



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

OZEIAS BATISTA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE HOLOCELULASES POR FUNGO
FILAMENTOSO (Ascomycota) A PARTIR DO
BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR E LEVEDURA DA
INDÚSTRIA CERVEJEIRA**

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Federal Fluminense visando a obtenção do grau de
Mestre em Ciências e Biotecnologia

Orientador(es): Dra. Sorele Batista Fiaux (UFF)
Dr. Rodrigo Pires do Nascimento (UFRJ)



Niterói
2024

OZEIAS BATISTA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE HOLOCELULASES POR FUNGO
FILAMENTOSO (Ascomycota) A PARTIR DO BAGAÇO DA
CANA-DE-AÇÚCAR E LEVEDURA DA INDÚSTRIA
CERVEJEIRA**

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Tecnologia Microbiana, do Departamento de Tecnologia Farmacêutica, da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, e no Laboratório de Ecologia e Processos Microbianos, do Departamento de Engenharia Bioquímica, da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, do Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense.

Dissertação de Mestrado submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial visando à obtenção do grau de Mestre em Ciências e Biotecnologia.

Orientadores: Sorele Batista Fiaux

Rodrigo Pires do Nascimento

Ficha catalográfica automática - SDC/BCV
Gerada com informações fornecidas pelo autor

D722p Dos Santos, Ozeias Batista
Produção de holocelulases por fungo filamentoso
(Ascomycota) a partir do bagaço da cana-de-açúcar e
levedura da indústria cervejeira / Ozeias Batista Dos Santos.
- 2024.
120 f.: il.

Orientador: Sorele Batista Fiaux.
Coorientador: Rodrigo Pires do Nascimento.
Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Instituto de Biologia, Niterói, 2024.

1. Celulase. 2. Aspergillus. 3. Fermentação em Estado
Sólido. 4. Extrato de levedura. 5. Produção intelectual. I.
Fiaux, Sorele Batista, orientadora. II. Nascimento, Rodrigo
Pires do, coorientador. III. Universidade Federal Fluminense.
Instituto de Biologia. IV. Título.

CDD - XXX

OZEIAS BATISTA DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE HOLOCELULASES POR FUNGO
FILAMENTOSO (*Ascomycota*) A PARTIR DO BAGAÇO DA
CANA DE AÇUCAR E LEVEDURA DA INDÚSTRIA
CERVEJEIRA**

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Federal Fluminense como
requisito parcial visando à obtenção do
grau de Mestre em Ciências e
Biotecnologia.

Banca examinadora:

Andrea Regina de Souza Baptista – Dep. Microbiologia e Parasitologia – UFF

Eliane Pereira Cicolatti – Dep. Engenharia Química – UFRJ

Ricardo Sposina Sobral Teixeira – Dep. Bioquímica – UFRJ

Gabrielle Alves Ribeiro da Silva – PPG Eng. Química – UERJ

A todos os que ensinam, educam, disciplinam, orientam, e cuidam, sejam pais, pedagogos, professoras do ensino infantil, acadêmicos, mestres religiosos, mestres de esportes, escritores, jornalistas, produtores de conteúdo digital, enfim, todos aqueles que transmitem seus acúmulos de conhecimento com generosidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar com amor e graça todos os dias.

Aos meus pais, Rosalee e Ranulfo, por terem formado quem eu sou, me dando a referência que procuro seguir.

À minha esposa, Gabriela, que me apoia e está ao meu lado todos os dias.

Ao meu irmão Rafael, por estar presente quando eu preciso.

Aos colegas e amigos da Faculdade de Farmácia da UFF e do Laboratório de Tecnologia Microbiana pela amizade, alegrias, dicas, torcidas e influências acadêmicas.

Aos queridos irmãos da Igreja Cristã Carioca, que sempre oram por mim e me enviam palavras de ânimo.

A todos os professores que já passaram pela minha vida, alimentaram meus interesses acadêmicos e, sabendo ou não, também determinaram os rumos que eu segui.

À professora Sorele Fiaux, que me orientou de forma muito generosa e presente durante todo esse período.

Ao professor Rodrigo do Nascimento, que me orientou com instruções úteis e provocações pertinentes, buscando me fazer sentir incluído no seu laboratório.

À Gabrielle da Silva, nos ombros de quem me apoio para a continuidade dos trabalhos com o fungo promissor que foi utilizado.

À professora Márcia Feijó e aos técnicos do Laboratório de Bromatologia da UFF, por possibilitarem as análises de pelo método de Kjeldahl.

Aos professores do PPBI pela busca constante por qualidade no ensino e pesquisa.

SUMÁRIO

Resumo.....	x
Abstract.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1 Biomassa lignocelulósica.....	2
1.1.1 Estrutura química do material lignocelulósico.....	2
1.2 Resíduos da indústria sucroalcooleira e cervejeira.....	5
1.2.1 Bagaço de cana.....	6
1.2.2 Extrato de levedura.....	11
1.3 Enzimas holocelulolíticas.....	12
1.3.1 Celulases.....	12
1.3.2 Xilanases.....	13
1.3.3 Atividade enzimática.....	14
1.3.4 Síntese enzimática e exigências nutricionais.....	16
1.3.5 Aplicações e mercado de holocelulases.....	17
1.3.6 Produção de holocelulases e o conceito de biorrefinarias.....	18
1.4 Microrganismos produtores de enzimas holocelulolíticas.....	20
1.4.1 Produção de holocelulases por fermentação em estado sólido.....	22
2. Objetivos.....	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. Material e métodos.....	24
3.1 Obtenção de extrato de levedura.....	24
3.1.1 Coleta e armazenamento da levedura cervejeira.....	24
3.1.2 Autólise de leveduras: avaliação do choque ácido e tempo de incubação.....	24
3.1.3 Autólise de levedura: preparo de extrato de levedura para uso nas fermentações.....	25
3.1.4 Análises pelo método de Kjeldahl.....	25
3.2 Bagaço de cana utilizado.....	27
3.2.1 Umidade dos bagaços de cana.....	27
3.3 Microrganismos utilizados.....	27
3.4 Determinação das taxas de crescimento em meios solidificados.....	28

