

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

**ESTRATÉGIA DE REUSO DE MICÉLIO**  
**DE *Penicillium echinulatum* E DE *Trichoderma reesei* EM**  
**CULTIVO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES**  
**E XILANASES**

**PAULA CAVION COSTA**

**Caxias do Sul, 2021**

**PAULA CAVION COSTA**

**ESTRATÉGIAS DE REUSO DE MICÉLIO  
DE *Penicillium echinulatum* E DE *Trichoderma reesei* EM  
CULTIVO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES  
E XILANASES**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador: Dr. Willian Daniel Hahn Schneider

**Caxias do Sul, 2021**

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

C837e Costa, Paula Cavion

Estratégias de reuso de micélio de *Penicillium echinulatum* e de *Trichoderma reesei* em cultivo sólido para a produção de celulases e xilanases [recurso eletrônico] / Paula Cavion Costa. – 2021.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2021.

Orientação: Marli Camassola.

Coorientação: Willian Daniel Hahn Schneider.

Modo de acesso: World Wide Web

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

1. Enzimas. 2. Biomassa. 3. Micélio. 4. *Penicillium*. 5. *Trichoderma*. 6. Celulase. 7. Xilanases. I. Camassola, Marli, orient. II. Schneider, Willian Daniel Hahn, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 577.15

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)  
Ana Guimarães Pereira - CRB 10/1460

**PAULA CAVION COSTA**

**ESTRATÉGIAS DE REUSO DE MICÉLIO  
DE *Penicillium echinulatum* E DE *Trichoderma reesei* EM  
CULTIVO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES E  
XILANASES**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade de  
Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de  
Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador: Dr. Willian Daniel Hahn Schneider

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 9 DE NOVEMBRO DE 2021

Orientadora

Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientador

Dr. Willian Daniel Hahn Schneider

Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Profa. Dra. Eloane Malvessi

Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha

*O homem não é nada além daquilo  
que a educação faz dele.*

- Immanuel Kant

*Dedico este trabalho à minha família.  
Obrigada por sempre terem me incentivado  
durante a jornada acadêmica e de vida,  
estando ao meu lado nos momentos bons e  
ruins. Aos meus avós, por acreditarem e  
estarem sempre olhando para mim.*

## AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte deste trabalho direta ou indiretamente.

À minha Orientadora, Profa. Dra. Marli Camassola, meus agradecimentos por estar sempre presente. Me recebestes de braços abertos no laboratório desde 2017 e confiou muito em meu trabalho desde então. Obrigada por todos os cafés, almoços e trocas de ideias. Tu és um exemplo para mim.

Ao meu Coorientador, Dr. Willian Daniel Hahn Schneider, obrigada por ser esse exemplo de pessoa que tu és. Grande parte do que sei hoje se deve aos teus ensinamentos para mim passados. Agradeço, além da amizade, por estar sempre alegre e disponível, e por confiar no meu trabalho, auxiliando com maestria.

À técnica do Laboratório de Enzimas e Biomassas, Roselei Claudete Fontana, obrigada pelos anos de dedicação para com todos nós do laboratório. Obrigada pelas conversas trocadas na bancada e pela sua prestatividade. Tu és muito especial.

Aos meus anos como Iniciação Científica, que permitiram o gosto pela investigação científica e pesquisa. Anos de muito aprendizado e grandes lições. Tempos de análises enzimáticas, cultivos de fungos, hidrólises e fermentações. Onde e quando este trabalho começou a se desenhar. O que me possibilitou chegar até aqui hoje.

Aos meus colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas, agradeço por todo o companheirismo, união, carinho e amor. Nossas celebrações e comemorações pelas conquistas fazem com que tenhamos mais vontade ainda de crescer. Obrigada por tornarem sempre tudo mais leve e pelo apoio gigantesco.

À minha família, agradeço por compreenderem a importância deste trabalho para mim e por sempre me incentivarem nos estudos. Nunca deixaram nada faltar e estiveram a todo momento ao meu lado. Vocês são chave essencial.

Ao apoio estrutural e financeiro da Universidade de Caxias do Sul e do Laboratório de Enzimas e Biomassas, e ao apoio financeiro da CAPES.

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
NOMENCLATURA .....	iv
RESUMO .....	1
PALAVRAS-CHAVE .....	1
ABSTRACT .....	2
KEY WORDS .....	2
1. INTRODUÇÃO .....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Biomassas lignocelulósicas .....	6
2.1.1. Composição das biomassas lignocelulósicas .....	8
2.1.1.1. Celulose .....	8
2.1.1.2. Hemiceluloses .....	9
2.1.3. Lignina .....	10
2.1.2. Matérias-primas lignocelulósicas .....	11
2.1.2.1. Eucalipto .....	11
2.1.2.2. Casca e farelo de arroz .....	13
2.1.2.3. Farelo de soja .....	14
2.1.2.4. Bagaço de cana-de-açúcar .....	14
2.2. Pré-tratamento de Biomassas Lignocelulósicas .....	15
2.2.1. Tipos de pré-tratamento .....	15
2.2.2. Pré-tratamento por explosão a vapor .....	17
2.3. Enzimas lignocelulolíticas .....	18
2.3.1. Celulases .....	18
2.3.2. Hemicelulases.....	21
2.4. Aplicações das enzimas celulases e hemicelulases .....	23
2.4.1. Etanol de segunda geração .....	23
2.4.2. Mercado de alimentos .....	26
2.4.3. Indústria de papel e polpação .....	26
2.5. Fungos filamentosos .....	26
2.5.1. Gênero <i>Penicillium</i> .....	27



2.5.2. Gênero <i>Trichoderma</i> .....	29
2.6. Cultivos para produção de enzimas .....	30
2.6.1. Processos de condução de cultivos .....	31
2.6.2. Necessidades nutricionais dos microrganismos .....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	34
3.1. Microrganismos e linhagens .....	34
3.2. Meios de manutenção e crescimento .....	35
3.3. Soluções e reagentes .....	35
3.4. Meio de cultivo e produção de enzimas .....	36
3.5. Caracterização da biomassa lignocelulósica.....	38
3.6. Determinações de atividades enzimáticas .....	39
3.6.1. Atividade sobre Papel Filtro (FPA) .....	39
3.6.2. Atividade de endoglucanases .....	39
3.6.3. Atividade de exoglucanases .....	40
3.6.4. Atividade de $\beta$ -glicosidases .....	40
3.6.5. Atividade de xilanases .....	41
3.7. Análise estatística .....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
ARTIGO: Making the process of enzyme production in solid-state cultivation cleaner and more sustainable - reuse of raw materials and syringe-type bioreactor enter in the scene.....	43
Abstract .....	43
1. Introduction .....	44
2. Experimental section .....	47
3. Results and discussion .....	51
4. Conclusion .....	63
Interest conflict .....	65
Acknowledgements .....	65
References .....	65
5. CONCLUSÕES .....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Composição química de biomassas lignocelulósicas encontradas no Brasil. (adaptado de Yang & Yu, 2013 *apud* Faria *et al.*, 2016).

**Tabela 2:** Comparação de diferentes tipos de pré-tratamento. (Fatma *et al.*, 2018).

**Tabela 3:** Enzimas envolvidas no processo de degradação da celulose. (A autora).

**Tabela 4:** Enzimas envolvidas no processo de degradação da xilose. (A autora).

**Tabela 5:** Performance comparativa da produção de enzimas celulases por *Trichoderma* e *Penicillium* em diferentes substratos e formas de cultivo. (Singhania *et al.*, 2010).

**ARTIGO. An efficient strategy for mycelium and raw materials turnover for cellulases and xylanases production in solid-state cultivation: The syringe-type bioreactor enters the scene**

**Table 1.** Conditions of the nutrient supplementation in SSC of *Penicillium echinulatum* S1M29 and *Trichoderma reesei* RUT C30 during enzymatic production.

**Table 2.** Evaluation of the addition of rice husk, sugar cane bagasse, and sponge in the solid medium of *Penicillium echinulatum* S1M29 and *Trichoderma reesei* RUT C30.

**Table 3.** Relationship between the conditions tested as nutrient supplementation and the control after the turnover system by *Trichoderma reesei* RUT C30 and *Penicillium echinulatum* S1M29 in SSC.

**Table 4.** General results of enzymatic activities of media containing different supports in solid-state cultivation.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Representação esquemática da composição de biomassas lignocelulósicas. (Wang *et al.*, 2021)

**Figura 2:** (A) Estrutura molecular da celulose; (B) Representação das regiões cristalina e amorfa da celulose (Elseify *et al.*, 2019; He *et al.*, 2021)

**Figura 3:** Representação esquemática da estrutura de glucuronoarabinoxilanas. (Buckeridge & De Souza, 2014)

**Figura 4:** (A) Unidade de fenilpropano; (B) Unidades básicas formadoras da lignina. (Adaptado de Rubin, 2008).

**Figura 5:** Principais tipos de ligações entre as moléculas básicas que constituem a lignina. (Carvalho *et al.*, 2009).

**Figura 6:** Eucalipto (A) mudas; (B) flor; e (C) plantação.

**Figura 7:** Exemplo de biomassa lignocelulósica e sua estrutura antes e depois da etapa de pré-tratamento. (Fatma *et al.*, 2018).

**Figura 8:** Ação sinérgica das enzimas celulasas sobre as regiões amorfas e cristalina da celulose. (Lynd *et al.*, 2002).

**Figura 9:** Estrutura geral de celulasas fúngicas e seu domínio catalítico (CD) e sítio de ligação ao carboidrato (CBD) unidos por um peptídeo ligante. (Sajith *et al.*, 2016).

**Figura 10:** Sistema enzimático envolvido na degradação da hemicelulose (arabinoxilana). (Carvalho *et al.*, 2009).

**Figura 11:** Esquema geral da produção de etanol de segunda geração a partir de biomassas lignocelulósicas. (BNDES & CGEE, 2008).

**Figura 12:** Distribuição de proteínas identificadas no secretoma de *Penicillium echinulatum* mutante S1M29. (Schneider *et al.*, 2016a).

**Figura 13:** Esquema do processo de melhoramento genético do microrganismo *Penicillium echinulatum*. (Schneider *et al.*, 2018).

**Figura 14:** Distribuição de proteínas identificadas no secretoma de *Trichoderma reesei* RUT C30 em cultivo submerso e sequencial. (Florencio *et al.*, 2016).

**Figura 15:** Representação geral das etapas realizadas até o momento no presente trabalho. (A autora.)

**Figura 16:** Fotografia do biorreator do tipo seringa com meio de cultivo utilizado no sistema de reuso de micélio e reposição de nutrientes.

**ARTIGO. An efficient strategy for mycelium and raw materials turnover for cellulases and xylanases production in solid-state cultivation: The syringe-type bioreactor enters the scene**

**Figure 1.** Syringe-type bioreactor for solid-state cultivation with mycelium recycling.

**Figure 2.** Flowchart describing the methods and the steps used in this study.

**Figure 3.** Variation of different enzymes produced during different times by *Trichoderma reesei* RUT C30 (■) and *Penicillium echinulatum* S1M29 (◆): (A) Filter Paper Activity, (B) Endoglucanases, (C) Exoglucanases, (D)  $\beta$ -glucosidases, and (E) Xylanases.

**Figure 4.** Enzymatic activities produced by *Penicillium echinulatum* S1M29 (A, C, E, and G) and by *Trichoderma reesei* RUT C30 (B, D, F, and H) in SSC in response to different conditions of nutrient reposition.

**Figure 5.** Filter paper activity of the cultivations of *Penicillium echinulatum* S1M29 and *Trichoderma reesei* RUT C30 with the addition of rice husk (RH) and the controls (C).

## NOMENCLATURA

BG –  $\beta$ -glicosidases

BL – Biomassa Lignocelulósica

BDA – Batata Dextrose Ágar

BNDES – Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social

CAZy – carbohydrate active enzymes

CBH - Exoglicanases

CGEE – Centro de Gestão e Estudos Estratégicos

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CF – Combustíveis fósseis

DNS – ácido dinitrosalicílico

EG – Endoglicanases

Etanol 2G – Etanol de segunda geração

EUA – Estados Unidos da América

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FPA – Filter Paper Activity

GEE – gases do efeito estufa

GH - glicosilhidrolases

kDA – kilodaltons

MME – Ministério de Minas e Energia

NREL – National Renewable Energy Laboratory

SmC – submerged cultivation

SSC – solid state cultivation

## RESUMO

O uso de biomassas lignocelulósicas para a produção de etanol de segunda geração é o foco de estudo de diversas pesquisas na área de Biotecnologia. Um dos gargalos para a vasta utilização desta tecnologia se encontra na dificuldade de desenvolver coquetéis enzimáticos que sejam economicamente viáveis e eficientes. Dois gêneros de fungos filamentosos são relatados na literatura como grandes produtores de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico: *Penicillium* e *Trichoderma*. Com o intuito de reduzir o volume de resíduos gerados durante o cultivo de microrganismos e o tempo de produção de enzimas em cultivo em estado sólido, bem como aumentar a atividade enzimática, foi proposta uma estratégia de reuso do substrato utilizado e de micélio fúngico. O sistema de reuso de micélio e substrato em cultivo em estado sólido consiste na utilização de um único inóculo de cada microrganismo e posterior reutilização do substrato e de seu micélio para conduzir um cultivo de maior duração de tempo e produção enzimática, fazendo uso de ciclos de extrações enzimáticas e reposição de nutrientes realizadas em um biorreator do tipo seringa. O meio de cultivo testado foi constituído de eucalipto pré-tratado por explosão a vapor, farelo de arroz, farelo de soja e solução mineral. Inicialmente foi realizada a análise de crescimento e produção enzimática dos fungos *P. echinulatum* e *T. reesei* ao longo de oito dias de cultivo para definir o dia de início das extrações enzimáticas. Após, foram testadas diferentes formulações para reposição de nutrientes durante os ciclos: adição de solução de sais; mistura do meio de produção; e uma combinação da solução de sais e mistura do meio de produção. Definida a melhor condição de suplementação, diferentes materiais foram utilizados visando a redução da compactação do meio de cultivo e promovendo uma melhor aeração do sistema: espuma de poliuretano, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz. A partir da cinética de produção enzimática, definiu-se que as extrações enzimáticas e reposição de nutrientes devem ser realizadas nos dias 4, 7, 10 e 13 para o cultivo de *P. echinulatum*, e para o cultivo de *T. reesei* nos dias 3, 5, 6 e 7. As condições mais promissoras de suplementação e suporte foram, respectivamente, a reposição de solução mineral de sais e utilização de casca de arroz. Nessas condições, as atividades sobre papel filtro foram cinco e duas vezes superiores à produção convencional das enzimas, respectivamente pelo cultivo de *P. echinulatum* e *T. reesei*. Além disso, atividade de xilanase de 1303 U.g<sup>-1</sup> foi registrada por *P. echinulatum* ao final dos ciclos de extração e reposição de nutrientes. Esse sistema se mostrou uma promissora estratégia para redução de custos, tempo de processo e resíduos, além de possibilitar aumentos significativos na produção enzimática em cultivo em estado sólido de *P. echinulatum* e *T. reesei*.

## PALAVRAS-CHAVE

Suplementação de nutrientes; Enzimas lignocelulolíticas; Pré-tratamento por explosão à vapor; Ciclo de extrações; Reuso de micélio; Biorreator tipo seringa.

## ABSTRACT

The usage of lignocellulosic biomass for second-generation ethanol production is the target of many studies in Biotechnology. One of the bottlenecks to the wide application of this technology lays on the difficulty of developing economically viable and efficient enzymatic cocktails. Two genres of filamentous fungi are related on literature as great producers of the cellulolytic and hemicellulolytic complex: *Penicillium* and *Trichoderma*. With the goal of reducing debris generated during the microorganism cultivation and time of enzyme production on solid state cultivation, as well as increasing enzymatic activities, a strategy of reusing substrate and fungal mycelium was proposed. The system of mycelium and substrate reuse in solid state cultivation consists of the utilization of one microorganism inoculum for each fungus, and subsequent utilization of substrate and its mycelium for the enzyme production. Therefore, only one inoculum of the microorganisms and raw material usage was made to proportionate a longer cultivation and enzymatic production. The cultivations were conducted in cycles of enzymatic extraction with nutrient reposition in a syringe-type bioreactor. The tested cultivation medium included eucalyptus pretreated by steam explosion, rice bran, soy bran and mineral solution. Initially, a growth and enzymatic production analysis of *P. echinulatum* and *T. reesei* was carried out through eight cultivation days in order to define the initial enzymatic extraction day. After that, different formulations of nutrient reposition were tested: addition of mineral solution, addition of a mixture of cultivation medium, and addition of the mixture and mineral solution. Having defined the best condition of supplementation, different materials were used aiming the reduction of the culture medium compaction and promoting a better system aeration: polyurethane sponge, sugar cane bagasse and rice husk. Considering the enzymatic production kinetics, it was defined that the enzymatic extractions and nutrient reposition must be done in days 4, 7, 10 and 13 for *P. echinulatum* and 3, 5, 6 and 7 for *T. reesei*. The most promising supplementation and support were, respectively, the reposition of mineral solution and rice husk. In these conditions, enzymatic activities of FPA were five and two times bigger than the conventional production of these enzymes, respectively for *P. echinulatum* and *T. reesei*. Furthermore, xylanase titers of 1303 U.g<sup>-1</sup> were registered by *P. echinulatum* at the end of the four extraction and reposition cycles. It has proved to be a promising strategy to reduce the cost, process time and debris, increasing significantly the enzymatic production of *P. echinulatum* and *T. reesei*.

## KEYWORDS

Nutrient supplementation; Lignocellulolytic enzymes; Steam explosion pretreatment; Cyclic extractions; Mycelium reuse; Syringe type bioreactor.

## 1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica – a mais abundante em todo o planeta -, de modo geral, é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. O uso dessa matéria prima pode suprir países com menor demanda energética, reduzindo a necessidade de importar suplementos energéticos. Dentre os setores que podem auxiliar no avanço da agroindústria está o setor de biocombustíveis, uma vez que este se utiliza de resíduos do mesmo setor e proporciona maior crescimento econômico, resolvendo problemas ambientais, justamente por ser uma fonte de energia segura e sustentável (Gueiros *et al.*, 2021a).

O crescimento da população mundial, o processo de industrialização e os avanços na indústria de transportes aceleram o uso de óleo, carvão, gás natural e combustíveis fósseis (Bilgili *et al.*, 2017). Assim, a demanda por alternativas aos combustíveis fósseis vem crescendo nos últimos anos, uma vez que projeções da *International Energy Agency* apontam que a necessidade energética global aumentará cerca de 30% até 2040 (International Energy Agency, 2020). No cenário energético mundial atual, 12% da energia primária é representada pelo uso de fontes renováveis, 83% de combustíveis fósseis e 5% de energia nuclear. (New Energy Outlook, 2018). Seb Henbest, um dos autores do *New Energy Outlook* publicado no ano de 2018 afirma que até 2050, as tecnologias eólicas e solares corresponderão a quase 50% da geração energética, e as usinas hidrelétricas, nucleares e outras renováveis corresponderão a 23% sem emissão de carbono.

Os fungos são microrganismos que degradam a biomassa lignocelulósica devido a sua capacidade de desestruturar a parede celular vegetal, convertendo seus polímeros em moléculas menores por meio de enzimas que degradam a celulose e a hemicelulose, respectivamente celulases e hemicelulases, bem como oxidam a lignina com enzimas ligninolíticas. Os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Trichoderma* estão entre os fungos filamentosos de interesse industrial devido ao seu elevado potencial de produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas que atuam na degradação de biomassas lignocelulósicas (Passos, Junior & Castro, 2018; Sukumaran *et al.*, 2009).

A produção de enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica é um desafio para o aproveitamento desta biomassa renovável e abundante. Estima-se que as celulases, enzimas que degradam a celulose, correspondam a cerca de 20% do mercado global de enzimas, demonstrando sua alta demanda e vasta aplicação (Singh *et al.*, 2021). As



hemicelulases são amplamente utilizadas como aditivos de ração animal, para biopolpação e como aditivo de farinha alimentícia (Shallom and Shoham, 2003). As enzimas ligninolíticas podem ser utilizadas em processos de hidrólise enzimática para liberação de açúcares fermentescíveis da biomassa, os quais serão convertidos a diversos produtos de interesse industrial, como por exemplo o etanol.

Diferentes fatores influenciam a produção de enzimas em cultivos microbianos, como fonte de carbono e nitrogênio, aeração do meio de cultivo, pH, temperatura de incubação, substâncias indutoras, forma de condução do processo e linhagem utilizada. O cultivo em estado sólido é uma alternativa para a produção enzimática, com geração de menor quantidade de efluentes e necessário menor espaço de produção em comparação ao cultivo submerso. Por outro lado, esse processo ainda precisa ser aprimorado para aplicação em larga escala, visando menor geração de resíduos e tempos de produção, além de estratégias que facilitem a extração de enzimas (Sreedharan Sajith *et al.*, 2016).

A possibilidade de controle do processo de crescimento e desenvolvimento dos microrganismos pode ter efeito direto sobre sua produtividade enzimática. Portanto, é crucial o desenvolvimento de biorreatores que operem em condições que permitam elevados níveis de produção de enzimas. Novos modelos de biorreatores vem sendo desenvolvidos nas últimas décadas, visando sistemas eficientes para escalonamento deste processo (Tarafdar *et al.*, 2021).

Diversas pesquisas estão sendo conduzidas com o foco de tornar o sistema de produção enzimática mais eficiente, produtivo, econômico e sustentável, em busca de suprir a demanda da produção de enzimas pelas indústrias. Diante disso, o objetivo geral deste trabalho foi desenvolver estratégias de reuso do micélio fúngico de *Penicillium echinulatum* S1M29 e *Trichoderma reesei* RUT C30 em cultivos em estado sólido, empregando resíduos de eucalipto pré-tratado para a produção de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico por meio de ciclos de extração enzimática e reposição de nutrientes, visando o aumento da produção dessas enzimas.

A partir do objetivo geral, desenvolveram-se os seguintes objetivos específicos:

- analisar a cinética da produção enzimática *P. echinulatum* e *T. reesei* ao longo do tempo, verificando o momento ideal para a suplementação do meio de cultivo.

- testar a viabilidade, para aumento da produção enzimática, da adição de solução de sais, de traços do meio de cultivo e de solução de sais com traços do meio de cultivo, relacionando com a condição sem suplementação;
- testar a viabilidade da utilização de bagaço de cana-de-açúcar, de espuma de poliuretano e de casca de arroz como formas de suporte do cultivo visando menor compactação do meio de cultivo utilizado durante os ciclos de extração enzimática e reposição de nutrientes;

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biomassas lignocelulósicas

A biomassa pode ser definida como “o termo coletivo utilizado para denotar materiais orgânicos encontrados na Terra, inclusive plantas aquáticas e terrestres, assim como resíduos provenientes de animais e demais resíduos orgânicos”. Anualmente cerca de 100 bilhões de toneladas de material vegetal seco são gerados no mundo a partir de atividade de fotossíntese. O excedente das biomassas lignocelulósicas (BL) é tratado como resíduos, mas vastas pesquisas na área sugerem sua utilização para produção de enzimas, biocombustíveis, antioxidantes, rações para suplementação animal, dentre outros (Sreedharan Sajith *et al.*, 2016).

A biomassa lignocelulósica como fonte alternativa para suprir a demanda energética está atraindo muito interesse nos últimos anos por ser o material renovável mais abundante na Terra, uma vez que é produzida com gás carbônico e água, utilizando energia solar a partir do processo de fotossíntese. É uma complexa matriz constituída de diversos polissacarídeos, compostos fenólicos e proteínas. Trata-se de uma fonte renovável sustentável com potencial para substituir os recursos fósseis (Sajith *et al.*, 2016b; Tu & Hallett, 2019a; Wang *et al.*, 2021).

Essa matéria-prima é composta por três componentes majoritários: celulose, hemicelulose e lignina, formado por unidades menores (Figura 1). Esses componentes formam uma matriz complexa que confere proteção, resistência e sustentação para a planta. De acordo com a espécie, há uma diferente porcentagem dessas três unidades (Sajith *et al.*, 2016a).

