bastawde, K.B.; Gokhale, D.V.; Varma, A.J. (2004). Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. **Carb. Polym.** 57: 67-72. [https://doi.org/ 0.1016/j.carbpol.2004.04.001](https://doi.org/0.1016/j.carbpol.2004.04.001)
- Agencia Brasil (2024). Disponível em: <<https://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2022-09/florestas-plantadas-no-brasil-ocuparam-95-milhoes-hectares-2021#:~:text=A%20%C3%A1rea%20estimada%20de%20florestas,1%2C8%20milh%C3%A3o%20de%20pinus.>>. Acesso em: 30 jul. 2024.
- Almeida, M.N.; Falkoski, D.L.; Guimarães, V.M.; Rezende, S.T. (2019). Study of gamba grass as carbon source for cellulase production by *Fusarium verticillioides* and its application on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops & Products**. 133: 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.03.008>
- Ângelo, R.S. (2004). **Enzimas hidrolíticas**. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Coord.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 1 ed. Caxias do Sul: EDUCS. pp 261-285.
- Bailey, J. E. (1980). Biochemical reaction engineering and biochemical reactors. *Chem. Eng. Soc.* 35: 1854-1886.
- Bailey, M.J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23: 257-270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J)
- Bano, A.; Chen, X.; Prasongsuk, S.; Akbar, A.; Lotrakul, P.; Punnapayak, H.; Anwar, M.; Sajid, S.; Ali, I. (2019). Purification and Characterization of Cellulase from Obligate Halophilic *Aspergillus flavus* (TISTR 3637) and Its Prospects for Bioethanol Production. **Appl Biochem Biotechnol.** 189:1327–1337. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03086-y>
- Barneto, A.G.; Vila, C.; Ariza, J. (2011). Eucalyptus kraft pulp production: Thermogravimetry monitoring. **Thermochimica Acta**. 520: 110–120.
- Barreira, J.C.M.; Oliveira, M.B.P.P.; Ferreira, I.C.F.R. (2014). Development of a novel methodology for the analysis of Ergosterol in mushrooms. **Food Analytical Methods**. 7(1): 217–223. <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9621-9>
- Baskaran, D.; Saravanan, P.; Saravanan, V.; Kannan, R.R.; Ramesh, S.; Dilipkumar, M.; Muthuvelayudham, R. (2022). Pomegranate peel utilization by an indigenous fungal strain of *Trichoderma reesei* NCIM 1186: Optimization and Kinetics studies on production of cellulase. **Biomassa Conv. Biorref.** <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02901-7>
- Berchem, T.; Roiseux, O.; Vanderghem, C.; Boisdenghien, A.; Foucart, G.; Richel, A. (2017). Corn stover as feedstock for the production of ethanol: chemical composition of different anatomical fractions and varieties. **Biofuels, Bioprod. Bioref.** 11:430–440. <https://doi.org/10.1002/bbb.1755>
- Bertacchi S.; Jayaprakash, P.; Morrissey, J.P.; Branduardi, P. (2021). Interdependence between lignocellulosic biomasses, enzymatic hydrolysis and yeast cell factories in biorefineries. **Microbial Biotechnology**. 15(3): 985-995. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13886>

- Bhardwaj, N.; Kumar, B.; Agrawal, K.; Verma, P. (2021) Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. **Bioresour. Bioprocess.** 8:95. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- Bon, E.P.S.; Pereira Jr., N.; Gottschalk, L.M.F.; Sá-Pereira, P.; Roseiro, J.C.; Ferrara, M.A. (2008). Bioprocessos para a produção de enzimas. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. (Coord.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência. pp 95-122.
- Brar, K.K.; Agrawal, D.; Chadha, B.S.; Lee, H. (2019). Evaluating novel fungal secretomes for efficient saccharification and fermentation of composite sugars derived from hydrolysate and molasses into ethanol. **Bioresour. Technol.** 273: 114–121.