3.5	Fermentação em estado sólido	29
3.5.1	Experimento cinético inicial: comparação de bagaços e fungos	30
3.5.2	Estudo de parâmetros de fermentação: planejamento fatorial	31
3.6	Obtenção de extrato enzimático	32
3.7	Análises de atividade enzimática	34
3.7.1	Atividade FPase (Celulase total)	34
3.7.2	Atividade CMCase (carboximetilcelulase)	35
3.7.3	Atividades β -glicosidase e β -xilosidase	35
3.7.4	Atividade endo- β -1,4-xilanase (endoxilanase).....	36
3.7.5	Curvas padrão e cálculos de atividade.....	36
4.	Resultados.....	39
4.1	Obtenção do extrato de levedura.....	39
4.1.1	Autólise de leveduras: avaliação do choque ácido e tempo de incubação.....	39
4.1.2	Autólise de toda a levedura disponível.....	40
4.2	Determinação das taxas de crescimento em meios solidificados	41
4.3	Experimento cinético inicial – comparação de bagaços e fungos	44
4.3.1	Umidade inicial do bagaço	44
4.3.2	Fermentação em estado sólido	44
4.4	Estudo de parâmetros de fermentação: planejamento fatorial.....	47
4.4.1	Atividades enzimáticas.....	49
4.4.2	Produtividades de atividades enzimáticas.....	51
4.4.3	Análises de variância considerando todos os fatores.....	54
4.4.4	Análises de variância e modelos simplificados baseados no planejamento fatorial 2^3	56
4.4.5	Validação do ponto máximo escolhido	63
5.	Discussão	66
5.1	Obtenção do extrato de levedura.....	66
5.1.1	Autólise de leveduras: avaliação do choque ácido e tempo de incubação.....	66
5.2	Determinação das taxa de crescimento em meios solidificados	67
5.3	Experimento cinético inicial – comparação de bagaços e fungos	68
5.4	Estudo de parâmetros de fermentação: planejamento fatorial.....	71
5.4.1	Atividades enzimáticas.....	71

5.4.2	Produtividades de atividades enzimáticas	74
5.4.3	Análises de variância e modelos baseados no planejamento fatorial 2^3 75	
5.4.4	Validação do ponto máximo escolhido	78
6.	Considerações Finais	82
7.	Referências Bibliográficas	83
8.	Apêndices	96
8.1	Apêndice 1: Atividades enzimáticas no experimento cinético Inicial – comparação de bagaços e fungos	96
8.2	Apêndice 2: ANOVAs <i>two-way</i> para experimento cinético inicial – comparação de bagaços e fungos	99
8.3	Apêndice 3: Atividades enzimáticas no estudo de parâmetros de fermentação: planejamento fatorial	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Estrutura química do material lignocelulósico	3
Figura 1-2: Representação esquemática da ação sinérgica das celulasas	13
Figura 1-3: Representação esquemática da ação sinérgica das xilanases totais.	14
Figura 3-1: Frascos contendo apenas bagaço de cana tratado por explosão a vapor e <i>in natura</i> após autoclavagem.....	30
Figura 3-2: Esquema da filtração e recolhimento dos extratos enzimáticos.....	32
Figura 4-1: Concentração de nitrogênio orgânico no extrato de levedura (sobrenadante) em função do tempo de autólise (a 59°C) e tratamentos com e sem choque ácido.....	40
Figura 4-2: Percentual de sólidos extraído e concentrações de nitrogênio orgânico obtidas antes (0h) e após (24h) a autólise a 59°C	41
Figura 4-3: Crescimento de fungos em meios contendo bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (MBtA) e <i>in natura</i> (MBnA) como única fonte de carbono, a 30°C em placas de Petri de 9cm de diâmetro	41
Figura 4-4: <i>Trichoderma asperellum</i> após 64h a 30°C em meio com bagaço <i>in natura</i> (MBnA) e com bagaço tratado por explosão a vapor (MBtA).	42
Figura 4-5: <i>Trichoderma asperellum</i> após 87h a 30°C em meio com bagaço <i>in natura</i> (MBnA) e com bagaço tratado por explosão a vapor (MBtA).	42
Figura 4-6: <i>Aspergillus niger</i> após 64h a 30°C em meio com bagaço <i>in natura</i> (MBnA) e com bagaço tratado por explosão a vapor (MBtA).	43
Figura 4-7: <i>Penicillium pedernalense</i> após 238h a 30°C, em meio com bagaço <i>in natura</i> (MBnA) e com bagaço tratado por explosão a vapor (MBtA).	43
Figura 4-8: Atividades enzimáticas produzidas por <i>A. niger</i> 5J, <i>T. asperellum</i> FEV e <i>P. pedernalense</i> F4B1, com respectivas análises estatísticas. São apresentados os resultados das comparações múltiplas para os dias 5 , 7 ou 10	45
Figura 4-9: Fotografias do experimento 9 (ponto central) do planejamento fatorial 2 ³ após 1, 2 e 3 dias de fermentação em estado sólido.	48
Figura 4-10: Fotografias do experimento 10 (ponto central) do planejamento fatorial 2 ³ após 1, 2 e 3 dias de fermentação em estado sólido.	48
Figura 4-11: Fotografias do experimento 11 (ponto central) do planejamento fatorial 2 ³ após 1, 2 e 3 dias de fermentação em estado sólido.	49