As cadeias de celulose são compostas por moléculas de glicose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Esse polímero pode formar microfibrilas que são dispostas de maneira paralela formando estruturas cristalinas, e quando desordenadas formando regiões amorfas. (Juturu & Chuan, 2014; Vaishnav *et al.*, 2018). Hemiceluloses são heteropolímeros ramificados que interagem diretamente com as fibras de celulose, mais fáceis de ser hidrolisados do que a celulose, e sua composição depende da biomassa. As hemiceluloses são formadas por pentoses, hexoses e ácidos urônicos. A lignina é um polímero aromático sintetizado por uma via oxidante de acoplamento de monolignóis a uma estrutura não

regular, que possui grande importância no desenvolvimento, fisiologia, evolução e defesa da planta. Uma vez que dificulta o acesso das enzimas aos carboidratos, sua presença faz com que a biomassa seja mais resistente à hidrólise enzimática. Em menores quantidades, está presente a pectina, um polissacarídeo com muita variação, constituído por moléculas de ácido galacturônico unidas entre si por ligações  $\alpha$ -1,4. (Sperandio, Ximenes & Filho, 2019).

As matérias-primas de lignocelulose podem ser oriundas de diferentes fontes, como madeira, resíduos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar, resíduos e bagaço de frutas, farelo de soja e até mesmo de folhas usadas) (Sperandio, Ximenes & Filho, 2019. A Tabela 1 apresenta a composição química de diferentes biomassas lignocelulósicas. As biorefinarias, instalações que integram diversos processos de conversão de biomassas, convertem os materiais lignocelulósicos utilizando diferentes estratégias para desconstruir a recalcitrante parede celular em açúcares fermentescíveis (França *et al.*, 2010).

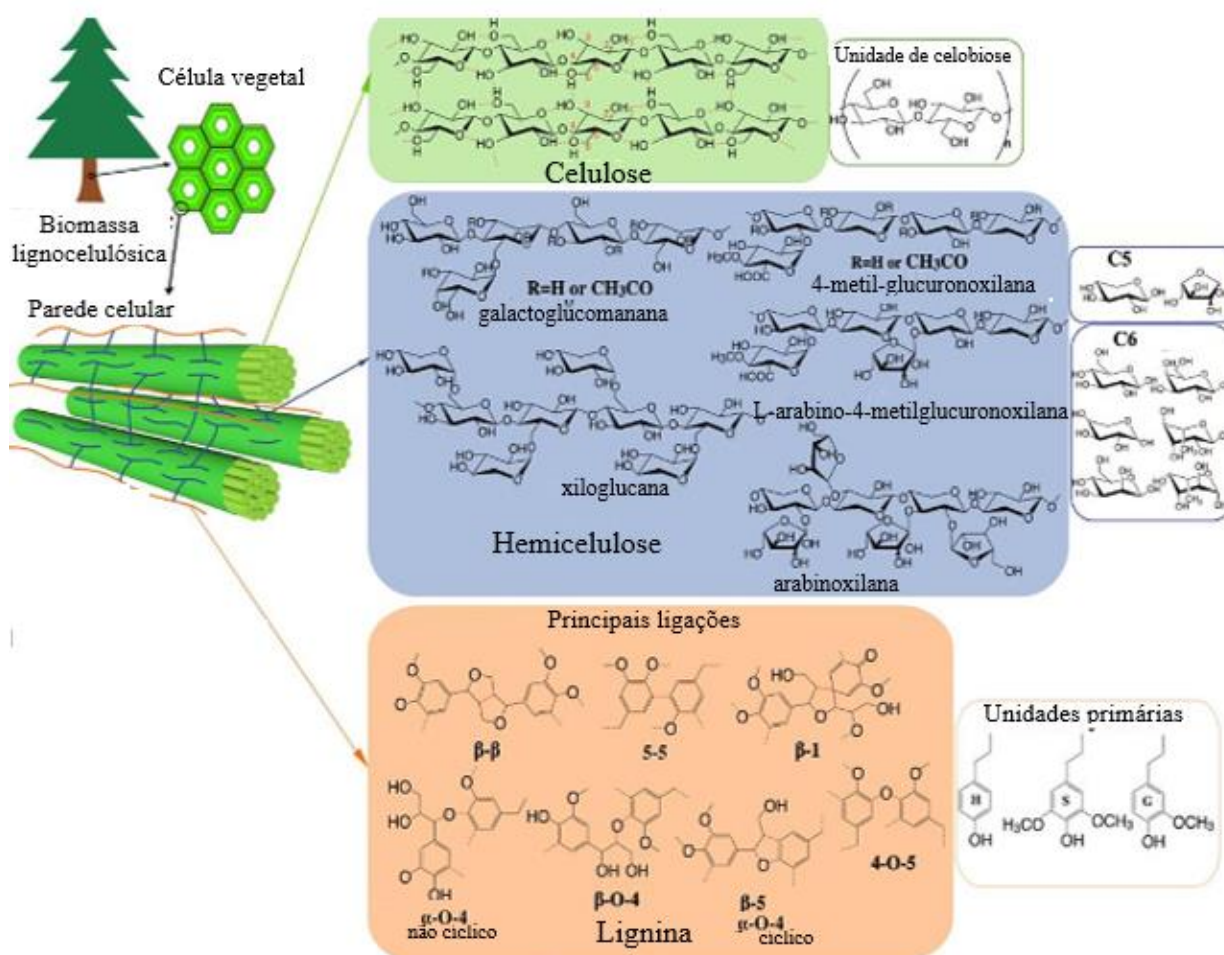


Figura 1. Representação esquemática da composição de biomassas lignocelulósicas.

Fonte: (Wang *et al.*, 2021).

Tabela 1. Composição química de biomassas lignocelulósicas encontradas no Brasil.

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Bagaço de cana-de-açúcar	40	24	25
Palha de milho	40	25	17
Sabugo de milho	39	35	15
Fibra de milho	15	35	8
Haste do algodão	31	11	30
Palha de arroz	35	25	12
Palha de soja	25	12	18
Farelo de trigo	10-15	35-39	8-12
Palha de trigo	38	21	23
Gramíneas	25-40	35-50	10-30
Álamo híbrido	44	18	26
Pinus	44	22	28
Resíduos de papel	76	13	11

Fonte: adaptado de Yang & Yu, 2013 *apud* Faria *et al.*, 2016.

### 2.1.1. Composição majoritária das biomassas lignocelulósicas

#### 2.1.1.1. Celulose

Aproximadamente 50% do carbono fixado por meio da fotossíntese é armazenado na forma de celulose em plantas. A celulose é um homopolímero cuja massa molecular é relativamente alto. É formado por inúmeras moléculas de D-glicose (cerca de 500 a 15000 unidades) unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. As cadeias de celulose interagem umas com as outras por meio de ligações tais como ligações de hidrogênio e interações de Van der Waal, formando agregados de microfibrilas de aproximadamente 5-15 nm de diâmetro (Figura 2A) (Sreedharan Sajith *et al.*, 2016)

Algumas regiões das microfibrilas de celulose estão arranjadas de modo paralela de uma maneira altamente ordenada, resultando em uma estrutura cristalina, enquanto outras, menos arranjadas, contribuem para a formação de regiões amorfas. (Figura 2B). Como consequência dessa estrutura da celulose, tem-se a sua alta rigidez e sua dificuldade de rompimento por enzimas (Fatma *et al.*, 2018; Sreedharan Sajith *et al.*, 2016)

Portanto, mesmo a celulose sendo um homopolímero, ela não apresenta uma estrutura homogênea, e, diante disso, a IUPAC recomenda a hidrólise de papel filtro (celulose com alto grau de cristalinidade) como condição de medida de processos de determinação de atividade celulolítica (Sreedharan Sajith *et al.*, 2016)

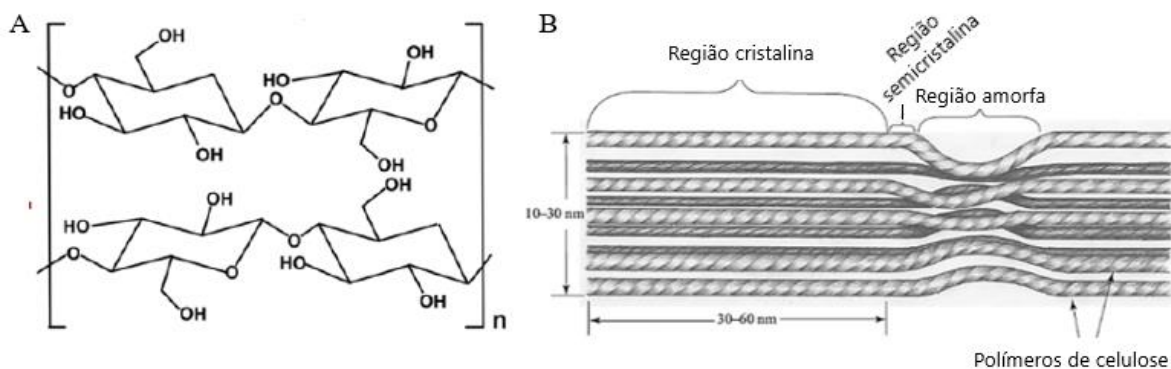


Figura 2. (A) Estrutura molecular da celulose; (B) Representação das regiões cristalina e amorfa da celulose.

Fonte: (Elseify *et al.*, 2019; He *et al.*, 2021)

#### 2.1.1.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses possuem uma estrutura heterogênea e variável, altamente ramificada, originada de heteropolímeros que incluem hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manoses) juntamente com pentoses (D-xilose, L-arabinose), podendo também conter açúcares ácidos (ácidos urônicos) como D-galacturônico, D-glucurônico e ácidos metilgalacturônicos. A Figura 3 representa uma cadeia de glucuronoarabinoxilanas: moléculas de xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 que se unem a arabinose em  $\alpha$ -1,3, e a ácido galacturônico em  $\alpha$ -1,2. A estrutura básica dessas cadeias é formada por ligações  $\beta$ -1,4 que unem D-xilose (90%) e L-arabinose (10%) (Buckeridge & de Souza, 2014; Fatma *et al.*, 2018; Sajith *et al.*, 2016a).

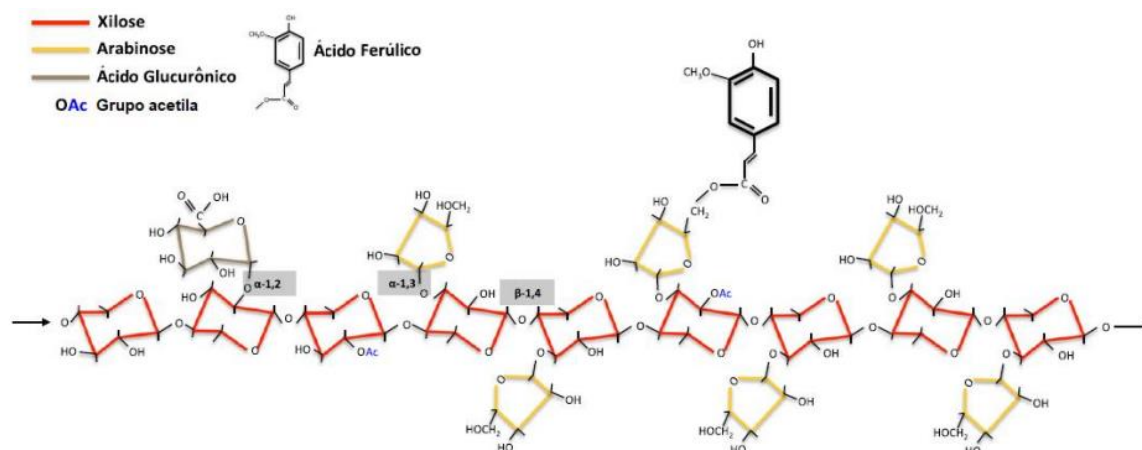


Figura 3. Representação esquemática da estrutura de glucuronoarabinoxilanas.

Fonte: (Buckeridge & de Souza, 2014)

Geralmente em gimnospermas como pinus, a parte hemicelulósica é composta principalmente por mananas, especialmente glicomananas e galactoglucomanas, enquanto em angiospermas e plantas herbáceas possuem alta quantidade de xilana. Assim sendo, a composição da fração de hemicelulose bem como seu grau de ramificação depende da matéria prima a qual é utilizada. O principal papel da hemicelulose é unir a celulose e a lignina (Fatma *et al.*, 2018; Sreedharan Sajith *et al.*, 2016).

### 2.1.1.3.Lignina

A lignina é o segundo componente majoritário presente na biomassa lignocelulósica. Além disso possui um grande papel no custo da utilização de materiais lignocelulósicos ao se referir a ação enzimática. A lignina é formada a partir do agrupamento radicalar de três álcoois hidroxi-cinâmílicos precursores: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 4). Pode-se classificar as unidades básicas conforme o grau de metilação do anel aromático: a) *p*-hidroxifenil (derivada do álcool *p*-cumarílico e não metoxilada, conhecida como lignina H); b) guaiacil (derivada do álcool coniferílico e com uma metoxila, conhecida como lignina G); e c) sinapil (derivada do álcool sinapílico e com duas metoxilas, conhecida como lignina S). As ligninas de madeiras de coníferas possuem, em maior quantidade, unidades do tipo G, enquanto as ligninas de madeiras folhosas são mais ricas em unidades S (Aguiar & Ferraz, 2011; Carvalho *et al.*, 2009).



Figura 4. (A) Unidade de fenilpropano; (B) Unidades básicas formadoras da lignina.

Fonte: Adaptado de (Rubin, 2008).

Os tipos de acoplamento entre as unidades básicas da lignina originam vários tipos de ligações entre as unidades de fenilpropano (Figura 5). As mais frequentes ligações são do tipo  $\beta$ -O-4, e  $\alpha$ -O-4 (50-65%),  $\beta$ -1 (9-15%),  $\beta$ -5 (6-15%), 5-5 (2-9%) e  $\beta$ - $\beta$  (2-5%). Mais recentemente estruturas dibenzodioxocinas estão sendo descritas, resultantes do acoplamento entre três fragmentos de fenilpropano por meio de ligações 5-5,  $\beta$ -O-4 e  $\alpha$ -O-4 (Aguiar & Ferraz, 2011; Carvalho *et al.*, 2009).

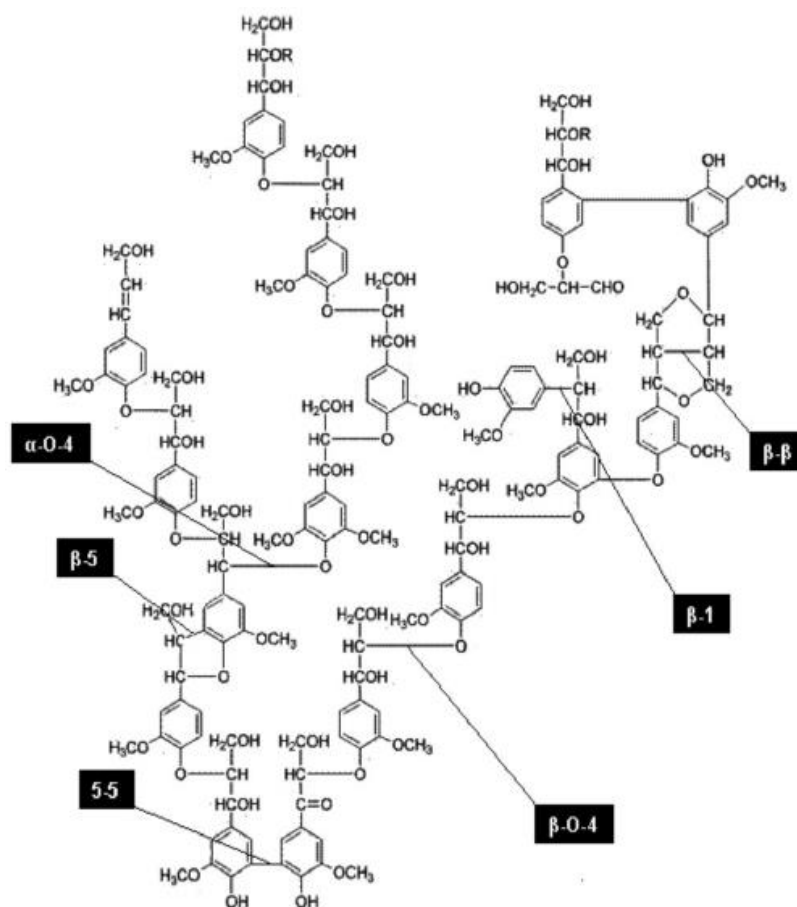


Figura 5. Principais tipos de ligações entre as moléculas básicas que constituem a lignina.

Fonte: (Carvalho *et al.*, 2009)



## 2.1.2. Matérias-primas lignocelulósicas

### 2.1.2.1. Eucalipto

O eucalipto é uma das *hardwoods* mais plantadas no mundo, utilizada para a produção de combustíveis, materiais e produtos químicos. Essa biomassa é relatada na literatura como potencial matéria-prima para biorefinarias, baseada no fracionamento de seus componentes majoritários a fim de gerar produtos de elevado valor agregado. Cerca de 90% da composição do eucalipto corresponde a celulose (34-51%), hemiceluloses (9-23%) e lignina (20-36%) (Penín *et al.*, 2020).

O eucalipto supre as necessidades de matéria-prima na indústria de papel e celulose. A produtividade dessa espécie vegetal está relacionada com a rápida expansão no mercado de papel, celulose e serraria. Os plantios de eucalipto cobriam, em 2019, mais de 5,5 milhões de hectares. Se plantados em bons solos e com boas sementes, adubados, e com ótimo combate a pragas, produtividades de mais de 39 m<sup>3</sup>/ha.ano podem ser atingidas (MME, 2007; Embrapa, 2019).

Além de resíduos da agroindústria, resíduos da indústria moveleira também vêm despertando interesse para a produção de energia, como por exemplo o eucalipto (Figura 6). O eucalipto é uma planta arbórea e perene que possui um ciclo de crescimento relativamente rápido, madeira de boa qualidade, e boa adaptação à diferentes regiões ecológicas (Hinchee, Rottmann & Mullinax, 2009).

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família *Myrtaceae*, possui 730 espécies botânicas, mas somente cerca de 20 são utilizadas para fins comerciais no mundo. Diversos países relatam o uso de espécies de Eucalipto para fibras e produção de energia, como Austrália, Hawaii (EUA), Irlanda, África do Sul e Brasil, dentre outros (González-López, García & Casquero, 2015). No Brasil, o gênero foi inicialmente introduzido no Rio Grande do Sul, em 1868, mas os primeiros estudos sobre a planta foram realizados somente em 1904 (Embrapa, 2019).

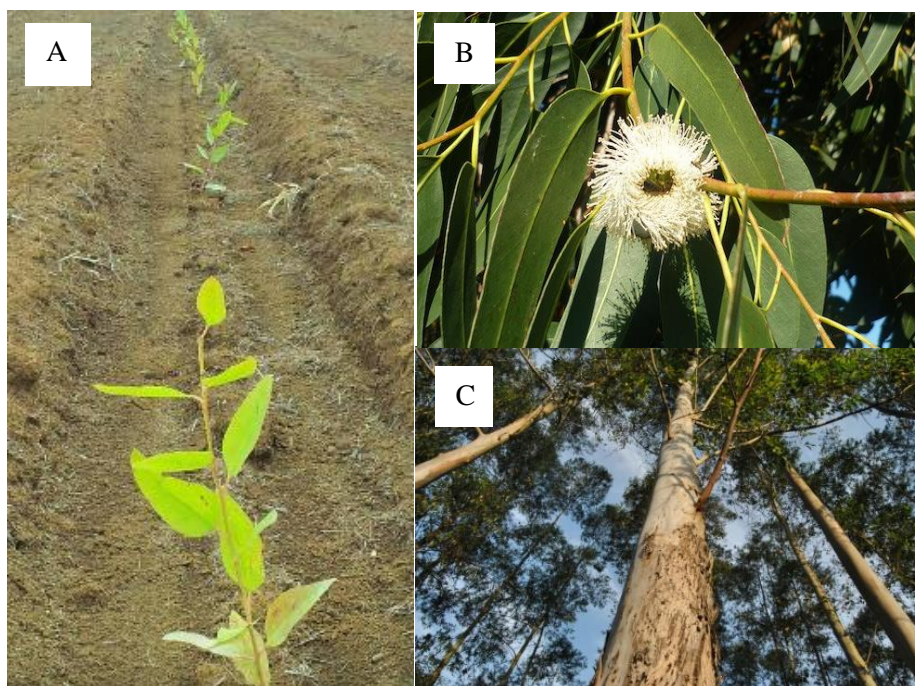


Figura 6: (A) Mudanças de eucalipto; (B) Flor de eucalipto; (C) Plantação de eucalipto.

#### 2.1.2.2. Casca e farelo de arroz

O arroz está entre as três maiores culturas agrícolas mundiais, sendo uma importante fonte de alimento em países asiáticos, principalmente. De acordo com a FAO, somente em 2018 foram produzidas cerca de 782 milhões de toneladas de arroz. O farelo de arroz é obtido através do processo de retirada da casca do arroz, o qual é uma mistura quebradiça de casca, tegumento e embrião. O farelo de arroz possui aproximadamente 95% dos nutrientes contidos no arroz (Matei *et al.*, 2020).

A produção anual na Coreia do Norte corresponde a cerca de 400 mil toneladas, das quais 3% são utilizadas como ração animal, 5% para óleo de farelo de arroz, e 92% é descartado (Choi, 2020). A casca de arroz é composta por cerca de 31.12% de celulose, 22.48% de hemicelulose, e 22.37% de lignina. Moinhos são utilizados para incinerar essa biomassa como forma de produção de energia, porém a parcial incineração desse material e a geração de cinzas da casca de arroz podem causar problemas ambientais. Portanto, melhores usos para esse subproduto devem ser investigados, como por exemplo, como matéria-prima para produção de biomateriais, biocombustíveis, dentre outros (Matei *et al.*, 2020; Senthil Kumar *et al.*, 2010).

### 2.1.2.3.Farelo de soja

A soja, planta pertencente à família Fabaceae e de nome científico *Glycine max*, é utilizada para alimentação humana e animal. São produzidas cerca de 359 milhões de toneladas anualmente, porém somente cerca de 6% da produção total de soja é utilizada na forma de grão inteiro, e o restante é processado (Jia et al., 2020). O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, atrás dos EUA. Entre 2016 e 2017 as plantações de soja atingiram a ocupação de 33,89 milhões de hectares, produzindo cerca de 113,92 milhões de toneladas dessa biomassa (Embrapa Soja, 2018). Cerca de 2/3 da produção mundial de farelo de soja é utilizada para suprir a demanda alimentar de suínos e aves. Essa biomassa apresenta em sua composição elevada quantidade de proteínas (Bellaver & Snizek, [s.d.]).

### 2.1.2.4.Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é a base de diversos sistemas agroindustriais em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Esta biomassa é amplamente utilizada como matéria-prima para a produção de combustíveis, além de servir como fonte de alimento. No Brasil a cana-de-açúcar teve sua participação no setor energético ampliada com o Programa ProÁlcool, que incentiva a produção de etanol combustível a partir dessa matéria-prima. Seus resíduos, o bagaço e a palha estão sendo cada vez mais valorizados devido ao seu elevado potencial de aplicação (Negrão *et al.*, 2021; Pazuch *et al.*, 2017).

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à família Gramineae e tem como nome botânico *Saccharum officinarum*. A produção estimada no Brasil é de cerca de 758 milhões de toneladas. Estima-se que aproximadamente 80% da demanda de açúcares seja suprida pelo cultivo da cana-de-açúcar. O bagaço de cana-de-açúcar, gerado após a extração da cana, é composto por 32-45% de celulose, 20-32% de hemicelulose, 17-32% de lignina, 1-9% de cinzas e outros componentes. Devido ao excesso de produção, o bagaço é queimado como forma de redução de resíduos, causando poluição ambiental. Portanto, é importante o desenvolvimento de pesquisas para utilização desse resíduo. Essa biomassa é relatada na literatura como matéria-prima potencial para produção de etanol de segunda geração, enzimas, eletricidade, açúcares e vários outros produtos de valor agregado (Alokika *et al.*, 2021).

## **2.2. Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas**

Devido à recalcitrância da biomassa lignocelulósica, diferentes estratégias de pré-tratamento são realizadas a fim de abrir a estrutura do material e aumentar a acessibilidade a moléculas hidrolisáveis (Figura 7). Cada tipo de pré-tratamento tem um efeito específico e distinto nos componentes majoritários da biomassa lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina), assim como cada pré-tratamento tem resultados diferentes dependendo da fonte lignocelulósica. De acordo com Robak & Balcersek (2018), cinco são os principais objetivos da etapa de pré-tratamento: evitar perda de açúcares (principalmente pentoses); aumentar a produção de açúcares fermentescíveis; reduzir a formação de inibidores do processo de fermentação; recuperar a lignina para geração de produtos de interesse comercial; e reduzir os gastos com energia (Robak & Balcersek, 2018).