- Brijwani, K.; Vadlani, P. (2011). Cellulolytic enzymes production via solid-state fermentation: Effect of pre-treatment methods on physicochemical characteristics of substrate. **Enzym. Res.** 860134. <https://doi.org/10.4061/2011/860134>
- Brito, J.O.; Silva, F.G.; Leão, M.M.; Almeida, G. (2008). Chemical composition changes in eucalyptus and pinus woods submitted to heat treatment. **Bioresour. Technol.** 99: 8545–8548.
- Camassola, M.; Bittencourt, L.R.; Shenem, N.T.; Andreus, J.; Dillon, A.J.P. (2004). Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatal. Biotransform.** 22: 391-396. <http://dx.doi.org/10.1080/10242420400024532>
- Camassola, M. Dillon, A.J.P. (2010). Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 162: 1889–1900.
- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2012). Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and Efficient. **J. Anal. Bioanal. Tech.** 1:1-4. <http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports.125>
- Castro-Ochoa, L.D.; Hernandez-Leyva, S.R.; Medina-Godoy, S.; Gomez-Rodriguez, J.; Aguilar-Uscanga, M.G.; Castro-Martinez, C. (2023). Integration of agricultural residues as biomass source to saccharification bioprocess and for the production of celulases from filamentous fungi. **Biotech.** 13:43. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03444-4>
- Chambon, C.L.; Mkhize, T.Y.; Reddy, P.; Brandt-Talbot, A.; Deenadayalu, N.; Fennell, P.S.; Hallett, J.P. (2018). Pretreatment of South African sugarcane bagasse using a low-cost protic ionic liquid: a comparison of whole, depithed, fibrous and pith bagasse fractions. **Biotechnol Biofuels.** 11: 247.
- Costa, P.S.; Büchli, F.; Robl, D.; Delabona, P.S.; Rabelo, S.C.; Pradella, J.G.C. (2016). Enhancement of *Penicillium echinulatum* glycoside hydrolase enzyme complex. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 43:627–639. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1746-6>
- Costa, S.G.; Pereira, O.L.; Teixeira-Ferreira, A.; Valente, R.H.; Rezende, S.T.; Guimarães, V.M.; Genta, F.A. (2018). *Penicillium citrinum* UFV1 β -glucosidases: purification, characterization, and application for biomass saccharification. **Biotechnol Biofuels** 11: 226. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1226-5>
- Daroit, D.J.; Simonetti, A.; Hertz, P.F.; Brandelli, A. (2008). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from *Monascus purpureus*. **J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 933-941.
- Deshpande, M. V.; Eriksson, K. E.; Pettersson, L. G. (1984). An assay for selective

- determination of exo-1,4-B-glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. **Anal. Biochem.** 238: 481-487. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90843-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90843-1)
- Dillon, A.J.P.; Zorgi, C.; Camassola, M.; Henriques, J.A.P. (2006). Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 70: 470-476. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0122-7>
- Dillon, A.J.P.; Camassola, M.; Henriques, J.A.P.; Fungaro, M.H.P.; Azevedo, A.C.S.; Velho, T.A.F.; Laguna, S.E. (2008). Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma harzianum*. **Enzyme Microb. Technol.** 43: 403-409. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.07.009>
- Dillon, A.J.P.; Bettio, M.; Pozzan, F.G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. (2011). A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **J. Appl. Microbiol.** 111: 48-53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05026.x>
- Embrapa (2024a). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cana-de-açúcar. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana>>. Acesso em: 30 jul. 2024.
- Embrapa (2024b). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Capim Elefante. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/9736/capim-elefante-brs-capiacu>>. Acesso em: 30 jul. 2024.
- Embrapa (2024c). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Eucalipto. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/florestas/transferencia-de-tecnologia/eucalipto/tema>>. Acesso em: 30 jul. 2024.
- Embrapa (2024d). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Pinus. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/2090/sistema-de-producao-de-pinus>>. Acesso em: 30 jul. 2024.