Figura 4-12: Atividades FPase produzidas por <i>A. niger</i> 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais.....	49
Figura 4-13: Atividades CMCCase produzidas por <i>A. niger</i> 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais.....	50
Figura 4-14: Atividades endoxilanase produzidas por <i>A. niger</i> 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais.....	50
Figura 4-15: Atividades β -glicosidase produzidas por <i>A. niger</i> 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais.....	51
Figura 4-24: Produtividades de atividade FPase obtidas por <i>A. niger</i> 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais	52
Figura 4-25: Produtividades de atividade CMCCase obtidas por <i>A. niger</i> 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais	52
Figura 4-26: Produtividades de atividade β -glicosidase obtidas por <i>A. niger</i> 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais	53
Figura 4-27: Produtividades de atividade endoxilanase obtidas por <i>A. niger</i> 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais	53
Figura 4-28: gráfico de Pareto completo da produtividade de atividade FPase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	54
Figura 4-29: gráfico de Pareto completo da produtividade de atividade CMCCase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	55
Figura 4-30: gráfico de Pareto completo da produtividade de atividade β -glicosidase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	55
Figura 4-31: gráfico de Pareto completo da produtividade de atividade endoxilanase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	56
Figura 4-32: gráfico de Pareto do modelo simplificado de produtividade de atividade FPase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central	57
Figura 4-33: gráfico de Pareto do modelo simplificado de produtividade de atividade CMCCase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	58
Figura 4-34: gráfico de Pareto do modelo simplificado de produtividade de atividade β -glicosidase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	59

Figura 4-35: gráfico de Pareto do modelo simplificado de produtividade de atividade endoxilanase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	60
Figura 5-1: Cinética de produção de FPase para algumas amostras e ponto central no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com triplicata do ponto central.....	72
Figura 5-2: Cinética de produção de CMCase para algumas amostras e ponto central no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com triplicata do ponto central	72
Figura 5-3: Cinética de produção de β -glicosidase para algumas amostras e ponto central no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com triplicata do ponto central	73
Figura 5-4: Cinética de produção de endoxilanase para algumas amostras e ponto central no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com triplicata do ponto central.	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-1: Composições do bagaço de cana <i>in natura</i> (I.n.) e pré-tratado por explosão a vapor (E.v.).	10
Tabela 3-1: Domínio experimental do planejamento fatorial completo 2^3 para estudo dos parâmetros de FES que influenciam a atividade enzimática.	31
Tabela 3-2: Planejamento fatorial completo 2^3 para estudo dos parâmetros de FES que influenciam a atividade enzimática.	31
Tabela 3-3: Diferentes procedimentos de extração em cada experimento.	33
Tabela 4-1: Análise de variância 2way para os tempos de incubação e tratamentos com ou sem choque ácido na autólise da levedura residual	39
Tabela 4-2: Análise de variância (ANOVA) do modelo simplificado de produtividade de atividade FPase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.....	57
Tabela 4-3: Análise de variância (ANOVA) do modelo simplificado de produtividade de atividade CMCase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.....	58
Tabela 4-4: Análise de variância (ANOVA) do modelo simplificado de produtividade de atividade β -glicosidase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	59
Tabela 4-5: Análise de variância (ANOVA) do modelo simplificado de produtividade de atividade endoxilase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central	60
Tabela 4-6: Efeitos estimados, e equações obtidas com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.....	61
Tabela 4-7: Valores das variáveis independentes para produtividade máxima de atividade endoxilase dentro do domínio.	62
Tabela 4-8: Atividades enzimáticas obtidas na repetição do ponto máximo do planejamento fatorial e sua estatística descritiva.	63
Tabela 4-9: Produtividades enzimáticas obtidas na repetição do ponto máximo do planejamento fatorial e sua estatística descritiva.	64
Tabela 4-10: Produtividades de atividade enzimática experimentais e preditas pelo modelo	64
Tabela 5-1: Atividades celulasas de alguns trabalhos encontrados na literatura.	78