### **2.2.1. Tipos de pré-tratamento**

Os pré-tratamentos físicos, na maioria das vezes, tem o intuito de reduzir o tamanho das partículas, porém são um método que consome muita energia, gerando um processo mais oneroso que seu produto. Além disso, fatores como a temperatura, tempo, pressão e material podem afetá-lo. Geralmente os pré-tratamentos mecânicos não são suficientes para obter um bom rendimento na etapa de hidrólise, sendo então combinados com pré-tratamentos químicos, por exemplo (Zhang, Han & Dong, 2021). A Figura 7 apresenta de maneira esquemática o exemplo de uma biomassa lignocelulósica e sua estrutura antes e após o processo do pré-tratamento.

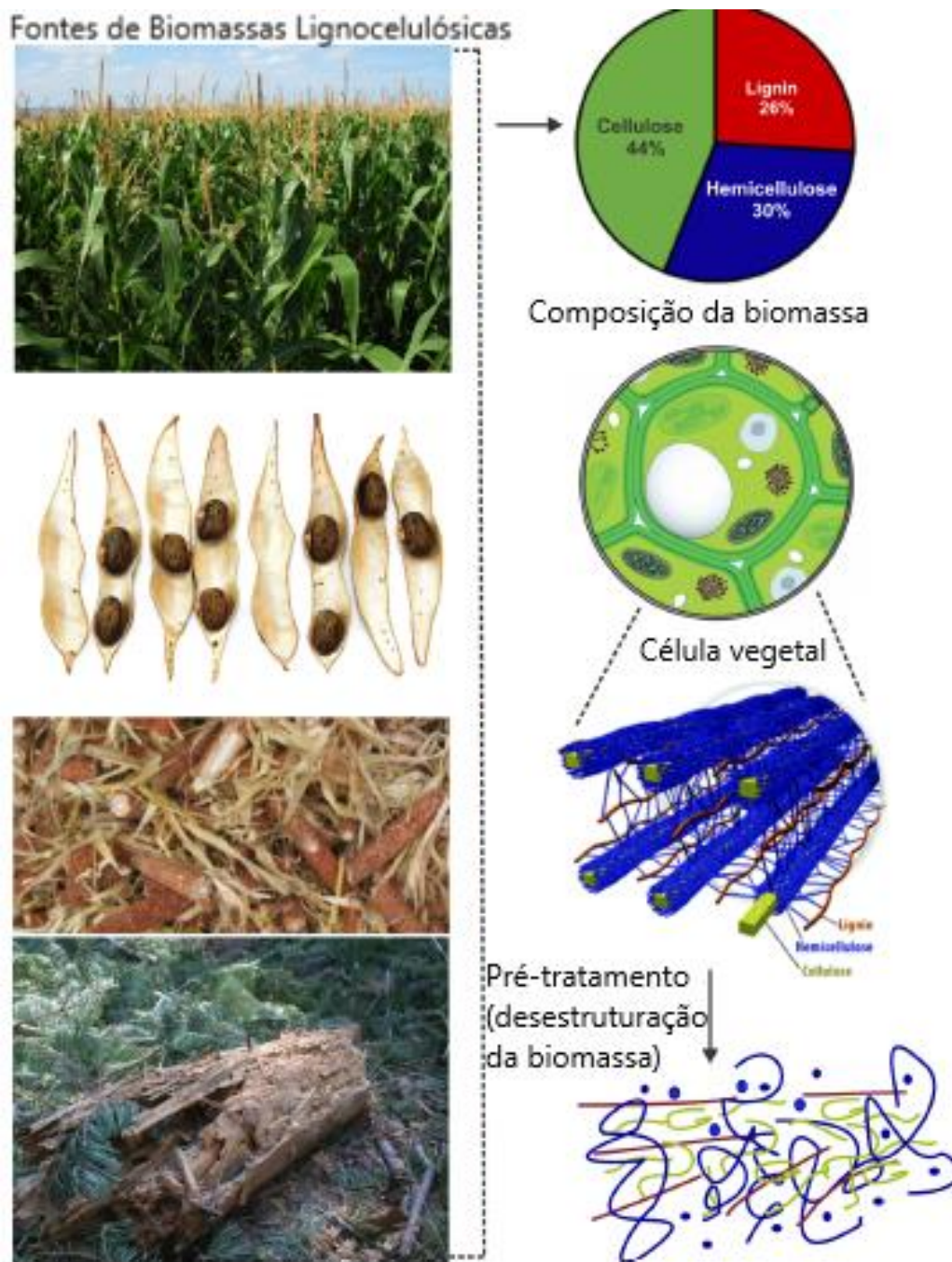


Figura 7. Exemplo de biomassa lignocelulósica e sua estrutura antes e após a etapa de pré-tratamento.

Fonte: (Fatma *et al.*, 2018).

Tabela 2. Comparação de diferentes tipos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas.

<b>Método de pré-tratamento</b>	<b>Abordagem</b>	<b>Descrição</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Físicos	Mecânico	Envolve trituração e moagem	Aumenta a superfície da biomassa e reduz a cristalinidade da celulose	Necessita de grande quantidade de energia e não remove lignina
	Irradiação	Envolve energias de radiação (raios gama, UV, beta, etc)	Aumenta a área de superfície, reduz o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, e desconstrói a lignina	Alto investimento e nível de energia e danifica o meio ambiente
Físico-químicos	Explosão a Vapor	Utiliza um sistema de alta pressão e temperatura (160-290°C) e depois faz descompressão a pressão atmosférica	Bom custo-benefício e separação de fibras da biomassa lignocelulósica	Deslignificação incompleta e produção de inibidores
	Hidrotérmico	Processamento da biomassa a alta temperatura (170-230°C) e pressão (5Mpa)	Alta taxa de recuperação de xilose, sustentável e econômico	Produção de inibidores e alto investimento energético
Químicos	Ácido	Utilização de ácidos concentrados ou diluídos para desconstrução da BL	Alto rendimento de açúcares e boa hidrólise da hemicelulose	Corroem equipamentos, produz inibidores e perda de açúcares
	Alcalino	Deslignifica a BL utilizando bases como NaOH, NH, etc.	Requer baixa temperatura e pressão, menor geração de inibidores e boa remoção de lignina	Necessidade de bastante tempo, neutralização e pode causar mudanças na estrutura da lignina
	Solventes orgânicos	Utilização de solventes como metanol, etanol, glicol, e outros para hidrolisar a hemicelulose	Recuperação de lignina pura, menor degradação de açúcares e limita a perda de celulose	Necessidade de agentes químicos onerosos para remoção de solventes e geração de inibidores
	Líquidos iônicos	Líquidos iônicos são sais que compreendem ânions e cátions	Sem produção de inibidores, baixa degradação de açúcares e sustentável	Requer investimento capital, lavagem necessária para reutilização, não relatado em escala industrial
Biológicos	Microrganismos	Processamento de matéria-prima com microrganismos (bactérias e fungos)	Degradação completa da lignina, bom custo-benefício, pouca energia necessária, pouca geração de inibidores, redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose	Demorado tempo de incubação (10 a 14 dias), perda de açúcares utilizados pelos microrganismos, degradação progressiva

Fonte: (Fatma *et al.*, 2018)

Pré-tratamentos químicos são realizados com a utilização de ácidos, bases, líquidos iônicos, solventes orgânicos, amônia, dentre outros agentes. Eles atuam diretamente modificando a estrutura nativa da biomassa lignocelulósica. Os pré-tratamentos químicos permitem obter maiores rendimentos do hidrolisado em *hardwoods*, enquanto *softwoods* apresentam menores rendimentos de açúcares (Kumar *et al.*, 2020).

Os pré-tratamentos biológicos apresentam diversas vantagens, como a baixa necessidade de energia, não-toxicidade, são ecologicamente sustentáveis e não geram inibidores. Nele são utilizados microrganismos como bactérias ou fungos, os quais despolimerizam a lignina e hemicelulose da BL. Esse pré-tratamento pode depender de condições químicas (como pH), físicas (como temperatura e tamanho das partículas), e biológicas (como linhagem do microrganismo utilizado). Assim como os pré-tratamentos físicos, não são suficientemente eficazes na degradação da biomassa lignocelulósica, e são, conseqüentemente, combinados com outros tipos de pré-tratamento. (Patel *et al.*, 2019; Tu & Hallett, 2019b).

### 2.2.2. Pré-tratamento por explosão a vapor

O pré-tratamento por explosão a vapor é um dos mais investigados, pois apresenta um baixo consumo de energia e pode ser realizado em um curto período de tempo. Este pré-tratamento consiste no tratamento da biomassa lignocelulósica com temperaturas entre 160-270 °C por um período de tempo que varia de alguns segundos a poucos minutos. Com o aumento da temperatura ocorre o aumento da pressão, e o resultado final do processo é um material escuro a partir do qual hemiceluloses parcialmente hidrolisadas podem ser recuperadas (com lavagem em água), produzindo uma fração insolúvel em água composta de celulose, hemicelulose residual e uma lignina com sua estrutura modificada – a qual pode ser futuramente extraída com dioxano, etanol ou agentes alcalinos (como peróxido de hidrogênio e clorito de sódio). A desestruturação da parede celular vegetal é consequência da elevada pressão, das condições químicas do meio, e da rápida despressurização do sistema ao final do pré-tratamento (Bhutto *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2020; Silveira *et al.*, 2015; Ramos, 2003a).

Biomassas provenientes de diferentes fontes podem ser submetidas ao pré-tratamento por explosão à vapor, sejam elas resíduos agroindustriais ou de florestas, como por exemplo bagaço de cana-de-açúcar, eucalipto e casca de arroz. O pré-tratamento pode

ser conduzido com alta concentração de sólidos totais, permite elevados índices de recuperação e produz uma fração enriquecida em celulose mais suscetível a hidrólise enzimática quando em comparação com a biomassa não pré-tratada (Henrique *et al.*, 2015; Ramos, 2003b). Porém, este pré-tratamento não desestrutura completamente a lignina e destrói uma parcela da xilana presente na hemicelulose (Kumar *et al.*, 2020).

A autoionização da água em elevadas temperaturas gera cátions e ânions, os quais atuam como catalisadores, dando início a hidrólise das hemiceluloses. O pré-tratamento por explosão a vapor pode ser conduzido com ou sem adição de ácidos catalíticos. O contato inicial com o vapor em alta pressão implica na desacetilação da hemicelulose, e o ácido acético catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas da hemicelulose. Pode ocorrer a formação de compostos inibidores de hidrólise e fermentação (como compostos aromáticos fenólicos e subprodutos da desidratação dos açúcares da hemicelulose - furfural e HMF). O uso de ácidos catalíticos como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e SO<sub>2</sub> junto com o pré-tratamento por explosão a vapor permite que o tempo e a temperatura do processo sejam menores (Henrique *et al.*, 2015).

### **2.3.Enzimas lignocelulolíticas**

As enzimas lignocelulolíticas são enzimas que atuam sobre a biomassa lignocelulósicas. As principais são:

#### **2.3.1. Celulases**

As enzimas celulases pertencem ao grupo das glicosilhidrolases (GH). A classificação das celulases é baseada no grau de polimerização do substrato sobre o qual essas enzimas agem (Florencio, Badino & Farinas, 2017; Gupta *et al.*, 2016a; Siqueira *et al.*, 2020). São três as principais classes de celulases encontradas: (1) Endoglicanases ou 1,4— $\beta$ -D-glicano-4-glicanohidrolases (EC 3.2.1.4); (2) Exoglicanases como as celudextrinases (EC 3.2.1.176) e as celubiohidrolases (EC 3.2.1.91); e (3)  $\beta$ -glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21) (Figura 8).



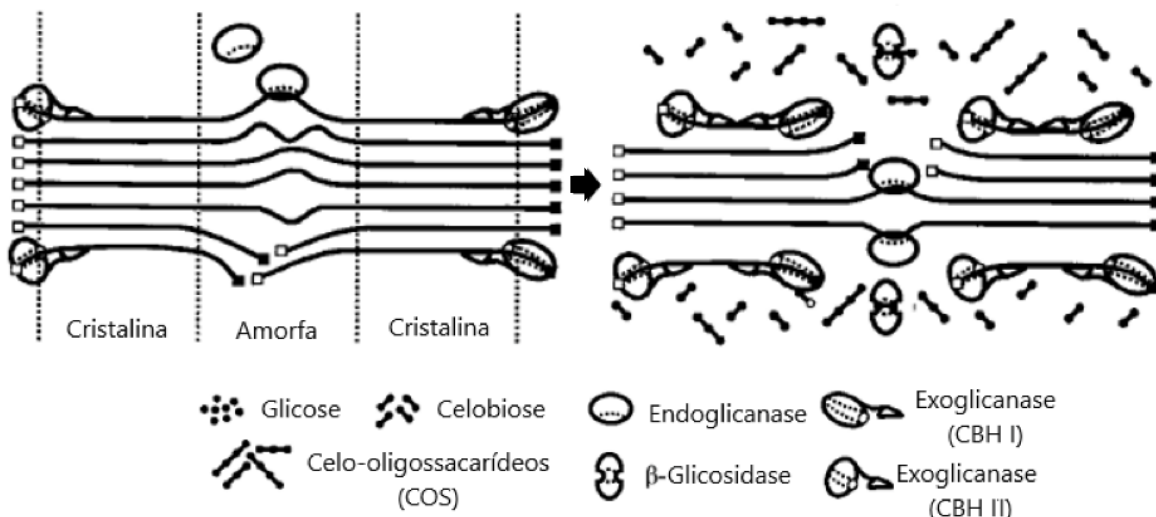


Figura 8. Ação sinérgica das enzimas celulases sobre as regiões amorfas e cristalina da celulose.

Fonte: (Lynd *et al.*, 2002)

As enzimas celulases atuam na conversão da celulose em oligossacarídeos, celobiose e glicose. Enquanto as EGs atuam sobre as regiões amorfas da celulose clivando as fibras de maneira aleatória, as CBHs atuam diretamente em extremidades reductoras e não reductoras das cadeias de glicose. Por fim, as BGs desconstruem a celobiose e os oligossacarídeos para liberar o produto final glicose (Tabela 3). Essas enzimas possuem afinidade por diferentes componentes da parede celular dependendo da morfologia e tamanho (Paul *et al.*, 2021).

Uma série de enzimas acessórias, também conhecidas como monooxigenases de polissacarídeo lítico (LPMOs) atuam sinergicamente com as celulases. Essas enzimas clivam a celulose na posição C1 e/ou C4 nas unidades de glicose na cadeia de celulose, mas requerem um agente redutor, que nos fungos acredita-se ser a celobiose desidrogenase. Proteínas não catalíticas denominadas expansinas possuem participação na degradação da celulose, porém seu mecanismo de funcionamento ainda não foi totalmente elucidado (Gupta *et al.*, 2016b).

Tabela 3. Enzimas envolvidas no processo de degradação da celulose.

<b>Enzima</b>	<b>Nomenclatura internacional</b>	<b>Ação</b>	<b>Produto</b>	<b>Exemplos de famílias</b>
Endoglicanases ou 1,4— $\beta$ -D-glicano-4-glicanohidrolases (EG)	EC 3.2.1.4	Hidrolisam aleatoriamente as pontes glicosídicas das regiões amorfas da celulose	Liberam oligômeros de diversos graus de polimerização com extremidades redutoras e não redutoras	GH5, GH12 e GH45
Exoglicanases	EC 3.2.1.176	Hidrolisam as ligações glicosídicas $\beta$ -1,4 de oligômeros com extremidades redutoras	Liberam celobiose (dímeros de glicose)	GH7
	EC 3.2.1.91	Hidrolisam as ligações glicosídicas $\beta$ -1,4 de oligômeros com extremidades não redutoras	Liberam celobiose (dímeros de glicose)	GH6
$\beta$ -glicosidases ou celobiasas	EC 3.2.1.21	Hidrolisam as ligações glicosídicas entre duas moléculas de glicose (celobiose)	Liberam monômeros de glicose	GH1 e GH3

Fonte: A autora.

Por serem enzimas hidrolíticas, as celulasas realizam a inserção de uma molécula de água ao substrato por meio de um ataque nucleofílico. Essas enzimas utilizam o mecanismo de ação denominado catálise ácida. As celulasas podem ser utilizadas na indústria de papel e polpa, extração e clarificação de sucos, ração animal, decomposição de resíduos para melhora da fertilidade do solo, etanol celulósico, assim como aditivos para indústria alimentícia (Siqueira *et al.*, 2020).

As celulasas fúngicas são enzimas relativamente simples e modulares com domínios e módulos distintos. A maioria apresenta duas regiões: o domínio catalítico e o domínio de ligação ao substrato, os quais são unidos por um poliligante rico em serina e treonina com tamanho e estrutura de cadeia variada (Figura 9). Os domínios de ligação ao substrato apresentam tamanhos que variam entre 4 e 20 kDa e são ricos em aminoácidos aromáticos, e por vezes polares que imobilizam o substrato durante o processo de catálise. O sítio ativo do domínio catalítico pode apresentar-se em forma de túnel, fenda ou bolso, de forma a

permitir a eficiência da hidrólise. A massa molecular das enzimas celulases de fungos varia entre 12 kDa a 126 kDa (Sreedharan Sajith *et al.*, 2016).

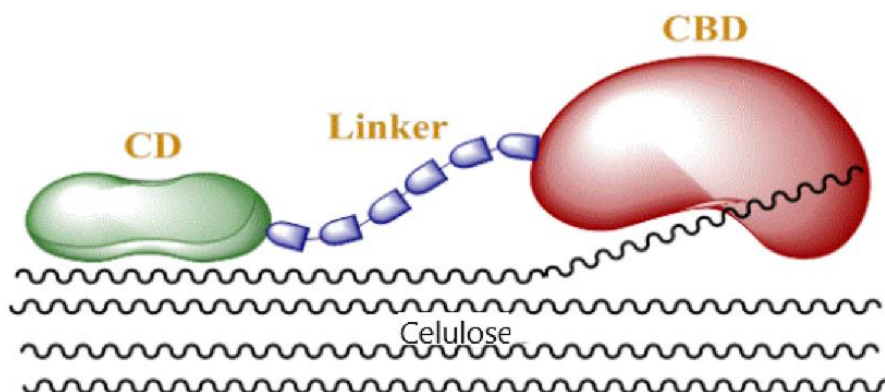


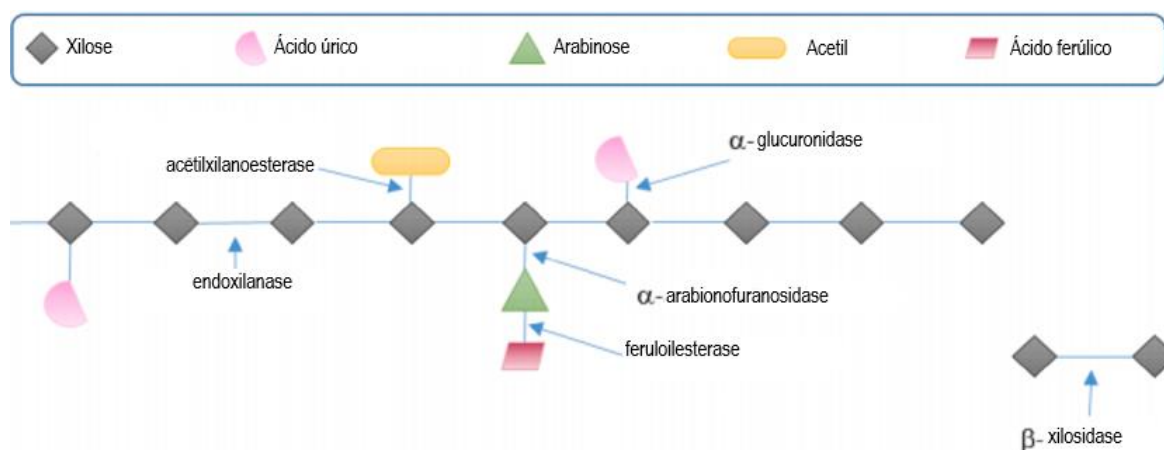
Figura 9: Estrutura geral de celulases fúngicas e seu domínio catalítico (CD) e domínio de ligação ao carboidrato (CBD) unidos por um peptídeo ligante (linker).

Fonte: (Sreedharan Sajith *et al.*, 2016)

### 2.3.2. Hemicelulases

Hemicelulases são glicosilhidrolases ou carboidrato esterases representadas principalmente pelas xilanases (EC 3.2.1.8), endoxilanases (famílias GH 10, 11, 30, 43 e 51), xiloglicanases (famílias GH 12 e 74),  $\beta$ -mananases (EC 3.2.1.78, famílias GH 5,26 e 134), arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), e  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37, famílias 30, 39, 43 e 51). As xilanases representam cerca de 70% das hemicelulases e são responsáveis pela hidrólise da xilana a oligômeros, os quais são posteriormente transformados em xilose pelas  $\beta$ -xilosidases. As enzimas que atuam na hemicelulose dependem da composição do seu substrato (Figura 10; Tabela 4) (Gupta *et al.*, 2016a; Sreedharan Sajith *et al.*, 2016).

A secreção de diferentes enzimas que degradam a hemicelulose geralmente está relacionada com a presença do seu substrato correspondente no meio de cultivo. O tamanho dos polissacarídeos previne a sua entrada nas células, mas os seus produtos após serem degradados atuam como indutores ao penetrar o ambiente intracelular (Méndez-Líter *et al.*, 2021).



\* As setas correspondem às ligações que são clivadas pelas enzimas correspondentes.

Figura 10. Sistema enzimático envolvido na degradação da hemicelulose (arabinoxilana).

Fonte: (Méndez-Líter *et al.*, 2021).

As xilanases fúngicas são produzidas em meio a qualquer resíduo lignocelulósico, mas sua máxima expressão se dá em cultivos na presença de xilana ou substratos que contenham esse polissacarídeo. As endo-1,4- $\beta$ -xilanases hidrolisam as ligações  $\beta$ -1,4 entre resíduos de xilopiranosídeo localizados ao redor dos grupos substituintes das xilanas, tais como ácidos metil-glucurônicos e ácidos acéticos. Na presença das incomuns ligações  $\beta$ -1,3 da cadeia principal, porém, percebe-se que sua atividade fica consideravelmente reduzida. As  $\beta$ -xilosidases, também conhecidas como exo-1,4- $\beta$ -xilosidases são capazes de realizar a liberação de monômeros de xilose a partir de terminações não redutoras de pequenos oligossacarídeos (Tabela 4) (Méndez-Líter *et al.*, 2021).

Tabela 4. Enzimas envolvidas no processo de degradação da xilana.

Enzima	Nomenclatura internacional	Ação	Produto	Exemplos de famílias
Endo-xilanases ou endo-1,4- $\beta$ -xilanase	EC 3.2.1.8	Hidrolisam a ligação homopolimérica de $\beta$ -D-xilopiranosose em 1,4	Xilooligômeros	GH5, GH7, GH8, GH10, GH 26 e GH43
$\beta$ -xilosidases ou exo-1,4- $\beta$ -xilosidase	EC 3.2.1.37	Hidrolisam xilooligômeros	Monômeros de xilose	GH3, GH39, GH43, GH52 e GH54

Fonte: A autora.

A estrutura heterogênea característica das xilanas requer a participação de enzimas acessórias para maior eficiência de hidrólise do substrato completo. Essas enzimas removem as ramificações e os substituintes das cadeias principais, e não são consideradas glicosil hidrolases. As  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases hidrolisam a ligação entre um substituinte  $\alpha$ -L-arabinofuranosil e uma das moléculas de xilana da cadeia principal. Elas atuam sobre as extremidades não redutoras das ligações alvo, liberando moléculas de arabinofuranose. As xilano  $\alpha$ -1,2-glicuronidases e  $\alpha$ -glicuronidases hidrolisam a ligação glicosídica entre o ácido galacturônico ou ácido 4-O-metilglucurônico e as unidades de xilopirranose na cadeia principal. As acetilxilanoesterases catalisam a hidrólise de ligações éster entre um resíduo xilopiranosídico e seu substituinte acetil. As feruloilexterases hidrolisam os resíduos de ácido ferúlico esterificados a certas arabinoses nas cadeias laterais das xilanas. (Méndez-Líter *et al.*, 2021).

## **2.4. Aplicações das celulases e hemicelulases**

As enzimas celulases e hemicelulases possuem vasta aplicação. São utilizadas na indústria alimentícia para clarificação de sucos, como aditivos alimentares e ração animal; na indústria têxtil; na indústria de detergentes e produtos de limpeza; na indústria de papel e polpação; e em biorefinarias, a fim de participarem do processo de geração de produtos de valor agregado durante a utilização das diferentes frações da biomassa lignocelulósica.