- Embrapa (2024e). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Milho. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/milho>>. Acesso em: 18 fev. 2024.
- Erenstein, O.; Jaleta, M.; Sonder, K.; Mottaleb, K.; Prasanna, B.M. (2021). Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. **Food Security.** 14:1295–1319. <https://doi.org/10.1007/s12571-022-01288-7>
- Esterbauer, H.; Steiner, W.; Labudova, I.; Hermann, A.; Hayn, M. (1991). Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. **Bioresour. Technol.** 36: 51-65.
- Ezeilo, U.R.; Lee, C.T.; Huyop, F.; Zakaria, I.I.; Wahab, R.A. (2019). Raw oil palm frond leaves as cost-effective substrate for cellulase and xylanase productions by *Trichoderma asperellum* UC1 under solid-state fermentation. **J. Environ. Manage.** 243: 206-217. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.113>
- Ezeilo, U.R.; Wahab, R.A.; Mahat, N.A. (2020). Optimization studies on cellulase and xylanase production by *Rhizopus oryzae* UC2 using raw oil palm frond leaves as substrate under solid state fermentation. **Renew. Energ.** 156: 1301-1312. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.11.149>
- Falcone, M.; Marques, A. B. (1965). Estudo sobre condições de hidrólise pelo ácido clorídrico na dosagem de açúcares redutores totais. **Technol. Ali. Beb.** 4: 24-30.

- Ferraz, A.L. (2004). **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos**. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Coord.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 1 ed. Caxias do Sul: EDUCS. pp 213-242.
- Galvagno, M.A.; Forchiassin, F. (2004). **Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo**. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Coord.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 1 ed. Caxias do Sul: EDUCS. pp 123-169.
- Ganesan, M.; Vinayakamoorthy, R.M.; Thankappan, S.; Muniraj, I.; Uthandi, S. (2020). Thermotolerant glycosyl hydrolases-producing *Bacillus aerius* CMCP51 and its saccharification efficiency on HCR-laccase (LccH)-pretreated corncob biomass. **Biotechnol Biofuels**. 13:124. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01764-2>
- Ganesh, K.; Joshi, J. B.; Sawant, S. B. (2000). Cellulase deactivation in a stirred reactor. **Biochem. Eng. J.** 4: 137-141.
- Gao, X.; Li, Y.; Zhang, J. (2020) Soybean lecithin enhanced cellulase production by *Penicillium oxalicum* JG in a scaled-up bioconversion process. **Cellulose Chem. Technol.** 54: 705-712. <https://doi.org/10.35812/CelluloseChemTechnol.2020.54.70>
- Ghose, T. K.; Sahai, V. (1979). Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fed-batch and continuous-flow culture with cell recycle. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 283-296.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59: 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Grigorevski-Lima, A.L.; Oliveira M.M.Q.; Nascimento, R.P.; Bon, E.P.S.; Coelho, R.R.R. (2013). Production and partial characterization of cellulases and xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 using lignocellulosic residual biomass. **Appl Biochem Biotechnol.** 169: 1373–1385.
- Gusakov, A.V. (2011). Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology.** 29 (9): 419-425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>.
- Heleno, S.A.; Diz, P.; Prieto, M.A.; Barros, L.; Rodrigues, A.; Barreiro, M.F.; Ferreira, I.C.F.R. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. **Food Chemistry.** 197:1054–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.108>.
- Hendy, N. A.; Wilke, C. R.; Blanch, H. W. (1984). Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C30. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 73-77.