Tabela 5-2: Atividades xilanases de alguns trabalhos encontrados na literatura.	79
Tabela 8-1: Atividades FPase produzidas por <i>A. niger</i> 5J, <i>T. asperellum</i> FEV e <i>P. pedernalense</i> F4B1.	96
Tabela 8-2: Atividades CMCase produzidas por <i>A. niger</i> 5J, <i>T. asperellum</i> FEV e <i>P. pedernalense</i> F4B1.	97
Tabela 8-3: Atividades β -glicosidase produzidas por <i>A. niger</i> 5J, <i>T. asperellum</i> FEV e <i>P. pedernalense</i> F4B1.	97
Tabela 8-4: Atividades Endoxilanase produzidas por <i>A. niger</i> 5J, <i>T. asperellum</i> FEV e <i>P. pedernalense</i> F4B1.	98
Tabela 8-5: Análises de variância <i>two-way</i> para atividades FPase do experimento cinético inicial, comparando os fatores Fungo e Bagaço.	99
Tabela 8-6: Análises de variância <i>two-way</i> para atividades CMCase do experimento cinético inicial, comparando os fatores Fungo e Bagaço.	100
Tabela 8-7: Análises de variância <i>two-way</i> para atividades β -glicosidase do experimento cinético inicial, comparando os fatores Fungo e Bagaço.	101
Tabela 8-8: Análises de variância <i>two-way</i> para atividades endoxilanase do experimento cinético inicial, comparando os fatores Fungo e Bagaço.	102
Tabela 8-9: Atividades FPase produzidas por <i>A. niger</i> 5J em planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	103
Tabela 8-10: Atividades CMCase produzidas por <i>A. niger</i> 5J em planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	103
Tabela 8-11: Atividades β -glicosidase produzidas por <i>A. niger</i> 5J em planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	104
Tabela 8-12: Atividades endoxilanase produzidas por <i>A. niger</i> 5J em planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.	104

RESUMO

As holocelulases (*i.e.*, celulases e hemicelulases) apresentam aplicações em vários setores industriais, em especial na sacarificação de material lignocelulósico em biorrefinarias. No entanto, o elevado custo dessas enzimas demanda o desenvolvimento de bioprocessos mais eficientes e econômicos. Este estudo investigou a produção dessas enzimas por fermentação em estado sólido (FES), um processo de custo operacional reduzido, utilizando as linhagens recém isoladas *Aspergillus niger* 5J, *Trichoderma asperellum* FEV e *Penicillium pedernalense* F4B1. Essas linhagens foram cultivadas em subprodutos da indústria sucroalcooleira e cervejeira, especificamente bagaço de cana e levedura residual. Para isso, foi produzido um extrato de levedura por autólise a partir de levedura cervejeira residual. Em seguida, os fungos foram triados em meios solidificados contendo bagaço de cana, e a produção de enzimas foi comparada em experimentos de FES utilizando bagaço de cana tratado por explosão a vapor e *in natura* como fontes de carbono. Apenas a linhagem *A. niger* 5J e o sistema utilizando bagaço *in natura* foram selecionados para um estudo de parâmetros de fermentação, que incluíram também concentrações iniciais de extrato de levedura, NaNO₃ e concentração de conídios. Os resultados obtidos mostraram baixas atividades enzimáticas de FPase e CMCase, mas elevadas atividades de endo- β -1,4-xilanase (691U/g), de β -glicosidase (4484U/g) e β -xilosidase (4138U/g). Desta forma, o presente estudo demonstra o grande potencial da linhagem *Aspergillus niger* 5J na produção de enzimas endo- β -1,4-xilanase, β -glicosidase e β -xilosidase, na presença de resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: celulase, xilanase, fermentação em estado sólido, extrato de levedura, *Aspergillus niger*, *Trichoderma asperellum*, *Penicillium pedernalense*.

ABSTRACT

Holocellulases (*i.e.*, cellulases and hemicellulases) have applications in various industrial sectors, particularly in the saccharification of lignocellulosic material in biorefineries. However, the high cost of these enzymes necessitates the development of more efficient and cost-effective bioprocesses. This study investigated the production of these enzymes by solid-state fermentation (SoSF), a process with reduced operational costs, using newly isolated strains *Aspergillus niger* 5J, *Trichoderma asperellum* FEV, and *Penicillium pedernalense* F4B1. These strains were cultivated on by-products from the sugar-alcohol and brewing industries, specifically sugarcane bagasse and residual yeast. For this purpose, a yeast extract was produced by autolysis from residual brewing yeast. Subsequently, the fungi were screened on solid media containing sugarcane bagasse, and enzyme production was compared in SoSF experiments using steam-exploded and raw sugarcane bagasse as carbon sources. Only the *A. niger* 5J strain and the system using raw bagasse were selected for a fermentation parameter study, which also included initial concentrations of yeast extract, NaNO₃, and conidia concentration. The results showed low FPase and CMCase activities but high endo- β -1,4-xylanase (691 U/g), β -glucosidase (4484 U/g) and β -xylosidase (4138 U/g) activities. Thus, this study demonstrates the significant potential of the *Aspergillus niger* 5J strain for the production of endo- β -1,4-xylanase, β -glucosidase, and β -xylosidase in the presence of agroindustrial residues.

Keywords: cellulase, xylanase, solid state fermentation, yeast extract, *Aspergillus niger*, *Trichoderma asperellum*, *Penicillium pedernalense*.

1. INTRODUÇÃO

Vivemos uma emergência climática. O aquecimento da superfície do planeta ao longo dos últimos 50 anos se deve ao aumento da presença de gases de efeito estufa na atmosfera, causada pelo uso de energia não sustentável, mudança do uso da terra e pelos padrões atuais de consumo e produção. Há impactos que já têm sido observados, bem como ameaças futuras à saúde e bem-estar humano, à saúde do planeta, perda de biodiversidade, prejuízos à produção de alimentos e disponibilidade de água, eventos climáticos extremos, danos a infraestruturas e perdas de territórios costeiros. As consequências ameaçam de forma desigual os países mais pobres e em desenvolvimento. Algumas alternativas de mitigação são o uso de energias sustentáveis e aumento da eficiência energética, sobretudo no transporte e indústria, redução do desperdício de alimentos e resíduos sólidos, redução do desmatamento e reflorestamento (IPCC, 2023).