### **2.4.1. Etanol de segunda geração**

A energia é um produto indispensável para a sobrevivência e desenvolvimento da sociedade humana. O aumento da população global, crescimento dos grandes centros mundiais e o aumento da emissão de gases do efeito estufa (GEE) apontam para a urgente necessidade de transição para fontes energéticas renováveis. De acordo com o *BP Energy Outlook* (2017), estima-se que a demanda global por energias cresça cerca de 30% até 2035, um aumento de 1,3% ao ano. Além disso, espera-se que os combustíveis não-fósseis representem aproximadamente metade desse crescimento no fornecimento de energia.

Os biocombustíveis –etanol celulósico, butanol e biodiesel – são de grande interesse para pesquisadores, indústrias e governos. O bioetanol auxilia na redução das emissões de GEEs, reduz a dependência do petróleo e demais combustíveis fósseis, e também auxilia na

geração de renda no setor da agricultura (Robak & Balcerek, 2018). O etanol de segunda geração é geralmente produzido a partir de biomassas lignocelulósicas, mas também pode ser produzido a partir de subprodutos industriais tais como o soro de leite e o glicerol. As biomassas são matérias primas relativamente pouco onerosas e disponíveis a nível local, dependendo das principais culturas de cada região do país (Dias *et al.*, 2011; Robak & Balcerek, 2018).

Uma vez que a biomassa lignocelulósica é composta por celulose, hemicelulose e lignina, ela pode ser convertida à açúcares fermentescíveis por meio de um processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática. Após essa etapa, o licor obtido é fermentado por bactérias e leveduras, e passará por uma etapa de destilação, para somente então ser denominado etanol de segunda geração (Dias *et al.*, 2011). A Figura 11 apresenta as etapas do processo de produção de etanol a partir de diferentes tipos de biomassa.

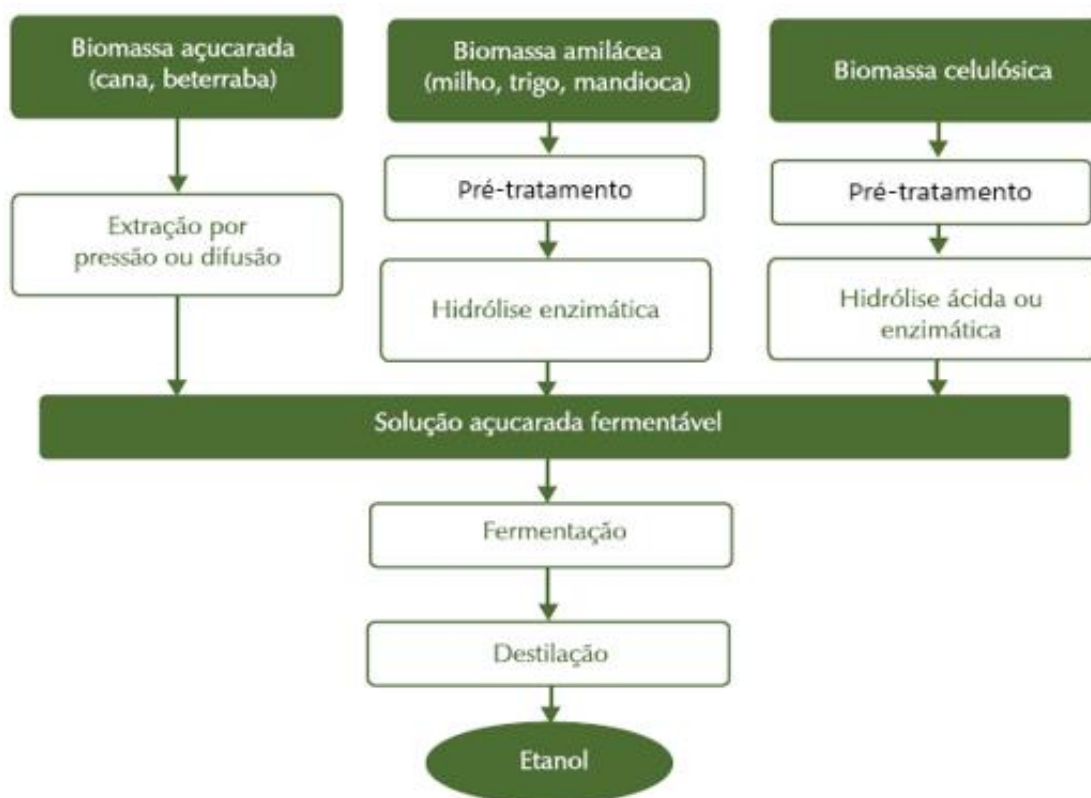


Figura 11. Esquema geral da produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas.

Fonte: adaptado de BNDES & CGEE, 2008.

A etapa de pré-tratamento da biomassa fraciona os constituintes de modo a possibilitar um melhor aproveitamento de cada fração e facilitar o acesso das enzimas. A escolha do melhor tipo de pré-tratamento deverá ser realizada de acordo com a composição

do material a ser hidrolisado. Nessa etapa podem ser gerados compostos inibidores, a depender do pré-tratamento utilizado, os quais podem ter grande influência sobre os microrganismos empregados no posterior processo de fermentação (Dias *et al.*, 2011).

A hidrólise enzimática tem como propósito liberar monossacarídeos obtidos a partir de polissacarídeos localizados na parede celular vegetal. A hidrólise da celulose e hemicelulose por meio das enzimas celulasas e hemicelulasas libera açúcares fermentescíveis que podem ser convertidos a etanol durante a fermentação. O processo de liberação de açúcares é catalisado por enzimas hidrolíticas. Biomassas sem pré-tratamento dificultam a acessibilidade de enzimas e assim sendo, necessitam da utilização de maior carga enzimática para conversão dos componentes. A quantidade de açúcares liberada está estreitamente ligada com o tipo de material lignocelulósico utilizado e os métodos de pré-tratamentos escolhidos (Dias *et al.*, 2011).

A sensibilidade do microrganismo a ser utilizado no processo fermentativo deve ser considerado, uma vez que pode ter sua atividade inibida devido a substâncias presentes no hidrolisado. A quantidade de componentes inibidores do processo fermentativo depende da biomassa utilizada, do pré-tratamento empregado e da hidrólise realizada. Os compostos inibidores do processo fermentativo podem ser divididos em categorias de acordo com sua origem: a) produzidos durante pré-tratamento e hidrólise – ácido acético (liberado a partir da quebra das cadeias de hemicelulose) e extrativos (terpenos, álcoois e compostos aromáticos como taninos); b) coprodutos da etapa de pré-tratamento e hidrólise, gerados a partir da degradação dos açúcares – furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido levulínico e ácido fórmico; c) compostos da degradação da lignina – diversos compostos aromáticos e poliaromáticos com vários grupos substituintes; d) produtos da fermentação – etanol, ácido acético, glicerol e ácido láctico – podem inibir o desenvolvimento do microrganismo fermentador (Olsson & Hahn-Hägerdal, 1996; Palmqvist, Arbel & Agerdal, 1999).

Diversos são os microrganismos relatados na literatura para fermentação dos hidrolisados, dentre eles: *Escherichia coli* recombinante, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chlostridium thermosacchrolyticum*, *Pachysolen stipitis*, etc. Essas bactérias e leveduras são capazes de bioquimicamente transformar carboidratos em produtos finais acetato e etanol. Para tal, fatores como temperatura, pH, nutrientes, concentração de substrato e presença de inibidores devem ser considerados a fim de atingir bons rendimentos de fermentação (Zabed *et al.*, 2016).

#### 2.4.2. Mercado de alimentos

As vendas de enzimas nos Estados Unidos da América corresponderam a US\$1.3 bilhões em 2002 e US\$ 5.1 bilhões em 2009, sendo que as enzimas com aplicação em indústria alimentícia corresponderam a cerca de 31% (Trafdar *et al.*, 2021). As enzimas celulases, xilanases e proteases são utilizadas para extração e clarificação de frutas, néctares e óleos. A extração de flavonóides com enzimas celulases a partir de flores e sementes aumenta o rendimento e reduz o tempo de extração e danos por aquecimento, quando comparado com a extração convencional. Celulases podem ser utilizadas para realçar o sabor e aroma de frutas cítricas, reduzindo sua acidez, assim como na indústria de cervejas e vinhos, favorecendo maior liberação de açúcares simples. As hemicelulases são utilizadas como aditivos de ração animal e para o processamento de farinhas (Sreedharan Sajith *et al.*, 2016; Shallom and Shoham, 2003; Tarafdar *et al.*, 2021).

#### 2.4.3. Indústria de papel e polpação

A utilização das celulases na indústria de polpação aumenta a eficiência energética do processo, assim como as propriedades físicas do papel, como ligações entre as fibras e força mecânica. Além de ser sustentável, limita a utilização de produtos químicos. Os resíduos de papel de diversos usos servem como uma importante matéria-prima para as indústrias de papel e polpação, uma vez que a reciclagem desses materiais reduz a geração de resíduos sólidos e reduz a exploração de madeira e desflorestamento. As celulases e hemicelulases, quando utilizadas em papéis reciclados, podem clareá-lo e aumentar sua qualidade para reuso (Juturu & Wu, 2012, 2014; Sajith *et al.*, 2016).

### **2.5.Fungos filamentosos**

Fungos compõem um grupo diverso de seres vivos que realizam um importante papel na reciclagem de energia e nutrientes, assim como influenciam a comunidade vegetal na qual está inserido por meio de relações simbióticas (Dighton & Dekker, 2004). Os fungos são organismos eucariotos que apresentam diferentes morfologias e são eficientes na degradação de diversos substratos (os quais são utilizados para sua nutrição), sendo os principais



decompositores de celulose e lignina. O crescimento e a atividade metabólica estão diretamente relacionados às condições físicas e químicas do ambiente. Sua forma de nutrição é absorptiva, e por meio da liberação de enzimas no substrato degradam macromoléculas a moléculas menores.

Fungos filamentosos são considerados grandes produtores de enzimas lignocelulolíticas e a principal fonte de celulases industriais, que podem ser obtidas em cultivo submerso ou em estado sólido. Os gêneros *Penicillium*, *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Hemicola* e *Fusarium* são de interesse industrial devido ao seu potencial na degradação de materiais lignocelulósicos (Passos, Junior & Castro, 2018; Sukumaran *et al.*, 2009). O fungo *Trichoderma reesei* é conhecido por ter grande potencial na desconstrução do material lignocelulolítico, comumente utilizado para a produção de enzimas xilanases e celulases (Faria *et al.*, 2008). Porém, o fungo filamentoso *Penicillium echinulatum* aparece também como um potencial produtor destas enzimas, uma vez que possui capacidade secretora semelhante à de *T. reesei* (Daniel *et al.*, 2017; Gusakov, 2011; Menegol *et al.*, 2016a; Vaishnav *et al.*, 2018).

#### 2.5.1. Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* é reportado na literatura entre os produtores de enzimas capazes de degradar a biomassa lignocelulósica. Dentre as espécies desse gênero, *Penicillium echinulatum* se destaca devido ao seu potencial de produzir elevadas atividades enzimáticas de celulases, sendo considerada uma linhagem potencial para produção de enzimas que participam no processo de hidrólise enzimática e consequente fermentação a etanol de segunda geração (Schneider *et al.*, 2018).

A Figura 12 ilustra o secretoma da linhagem mutante *P. echinulatum* S1M29 em um estudo realizado por Schneider *et al.*, 2016. Aproximadamente 42% das proteínas de *P. echinulatum* S1M29 são enzimas relacionadas à degradação de celulose e hemiceluloses, corroborando sua alta potencialidade como produtor dessa variedade de enzimas. Cerca de 11% de seu secretoma é composto por enzimas que degradam a lignina e 9% que degradam pectina (Schneider *et al.*, 2016a).

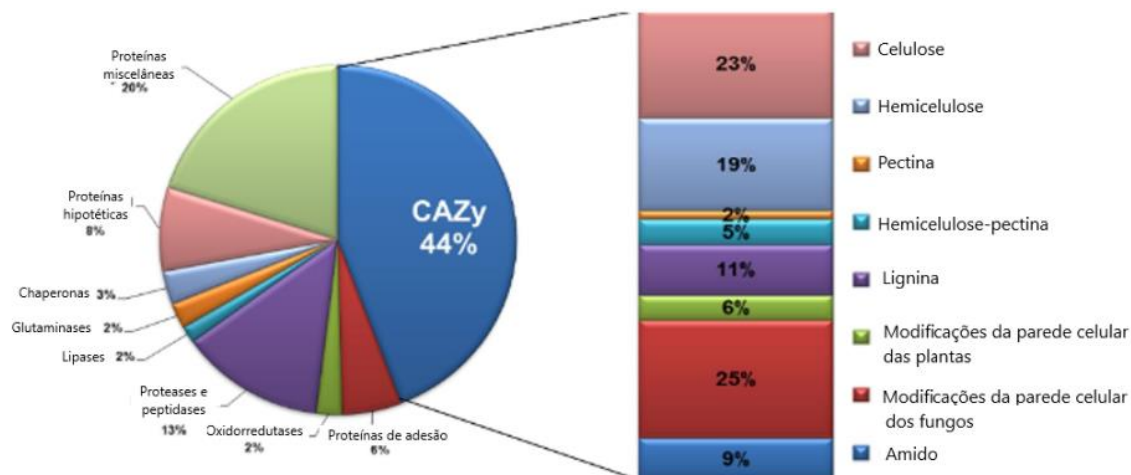


Figura 12. Distribuição de proteínas identificadas no secretoma de *Penicillium echinulatum* mutante S1M29 e seus respectivos substratos.

Fonte: (Schneider *et al.*, 2016a).

A linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum* foi obtida através de um processo de mutagênese da linhagem selvagem 2HH, extraída de larva *Anobium punctatum*, sendo caracterizada como parcialmente desreprimido por glicose. Esse microrganismo está depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* – DSM 18942. A linhagem mutante S1M29 foi obtida através do processo de mutação da linhagem 9A02S1 utilizando peróxido de hidrogênio e seleção de mutantes em um meio suplementado com 2-desoxiglicose (Dillon *et al.*, 2006, 2011) (Figura 13).

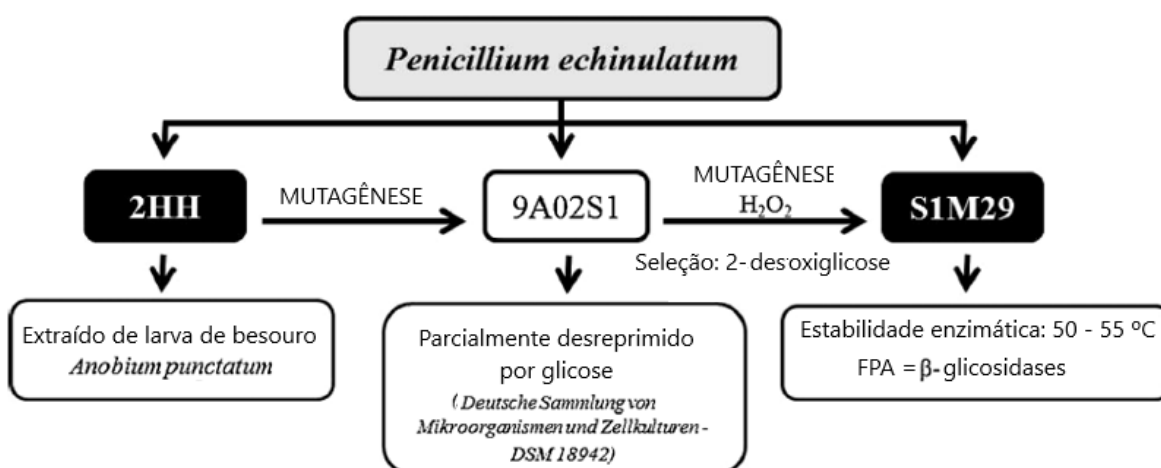


Figura 13. Esquema do processo de melhoramento genético do microrganismo *Penicillium echinulatum*.

Fonte: Schneider *et al.*, 2018.

Estudos relatam a utilização de diferentes substratos com o intuito de aumentar e aprimorar o processo de produção enzimática de *P. echinulatum*. Zampieri *et al.* (2013) observaram o efeito de diferentes fontes de carbono como indutores para a produção enzimática por *P. echinulatum* 9A02S1, concluindo que não somente os níveis de atividades enzimáticas variam dependendo da fonte utilizada, mas também houve uma variabilidade na distribuição das enzimas de uma mesma classe (Zampieri *et al.*, 2013). Scholl *et al.* (2015c) utilizaram biomassa de capim-elefante pré-tratada por explosão a vapor para indução da produção de celulases e xilanases de *P. echinulatum* S1M29.

### 2.5.2. Gênero *Trichoderma*

Por mais de cinco décadas a espécie *Trichoderma reesei* tem sido alvo de diversas pesquisas devido ao seu elevado potencial de secretar enzimas celulases. Atualmente, *T. reesei* é um dos microrganismos mais utilizados na produção de enzimas celulases, inclusive em empresas que comercializam esse produto. Os sistemas enzimáticos produzidos por esse fungo são considerados um dos mais eficientes para degradação da biomassa lignocelulósica para liberação de açúcares fermentescíveis (Hasunuma *et al.*, 2013; Rana *et al.*, 2014; Xiang, Wang & Sang, 2021). A cepa RUT C30 do fungo *T. reesei* foi desenvolvida com mutagenese aleatória e possui alta secreção de proteínas e resulta em elevada atividade celulolítica (Peciulyte *et al.*, 2014). A Figura 14 apresenta a distribuição de proteínas do secretoma de *T. reesei* RUT C30.

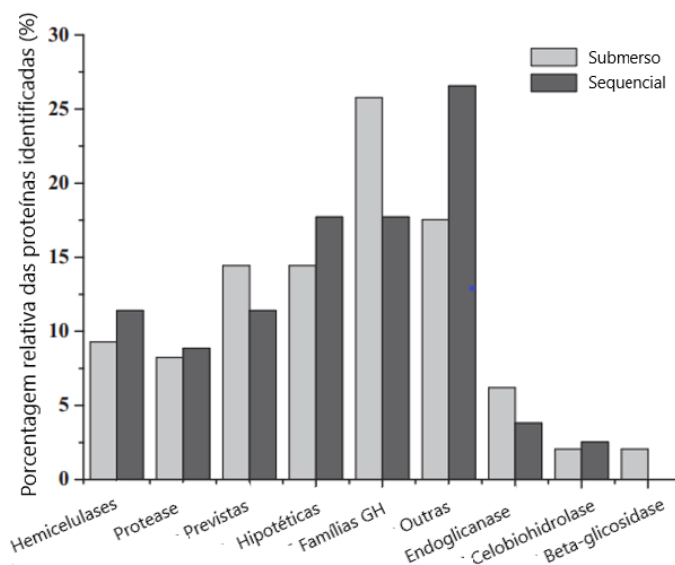


Figura 14. Distribuição de proteínas identificadas no secretoma de *Trichoderma reesei* RUT C30 em cultivo submerso e sequencial.

Fonte: (Florencio *et al.*, 2016).

He *et al.* (2020) estudaram o efeito da utilização de palha de arroz pré-tratada por explosão a vapor como substrato na expressão homóloga de duas enzimas (álcool desidrogenase e nicotinato fosforibosiltransferase) e seus efeitos na produção de enzimas, conversão de furfural e derivados de furanos de *T. reesei* RUT C30 (He *et al.*, 2020). Peciulyte *et al.* (2014) estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono na morfologia do fungo *T. reesei* RUT C30 (Peciulyte *et al.*, 2014). O fungo em questão adapta-se em diferentes ambientes, fontes de carbono, nitrogênio e produz uma alta variabilidade de enzimas hidrolíticas extracelulares. Devido ao seu grande potencial, diferentes linhagens de *Trichoderma* são alvos de pesquisas para produção de enzimas celulases e hemicelulases (Adav & Sze, 2014).

## **2.6. Tipos de cultivos para produção de enzimas**

Os fungos filamentosos podem ser cultivados em estado sólido ou submerso, sendo o segundo utilizado em larga escala para a produção de enzimas. A Tabela 5 apresenta resultados de atividades enzimáticas dos microrganismos pertencentes ao gênero *Penicillium* e *Trichoderma* em resposta a diferentes substratos e métodos de cultivo. Normalmente os fungos filamentosos pertencentes aos dois gêneros mencionados, assim como os do gênero *Aspergillus* produzem enzimas em maior quantidade quando em meio sólido. O desenvolvimento de meio de cultivo, sua formulação e condições exercem grande impacto na produção de enzimas pelo microrganismo, sendo essa uma etapa fundamental na busca de elevadas atividades enzimáticas (Sreedharan Sajith *et al.*, 2016). A Tabela 4 apresenta uma comparação entre estudos realizados por diversos autores com a produção enzimática de *Penicillium* e *Trichoderma* em cultivos em estado sólido e submerso, empregando diferentes substratos.

Tabela 5. Performance comparativa da produção de enzimas celulases por *Trichoderma* e *Penicillium* em diferentes substratos e formas de cultivo.

Microrganismo	Substrato	Método de cultivo	Atividade enzimática
<i>Trichoderma citrinoviridae</i>	ND	Submerso	FPA: 0.63 U.mL <sup>-1</sup> Endoglicanases: 3.12 U.mL <sup>-1</sup> β-glicosidases: 8.22 U.mL <sup>-1</sup>
<i>Penicillium citrinum</i>	Farelo de trigo	Submerso	FPA: 1.72 U.mL <sup>-1</sup> Endoglicanases: 1.89 U.mL <sup>-1</sup>
<i>Penicillium janthinellum</i>	Bagaço de cana de açúcar	Submerso	FPA: 0.55 U.mL <sup>-1</sup> β-glicosidases: 2.3 U.mL <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma reesei</i>	Xilose	Submerso	FPA: 0.69 U.mL <sup>-1</sup> .h
<i>Penicillium decumbens</i>	Farelo e palha de trigo	Sólido	FPA: 20.4 U.g <sup>-1</sup>
<i>Penicillium citrinum</i>	Farelo de arroz	Sólido	FPA: 2 U.g <sup>-1</sup>
<i>Penicillium decumbens</i>	Farelo de trigo	Sólido	FPA: 52.8 U.g <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Farelo de trigo	Sólido	FPA: 3.8 U.g <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma reesei</i> LM-UC4	Bagaço	Sólido	FPA: 33.8 U.g <sup>-1</sup>

Fonte: (Sajith *et al.*, 2016; Singhanian *et al.*, 2010).

#### 2.6.1. Métodos de condução de cultivos

O cultivo em estado submerso (SmC) se caracteriza pela presença de líquido livremente circulante no qual o substrato está disperso e os nutrientes dissolvidos ou em suspensão. O controle dos parâmetros em cultivos em estado submerso é menos difícil quando comparado ao de cultivos em estado sólido. Em SmC fatores como pH, temperatura, concentração de substrato, indutor, composição do meio de cultivo, dentre outros fatores têm influência significativa na produção de enzimas. O principal aspecto negativo no que tange SmF é a necessidade de maior período de tempo e menor produção (Perez *et al.*, 2021; Sajith *et al.*, 2016).

A estratégia de cultivo em estado sólido (SSC) é empregada em indústrias para a elevada produção de várias enzimas. Esse tipo de cultivo caracteriza-se pela utilização de substratos sólidos e ausência de água livre no sistema, havendo umidade suficiente para o desenvolvimento do microrganismo. Nos últimos anos o SSC está ganhando mais interesse como uma maneira de utilização dos resíduos lignocelulósicos ricos em nutrientes. Dentre as vantagens apresentadas pelo SSF estão seu baixo custo de investimento e operação, a utilização de resíduos agroindustriais, e maior produtividade enzimática. Propriedades

físico-químicas do substrato como cristalinidade, porosidade e área superficial podem afetar a produção de enzimas em SSC. Condições de operação como temperatura, pH e composição da mistura, assim como a disponibilidade de oxigênio entre as partículas do substrato e a geração de calor e gases são fatores vitais que influenciam o crescimento do microrganismo (Perez *et al.*, 2021; Sajith *et al.*, 2016).

Tendo em vista a grande geração de resíduos do processo de produção enzimática, em especial em cultivos em estado sólido, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias que reduzam a produção de resíduos e reutilizem matéria-prima. O reuso de micélio fúngico é uma alternativa que auxilia na redução dos custos com substrato e matérias-primas, podendo também auxiliar na diminuição do tempo de processo. Camassola *et al.* descreveram em sua patente BR 10 2018 011926 5 um processo que reutiliza micélio após a produção de enzimas celulasas e xilanasas em cultivo em estado submerso: foram realizados cinco ciclos de reuso de massa micelial e substrato residual com duração de 96 horas cada. Um único inóculo com esporos é realizado, sendo o cultivo conduzido posteriormente em regime contínuo ou descontínuo. Diversos relatos são encontrados na literatura no que tange a reutilização de substratos para a produção de cogumelos. Porém, ainda são escassas as referências de reuso de micélio fúngico para produção enzimática em estado sólido (Camassola *et al.*, 2018).