- Jönson, L.J.; Martín, C. (2016). Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresour. Technol.** 199: 103–112. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.009>
- Kronemberger, G.S.; Terrone, C.C.; Sade, Y.B.; Brienzo, M.; Akamine, D.T.M. (2021). β -glycosidase of the GH3 family produced by filamentous fungus isolated from the intestine of *Nausitora fusticula* (Bivalvia: Teredinidae). **Brazilian Journal of Development.** 10043. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-681>
- Kuhad, R.C.; Deswal, D.; Sharma, S.; Bhattacharya, A.; Jain, K.K.; Kaur, A.; Pletschke, B.I.; Singh, A.; Karp, M. (2016). Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 55: 249-272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.13>

- Kumar, J.A.; Sathish, S.; Prabu, D.; Renita, A.A.; Saravanan, A.; Deivayanai, V.C.; Anish, M.; Jayaprabakar, J.; Baigenzhenov, O.; Hosseini-Bandegharai, A. (2023). Agricultural waste biomass for sustainable bioenergy production: Feedstock, characterization and pre-treatment methodologies. **Chemosp.** 331. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138680>
- Kwon, K-S.; Lee, J.; Kang, H. G.; Hah, Y. C. (1994). Detection of β -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 4584-4586.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.
- Legodi, L.M.; La Grange, D.C.; van Rensburg, E.L.J. (2023). Production of the Cellulase Enzyme System by Locally Isolated *Trichoderma* and *Aspergillus* Species Cultivated on Banana Pseudostem during Solid-State Fermentation. **Fermentation.** 9: 412. <https://doi.org/10.3390/fermentation9050412>
- Lenz, A. R.; Balbinot, E.; de Abreu, F. P.; de Oliveira, N. S.; Fontana, R. C.; de Avila E Silva, S.; Park, M. S.; Lim, Y. W.; Houbraken, J.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2022). Taxonomy, comparative genomics and evolutionary insights of *Penicillium ucsense*: a novel species in series Oxalica. **Anton Leeuw Int J G.** <https://doi.org/10.1007/s10482-022-01746-4>
- Li, Z.; Zhaia, H.; Zhang, Y.; Yu, L. (2012). Cell morphology and chemical characteristics of corn stover fractions. **IND CROP PROD.** 37: 130– 136. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.11.025>
- Li, C.; Yang, Z.; Zhang, R. H. C.; Zhang, D.; Chen, S.; Ma, L. (2013). Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **J. Biotechnol.** 168: 470-477. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.10.003>
- Li, C.; Kumar, A.; Luo, X.; Shi, H.; Liu, Z.; Wu, G. (2020). Highly alkali-stable and cellulase-free xylanases from *Fusarium* sp. 21 and their application in clarification of orange juice. **Int. J. Biol. Macromol.** 155: 572-580. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.249>
- Liao, H.; Fan, X.T.; Mei, X.; Wei, Z.; Raza, W.; Shen, Q.; Xu, Y. (2015). Production and characterization of cellulolytic enzyme from *Penicillium oxalicum* GZ-2 and its application in lignocellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy.** 74: 122-134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.01.016>
- Ma, L.; Li, C.; Yang, Z.; Jia, W.; Zhang, D.; Chen, S. (2013). Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. **J. Biotechnol.** 166: 192-197.
- Maleki, M.; Shahraki, M.F.; Kavousi, K.; Ariaeenejad, S.; Salekdeh, G.H. (2020). A novel thermostable cellulase cocktail enhances lignocellulosic bioconversion and biorefining in a broad range of pH. **Int. J. Biol. Macromol.** 154: 349-360. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.100>
- Mandels, M., Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269–278. <https://doi.org/10.1128/jb.73.2.269-278.1957>
- Martins, L.F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.** 99: 1417-1424.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.060>

- Matkar, K.; Chapla, D.; Divecha, J.; Nighojkar, A.; Madamwar, D. (2013). Production of cellulase by a newly isolated strain of *Aspergillus sydowii* and its optimization under submerged fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 78: 24-33.
- Menegol, D.; Scholl, A.L.; Fontana, R.C.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M.; (2014). Increased release of fermentable sugars from elephant grass by enzymatic hydrolysis in the presence of surfactants. **Energ Convers Manage**. 88: 1252–1256.