O Brasil é uma grande potência agropecuária, quadro que eleva a vulnerabilidade da economia às mudanças do clima, mas também viabiliza novas oportunidades de desenvolvimento sustentável. Nesse sentido, o país apresenta um grande potencial de desenvolvimento econômico sustentável: trata-se do país com a maior biodiversidade do mundo, concentrando cerca de 15 a 20% do total de espécies conhecidas (SCARAMUZZA et al., 2017). Além de garantir serviços ecossistêmicos, como provisão de água, ciclagem de nutrientes, polinização, entre outros, a conservação da diversidade biológica pode permitir sua exploração para obtenção de produtos. Tal bioeconomia pode incentivar a continuidade da preservação, em um ciclo virtuoso no qual o desenvolvimento e a biodiversidade tornam-se plenamente integrados e codependentes (SCARANO; SANTOS, 2018).

A rica biodiversidade nacional inclui os microrganismos, em especial a biodiversidade fúngica (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2024). Contraditoriamente, há falta de produção nacional de enzimas lignocelulolíticas, produtos de alto valor agregado obtidos em grande parte a partir de fungos (DE OLIVEIRA RODRIGUES et al., 2020). Essas enzimas têm diversas aplicações, por exemplo nas indústrias de alimentos, tecidos e biocombustíveis.

Além disso, esses produtos podem ser obtidos a partir de resíduos agroindustriais de baixo valor agregado provenientes da própria produção de biocombustíveis, em processos de baixo custo, como a fermentação em estado sólido, que podem ser integrados a plantas industriais (SIQUEIRA et al., 2020). Por exemplo, a biomassa lignocelulósica proveniente da indústria sucroalcooleira pode ser suplementada por outro resíduo rico em nutrientes, que é a levedura residual, a qual pode ser obtida da própria usina ou de uma cervejaria. Esse substrato pode ser usado para obtenção de enzimas *on site*, que podem ser enriquecidas e vendidas como produtos de alto valor agregado ou usadas no próprio local para hidrólise de material lignocelulósico, parte do processo de produção de bioetanol de segunda geração. Para a obtenção dessas enzimas lignocelulolíticas, têm sido utilizados principalmente fungos filamentosos, entre os quais se destacam os dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* (PASSOS; PEREIRA; CASTRO, 2018; ROTH; HOELTZ; BENITEZ, 2020). Diante desse cenário, o presente estudo avaliou a produção de holocelulases, enzimas capazes de hidrolisar a fração polissacarídica da biomassa vegetal, por meio da dosagem das atividades de FPase, CMCase, endo- β -1,4-xilanase (endoxilanase), β -glicosidase e β -xilosidase. Para o processo de fermentação em estado sólido, utilizou-se bagaço de cana, levedura cervejeira residual e as novas linhagens fúngicas *Aspergillus niger* 5J, *Penicillium pedernalense* F4B1 e *Trichoderma asperellum* FEV.

1.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é um tipo de matéria-prima originária principalmente de resíduos da agricultura, silvicultura ou urbanos. Sendo assim, é um material de baixo custo, que tradicionalmente é utilizado para finalidades com retorno financeiro limitado, como produção de energia por combustão direta. No entanto, utilizar materiais lignocelulósicos para obtenção de produtos de alto valor agregado é possível e diversas rotas têm sido estudadas (DE BHOWMICK; SARMAH; SEN, 2018).

1.1.1 ESTRUTURA QUÍMICA DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

O material lignocelulósico presente na natureza tem diversas funções fisiológicas e estruturais, incluindo proteção e sustentação de células e tecidos

vegetais, de algas e alguns microrganismos. Assim, sua estrutura molecular consiste em um conjunto de polímeros que precisa ser resiliente contra ataques de outros organismos. Apesar disso, grande parte dessas cadeias é composta de açúcares e pode ser metabolizada até seus monômeros, com alto conteúdo energético. Isso as torna alvo de ataques de microrganismos e atrai interesse biotecnológico, uma vez que esses monômeros são fermentescíveis, podendo ser usados para obtenção de diversos produtos. (BONECHI et al., 2017).

As paredes celulares vegetais são formadas por material lignocelulósico, mais especificamente: polímeros de celulose, hemicelulose, pectina e lignina, organizados em um arranjo complexo (Figura 1-1). Essas moléculas constituem grande parte das massas dessas células e sua síntese representa um grande custo metabólico para as plantas. De fato, estima-se que dos cerca de 27000 genes de plantas do gênero *Arabidopsis*, aproximadamente 15% sejam necessários para biogênese e modificação da parede celular (ZHANG et al., 2021). A fração deste conjunto de polímeros constituída apenas pelos principais sacarídeos é chamada de holocelulose (i.e. celulose e hemicelulose).