Um dos fatores a ser considerado para a produção de enzimas em escala industrial é a geração de pouco ou nenhum impacto ambiental, assim como a busca de maneiras de tornar esse processo mais viável economicamente. O escalonamento dos cultivos em estado sólido está entre os gargalos para maior utilização dessa tecnologia. Os biorreatores podem ser ferramentas úteis para aumento de produção enzimática e menor geração de resíduos. O principal desafio para o desenvolvimento de eficientes biorreatores é a superação dos efeitos de transferência de calor e de massa, já que o crescimento do microrganismo resulta em produção metabólica de calor com a captação de nutrientes e hidrogênio (Ashok *et al.*, 2017).

#### 2.6.2. Necessidades nutricionais dos microrganismos

É de comum acordo entre a comunidade científica que água, energia e compostos químicos são essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos. O carbono é um dos principais componentes requeridos para o crescimento de todos os organismos vivos, uma

vez que aproximadamente 50% da massa seca das células corresponde a esse composto, o qual está presente na maior parte das classes de nutrientes orgânicos: proteínas, carboidratos e lipídeos. Essas estruturas promovem energia para o crescimento celular e serve como moléculas básicas do material celular. O nitrogênio é necessário para a síntese dos anéis das bases purinas e pirimidinas que formam os ácidos nucleicos, assim como para alguns carboidratos, lipídeos, cofatores de enzimas, etc. Além desses dois macronutrientes, hidrogênio, oxigênio e fósforo também são importantes para o microrganismo. Os micronutrientes são elementos-traço geralmente necessitados em menores quantidades, e podem funcionar como cofatores ou indutores de enzimas, assim como podem dar suporte ao crescimento do microrganismo (Chan, 2003).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Tendo em vista a produção de enzimas celulases e xilanases em um sistema de reuso de micélio, o presente trabalho foi executado em três partes principais: a) análise da cinética de produção enzimática em cultivos dos microrganismos para definição de ciclos; b) suplementação dos meios de cultivo para aumento da produção enzimática; c) avaliação de materiais alternativos para substituição de esponja de poliuretano nos meios de cultivo. A Figura 15 apresenta a representação esquemática das etapas experimentais realizadas durante o presente trabalho.

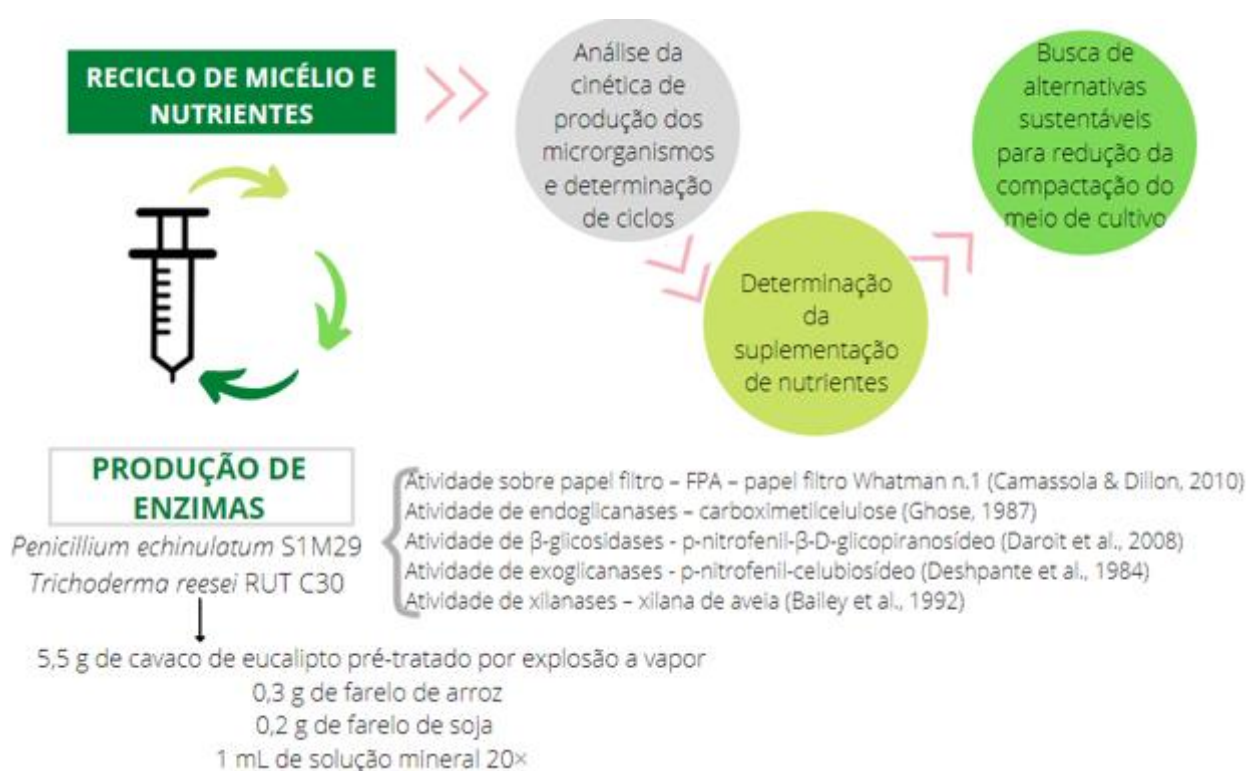


Figura 15. Representação geral das etapas experimentais realizadas durante o presente trabalho.

Fonte: A autora.

#### 3.1. Microrganismos e linhagens

Para a produção das enzimas foram utilizados os microrganismos *Penicillium echinulatum* S1M29 (mutante obtido a partir da linhagem 9A02S1 – depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942), pertencente à coleção de



microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassa da Universidade de Caxias do Sul. A linhagem mutante de *P. echinulatum* foi obtida a partir de mutagênese de *P. echinulatum* 9A02S1 utilizando peróxido de hidrogênio e mutantes selecionados em meio suplementado com 2-desoxiglicose (Dillon, 2011). A linhagem comercial *Trichoderma reesei* RUT C30 foi gentilmente cedida pela Professora Elba Pinto Bon da Silva, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### 3.2. Meio de manutenção e de crescimento

O microrganismo *P. echinulatum* S1M29 foi crescido e mantido em 100 mL de ágar-celulose (C-ágar) (40 mL de celulose intumescida; 10 mL de solução mineral; 0,1g proteose peptona (Oxoid L85®); 2 g ágar e 50 mL de água destilada). Para tal foram utilizados tubos transparentes inclinados contendo o meio e incubados durante 7 dias a 28°C até que fossem formados conídios, e a partir deste momento armazenadas a 4 °C (Dillon, 2006). O microrganismo *T. reesei* RUT C30 foi mantido e crescido em meio Ágar batata dextrose (BDA) (17 g de agar-agar, 20 g de glicose, 200 g de batatas, 1 litro de água destilada), em placas de Petri, incubados durante 7 dias a 28°C até que fossem formados conídios, e a partir deste momento armazenadas a 4 °C.

### 3.3. Soluções e Reagentes

As seguintes soluções e reagentes foram utilizadas ao longo deste trabalho:

- Solução de ácido dinitrosalicílico (DNS): a solução de ácido dinitrosalicílico utilizada para determinar açúcares redutores e na reação de Atividade Sobre Papel Filtro, atividade de xilanases e de endoglicosidases foi descrita por Miller (1959). É composta por 2,12 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 3,92 g de hidróxido de sódio, 61,20 g de tartarato de sódio e potássio, 1,52 g de fenol, 1,66 g de metabissulfito de sódio e 283,3 mL de água destilada.
- Solução de carboximetilcelulose 2% (m/v): a solução de carboximetilcelulose foi preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 4,8.
- Solução de xilana 1% (m/v) (xilana de faia): a solução de xilana foi preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8.

- Solução de  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (4 mmol/L): a solução de  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo foi preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8.
- Solução de  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-celubiosídeo (1 mmol/L): a solução de  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-celubiosídeo foi preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol/L, pH 4,8.
- Tampão citrato de sódio 0,05 mol/L (pH 4,8): a solução de tampão citrato de sódio foi preparada utilizando 4,8 g de ácido cítrico e 500 mL de água destilada. Dilui-se o ácido cítrico em volume menor que 500 mL, ajusta-se o pH desejado com pastilhas de NaOH, e depois completar o volume em balão volumétrico.
- Solução de glicose 2 mg/mL para curva padrão de FPA e endoglicosidases.
- Solução de  $\rho$ -nitrofenol 0,02 mol/L para curva padrão de  $\beta$ -glicosidases e exoglicosidases.
- Solução de xilose 0,01 mol/L para curva padrão de xilanases.
- Solução de sais 20 x concentrada: a solução de sais foi preparada de acordo com Mandels & Reese (1957), composta por 40 g de fosfato monobásico, 28 g de sulfato de amônio, 6 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 6 g de ureia, 6 g de cloreto de cálcio, 0,05 g de sulfato ferroso, 0,0156 g de sulfato de manganês monohidratado, 0,014 g de sulfato de zinco heptahidratado, 0,02 g de cloreto de cobalto hexahidratado, em q.s.p. 1 litro de água destilada.

### **3.4.Meio de cultivo e produção de enzimas**

Partindo de estudos preliminares, foi definida a utilização de um meio base composto por 5,5 g de cavacos de eucalipto previamente pré-tratado por explosão a vapor (20 bar, 17.5 kgf/cm<sup>2</sup>, aproximadamente 205 °C durante 10 minutos); 0,3 g de farelo de arroz, 0,2 g de farelo de soja, 1 mL de solução mineral 20× (g/L) (Mandels & Reese, 1957). Para diminuir a compactação do meio foram utilizados pedaços de 0,2 g de espuma de poliuretano em fragmentos de 0,3 x 0,3 cm. Os meios de cultivo foram esterilizados a 121°C por 1 hora e depois transferidos para o biorreator do tipo seringa (patente BR 102020008179-9) (Figura 16).

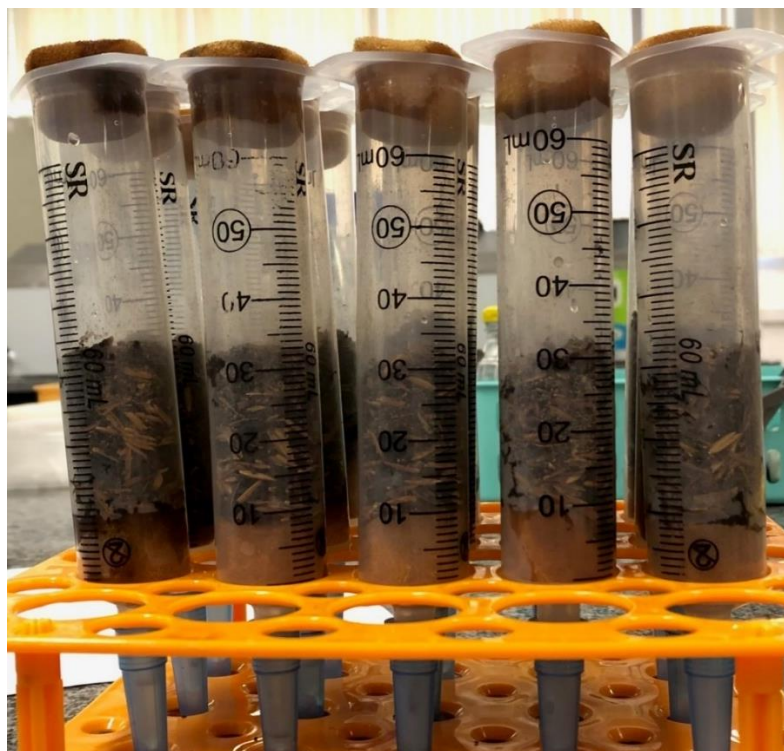


Figura 16. Biorreator do tipo seringa com meio de cultivo utilizado no sistema de reuso de micélio e reposição de nutrientes.

Fonte: A autora.

A primeira etapa constituiu na realização de cultivos em estado sólido com ambos os microrganismos, com amostras destrutivas, para a definição dos dias de extrações enzimáticas e de suplementação de nutrientes. Dessa maneira, os cultivos foram preparados de acordo com o item 3.2. e após inoculados os microrganismos ( $1 \cdot 10^6$  esporos). Nessa etapa os cultivos foram realizados em vidro transparente de aproximadamente 5 cm x 8 cm. As amostras foram incubadas por 8 dias a 28°C em estufa com umidade controlada, e as triplicatas retiradas nos dias 1, 2, 3, 4, 6 e 8 após o inóculo. Para a extração enzimática foi adicionada água em uma proporção de 6:10 (m/v), e as amostras ficaram sob agitação constante de 150 rpm durante 40 minutos, 28 °C. Após, foram transferidas para tubos de centrífuga e centrifugadas a 3200 g, 4°C durante 30 minutos, e armazenadas em caixas de 96 poços.

Depois de definidos os melhores dias de extração e reposição, foi feita a segunda etapa visando identificar qual a melhor condição de alimentação de nutrientes aos meios de cultivos. Nessa etapa foram utilizados biorreatores do tipo seringas para realizar os cultivos com a composição descrita no item 3.2. As seringas foram mantidas com a abertura superior

fechada com material de gaze e algodão, e as extrações foram realizadas com 30 mL de água previamente esterilizada e com auxílio do respectivo êmbolo. Foram testadas as seguintes condições: 1 - condição controle (sem suplementação); 2 - 0,5 mL de solução de sais 20× concentrada; 3 - 2% do meio de cultivo inicial; e 4 - 0,5 mL de solução de sais 20× concentrada e 2% do meio de cultivo inicial. As extrações e reposições foram realizadas conforme definições da primeira etapa.

A terceira etapa visou a busca de alternativas para a espuma de poliuretano utilizada para reduzir a compactação do meio de cultivo. As condições testadas nessa etapa foram: 1 - controle (sem adição de material suporte); 2 - 1 g de casca de arroz; 3 - 1 g de bagaço de cana de açúcar; e 4 - 0,2 g de espuma de poliuretano. Os cultivos foram realizados em seringas de acordo com as melhores condições pré-definidas anteriormente e com extrações e reposições conforme definidas na primeira etapa.

### **3.5. Caracterização da biomassa lignocelulósica**

A caracterização da biomassa foi feita como determinado pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL - TP - 510 - 42618), utilizando 0,3 g de biomassa seca, a qual é tratada com ácido sulfúrico 72% (v/v) a 25 °C durante 1 h em agitação constante. A mistura é diluída a uma concentração de 4% (v/v) em ácido sulfúrico e a suspensão é tratada em autoclave (1atm) por um período de 1 h. A mistura é filtrada a vácuo em cadinho de Gooch com porosidade 2 µm (30 mL) previamente tarado. O resíduo é lavado com água quente e seco em estufa até massa constante, e a porcentagem de lignina insolúvel é calculada em relação à massa, descontando as cinzas.

Com a fração líquida é realizada análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para tal utilizou-se uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 60 °C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol/L a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação é efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado (glicose, xilose, arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural).

### 3.6. Determinações das atividades enzimáticas

#### 3.6.1. Atividade sobre Papel Filtro

A análise de FPA foi conduzida de acordo com Camassola & Dillon (2010). São adicionados 20 µL de amostra a 130 µL de tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8 e então a solução é levada para banho-maria a 50 °C durante 5 minutos. Após é adicionado a cada amostra uma tira de papel filtro (Whatman nº1) com dimensão de 1 cm x 0,6 cm, os quais são mantidos em banho-maria a 50 °C durante 1 hora. Depois a reação é interrompida com adição de 300 µL de DNS, e a mistura é fervida a 100 °C durante 5 minutos. Após resfriado em gelo, são transferidos 100 µL da reação para uma placa de Elisa com 200 µL de água destilada. A absorbância das amostras é medida em espectrofotômetro a 545 nm. As concentrações de Atividade sobre Papel Filtro presentes nas amostras são determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose com concentrações de 0-2,0 mg/mL, por meio de regressão linear.

Cálculo da determinação da Atividade sobre Papel Filtro:

$$IU \equiv \left( \frac{abs - a}{b} \right) \cdot FD \cdot 0,185 \quad \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}, \text{ onde}$$

a e b – valores da equação da reta

FD – fator de diluição

#### 3.6.2. Atividade de endoglicosidases

A atividade de endoglicosidases foi mensurada de acordo com Ghose (1987). São colocados 10 µL da amostra em 40 µL de tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8 e adiciona-se 50 µL de carboximetilcelulose (2% m/v). A mistura é incubada a 50 °C durante 30 minutos. Após foram adicionados 300 µL de DNS e a mistura é fervida a 100°C durante 5 minutos. Depois de resfriar a mistura adiciona-se 100 µL da reação para uma placa de Elisa com 200 µL de água destilada. A absorbância das amostras é medida em espectrofotômetro a 545 nm. As concentrações de endoglicosidases presentes nas amostras são determinadas através de curva de calibração construída com soluções de glicose com concentrações de 0-2,0 mg/mL, por meio de regressão linear.

Cálculo da determinação de atividade enzimática de endoglicosidases:

$$IU \equiv \left( \frac{\text{abs} - a}{b} \right) \cdot \text{FD} \cdot 0,185 \quad \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad , \text{ onde}$$

a e b – valores da equação da reta

FD – fator de diluição

### 3.6.3. Atividade de exoglicosidases

Atividade de exoglicanases foi realizada de acordo com Deshpande, Eriksson & Pettersson (1984). São adicionados 10  $\mu\text{L}$  da amostra em 90  $\mu\text{L}$  de *p*-nitrofenil-celubiosídeo (1 mg/mL) e a mistura incubada por 30 minutos a 50 °C em banho-maria. Após, adiciona-se 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCO}_3$  (10%) e a absorbância das amostras é medida em espectrofotômetro a 405 nm. A concentração de Exoglicanases é determinada através da curva de calibração obtida a partir de diluições da solução estoque de *p*-NP (1,5 mmol/L ou 2,0 mmol/L).

Cálculo de determinação da atividade enzimática de exoglicanases:

$$IU \equiv \frac{\left( \frac{\text{abs} - a}{b} \right) \cdot \text{FD} \cdot V_R}{t \cdot V_E} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad , \text{ onde}$$

a e b – valores da equação da reta

FD – fator de diluição

$V_R$  – volume da reação (100 $\mu\text{L}$ )

t – tempo de reação (30 min)

$V_E$  – volume da enzima (10 $\mu\text{L}$ )

### 3.6.4. Atividade de $\beta$ -glicosidases

A análise enzimática de  $\beta$ -glicosidases foi conduzida de acordo com Bailey, Biely & Poutanen (1992). São adicionados 10  $\mu\text{L}$  da amostra em 90  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosil (4 mg/mL) e a mistura incubada por 30 minutos a 50 °C em banho-maria. Após, adiciona-se 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaCO}_3$  (10% m:v) e a absorbância das amostras é medida em espectrofotômetro a 405 nm. A concentração de  $\beta$ -glicosidases é determinada através da curva de calibração obtida a partir de diluições da solução estoque de *p*-NP (1,5 mmol/L ou 2,0 mmol/L).

Cálculo de determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidasas:

$$IU \equiv \frac{\left(\frac{\text{abs} - a}{b}\right) \cdot \text{FD} \cdot V_R}{t \cdot V_E} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad , \text{ onde}$$

a e b – valores da equação da reta

FD – fator de diluição

$V_R$  – volume da reação (100 $\mu$ L)

t – tempo de reação (30 min)

$V_E$  – volume da enzima (10 $\mu$ L)

### 3.6.5. Atividades de xilanases

A análise de xilanases foi conduzida de acordo com Miller (1959). A amostra é incubada a 50 °C e são adicionados 10  $\mu$ L de amostra a 90  $\mu$ L da solução de xilana (1%). A mistura é incubada a 50 °C durante 5 minutos e após a adição de 300  $\mu$ L de DNS é incubada a 100 °C durante 5 minutos (Miller, 1959). Após resfriar, adicionam-se 100  $\mu$ L da reação em placa de 96 poços contendo 200  $\mu$ L de água destilada. A absorbância das amostras é medida em espectrofotômetro a 545 nm. A concentração de xilanase presente nas amostras é determinada através de curva de calibração construída com soluções de xilose (10 mmol/L), por meio de regressão linear.

Cálculo de determinação da atividade de Xilanases:

$$IU \equiv \frac{\left(\frac{\text{abs} - a}{b}\right) \cdot \text{FD}}{5 \text{ min (t)}} \cdot 10 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad , \text{ onde}$$

a e b – valores da equação da reta

FD – fator de diluição

t – tempo de reação (5 min)

### 3.7. Análises estatísticas

O programa Prisma Graph Pad (versão 5.0.1.334) foi utilizado para a construção dos gráficos e para realização de análise estatística One-Way ANOVA com pós teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho são apresentados e discutidos na forma de um artigo científico publicado em periódico internacional.

**Artigo. Making the process of enzyme production in solid-state cultivation cleaner and more sustainable - reuse of raw materials and syringe-type bioreactor enter in the scene**

- Artigo original publicado na revista ACS Sustainable Chemistry & Engineering

Paula Cavion Costa, Eduardo Echer dos Reis, Laura Salgueiro de Carvalho, Roselei Claudete Fontana, Willian Daniel Hahn Schneider, Marli Camassola

ACS  
**Sustainable**  
Chemistry & Engineering

pubs.acs.org/journal/ascecg

Research Article

## Making the Process of Enzyme Production in Solid-State Cultivation Cleaner and More Sustainable—Reuse of Raw Materials and a Syringe-Type Bioreactor Enter in the Scene

Paula Cavion Costa, Eduardo Echer dos Reis, Laura Salgueiro de Carvalho, Roselei Claudete Fontana, Willian Daniel Hahn Schneider, and Marli Camassola\*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c04257>

Read Online

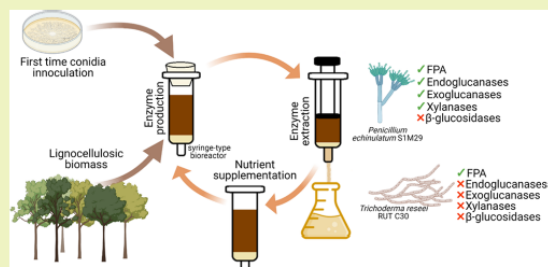
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

**ABSTRACT:** The strategy to reuse the mycelium grown in solid-state cultivation for enzyme production was developed in this work. Also, the nutrients and syringe-type bioreactor necessary for the enzymatic production have also been tested to make the process more sustainable and less onerous. For the best condition of supplementation in the mycelia turnover system, the enzymatic activities over filter paper were 5 times and 2 times higher than the ones found in the conventional production by *Penicillium echinulatum* S1M29 and *Trichoderma reesei* RUT C30, respectively. A xylanase activity of 1303 U/g by *P. echinulatum* S1M29 was reported in this work after the four cycles of extraction, showing the efficiency of this novel strategy for this fungus. The reuse of the mycelium in solid-state cultivation proved to be a promising strategy to increase production and productivity and reduce the amounts of inputs used in enzyme production processes.