- Mihajlovski, K.; Pecarski, D.; Rajilić-Stojanović, M.; Dimitrijević-Branković, S. (2021). Valorization of corn stover and molasses for enzyme synthesis, lignocellulosic hydrolysis and bioethanol production by *Hymenobacter* sp. CKS3. **Environmental Technology & Innovation**. 23: 101627. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101627>
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. 31(3): 426-428.
- Moyer, P.; Kim, K.; Abdoulmoumine, N.; Chmely, S.C.; Long, B.K.; Carrier, D.J.; Labbé, N. (2018). Structural changes in lignocellulosic biomass during activation with ionic liquids comprising 3-methylimidazolium cations and carboxylate anions. **Biotechnol Biofuels**. 11: 265.
- Mourtzinis, S.; Cantrell, K.B.; Arriaga, F.J.; Balkcom, K.S.; Novak, J.M.; Frederick, J.R.; Karlen, D.L. (2016). Carbohydrate and nutrient composition of corn stover from three southeastern USA locations. **Biomass Bioenergy**. 85: 153-158. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.11.031>
- Nichols, N.N.; Sharma, L.N.; Mowery, R.A.; Chambliss, C.K.; vanWalsum, G.P.; Dien, B.S.; Iten, L.B. (2008). Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. **Enzyme Microb. Technol.** 42: 624–630. doi:10.1016/j.enzmictec.2008.02.008
- Patel, N.; Choy, V.; Malouf, P.; Thibault, J. (2009). Growth of *Trichoderma reesei* RUT-C30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. **Process Biochem**. 44: 1164-1171.
- Patel, A.K.; Singhania, R.R.; Sim, S.J.; Pandey, A. (2019). Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresour. Technol.** 279: 385-392. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.049>
- Pereira, B. M. P.; Alvarez, T. M.; Delabona, P. S.; Dillon, A. J. P.; Squina, F. M.; Pradella, J. G. C. (2013). Cellulase on-site production from sugar cane bagasse using *Penicillium echinulatum*. **Bioenerg. Res**. 6:1052-1062.
- Ramamoorthy, N.K.; Sambavi, T.R.; Renganathan, S. (2019). A study on cellulase production from a mixture of lignocellulosic wastes. **Process Biochem**. 83: 148-158. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.05.006>
- Reis, L. (2011). Produção de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica. **Dissertação de mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Reis, L.; Fontana, R.C.; Delabona, P.S.; Lima, D.J.S.; Camassola, M.; Pradella, J.G.C.; Dillon, A.J.P. (2013). Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and feed-batch culture. **Bioresour. Technol.** 146: 597-603. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.124>

- Reis, L. (2017). Estratégias para incremento das atividades de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em cultivo submerso. **Tese de Doutorado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Salazar, L. N.; Astolfi, V.; Ogimbovski, T. A.; Daronch, N.A.; Zeni, J.; Junges, A.; Cansian, R.L.; Backes, G.T. (2020). Newly Isolated *Penicillium* sp. for cellulolytic enzyme production in soybean hull residue. **Braz. arch. biol. technol.** 63: 2-13. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020170710>
- Sarkar, N.; Aikat, K. (2012). Alkali pretreatment of rice straw and enhanced cellulase production by a locally isolated fungus *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3. **J. Microbiol. Biotechnol.** 2, 717–726.
- Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001) **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1 ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. 541p.
- Scholl, A.L.; Menegol, D.; Pitarelo, A.P.; Fontana, R.C.; Filho, A.Z.; Ramos, L.P.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2015a). Ethanol production from sugars obtained during enzymatic hydrolysis of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) pretreated by steam explosion. **Bioresour. Technol.** 192: 228–237.
- Scholl, A.L.; Menegol, D.; Pitarelo, A.P.; Fontana, R.C.; Filho, A.Z.; Ramos, L.P.; Dillon, A.J.P.; Camassola, M. (2015b). Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. **Industrial Crops and Products**. 77: 97–107.