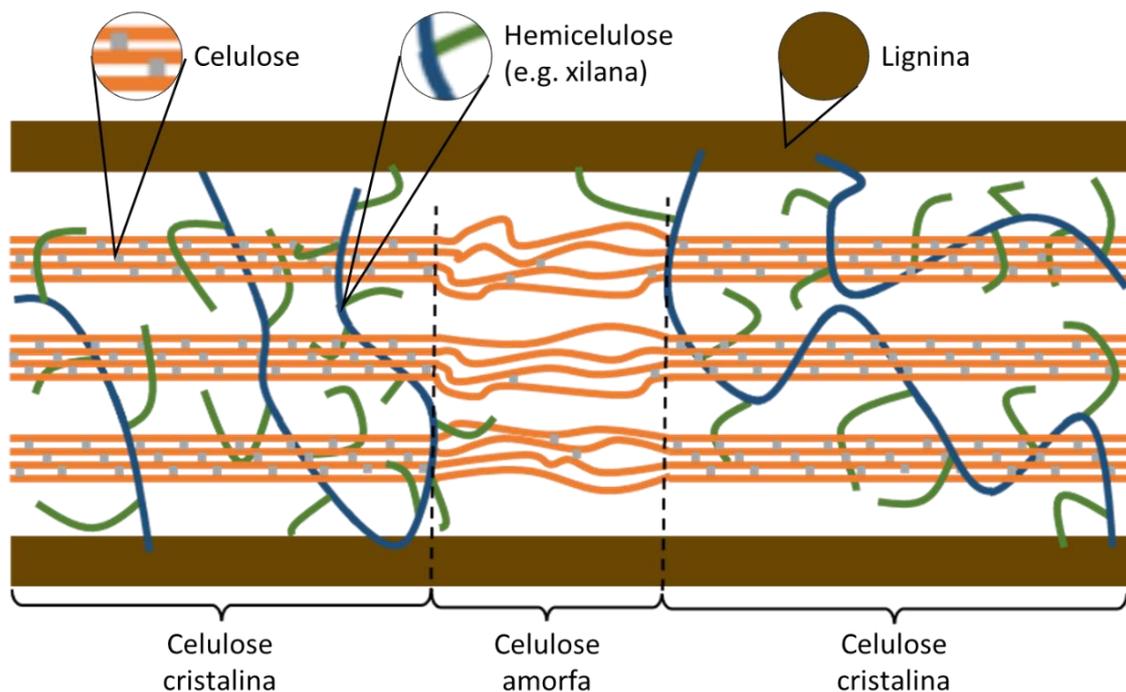


Figura 1-1: Estrutura química do material lignocelulósico. Em laranja estão representadas as fibrilas de celulose, com as ligações de hidrogênio representadas em cinza. Em azul estão representadas as cadeias de hemicelulose, com suas ramificações em verde. Em marrom está representada a lignina. Fonte: próprio autor.

1.1.1.1 Celulose

A celulose consiste em longas cadeias não ramificadas de glicose (10.000 a 50.000 unidades de glicose) associadas por ligações β -(1,4), formando fibrilas organizadas em múltiplas escalas. Esses polímeros constituem a maior parte da biomassa lignocelulósica e são as macromoléculas orgânicas mais abundantes da Terra (ALBERTS et al., 2015).

A configuração β favorece a formação de ligações de hidrogênio entre cadeias paralelas, o que permite a formação de microfibrilas longas e resistentes à tensão (BERG *et al.*, 2015). As microfibrilas são cadeias de celulose conectadas por ligações cruzadas formadas por glicanas. Escalando os níveis hierárquicos de organização, múltiplas microfibrilas se organizam em macrofibrilas e estas em fibras de celulose. O grau de interação entre as cadeias paralelas nas fibrilas determina a sua cristalinidade, ou seja, o quanto essas cadeias estão empacotadas. Normalmente, essas estruturas têm um arranjo periódico, alternando entre regiões cristalinas e amorfas (Figura 1-1) (BONECHI *et al.*, 2017).

1.1.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose compõe cerca de 20 a 30% da biomassa lignocelulósica (BONECHI *et al.*, 2017). É constituída por uma mistura de sacarídeos que inclui xilanas, mananas, β -glucanas e xiloglucanas. Essa fração complexa tem a função de aumentar a flexibilidade biomecânica na parede celular, especialmente na parede celular secundária (LI, 2021).

As xilanas são os polímeros mais abundantes na hemicelulose e consistem em cadeias de xilose unidas por ligações β -(1,4), com cadeias laterais curtas associadas às cadeias principais por ligações α -(1,2) (Figura 1-1). A composição e frequência dessas substituições varia, gerando uma diversidade de xilanas. Assim, as xilanas podem ser classificadas de acordo com as suas substituições: arabinoxilanas, com substituições compostas por arabinoses com cadeias laterais de o-feruloil arabinoses; glicuronoxilanas, com substituições constituídas de ácido glicurônico e ácido 4-o-metil-glucurônico; e glicuronoarabinoxilanas, que contêm substituintes de arabinoses e ácido glicurônico (LI, 2021).

Outros polímeros que constituem a hemicelulose incluem: mananas lineares, que são polímeros de β -1,4-manose; glicomananas, que consistem de cadeias lineares de manose e glicose com ligações β -(1,4); galactoglicomananas, semelhantes às anteriores, porém com cadeias laterais de galactose com ligações α -(1,6); galactomananas, que têm as mesmas cadeias laterais, porém com a cadeia linear central composta apenas por manose (ANDERSON; KIEBER, 2020).

O grupo das hemiceluloses contém também β -glicanas, que são cadeias lineares de glicose com 50-70% de ligações β -(1,4) e cerca de 30% β -(1,3). Além disso, xiloglicanas são outros polímeros encontrados na hemicelulose, os quais têm cadeias lineares de resíduos de glicose ligados entre si em conformação β -(1,4), com substituições laterais de xilana unidas por ligações α -(1,6). Esses substituintes podem ainda ter galactoses com ligações β -(1,2), as quais podem ser ligadas a fucoses através de ligações α -(1,2) (ANDERSON; KIEBER, 2020).