**KEYWORDS:** nutrient reposition, *Penicillium echinulatum*, *Trichoderma reesei*, steam explosion, enzyme production





## ARTIGO

**Making the process of enzyme production in solid-state cultivation cleaner and more sustainable - reuse of raw materials and syringe-type bioreactor enter in the scene**

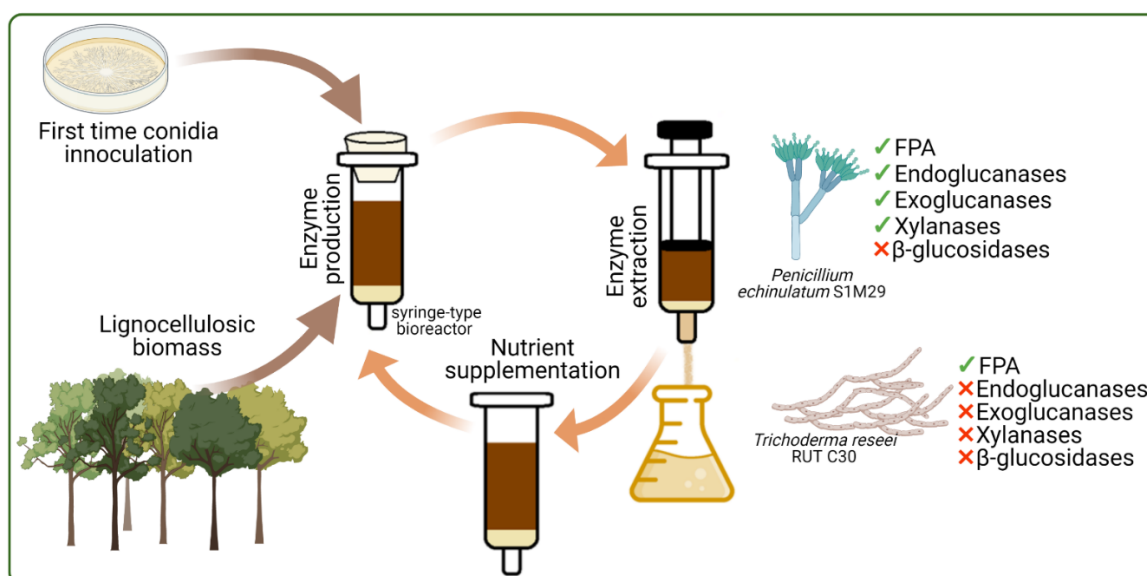
Paula Cavion Costa, Eduardo Echer dos Reis, Laura Salgueiro de Carvalho, Roselei Claudete Fontana, Willian Daniel Hahn Schneider, Marli Camassola\*

*Laboratory of Enzymes and Biomasses, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul*

*Francisco Getúlio Vargas Street 1130, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil*

\*Corresponding author: Tel./fax: +55 54 3218 2149

Email address: [mcamassola@gmail.com](mailto:mcamassola@gmail.com) (Camassola, M.)



**Graphical abstract.** Development of a turnover system based on a syringe-type bioreactor as a novel strategy for cellulase and hemicellulase production.

## ABSTRACT

The strategy to reuse the mycelium grown in solid-state cultivation for enzyme production was developed in this work. Also, the nutrients and syringe-type bioreactor necessary for the enzymatic production have also been tested to make the process more sustainable and less

onerous. For the best condition of supplementation in the mycelia turnover system, the enzymatic activities over filter paper (FPA) were five times and two times higher than the ones found in the conventional production by *Penicillium echinulatum* S1M29 and *Trichoderma reesei* RUT C30, respectively. A xylanase activity of 1,303 U/g by *P. echinulatum* S1M29 was reported in this work after the four cycles of extraction, showing the efficiency of this novel strategy for this fungus. The reuse of mycelium in solid-state cultivation proved to be a promising strategy to increase production and productivity and reduce the amounts of inputs used in enzyme production processes.

**Key words:** nutrient reposition, *Penicillium echinulatum*, *Trichoderma reesei*, steam explosion, enzyme production.

## INTRODUCTION

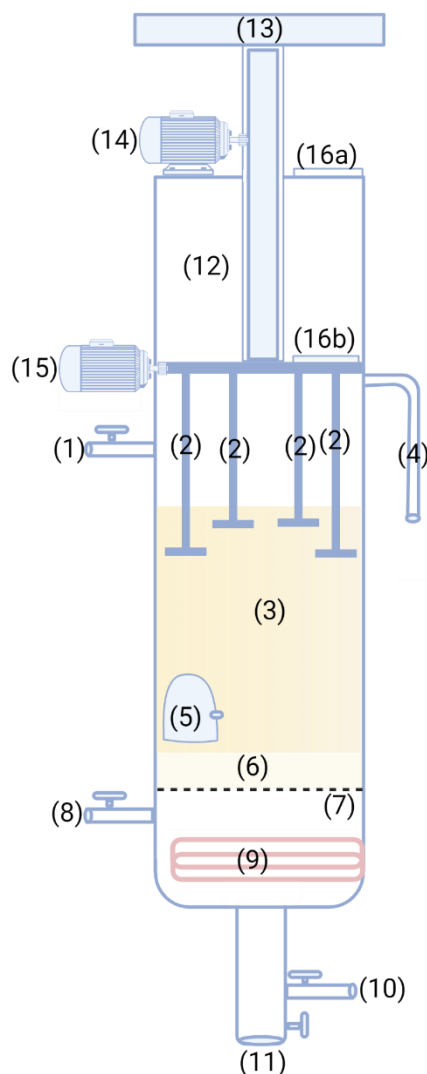
With the increasing need to develop sustainable alternatives to fossil fuels, biofuels have been a research priority over the last few decades to mitigate problems related to carbon dioxide emissions and global warming (1,2). They are produced using biomass waste, such as from the plants, which are abundant, underused resources with a large quantity of lignocellulose (3). There is an estimation of  $1.5 \times 10^{12}$  tons of annual production of these raw materials, and most of its production is being wasted. Lignocellulose is the abundant component found in plants and is formed by cellulose (glucose), hemicellulose (including xylose, arabinose, and mannose), and lignin (aromatic alcohols, such as sinapyl, coumarin, and coniferin) (4, 5). Cellulose is a homopolymer with a relatively high molecular weight. Cellulose chains form microfibrils running parallel making crystalline structures, and when in disorder, create amorphous regions. Cellulases are the enzymes capable of degrading this cellulose, releasing fermentable sugars (6, 7, 8). Hemicellulose is a ramified heteropolymer and is easier to hydrolyze than cellulose. Its composition may suffer variation according to the raw material (9).

In the production of biofuels, such as the second-generation ethanol, enzymatic methods of lignocellulose degradation gain prominence in view of the appeal for green technologies (7). Cellulases and xylanases can be used in different applications, such as the textile, food, and paper industry, biofuels and compositing (10, 11). Filamentous fungi are great producers of these enzymes, and the genera *Penicillium*, *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Humicola*, and *Fusarium* have a special industrial interest because of their potential in lignocellulosic degradation (12, 13, 14, 15, 16). The fungi *Trichoderma reesei* is commonly used for the enzyme production of cellulases and xylanases (13) and lignocellulosic hydrolysis (17, 18). *Penicillium echinulatum* is gaining attention as a producer of these enzymes as it has a similar secretor capacity of *T. reesei* (19). Moreover, over the last decade, the genome and secretome of the mutant and wild-type strains of *P. echinulatum* have been studied and point to an enzymatic arsenal totally focused on the deconstruction of lignocellulosic biomass (20).

Different factors can influence the enzymatic production by a certain microorganism, such as carbon and nitrogen resources, aeration of the culture medium, pH, temperature, substrate, way of conducting the process (solid-state cultivation, SSC; or submerged cultivation, SmC), as well as the use of genetically modified strains (21, 22). Among the advantages of SmC are the simplicity of sterilization, process monitoring of the pH, mass transfer and heat, and the extraction and recovery of enzymes. The application of cellulases and xylanases is limited because of the high cost of production of their enzymatic complex. SSC is an alternative to this issue, so it is possible to use cheaper substrates, have a low energy consumption, and high productivity of enzymes (23, 24). It also generates fewer residues and needs less space for production than SmC (25).

Considering this, the present work aimed to evaluate reusing residues from the production of enzymes in solid-state cultivation -residual substrate and mycelium -as a way

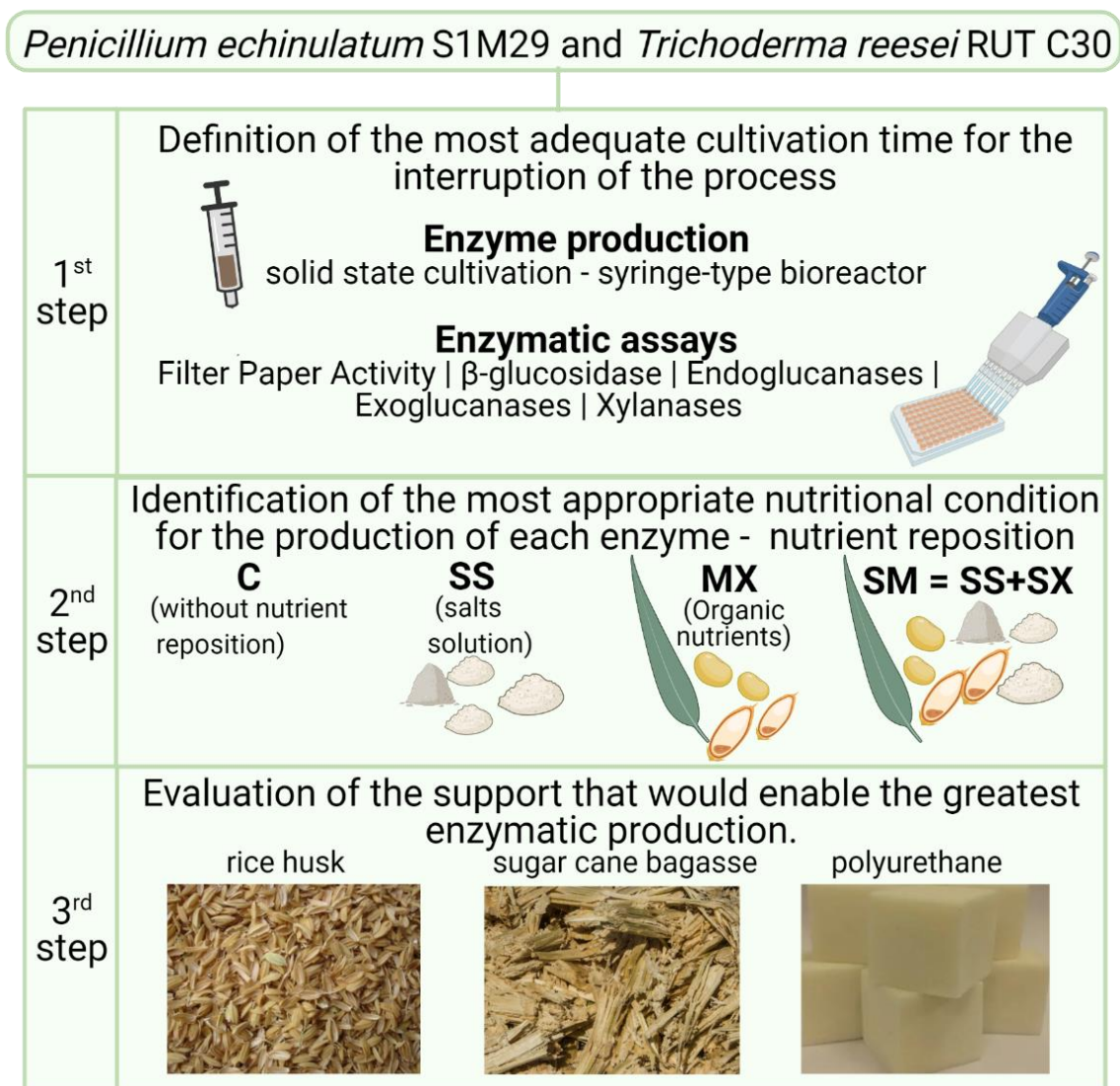
of reducing costs and production time, as well as making the process more sustainable and economical. To our knowledge, this is the first paper in which a syringe-type bioreactor (Figure 1) was developed to reuse the same mycelium and nutrients in the culture medium to improve the production of the desired enzymes.



**Figure 1.** Syringe-type bioreactor for solid-state cultivation with mycelium recycling characterized by comprising input for nutrient supplementation (1); mobile propellers (2); solid-state culture medium (3); air exhaust (4); opening for the removal of exhausted medium (5); polyurethane foam (6); support sieve (7); water inlet (8); electrical resistance (9); humidified air inlet (10); post-sterilization water outlet (11); main vessel (12); plunger (13); motor to move the piston and hydraulic piston (14); motor for moving propellers to homogenize the means of production (15); and, input for feeding with solids (16 a, b).

## EXPERIMENTAL SECTION

A flow chart describing the methods used to perform this study is presented in Figure 2.



**Figure 2.** Flowchart describing the methods and the steps used in this study.

### Microorganism

For this work, we used the fungi *P. echinulatum* S1M29, obtained from a mutant strain 9A02S1 (26), deposited in the *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942, which belongs to the collection of microorganisms of the Laboratory of Enzymes and Biomasses from the University of Caxias do Sul, and the commercial strain of *Trichoderma reesei* RUT C30, kindly provided by Professor Elba Pinto Bon da Silva, from the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

## Cultivation medium

*P. echinulatum* S1M29 and *T. reesei* RUT C30 were maintained in agar-cellulose medium (C-agar), as described in Dillon et al. (2005) (21).

For the SSC, a control medium was used, composed of 5.5 g of eucalyptus sawdust pretreated by a steam explosion at 20 bar and 17.5 kgf/cm<sup>2</sup> (approximately 205 °C) for 10 minutes; 0.3 g of rice bran, 0.2 g of soybean meal, 1 mL of a salt solution containing in g/L: 40 of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 28 of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6 of MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6 of CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 6 of CaCl<sub>2</sub>, 0,05 of FeSO<sub>4</sub>, 0.0156 of MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.014 of ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 0.02 of CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (27).

The eucalyptus sawdust pre-treated by steam explosion, which constituted the majority of the cultivation medium, consists of (% w/w): insoluble lignin, 44 ± 2; soluble lignin, 6.0 ± 0.2; glucan (cellulose), 44.2 ± 1.7; xylan (hemicellulose), 0.89 ± 0.04; acetate, 1.5 ± 0.6; and ashes, 1.9 ± 0.2. This characterization was performed according to the methodologies of the *National Renewable Energy Laboratory (NREL)* Technical Report NREL/TP-510-42618, NREL/TP-510-42619 and NREL/TP-510-42622.

In some cultivations, supplementations were done with the same composition mentioned before. In order to reduce the compaction of the medium, 0.2 g of 0.3 cm × 0.3 cm of polyurethane fragments were used as a support. Mediums were sterilized at 120 °C for 45 minutes in a 100 mL Erlenmeyer flask.

## Enzyme production

For enzyme production, we used a 60 mL, previously sterilized syringe-type bioreactor (patent BR 102020008179-9) (Figure 1).

The culture medium was inoculated with 1 × 10<sup>6</sup> spores of *P. echinulatum* or *T. reesei* per gram of medium. The spores were produced in a test tube sealed with a cotton swab, as described in Dillon et al. (2005) (21). The bioreactors were incubated in an incubator with

saturated humidity at 28 °C. We kept the entire system in an environment with controlled humidity. At the end of each exchange, we always checked the humidity and this was adjusted between 66 and 70%, by adding nutrients and, when necessary, also distilled water. The initial pH was around 6. All cultivations were performed in quintuplicates.

During enzyme production, the bioreactors were used without the plungers, with a polyurethane system at the bottom to help the enzyme extraction. To close the system during enzyme production time, a polyurethane layer was used. The enzymatic extraction was performed under aseptic conditions, using 30 mL of sterilized water with the help of plungers. In the cultivation with nutrient supplementation, the bioreactors were returned to incubation. The enzymatic extract was centrifuged at  $3220 \times g$  and 4 °C for 15 minutes and stored at 4 °C for later analysis. In each stored sample, 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  of sodic azide (0.5%) solution was added as a preservative.

Initially, with the intention to define the ideal time to interrupt the cultivation for enzyme extraction, nutrient supplementation and mycelium turnover were carried out with destructive cultivations with *P. echinulatum* S1M29 and *T. reesei* RUT C30. The samples were taken at one, two, three, four, six and eight days, in quintuplicates.

After defining the nutrient replacement times for each fungus, enzymes were produced, and different nutrients were tested in order to select the best condition that would be better for the cultivation to continue. Therefore, the base medium for enzyme production was used and then, after enzyme extraction, to the remaining mycelial and culture medium were added the salt solution or other nutrients (Table 1). For this stage, the enzymatic extractions followed by nutrient replacement were performed on days 4, 7, 10 and 13 for *P. echinulatum* S1M29 and 3, 5, 6 and 7 for *T. reesei* RUT C30. Then, bioreactors were taken off from the incubator and followed by enzymatic extraction in aseptic conditions. After, nutrients were added, and the bioreactors went back to the incubator until the next step of

extraction. Thus, three nutrient supplementations were made. This supplementation was performed after enzyme extraction. So, for each batch of enzyme produced, it was performed a supplementation.

**Table 1.** Conditions of the nutrient supplementation in SSC of *Penicillium echinulatum* S1M29 and *Trichoderma reesei* RUT C30 during enzymatic production.

Condition	Composition
SS	Addition of 0.50 mL of salts solution
MX	Addition of mix (0.185g of pretreated eucalyptus, 0.010g of rice bran and 0.006g of soybean bran)
SM	Addition of mix (0.185g of pretreated eucalyptus, 0.010g of rice bran and 0.006g of soybean bran) and 0.50 mL of salt solution

SS = salt solution; MX = mixture; SM = salt solution and mixture.

After defining the condition of supplementation, it was evaluated the possibility of substituting the polyurethane fragments incorporated into the medium for rice husk (RH) or sugar cane bagasse (SCB) (Table 2). The addition of these components is related to system compaction over the extraction, aiming for better growth and maintenance of enzymatic production. Enzyme extractions were performed on days 4, 7, 10 and 13 for *P. echinulatum* S1M29 and 3, 5, 6 and 7 for *T. reesei* RUT C30. Figure 2 schematically represents the steps and conditions tested in this study.

**Table 2.** Evaluation of the addition of rice husk, sugar cane bagasse, and sponge in the solid medium of *Penicillium echinulatum* S1M29 and *Trichoderma reesei* RUT C30.

Condition	Support
PU	Culture medium + 0.2g of polyurethane fragments 3 × 3 mm
SCB	Culture medium + 1g of untreated sugar cane bagasse
RH	Culture medium + 1g of rice husk

The condition of salt solution supplementation was used in this experiment.

### Enzymatic analysis

The total activity of cellulases (Filter Paper Activity – FPA) was performed with filter paper (Whatman No. 1) as substrate, according to Camassola and Dillon (2012) (28). The activity of  $\beta$ -glucosidase was performed according to Daroit et al. (2008) (29). using p-



nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (4 mmol/L) as a substrate. For the determination of endoglucanases, a solution of carboxymethylcellulose 2% in sodium citrate buffer pH 4.8 was used, according to Ghose (1987) (30). Exoglucanases were carried out with the substrate p-nitrophenylcelluloside (1 mg/mL) according to Deshpande (1984) (31). Xylanase activity was determined according to Bailey (1992) (32) with oat xylan 1% (w/v).

### **Statistical analysis**

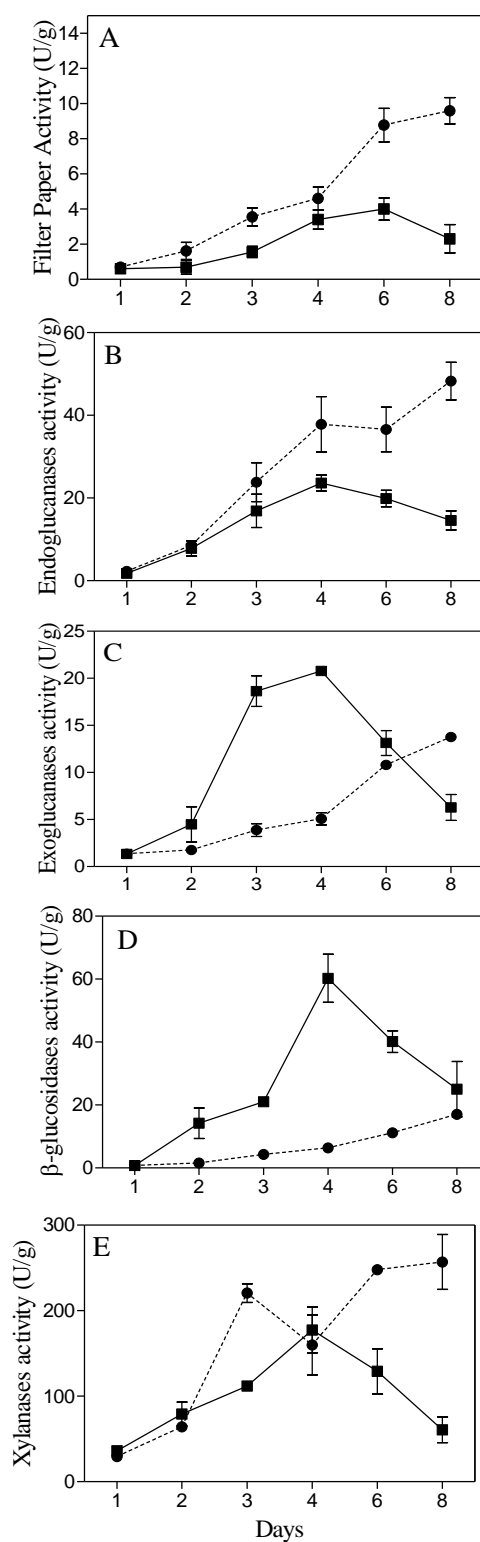
The program Prism Graph Pad (version 3.0) was used to construct graphics and perform a one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-test for  $p < 0.05$ .

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Determination of interruption time**

It was verified that the enzymatic production by the fungi evaluated presents different times of maximum production. In this sense, the following results detail this difference and constituted important processes for the planning of nutrient repositions and determination of times for enzymatic extraction.

The greatest activities of FPA, a set of enzymes that reflects the participation of all cellulases and  $\beta$ -glucosidases, showed the higher titers for *P. echinulatum* S1M29. However, it appears that for both fungi, the activity of this enzyme increased until the sixth day, and after this time, for *P. echinulatum* S1M29, it kept increasing enzymatic activities, while for *T. reesei* RUT C30, there was a decline in enzyme activity (Figure 3A; Figure 3D).



**Figure 3.** Variation of different enzymes produced during different times by *Trichoderma reesei* RUT C30 (■) and *Penicillium echinulatum* S1M29 (●): (A) Filter Paper Activity, (B) Endoglucanases, (C) Exoglucanases, (D)  $\beta$ -glucosidases, and (E) Xylanases.

In relation to the activities of endoglucanases (Figure 3B), there was also an increasing activity until the fourth day of production and, as in FPA, for *P. echinulatum* S1M29, had an increment, reaching  $48.3 \pm 4.5$  U/g, while on the fourth day of cultivation the highlighted activities were  $37.8 \pm 6.7$  U/g and  $23.6 \pm 2.0$  U/g, for *P. echinulatum* S1M29 and *T. reesei* RUT C30, respectively.

Analyzing the data obtained for exoglucanases (Figure 3C), *T. reesei* RUT C30 presents the highest enzymatic titles, showing its high potential for this enzyme production. The highest production was seen on the fourth day of cultivation for *T. reesei*, while for *P. echinulatum* S1M29, the activities were growing until the eighth day of cultivation, proving that these enzymes are lately produced by *P. echinulatum* S1M29 than by *T. reesei* RUT C30.

It has also been registered a larger production of  $\beta$ -glucosidases (Figure 3D) for *T. reesei* RUT C30 in relationship with *P. echinulatum* S1M29 when grown in the culture medium proposed in this work. It is noteworthy that the fourth production day also presented the larger activity of this enzyme, reaching  $60.3 \pm 7.6$  U/g by *T. reesei* RUT-C30. *P. echinulatum* S1M29 secreted higher enzymatic titers of xylanases in comparison to *T. reesei*, with 256.95 U/g in the last cultivation day, which represents two-fold more the enzymatic production of *T. reesei* RUT C30 in four days (Figure 3E). We suggest that different forms of xylanases can be produced at different times or even, perhaps, there is a release of more substrate (hemicellulose) that was not accessible and became available through the action of other enzymes produced by the fungus.

It is possible to say, for SSC of *P. echinulatum* S1M29, that until the last day of the evaluated process, there has been an increase in the enzymatic activity, while for *T. reesei* RUT C30, there have been decreases after the fourth day. Therefore, it is suggested that the nutrient reposition for *P. echinulatum* S1M29 be made in the first days of second cultivation

(fourth day), seen that in the first 24 h there is spore germination, and after, samples were collected every three days until the thirteenth day (days 7, 10, and 13), in order to keep the levels of enzymatic production. For *T. reesei* RUT C30, it is more interesting to begin the nutrient replacement before the first peak of enzyme production so that the fungus has three days for growing, and begin the nutrient supplementation on day 3, and then 5, 6 and 7. The intention of this production mechanism is to keep the cell viability through the reposition of these nutrients that are missing for the microorganism, given the reuse of fungal mycelium and cultivation medium.

It was not reported any significant variations on the pH, since the enzyme extraction was done using destilated water just passing throught the system (data not shown).