- Sidana, A.; Yadav, S.K. (2022). Recent developments in lignocellulosic biomass pretreatment with a focus on eco-friendly, non-conventional methods. **Journal of Cleaner Production**. 335. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130286>
- Singh, N.; Sithole, B.; Govinden, R. (2023). Screening for cellulases and preliminary optimisation of glucose tolerant β -glucosidase production and characterization. **Mycol.** 14(2):91-107. DOI: 10.1080/21501203.2022.2155261
- Singhania, R.R.; Sukumaran, R.K.; Patel, A.K.; Larroche, C.; Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb. Technol.** 46: 541-549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Sluiter, A., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2005. Determination of Extractives in Biomass - Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory - NREL. NREL/TP-510-42619.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. 2008a. Determination of ash in biomass (NREL/TP-510-42622). *Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO.*
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D. 2008b. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, **1617**.
- Sternberg D.; Dorval S. (1979) Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol Bioeng.** 21(2):181-91. doi: 10.1002/bit.260210205. PMID: 34447.
- Stoffel, F.; Santana, W.O.; Fontana, R.C.; Gregolon, J.G.N.; Kist, T.B.L.; Siqueira, F.G.; Mendonça, S.; Camassola, M. (2019). Chemical features and bioactivity of grain flours colonized by macrofungi as a strategy for nutritional enrichment. **Food Chemistry**.

297: 124988. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.124988>

- Sulyman, A.O.; Igunnu, A.; Malomo, S.O. (2020). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. **Heliyon**. 6(12):e05668. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05668>.
- Sun, X.; Liu, Z.; Zheng, K.; Song, X.; Qu, Y. (2008). The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. **Enzyme Microb. Technol.** 42: 560-567. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.01.020>
- Toscan, A.; Fontana, R.C.; Andreaus, J.; Camassola, M.; Lukasik, R.M.; Dillon, A.J.P. (2019). New two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic componentes using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification: focus on the polysaccharide valorization. **Bioresource Technology**. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121346>
- United Nations. (2022). World Population Prospects 2022. Available in <<https://news.un.org/en/story/2022/07/1122272>>. Access in July, 17, 2022.
- Vaishnav, N.; Singh, A.; Adsul, M.; Dixit, P.; Sandhu, S.K.; Mathur, A.; Puri, S.K.; Singhania, R.R. (2018). Penicillium: The next emerging champion for cellulase production. **Bioresour. Technol. Rep.** 2: 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003>
- Verma, N.; Kumar, V.; Bansal, M.C. (2021). Valorization of Waste Biomass in Fermentative Production of Cellulases: A Review. **Waste Biomass Valor** 12: 613–640. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01048-8>
- Vieira, M.M.; Kadoguchi, E.; Segato, F.; da Silva, S.S.; Chandel, A.K. (2021). Production of cellulases by *Aureobasidium pullulans* LB83: optimization, characterization, and hydrolytic potential for the production of cellulosic sugars. **Prep. Biochem. Biotechnol** 51:2: 153-163. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1799393>
- Yamakawa, C.K.; Qin, F.; Mussato, S.I. (2018). Advances and opportunities in biomass conversion technologies and biorefineries for the development of a bio-based economy. **Biomass Bioenergy**. 119: 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.007>
- Ward, O.P. (1991). **Biotechnología de la fermentación**: Principios, procesos y productos. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.
- Zabed, H.; Sahu, J.N.; Boyce, A.N.; Faruq, G. (2016). Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 66: 751-774. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zhao, X.; Liu, L.; Deng, Z.; Liu, S.; Yun, J.; Xiao, X.; Li, H. (2021) Screening, cloning, enzymatic properties of a novel thermostable cellulase enzyme, and its potential application on water hyacinth utilization. **Int Microbiol.** 24:337–349. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00170-4>
- Zohri, A.E.; Ali, M.M.; Ibrahim, S.M. (2022). Evaluation of Cellulases Production by *Aspergillus niger* Using Response Surface Methodology. **Egyptian Sugar Journal**. 19:18-28 <https://doi.org/10.21608/esugj.2022.155979.1017>