1.1.1.3 Lignina e Pectina

A pectina é composta por uma rede de polissacarídeos ricos em ácido galacturônico. Sua estrutura é altamente hidratada e constitui uma matriz que banha as fibrilas de celulose. Esse conjunto de moléculas está presente principalmente em células vegetais novas, em suas paredes celulares primárias, as quais são extensíveis. Já a lignina é constituída de compostos fenólicos ligados covalentemente, formando moléculas complexas de alta massa molecular. Ela está presente nas paredes celulares secundárias das plantas, as quais crescem por baixo das paredes primárias. Um conjunto de células lignificadas forma um tecido chamado esclerênquima, sendo a lignina fundamental para sua rigidez (ALBERTS *et al.*, 2015).

1.2 RESÍDUOS DA INDÚSTRIA SUCROALCOOLEIRA E CERVEJEIRA

O Brasil ocupa o primeiro lugar na produção mundial de cana-de-açúcar. O cultivo está associado à indústria sucroalcooleira e concentra-se principalmente na região sudeste, com protagonismo do estado de São Paulo, que produziu 383 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2023/24. No Rio de Janeiro, a produção de etanol é muito mais expressiva que a de açúcar

e nessa mesma safra, produziu-se 1,42 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e 82 mil m³ de álcool, apenas neste estado (CONAB-OBSERVATÓRIO AGRÍCOLA, 2024).

Em uma usina sucroalcoeira baseada em cana-de-açúcar típica, resumidamente este material passará por um processo de lavagem, seguido de moagem, onde o caldo será separado. Este líquido poderá sofrer um tratamento químico por sulfitação, seguido de ajuste pH com hidróxido de cálcio. Após isto, ocorre a clarificação para remoção de sólidos remanescentes, que consiste de floculação, sedimentação e filtração. Este líquido poderá ser evaporado, cozido, centrifugado, cristalizado e seco, para obtenção de melaço e/ou açúcar. Alternativamente, o líquido poderá ser aquecido e levado a um fermentador para produção de etanol. Na fermentação utiliza-se leveduras, que em geral têm um reciclo, usualmente agregado a uma lavagem com redução de pH por um ácido. O caldo após a fermentação passa por etapas de destilação para obtenção de álcool hidratado e/ou anidro (OLIVEIRA; VALDÉS SERRA; MAGALHÃES, 2013).

Decorre do processo descrito que os principais subprodutos são o bagaço de cana (juntamente com a palha de cana), obtido na moagem, e a vinhaça (ou vinhoto), subproduto de fundo da destilação. Depois destes, estão a torta de filtração, obtida na clarificação do caldo, além da levedura residual do processo fermentativo e outros, como a água residual da lavagem da cana e subprodutos da destilação mais voláteis que o álcool (RABELO; DA COSTA; VAZ ROSSEL, 2015).

1.2.1 BAGAÇO DE CANA

O bagaço de cana é uma biomassa lignocelulósica proveniente da indústria sucroalcoeira que pode ser utilizada como substrato ou matéria-prima em outros processos biotecnológicos, como a produção de etanol de segunda geração (2G) e uso como ração animal e adubo, ou mesmo na queima para cogeração de energia. Aproximadamente 157 milhões de toneladas de bagaço de cana foram produzidas no Brasil em 2022, cerca de 26% da massa total de cana-de-açúcar produzida nesse ano. Esse subproduto é empregado na produção de energia por meio da queima direta em caldeiras, sendo cerca de 36% para uso no próprio setor energético, 48% para a geração de energia em outros setores

da indústria e 16% excedentes para transformação em energia elétrica, parcela que sozinha constitui 4,7% da oferta interna de eletricidade do país (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2023).

Apesar de bem-sucedido, o uso do bagaço apenas para obtenção de energia apresenta limitações econômicas, principalmente por estar vulnerável a variações do preço da energia no Brasil, país que conta com matriz energética muito diversa. Além disso, perspectivas de aumento de demanda por etanol devido ao aumento da frota brasileira e da proporção de etanol anidro adicionado à gasolina (ELISEU NICULA DE CASTRO *et al.*, 2019) levam à necessidade de aumento de produtividade por hectare. Considerando isso, o etanol de segunda geração se viabiliza, de modo que a empresa Raízen inaugurou em 2024 a maior planta do mundo com esta finalidade, capaz de um ganho de até 50% em produtividade (RAÍZEN S.A., 2024).

Também têm se apresentado novas possibilidades para obtenção de produtos de maior valor agregado a partir do bagaço, de modo a maximizar a valorização do subproduto. Uma opção para isso consiste em processos que tiram proveito da estrutura molecular do material lignocelulósico para obtenção, por exemplo, de furfural e moléculas correlatas a partir de pentoses, na hemicelulose e diversas outras moléculas de alto valor agregado. Algumas dessas são produtos finais, commodities e outras são químicos plataforma, que servem de blocos de construção para materiais, compostos bioativos, combustíveis de alta performance e intermediários para outros produtos (BUDZIANOWSKI, 2017). Outra opção é a hidrólise do bagaço para uso em processos fermentativos, ou utilizá-lo diretamente como substrato em fermentações utilizando fungos, para obtenção de enzimas, ácidos orgânicos, metabólitos secundários bioativos, fragrâncias entre outros (CHILAKAMARRY *et al.*, 2022). Mais especificamente, já foi demonstrada a possibilidade de seu uso para a produção de enzimas lignocelulolíticas (ABDULLAH *et al.*, 2018; MORAN-AGUILAR *et al.*, 2021a).