#### **Nutrients reposition in solid-state cultivation**

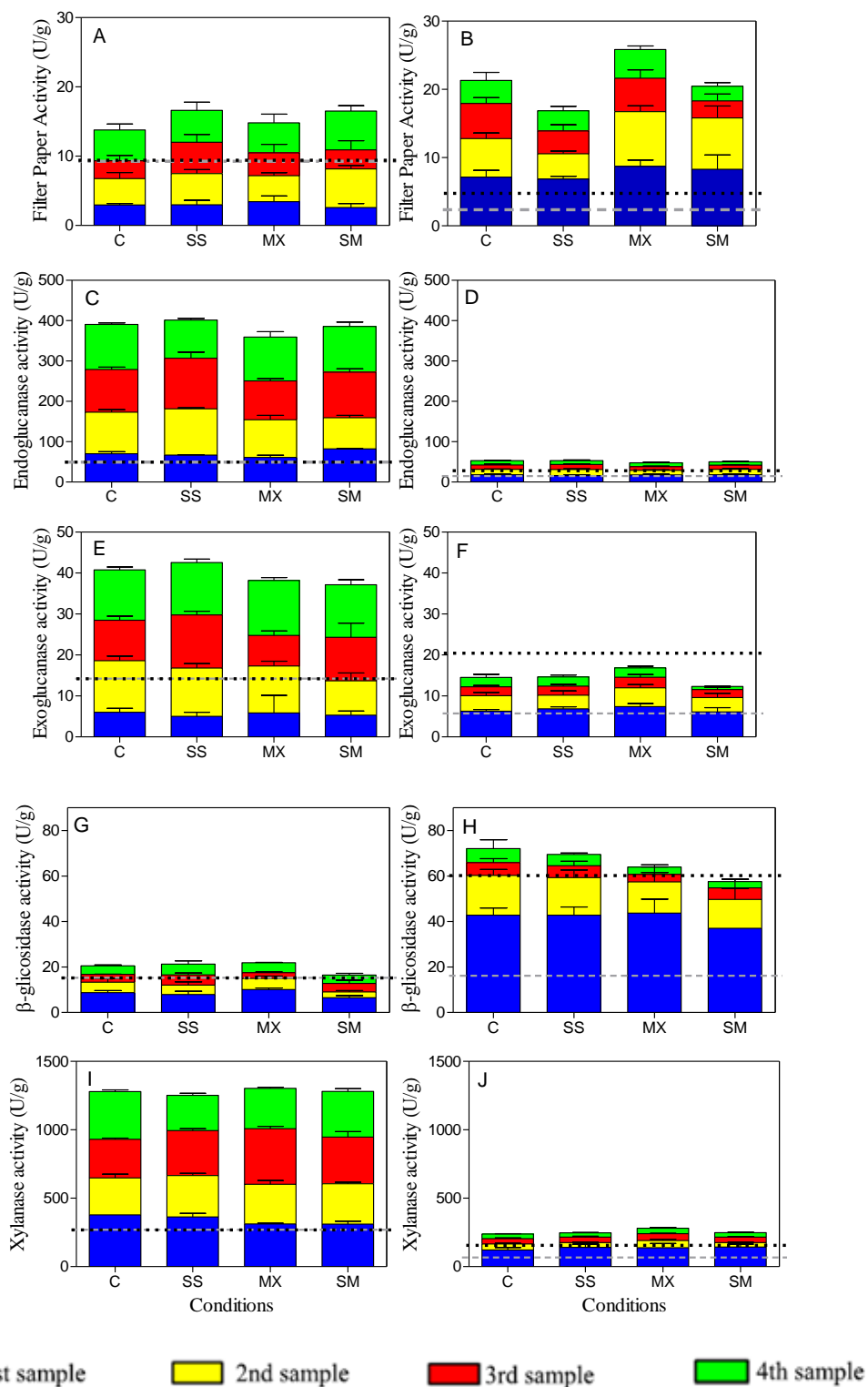
After the definition of the best nutrient supplementation, different conditions were tested in relation to components already present in the cultivation medium. Figure 4 shows the results of *P. echinulatum* S1M29 and *T. reesei* RUT-C30, where strategies of supplementation were evaluated, such as the salt solution addition, reposition of the cultivation medium, and both together after the enzymatic extractions. For both microorganisms, the salt solution proved promising, even though the enzymatic activities of *T. reesei* RUT C30 decrease after the first day of extraction (third day of cultivation), indicating that this system is not efficient for the production of enzymes of interest by this microorganism.

It is important to note that in the series of experiments presented in Figure 4, it was also verified that there was complete extraction of the enzymes. For this, a second extraction was carried out. We noticed that in the first extraction, the extraction of the enzymes was already sufficient since when performing a second extraction, there were no significant amounts of enzymes.

In the results obtained for *P. echinulatum* S1M29, the condition of supplementation of SS was the most promising between the ones tested. All of the repositions presented better results in comparison to the control condition for FPA (Table 3). Significant enzymatic titers of FPA for this fungus were found on the seventh day of cultivation, equivalent to 6 U/g in the condition of simultaneous addition of salt solution and mixture (SM) (Figure 4A).

For endoglucanases, the enzymatic peak was observed on the tenth day of cultivation with the condition of SS addition, reaching 118 U/g (Figure 4C). Menegol et al. (2016) (18) achieved 158 U/g with *P. echinulatum* S1M29. We obtained 13 U/g of exoglucanases on the seventh and tenth day of cultivation for the control (C) and supplementation of SS, respectively (Figure 4E). For  $\beta$ -glucosidases, no increments in the enzymatic activity were verified in any of the strategies used in relation to the control (Figure 4G).

The results described in this work for *P. echinulatum* show the advantages of recycling the mycelium, there is a high amount of enzyme produced through this system with lower costs and demand for time and residual generation. The process proves that nutrient supplementation is possible for this microorganism, especially adding mineral solution during growth and enzymatic extractions. Besides, a related mutant microorganism has demonstrated a great potential for producing enzymes that degrade plant cell walls to release sugars that can be used for different applications.



**Figure 4.** Enzymatic activities produced by *Penicillium echinulatum* S1M29 (A, C, E, G and I) and by *Trichoderma reesei* RUT C30 (B, D, F, H and J) in SSC in response to different conditions of nutrient reposition: C—control; SS—salt solution; MX—mix; SM—salt solution and mix. The black dotted lines indicate the activity obtained at the peak, the dashed line in grey indicates the activity obtained on the eighth day of cultivation, as shown in Figure 3. In figures A, C, E, and G, the two lines are superimposed.

Previous studies have shown that the mutant strain of *P. echinulatum* increased the production of lignocellulosic enzymes related to biomass deconstruction when compared to the wild type 2HH (20). This fungus has also been reported as a potential for submerged cultivation, reaching an FPA of 8.3 U/mL in fed-batch processes (22), but many studies have shown that the FPA is lower than the few studies in which solid-state cultivation was carried out. The disadvantages of this type of cultivation are related to residual wastes and higher costs in the production of the enzymes (33). Activities of 0.63 U/mL were reported for *Trichoderma citrinoviridae* (34) and 1.72 U/mL for *Penicillium citrinum* in submerged fermentation (35), whereas studies in solid-state cultivation have shown activities of 3.8 U/g for *Trichoderma reesei* RUT C30 (14) and 20.4 U/g for *Penicillium decumbans* (33).

There is a visible increase in enzymatic production when reusing mycelia and raw material in comparison to the usual mechanism of enzyme production and extraction, which represents approximately six-fold higher FPA by *P. echinulatum*, producing a total of 16.61 U/g after 13 days.

For *T. reesei*, the activity above FPA found was equal to 9 U/g, which was higher than for *P. echinulatum* (Figure 4B). This peak was registered on the third day of extractions with the mixture addition condition. This activity is greater than the ones found in other studies, such as 5.64 U/g according to Yang et al. (2004) (36) with *T. reesei* and *Aspergillus niger*, and 3.8 U/g in Singhania et al. (2016) (14) with *T. reesei* on wheat bran as the raw material.

It is important to note that these results correspond only to the first enzymatic extraction. If the entire process using the system proposed in this study is considered, the enzymatic activities are three-fold times higher for FPA with *T. reesei*, reaching 25.82 U/g.

The enzymatic production of endoglucanases by *T. reesei* RUT C30 achieved 18 U/g on the third day of cultivation (Figure 4D). This result is similar to the ones in the literature,

such as Gutierrez-Correa & Tengerdy (37), who reported 18 U/g. Furthermore, 7 U/g of exoglucanases (Figure 4F) and 44 U/g of  $\beta$ -glucosidases (Figure 4H) were produced in this work in the control condition, salt solution supplementation, and mixture addition.

For xylanase enzymes of *P. echinulatum* (Figure 4I), the titers were seen on the tenth day, with SS addition reaching 415 U/g, showing higher results than in the previous studies found in the literature, in which the production of 372 U/g was registered by *P. echinulatum* (18).

For *T. reesei* RUT C30, the yield for xylanase enzymes was similar to the previous microorganism mentioned, reaching 142 U/g on the third day of enzymatic production, with the addition of SS (Figure 4J). This result is lower than the ones in the literature described by Gutierrez-Correa (38), 2,842 U/g for *T. reesei* and *A. niger* mixed culture in a medium containing sugar cane bagasse. The supplementation of nutrients did not have the expected result which was the increase in enzyme activity. Its activities were almost three times lower than *P. echinulatum* S1M29. At the end of the four extractions, that is, at the end of the entire process of enzyme production and mycelium turnover, *P. echinulatum* S1M29 produced approximately 1300 U/g of xylanases. It is worth noting that the raw material used in a greater proportion in the cultivation medium, the eucalyptus pretreated with the steam explosion, had very low amounts of hemicellulose (item 2.2), which was probably the determining factor for the activities not being similar to those verified in the literature.

Although the strategy of reusing mycelium and enzyme production medium brings important increments in the production of enzymes in a differentiated way between microorganisms of different species, in general, using the cycle system provides an economic advantage to the production process, cutting out spending on raw materials for the preparation of the culture and spending on energy for sterilization.



Table 3 represents a comparison of the alternatives of nutrient supplementation in relation to each microorganism and enzyme. The registered enzymatic activities of *T. reesei* RUT C30 are lower than the ones of *P. echinulatum* S1M29 (except for FPA and  $\beta$ -glucosidases). In addition, we verified that the enzymatic production through this process of nutrient reposition and mycelium turnover is not efficient for *T. reesei* RUT C30, given that its enzymatic peak occurs on the third day of production when there is no supplementation and in the next cycles, the enzymatic activities decrease. Therefore, we will supplement with a salt solution in the next step.

**Table 3.** Relationship between the conditions tested as nutrient supplementation and the control after the turnover system by *Trichoderma reesei* RUT C30 and *Penicillium echinulatum* S1M29 in SSC.

Condition	FPA		Endoglucanase		Exoglucanase		$\beta$ -glucosidases		Xylanases	
	S1M29	RUT C30	S1M29	RUT C30	S1M29	RUT C30	S1M29	RUT C30	S1M29	RUT C30
SS	++	-	+	0	+	0	0	-	+	+
MX	+	+	--	0	-	++	+	--	+	++
SM	++	0	-	0	-	-	-	---	0	+

The positive symbols correspond to the scale of best conditions compared to the control (0: similar to the control condition), whereas the negative symbols represent the scale of the worst conditions compared to the control.

SS = salt solution; MX = mixture; SM = salt solution and mixture.

Nutrient replacement is a strategy that can be used to prevent cell lysis, allow greater cell viability, reduce the *lag* phase, and maintain enzyme secretion by microorganisms (1, 11, 17, 23). Screening different supports is necessary since the rate of aeration in the solid-state cultivation is a factor that influences fungal growth and, consequently, enzymatic secretion.

### Evaluation of different support materials in solid-state cultivation

In the beginning, polyurethane fragments were cut and incorporated into the cultivation medium to reduce its compaction during the extracting process. This step evaluated the possibility of substituting polyurethane for another material that allows air

entrance favorable to the microorganism development and enzymatic production, as well as reducing medium compaction. Therefore, culture medium with polyurethane, rice husk, and *in nature* sugar cane bagasse were tested, in addition to the control condition (only the medium).

The most promising FPA obtained by *P. echinulatum* S1M29 was 9 U/g on the tenth day of cultivation in the presence of RH. This result is bigger than the one registered by Liu *et al.*, 2011 (12) with *P. decumbens* in rice bran, producing 5.76 U/g. Activities superior to those obtained in this work were for *P. echinulatum* 9A02S1, by Camassola and Dillon (2007, 2010) (39, 23), but the composition of the culture medium was different; the base was SCB. However, SCB is not found in all regions of the planet, so it is important to explore different biomasses, such as eucalyptus, which is widely used in commercial crops (1).

$\beta$ -glucosidases reached a peak of 23 U/g on the last day of cultivation using RH. For xylanases, *P. echinulatum* S1M29 achieved 326 U/g on the thirteenth day with SCB. We verified endoglucanases and exoglucanases activities to be 40 U/g and 34 U/g, respectively, in the second cycle with the presence of polyurethane (Table 4).

**Table 4.** General results of enzymatic activities of media containing different supports in solid-state cultivation.

Enzymes	<i>Penicillium echinulatum</i> S1M29				<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30			
	PU	SCB	RH	C	PU	SCB	RH	C
FPA <sub>max</sub> (U/g)	3.80±0.26 <sup>c</sup>	1.46±0.23 <sup>d</sup>	8.15±0.29 <sup>a</sup>	5.44±0.38 <sup>b</sup>	0.97±0.24 <sup>a</sup>	0.37±0.03 <sup>b</sup>	0.53±0.4 <sup>b</sup>	0.45±0.09 <sup>b</sup>
<sup>t</sup> FPA <sub>max</sub> (h)	168	312	240	168	72	72	72	72
Endoglucanases <sub>max</sub> (U/g)	40.46±3.44 <sup>a</sup>	24.20±1.75 <sup>b</sup>	22.56±2.2 <sup>b</sup>	27.04±2.80 <sup>b</sup>	5.73±0.24 <sup>ab</sup>	4.55±0.46 <sup>ab</sup>	4.32±0.01 <sup>b</sup>	6.58±1.51 <sup>a</sup>
<sup>t</sup> Endoglucanases <sub>max</sub> (h)	168	312	240	168	72	72	72	72
Xylanases <sub>max</sub> (U/g)	254.6±16.3 <sup>a</sup>	158.81±46.73 <sup>a</sup>	267.43±2.4 <sup>a</sup>	224.2±15.1 <sup>1a</sup>	107.64±16.13 <sup>a</sup>	60.10±8.50 <sup>b</sup>	71.53±4.90 <sup>b</sup>	60.79±8.2 <sup>b</sup>
<sup>t</sup> Xylanases <sub>max</sub> (h)	168	312	240	168	72	72	72	72
$\beta$ -glucosidases <sub>max</sub> (U/g)	14.79±3.32 <sup>a</sup>	16.79±4.58 <sup>ab</sup>	23.57±3.16 <sup>a</sup>	8.10±1.77 <sup>b</sup>	43.26±0.42 <sup>a</sup>	28.23±2.28 <sup>b</sup>	25.05±1.06 <sup>b</sup>	44.95±3.8 <sup>a</sup>
<sup>t</sup> $\beta$ -glucosidases <sub>max</sub> (h)	312	312	312	168	72	72	72	72
Exoglucosidases <sub>max</sub> (U/g)	33.19±4.26 <sup>a</sup>	22.36±1.78 <sup>c</sup>	27.57±2.02 <sup>b</sup>	36.38±3.28 <sup>a</sup>	10.04±0.81 <sup>a</sup>	6.26±1.73 <sup>b</sup>	4.38±0.28 <sup>b</sup>	5.19±1.78 <sup>b</sup>
<sup>t</sup> Exoglucosidases <sub>max</sub> (h)	168	312	240	168	72	72	72	72

Treatments with the same letter for each enzyme evaluated are not statistically different at a level of 5% ( $p < 0.05$ ) by statistical analysis one-way ANOVA with Tukey's post-test.

Based on the results described above, it is possible to say that rice husk in the cultivation medium for SSC has a positive effect for *P. echinulatum* S1M29, becoming an efficient alternative as support for the enzymatic production with turnover since the highest enzymatic activities were registered in its presence. Besides that, it is also a sustainable alternative for the process in comparison to polyurethane.

On the other hand, for *T. reesei*, 1.3 U/g of FPA were registered in the second extraction cycles with the addition of polyurethane (Table 4). For xylanases, the enzymatic peak was found in the first extraction cycles, reaching 118 U/g, a lower result than the one found in the literature by Syuan *et al.*, 2018 (40), with *Trichoderma harzarium*, also in three days of cultivation, with untreated rice straw as substrate.

Endoglucanases and  $\beta$ -glucosidases activities had their peaks in the absence of aeration component, being only composed of carbon and nitrogen sources and salts. They registered at 7 U/g and 42 U/g, respectively, both on the first day of extractions. For exoglucanases, the maximum production corresponded to 9 U/g in the presence of polyurethane on the third day of cultivation (Table 4).

The standard deviation in the cultivations is a characteristic of SSC due to its difficulty to control mass, heat transfer, homogenization, and humidity. Otherwise, this kind of cultivation simulates the natural environment used as a substrate for filamentous fungi, which allows a similar condition to the natural one. Consequently, there is more enzymatic activity than in submerged cultivation (41).

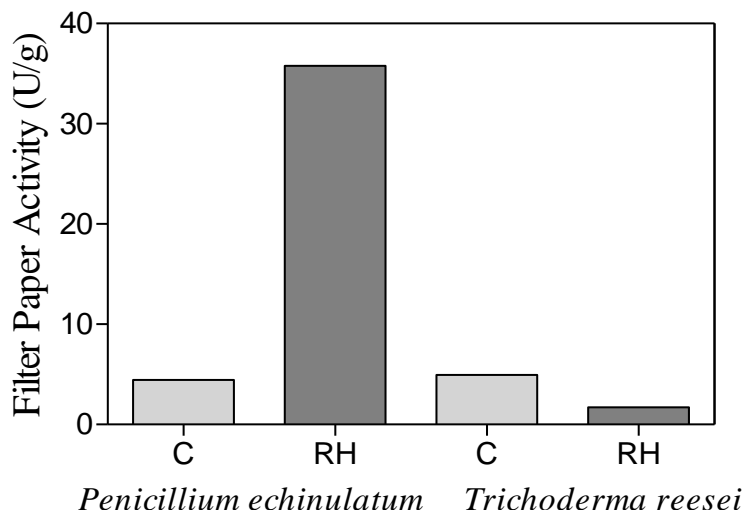
Based on that, it is possible to affirm that the microorganism *T. reesei* RUT C30 is not efficient for the production in this turnover system because most of its enzymatic peaks were in the first extraction, that is, in the one that did not have nutrient supplementation and turnover process, but only the initial cultivation as usual. The best aeration condition for this

system used 0.2 g of polyurethane. However, the use of a renewable resource would be more sustainable.

The turnover process is continuous and allows a realization of many enzyme extractions, being able to add the enzymatic assays obtained in the different days. The microorganism *P. echinulatum* S1M29 stands out as a producer of the best enzymatic titers obtained, with a uniform secretion of enzymes through nutrient supplementation. The best activities related to this fungus were reported in the days where the nutrient reposition was already completed, whereas, by *T. reesei* RUT C30, the best titers were obtained in the first extraction.

Therefore, in Figure 5, the results of the best condition of support for FPA by *P. echinulatum*, RH and the same condition for *T. reesei* RUT C30 are shown, as well as the control condition for both microorganisms. The figure represents the addition of all enzymatic activities obtained during all the extractions. Using *P. echinulatum* S1M29, the total titer registered corresponded to 35.79 U/g of FPA, about eight times more than the control condition (4.44 U/g). For *T. reesei* RUT C30, the results were considerably lower than the other microorganism and its own control: the rice husk condition reached 1.71 U/g, and the control, 4.94 U/g.

The objective of comparing only the rice husk condition and control for both microorganisms is to verify the differences between these fungi for the turnover system. It can be seen, in Table 4, that for *P. echinulatum* S1M29, the RH condition had a better result for FPA, xylanases, and  $\beta$ -glucosidases, respectively, in 240, 240, and 312 hours of cultivation. RH is a great alternative material to polyurethane because it is natural and more sustainable. SCB is also a natural source but has not demonstrated better results than the other conditions. Moreover, RH provided better enzymatic titers in less time than SCB.



**Figure 5.** Filter paper activity of the cultivations of *Penicillium echinulatum* S1M29 and *Trichoderma reesei* RUT C30 with the addition of rice husk (RH) and the controls (C). Condition C refers to the destructive sample of 13 days for *P. echinulatum* and seven days for *T. reesei*. The values presented of RH result from the addition of all (days 4, 7, 10, and 13 for *P. echinulatum* S1M29 and 3, 5, 6, and 7 for *T. reesei* S1M29).

For *T. reesei* RUT C30, all the maximum activities were in 72 hours of cultivation, proving once again that the system does not work for this microorganism. Most of the enzymes presented better results with polyurethane, with the exception of endoglucanases, which had a better result with the control condition.

The cultivation held with these microorganisms shows the difference of efficiency for this syringe-type bioreactor among *P. echinulatum* S1M29 and *T. reesei* RUT C30, as the second fungus is not capable of keeping or increasing its enzymatic secretion, so it cannot be considered an alternative for this production system. *P. echinulatum* S1M29 shows distinct enzymatic patterns for each condition tested, while *T. reesei* RUT C30 has the same pattern: a decrease in enzymatic activity after the first enzyme extraction.

## CONCLUSION

Reusing mycelium and raw material in the enzyme production system presented itself as a promising strategy for the production of enzymes. However, it demonstrated

specificities according to the microorganism. The data proved to be promising, especially for *P. echinulatum* S1M29; however, *T. reesei* RUT C30 did not have the same response. Therefore, the mycelium reuse combined with the nutrient reposition (salt solution) and rice husk as a support was considered the best strategy for significant increases in enzymatic activities.

## **AUTHOR INFORMATION**

### **Corresponding Author**

Marli Camassola - Laboratory of Enzymes and Biomasses, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street 1130, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil, [orcid.org/0000-0001-7410-4337](https://orcid.org/0000-0001-7410-4337) Email: [mcamassola@gmail.com](mailto:mcamassola@gmail.com), [mcamasso@ucs.br](mailto:mcamasso@ucs.br)

**Paula Cavion Costa** - Laboratory of Enzymes and Biomasses, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

**Laura Salgueiro de Carvalho** - Laboratory of Enzymes and Biomasses, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

**Roselei Claudete Fontana** - Laboratory of Enzymes and Biomasses, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

**Willian Daniel Hahn Schneider** - Laboratory of Enzymes and Biomasses, Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil

### **Author Contributions**

Paula Cavion Costa: Formal analysis, Writing – original draft, Writing – review & editing

Eduardo Echer dos Reis: Formal analysis, Writing – review & editing

Laura Salgueiro de Carvalho: Formal analysis, Writing – review & editing

Roselei Claudete Fontana: Formal analysis, Supervision.

Willian Daniel Hahn Schneider: Supervision, Writing – review & editing

Marli Camassola: Conceptualization, Funding acquisition, Writing – review & editing, Visualization, Project administration

### **Declaration of competing interest**

The authors declare that there is not interest conflict.

### **Acknowledgements**

We acknowledge the University of Caxias do Sul (UCS), the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) by the scholarship, the Research Support Foundation of the State of Rio Grande do Sul (Process 16/2551-0000 246- 0) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Process 407228/2018-7 and 314897/2018-6).

### **References**

- (1) Schneider, W. D. H.; Fontana, R. C.; Baudel, H. M.; de Siqueira, F. G.; Rencoret, J.; Gutiérrez, A.; de Eugenio, L. I.; Prieto, A.; Martínez, M. J.; Martínez, Á. T.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. Lignin Degradation and Detoxification of Eucalyptus Wastes by On-Site Manufacturing Fungal Enzymes to Enhance Second-Generation Ethanol Yield. *Appl. Energy* **2020**, *262*, 114493. <https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2020.114493>.
- (2) Liu, Y.; Nemmaru, B.; Chundawat, S. P. S. Thermobifida Fusca Cellulases Exhibit Increased Endo-Exo Synergistic Activity, but Lower Exocellulase Activity, on Cellulose-III. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8* (13), 5028–5039. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06792>.
- (3) Naik, S. N.; Goud, V. V; Rout, P. K.; Dalai, A. K. Production of First and Second

- Generation Biofuels : A Comprehensive Review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2010**, *14*, 578–597. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.003>.
- (4) Sajith, S.; Priji, P.; Sreedevi, S.; Benjamin, S. An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *J. Nutr. Food Sci.* **2016**, *6* (1), 1–13. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461>.
- (5) Schneider, W. D. H.; Bolanõ Losada, C.; Moldes, D.; Fontana, R. C.; De Siqueira, F. G.; Prieto, A.; Martínez, M. J.; Martínez, Á. T.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. A Sustainable Approach of Enzymatic Grafting on *Eucalyptus Globulus* Wood by Laccase from the Newly Isolated White-Rot Basidiomycete *Marasmiellus Palmivorus* VE111. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2019**, *7* (15), 13418–13424. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02770>.
- (6) Zhai, R.; Hu, J.; Saddler, J. N. What Are the Major Components in Steam Pretreated Lignocellulosic Biomass That Inhibit the Efficacy of Cellulase Enzyme Mixtures? *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2016**, *4* (6), 3429–3436. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00481>.
- (7) Scholl, A. L.; Menegol, D.; Pitarelo, A. P.; Fontana, R. C.; Filho, A. Z.; Ramos, L. P.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. Ethanol Production from Sugars Obtained during Enzymatic Hydrolysis of Elephant Grass (*Pennisetum Purpureum*, Schum.) Pretreated by Steam Explosion. *Bioresour. Technol.* **2015**, *192*, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.065>.
- (8) Sohail, M.; Siddiqi, R.; Ahmad, A.; Khan, S. A. Cellulase Production from *Aspergillus niger* MS82: Effect of Temperature and PH. *N. Biotechnol.* **2009**, *25* (6), 437–441. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.02.002>.
- (9) Pandiyan, K.; Singh, A.; Singh, S.; Saxena, A. K.; Nain, L. Technological Interventions for Utilization of Crop Residues and Weedy Biomass for Second Generation Bio-Ethanol Production. *Renew. Energy* **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.08.049>.
- (10) Novello, M.; Vilasboa, J.; Schneider, W. D. H.; Reis, L. Dos; Fontana, R. C.; Camassola, M. Enzymes for Second Generation Ethanol: Exploring New Strategies for the Use of Xylose. *RSC Adv.* **2014**, *4* (41), 21361–21368. <https://doi.org/10.1039/c4ra00909f>.
- (11) Schneider, W. D. H.; dos Reis, L.; Fontana, R. C.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. Exploring Strategies for the Use of Glycerol in the Production of Cellulases and Xylanases, and the Use of These Enzymes in the Hydrolysis of Lignocellulosic



- Biomass. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *122*, 114–118. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.05.067>.
- (12) Liu, Y.; Luo, Z.; Long, C.; Wang, H.; Long, M.; Hu, Z. Cellulase Production in a New Mutant Strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by Solid State Fermentation with Rice Bran. *N. Biotechnol.* **2011**, *28* (6), 733–737. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.12.003>.
- (13) Martins, L. F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P.; Ramos, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* Cellulases in Relation to Their Activity against Various Cellulosic Substrates. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 1417–1424. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.060>.
- (14) Singhanian, R. R.; Sukumaran, R. K.; Pillai, A.; Prema, P.; Szakacs, G.; Pandey, A. Solid-State Fermentation of Lignocellulosic Substrates for Cellulase Production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. *Indian J. Biotechnol.* **2006**, *5*, 332–336.
- (15) Gusakov, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in Biofuel Production. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29* (9), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>.
- (16) Sukumaran, R. K.; Singhanian, R. R.; Mathew, G. M.; Pandey, A. Cellulase Production Using Biomass Feed Stock and Its Application in Lignocellulose Saccharification for Bio-Ethanol Production. *Renew. Energy* **2009**, *34* (2), 421–424. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2008.05.008>.
- (17) Scholl, A. L.; Menegol, D.; Pitarello, A. P.; Fontana, R. C.; Filho, A. Z.; Ramos, L. P.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. Elephant Grass Pretreated by Steam Explosion for Inducing Secretion of Cellulases and Xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 Solid-State Cultivation. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *77*, 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.051>.
- (18) Menegol, D.; Fontana, R. C.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. Second-Generation Ethanol Production from Elephant Grass at High Total Solids. *Bioresour. Technol.* **2016**, *211*, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.098>.
- (19) Menegol, D.; Luisi Scholl, A.; Claudete Fontana, R.; Pinheiro Dillon, A. J.; Camassola, M. Potential of a *Penicillium echinulatum* Enzymatic Complex Produced in Either Submerged or Solid-State Cultures for Enzymatic Hydrolysis of Elephant Grass. *Fuel* **2014**, *133*, 232–240. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2014.05.003>.
- (20) Schneider, W. D. H.; Gonçalves, T. A.; Uchima, C. A.; Couger, M. B.; Prade, R.; Squina, F. M.; Dillon, A. J. P.; Camassola, M. *Penicillium echinulatum* Secretome Analysis Reveals the Fungi Potential for Degradation of Lignocellulosic Biomass.

- Biotechnol. Biofuels* **2016**, 9 (1). <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0476-3>.
- (21) Dillon, A. J. P.; Zorgi, C.; Camassola, M. Use of 2-Deoxyglucose in Liquid Media for the Selection of Mutant Strains of *Penicillium echinulatum* Producing Increased Cellulase and  $\beta$ -Glucosidase Activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 1, 740–746. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0122-7>.
- (22) dos Reis, L.; Schneider, W. D. H.; Fontana, R. C.; Camassola, M.; Dillon, A. J. P. Cellulase and Xylanase Expression in Response to Different PH Levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 Medium. *Bioenergy Res.* **2014**, 7 (1), 60–67. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9345-0>.
- (23) Camassola, M.; Dillon, A. J. P. Cellulases and Xylanases Production by *Penicillium echinulatum* Grown on Sugar Cane Bagasse in Solid-State Fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, 162 (7), 1889–1900. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8967-3>.
- (24) Oliveira, S. D.; de Araújo Padilha, C. E.; Asevedo, E. A.; Pimentel, V. C.; de Araújo, F. R.; de Macedo, G. R.; dos Santos, E. S. Utilization of Agroindustrial Residues for Producing Cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. *J. Environ. Chem. Eng.* **2018**, 6 (1), 937–944. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.12.038>.
- (25) Rani, R.; Sukumaran, R. K.; Kumar, A.; Larroche, C.; Pandey, A. Advancement and Comparative Profiles in the Production Technologies Using Solid-State and Submerged Fermentation for Microbial Cellulases. *Enzyme Microb. Technol.* **2010**, 46 (7), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>.
- (26) Dillon, A. J. P.; Bettio, M.; Pozzan, F. G.; Andrighetti, T.; Camassola, M. A New *Penicillium echinulatum* Strain with Faster Cellulase Secretion Obtained Using Hydrogen Peroxide Mutagenesis and Screening with 2-Deoxyglucose. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, 111 (1), 48–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05026.x>.
- (27) Mandels, M.; Reese, E. T. Induction of Cellulase in *Trichoderma viride* as Influenced by Carbon Sources and Metals by the Dinitrosalicylic Glucose. *J Bacteriol* **1957**, No. 1941, 269–278.
- (28) Camassola, M.; Dillon, J. P. A. Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and Efficient. *J. Anal. Bioanal. Tech.* **2012**, 01 (S1), 10–13. <https://doi.org/10.4172/scientificreports.125>.
- (29) Daroit, D.; Simonetti, A.; Hertz, P.; Brandelli, A. Purification and Characterization of an Extracellular Beta-Glucosidase from *Monascus purpureus*. *J Microbiol*

- Biotechnol.* **2008**, *18* (5), 933–941.
- (30) Ghose, T. K. Measurement of Cellulase Activities. *Pure Appl. Chem.* **1987**, *59* (5), 695–702. <https://doi.org/10.1351/pac198759050695>.
- (31) Deshpande, M. V; Eriksson, K.-E.; Pettersson, L. G. An Assay for Selective Determination of Exo-1, 4, + Glucanases in a Mixture of Cellulolytic Enzymes. *Anal. Biochem.* **1984**, *487*, 481–487.
- (32) Bailey, M. J.; Biely, P.; Poutanen, K. Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity. *J. Biotechnol.* **1992**, *23* (3), 257–270. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90074-J](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90074-J).
- (33) Gusakov, A. V; Sinitsyn, A. P. Cellulases from *Penicillium* Species for Producing Fuels from Biomass. *Biofuels* **2014**, *7269*, 463–477. <https://doi.org/10.4155/bfs.12.41>.
- (34) Chandra, M.; Kalra, A.; Sangwan, N. S.; Gaurav, S. S.; Darokar, M. P.; Sangwan, R. S. Bioresource Technology Development of a Mutant of *Trichoderma citrinoviride* for Enhanced Production of Cellulases. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (4), 1659–1662. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.09.011>.
- (35) Dutta, T.; Sahoo, R.; Sengupta, R.; Ray, S. S.; Bhattacharjee, A.; Ghosh, S. Novel Cellulases from an Extremophilic Filamentous Fungi *Penicillium citrinum*: Production and Characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2008**, No. 35, 275–282. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0304-2>.
- (36) Yang, Y. H.; Wang, B. C.; Wang, Q. H.; Xiang, L. J.; Duan, C. R. Research on Solid-State Fermentation on Rice Chaff with a Microbial Consortium. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2004**, *34*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.10.009>.
- (37) Gutierrez-correa, M.; Tengerdy, R. P. Production of Cellulase on Sugar Cane Bagasse by Fungal Mixed Culture Solid Substrate Fermentation. *Biotechnol. Lett.* **1997**, *19* (7), 665–667.
- (38) Gutierrez-correa, M.; Tengerdy, R. P. Xylanase Production by Fungal Mixed Culture Solid Substrate Fermentation on Sugar Cane Bagasse. *Biotechnol. Lett.* **1998**, *20* (1), 45–47.
- (39) Camassola, M.; Dillon, A. J. P. Production of Cellulases and Hemicellulases by *Penicillium echinulatum* Grown on Pretreated Sugar Cane Bagasse and Wheat Bran in Solid-State Fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 2196–2204. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03458.x>.
- (40) Syuan, K. Y.; Ong, L.; Ai, G.; Kim, T. Evaluation of Cellulase and Xylanase

- Production from *Trichoderma harzianum* Using Acid-Treated Rice Straw as Solid Substrate. *Mater. Today Proc.* **2018**, 5 (10), 22109–22117. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.07.077>.
- (41) Passos, D. D. F.; Jr, N. P.; Castro, A. M. De. A Comparative Review of Recent Advances in Cellulases Production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* Strains and Their Use for Lignocellulose Deconstruction. *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2018**, 14, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.003>.

## 5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que:

- o sistema de reuso de micélio fúngico para cultivos em estado sólido desenvolvido no presente trabalho mostrou-se como uma potencial alternativa para tornar o processo de produção de enzimas do complexo celulolítico e hemicelulolítico menos oneroso, bem como reduzir os custos com matéria-prima, tempo, energia, e geração de resíduos;

- o meio de cultivo composto por eucalipto pré-tratado por explosão a vapor, farelo de soja, farelo de arroz e solução de sais com suplementação de sais a cada ciclo foi o que apresentou os resultados mais promissores;

- para o microrganismo *Penicillium echinulatum* S1M29 as extrações enzimáticas e reposições de nutrientes devem ser realizadas nos dias 4, 7, 10 e 13, e para *Trichoderma reesei* nos dias 3, 5, 6 e 7;

- a utilização da casca de arroz para evitar compactação foi o suporte mais promissor para a produção de enzimas celulasas e xilanases;

- para a utilização deste novo sistema de produção enzimática faz-se necessária uma etapa prévia de testagem com o microrganismo a ser empregado, uma vez que este estudo demonstrou diferença de comportamento entre os dois microrganismos utilizados.

Como perspectivas, sugere-se a utilização dos meios de cultivo após extração enzimática como substratos para hidrólise e posterior fermentação, uma vez que esses seriam descartados e novas matérias primas com características semelhantes seriam realizadas. Essa possibilidade reduz custos de matéria-prima e contribui para a sustentabilidade do processo de produção de etanol de segunda geração e outros produtos tecnológicos advindos de açúcares, reduzindo os gargalos presentes na utilização em grande escala dessa tecnologia.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adav, S.S., Sze, S.K., 2014. Trichoderma Secretome: An Overview, in: Biotechnology and Biology of Trichoderma. Elsevier B.V., pp. 103–114. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00008-4>
- Aguiar, A., Ferraz, A., 2011. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas, *Quim. Nova*.
- Alokika, Anu, Kumar, A., Kumar, V., Singh, B., 2021. Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.175>
- Ashok, A., Doriya, K., Rao, D.R.M., Kumar, D.S., 2017. Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.014>
- Bellaver, C., Snizek, P.N., n.d. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. Concórdia, São Paulo.
- Bhutto, A.W., Qureshi, K., Harijan, K., Abro, R., Abbas, T., Bazmi, A.A., Karim, S., Yu, G., 2017. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. *Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.01.005>
- Bilgili, F., Koçak, E., Bulut, Ü., Ku, S., 2017. Can biomass energy be an efficient policy tool for sustainable development? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 71, 830–845. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.109>
- Buckeridge, M.S., de Souza, A.P., 2014. Breaking the “Glycomic Code” of Cell Wall Polysaccharides May Improve Second-Generation Bioenergy Production from Biomass. *Bioenergy Research*. <https://doi.org/10.1007/s12155-014-9460-6>
- Carvalho, W., Canilha, L., Ferraz, A., Ferreira Milagres, A.M., 2009. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira, *Quim. Nova*.
- Chan, E.C.S., 2003. Microbial nutrition and basic metabolism. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-470100-7.50002-9>

- Choi, H.J., 2020. Agricultural biowaste, rice bran, as carbon source to enhance biomass and lipid production: Analysis with various growth rate models. *Water Science and Technology* 82, 1120–1130. <https://doi.org/10.2166/wst.2020.342>
- Daniel, W., Schneider, H., Gonçalves, T.A., Uchima, C.A., Reis, L., Fontana, R.C., Squina, F.M., José, A., Dillon, P., Camassola, M., 2017. Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. *Process Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.004>
- Dias, M.O.S., Cunha, M.P., Jesus, C.D.F., Rocha, G.J.M., Pradella, J.G.C., Rossell, C.E.V., Maciel Filho, R., Bonomi, A., 2011. Second generation ethanol in Brazil: Can it compete with electricity production? *Bioresource Technology* 102, 8964–8971. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.098>
- 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. *Journal of Applied Microbiology* 111, 48–53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05026.x>
- 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  $\beta$ -glucosidase activities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 740–746. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0122-7>
- Elseify, L.A., Midani, M., Shihata, L.A., El-Mously, H., 2019. Review on cellulosic fibers extracted from date palms (*Phoenix Dactylifera* L.) and their applications. *Cellulose*. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02259-6>
- Faria, L., Kolling, D., Camassola, M., Jose, A., 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates 99, 1417–1424. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.060>
- Fatma, S., Hameed, A., Noman, M., Ahmed, T., Sohail, I., Shahid, M., Tariq, M., Tabassum, R., 2018. Lignocelulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for Future. *Protein & Peptide Letters* 25. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180122144504>

- Florencio, C., Badino, A.C., Farinas, C.S., 2017. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. *Quimica Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170104>
- Florencio, C., Cunha, F.M., Badino, A.C., Farinas, C.S., Ximenes, E., Ladisch, M.R., 2016. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: Enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology* 90, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.04.011>
- França, M., Fernandes, R., Santos, D., Borschiver, S., Peixoto, M.A., Couto, G., 2010. Biorefinery in Brazil: New Technological Trends Adopted by Domestic Companies, *J. Technol. Manag. Innov.*
- González-lópez, Ó., García, C., Casquero, P.A., 2015. Secoiridoids glycosides and root development in *Gentiana lutea* L. subsp. *aurantiaca* M. Lainz from the Northwest of the Iberian Peninsula. *Industrial Crops & Products* 77, 932–939. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.072>
- Gueiros, J., Siqueira, W., Rodrigues, C., Porto, L., Vandenberghe, D.S., Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R., 2021. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. *Biomass and Bioenergy* 132, 105419. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>
- Gupta, V.K., Kubicek, C.P., Berrin, J.G., Wilson, D.W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E.X.F., Ezeji, T., 2016a. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.006>
- Gupta, V.K., Kubicek, C.P., Berrin, J.G., Wilson, D.W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E.X.F., Ezeji, T., 2016b. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.04.006>
- Gusakov, A. V., 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology* 29, 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.004>
- Hasunuma, T., Okazaki, F., Okai, N., Hara, K.Y., Ishii, J., Kondo, A., 2013. A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. *Bioresource Technology* 135, 513–522. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.047>



- He, J., Liu, X., Xia, J., Xu, J., Xiong, P., Qiu, Z., 2020. One-step utilization of non-detoxified pretreated lignocellulose for enhanced cellulolytic enzyme production using recombinant *Trichoderma reesei* RUT C30 carrying alcohol dehydrogenase and nicotinate phosphoribosyltransferase. *Bioresource Technology* 310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123458>
- He, X., Lu, W., Sun, C., Khalesi, H., Mata, A., Andaleeb, R., Fang, Y., 2021. Cellulose and cellulose derivatives: Different colloidal states and food-related applications. *Carbohydrate Polymers*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117334>
- Henrique, M., Silveira, L., Rita, A., Morais, C., da Costalopes, A.M., Driellynayarao, J., Bogel-Lukasik, R., Andraus, J., Pereiramos, L., 2015. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries.
- Hinchee, M., Rottmann, W., Mullinax, L., 2009. Short-rotation woody crops for bioenergy and biofuels applications 619–629. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9235-5>
- Jia, F., Peng, S., Green, J., Koh, L., Chen, X., 2020. Soybean supply chain management and sustainability: A systematic literature review. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120254>
- Juturu, V., Chuan, J., 2014. Microbial cellulases: Engineering , production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>
- Juturu, V., Wu, J.C., 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.01.077>
- Juturu, V., Wu, J.C., 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>
- Kumar, B., Bhardwaj, N., Agrawal, K., Chaturvedi, V., Verma, P., 2020. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.106244>

- Luciano Silveira, M.H., Morais, A.R., da Costa Lopes, A., Nayara Oleksyszzen, D., Rafal, B.-Ł., Jürgen, A., Ramos, L.P., 2015. Current Pretreatment Technologies for the Development of Cellulosic Ethanol and Biorefineries.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 506–577. <https://doi.org/10.1128/mnbr.66.3.506-577.2002>
- Matei, J.C., Soares, M., Bonato, A.C.H., de Freitas, M.P.A., Helm, C. v., Maroldi, W. v., Magalhães, W.L.E., Haminiuk, C.W.I., Maciel, G.M., 2020. Enzymatic delignification of sugar cane bagasse and rice husks and its effect in saccharification. *Renewable Energy* 157, 987–997. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.028>
- Méndez-Líter, J.A., de Eugenio, L.I., Nieto-Domínguez, M., Prieto, A., Martínez, M.J., 2021. Hemicellulases from *Penicillium* and *Talaromyces* for lignocellulosic biomass valorization: A review. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124623>
- Menegol, D., Fontana, R.C., José, A., Dillon, P., Camassola, M., 2016. *Bioresource Technology* Second-generation ethanol production from elephant grass at high total solids. *BIORESOURCE TECHNOLOGY* 211, 280–290. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.098>
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.
- MME, 2007. Plano Nacional de Energia - 2030; Geração Termelétrica - Biomassa.
- Negrão, D.R., Grandis, A., Buckeridge, M.S., Rocha, G.J.M., Leal, M.R.L.V., Driemeier, C., 2021. Inorganics in sugarcane bagasse and straw and their impacts for bioenergy and biorefining: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111268>
- Olsson, L., Hahn-Hägerdal, B., 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production.
- Palmqvist, E., Arbel, B., Agerdal, H.-H., 1999. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition.

- Passos, D.D.F., Jr, N.P., Castro, A.M. De, 2018. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 14, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.06.003>
- Patel, A.K., Pant, D., Banu, J.R., Rao, C. V, 2019. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology* 122724. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122724>
- Paul, M., Mohapatra, S., Kumar Das Mohapatra, P., Thatoi, H., 2021. Microbial cellulases – An update towards its surface chemistry, genetic engineering and recovery for its biotechnological potential. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125710>
- Pazuch, F.A., Nogueira, C.E.C., Souza, S.N.M., Micuanski, V.C., Friedrich, L., Lenz, A.M., 2017. Economic evaluation of the replacement of sugar cane bagasse by vinasse, as a source of energy in a power plant in the state of Paraná, Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.047>
- Peciulyte, A., Anasontzis, G.E., Karlström, K., Larsson, P.T., Olsson, L., 2014. Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. *Fungal Genetics and Biology* 72, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.07.011>
- Penín, L., López, M., Santos, V., Alonso, J.L., Parajó, J.C., 2020. Technologies for Eucalyptus wood processing in the scope of biorefineries: A comprehensive review. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123528>
- Pereira Ramos, L., 2003a. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials, *Quim. Nova*.
- Pereira Ramos, L., 2003b. THE CHEMISTRY INVOLVED IN THE STEAM TREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIALS, *Quim. Nova*.
- Perez, C.L., Casciatori, F.P., Thoméo, J.C., 2021. Improving enzyme production by solid-state cultivation in packed-bed bioreactors by changing bed porosity and airflow distribution. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 44, 537–548. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02466-7>

- Rana, V., Eckard, A.D., Teller, P., Ahring, B.K., 2014. On-site enzymes produced from *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine. *Bioresource Technology* 154, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.059>
- Robak, K., Balcerek, M., 2018. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5428>
- Rubin, E.M., 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature07190>
- Sajith, S, Priji, P., Sreedevi, S., Benjamin, S., 2016. An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *Journal Nutrition & Food Sciences* 6, 1–13. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461>
- Sajith, Sreedharan, Priji, P., Sreedevi, S., S, B., 2016. An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *Journal of Nutrition & Food Sciences* 06. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461>
- Schneider, W.D.H., Gonçalves, T.A., Uchima, C.A., Couger, M.B., Prade, R., Squina, F.M., Dillon, A.J.P., Camassola, M., 2016. *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. *Biotechnology for Biofuels* 9. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0476-3>
- Schneider, W.D.H., Gonçalves, T.A., Uchima, C.A., Reis, L. dos, Fontana, R.C., Squina, F.M., Dillon, A.J.P., Camassola, M., 2018. Comparison of the production of enzymes to cell wall hydrolysis using different carbon sources by *Penicillium echinulatum* strains and its hydrolysis potential for lignocelulosic biomass. *Process Biochemistry* 66, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.004>
- Senthil Kumar, P., Ramakrishnan, K., Dinesh Kirupha, S., Sivanesan, S., 2010. Thermodynamic and kinetic studies of cadmium adsorption from aqueous solution onto rice husk. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 27, 347–355. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322010000200013>
- Shallom, D., Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00056-0)

- Singh, A., Bajar, S., Devi, A., Pant, D., 2021. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>
- 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 and Microbial Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>
- Siqueira, J.G.W., Rodrigues, C., Vandenberghe, L.P. de S., Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R., 2020. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. *Biomass and Bioenergy*. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>
- Sperandio, G.B., Ximenes, E., Filho, F., 2019. International Biodeterioration & Biodegradation Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context : A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 142, 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.05.014>
- Sukumaran, R.K., Singhania, R.R., Mathew, G.M., Pandey, A., 2009. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy* 34, 421–424. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2008.05.008>
- Tarafdar, A., Sirohi, R., Gaur, V.K., Kumar, S., Sharma, P., Varjani, S., Pandey, H.O., Sindhu, R., Madhavan, A., Rajasekharan, R., Sim, S.J., 2021. Engineering interventions in enzyme production: Lab to industrial scale. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124771>
- Tu, W., Hallett, J.P., 2019a. ScienceDirect Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 20, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.07.004>
- Tu, W., Hallett, J.P., 2019b. ScienceDirect Recent advances in the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 20, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.07.004>
- Vaishnav, N., Singh, A., Adsul, M., Dixit, P., Sandhu, S.K., Mathur, A., Puri, S.K., Singhania, R.R., 2018. *Bioresource Technology Reports* *Penicillium*: The next

- emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports* 2, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003>
- Wang, F., Ouyang, D., Zhou, Z., Page, S.J., Liu, D., Zhao, X., 2021. Lignocellulosic biomass as sustainable feedstock and materials for power generation and energy storage. *Journal of Energy Chemistry* 57, 247–280. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2020.08.060>
- Xiang, J., Wang, X., Sang, T., 2021. Cellulase production from *Trichoderma reesei* RUT C30 induced by continuous feeding of steam-exploded *Miscanthus lutarioriparius*. *Industrial Crops and Products* 160. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113129>
- Zabed, H., Sahu, J.N., Boyce, A.N., Faruq, G., 2016. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>
- Zampieri, D., Guerra, L., Camassola, M., Dillon, A.J.P., 2013. Secretion of endoglucanases and  $\beta$ -glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. *Industrial Crops and Products* 50, 882–886. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.045>
- Zhang, H., Han, L., Dong, H., 2021. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110758>