1.2.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana: explosão a vapor

O bagaço de cana tem sido amplamente utilizado como subproduto para obtenção de etanol de segunda geração, podendo incluir outros produtos de valor agregado, como enzimas, açúcares e compostos aromáticos e

antioxidantes. Considerando apenas o etanol, esses processos podem ser divididos em três grandes blocos: pré-tratamento do bagaço; hidrólise (sacarificação) do bagaço pré-tratado; e fermentação alcoólica (VANDENBERGHE *et al.*, 2022).

O pré-tratamento é uma etapa muito importante para promover a modificação da estrutura da biomassa e/ou alteração da sua composição de modo a garantir uma conversão mais eficiente na etapa subsequente, de hidrólise enzimática. Para isso, podem ser usados métodos químicos, físicos, biológicos ou uma combinação desses métodos. Alguns exemplos de pré-tratamentos são a explosão a vapor, a pirólise, a explosão com CO₂ supercrítico, ozonólise, a AFEX (explosão da fibra com amônia), o pré-tratamento ácido, o pré-tratamento alcalino e a hidrólise biológica mediada por microrganismo (DE BHOWMICK; SARMAH; SEN, 2018).

A escolha do método depende do material lignocelulósico, dos produtos de interesse, dos tipos de processos subsequentes e de um balanço entre eficiência, custos e geração de subprodutos indesejados. Por exemplo, alguns pré-tratamentos, sobretudo os que ocorrem a altas temperaturas e pressões e baixos valores de pH, podem levar à formação de compostos considerados tóxicos ou inibidores de enzimas, como compostos fenólicos derivados da lignina, compostos furânicos derivados da degradação de pentoses (como furfural e 5-hidroximetilfurfural) e ácidos, o que não é o mais apropriado para processos que optam pela hidrólise enzimática da biomassa (ANTUNES *et al.*, 2019). O material lignocelulósico disponível também influenciará essa decisão. Por exemplo, a presença em alguns materiais de grupos ácidos, como ácido urônico e grupos acetil, permite a auto-hidrólise parcial da hemicelulose em oligossacarídeos por meio de um tratamento físico a altas temperaturas, devido à liberação desses ácidos para o meio com o aquecimento (FOCKINK; SÁNCHEZ; RAMOS, 2018). Assim, essa pode ser uma estratégia apropriada nesses casos.

Entre os pré-tratamentos citados, a explosão a vapor é um método físico-químico que consiste na exposição da biomassa a vapor saturado a até 200°C, sob alta pressão por alguns minutos, seguida de uma rápida descompressão. Durante esse processo acontece uma série de fenômenos que causam a desagregação da estrutura complexa da parede celular do vegetal. LANGAN *et*

al. (2014) estudaram esses fenômenos detidamente por meio da comparação entre análises cristalográficas (cristalografia de raios X e dispersão de nêutrons) e simulações por dinâmica molecular ao longo do pré-tratamento de lascas de madeira de álamo (*Populus tremuloides*) por explosão a vapor.

As primeiras mudanças de conformação são regidas pela tendência constante do sistema a minimizar a energia livre de Gibbs (G) total, que é definida pela equação $G \equiv H - TS$, em que H é a entalpia, T é a temperatura absoluta e S é a entropia (IRA N. LEVINE, 2012). Os resultados observados por LANGAN et al. (2014) indicaram que a associação de água às fibrilas de celulose é entropicamente desfavorável e só é mantida devido às ligações de hidrogênio entre essas moléculas, que diminuem o termo entálpico da energia livre de Gibbs. Então, inicialmente o aumento da temperatura faz com que o termo da entropia se torne mais importante para a G total, levando à liberação dessa água para a matriz circundante, que é mais rica em hemicelulose. Por consequência, as fibrilas de celulose se agregam mais, o que permanece mesmo após o retorno para a temperatura ambiente. Essa agregação pode causar o aumento da cristalinidade da celulose, sendo um efeito negativo desse tipo de pré-tratamento.

Em segundo lugar, a presença de grupamentos ácidos, como grupos acetil, leva à auto-hidrólise da hemicelulose, o que reduz sua proporção na estrutura. Enquanto isso, a lignina associada à hemicelulose diminui essa interação e passa a se colapsar em glóbulos. A hemicelulose desassociada da lignina passa então a se associar à água, e suas cadeias se estendem, aumentando de comprimento (extrusão). Por isso, a parede celular vegetal aumenta de tamanho (incha), com mais água em sua estrutura, e os glóbulos de lignina se afastam mais entre si. Apesar de mais afastados, os polímeros da lignina e hemicelulose permanecem conectados, por meio de ligações covalentes existentes entre essas moléculas. Em tratamentos com ácido diluído ou em bagaços com maior abundância de substituintes ácidos na hemicelulose, até mesmo essas ligações podem ser quebradas, liberando os glóbulos de lignina (LANGAN *et al.*, 2014). Além disso, a despressurização rápida do vapor saturado leva à vaporização e expansão rápida da água contida nas paredes celulares, o que contribui ainda mais com a desestruturação do material (FOCKINK; SÁNCHEZ; RAMOS, 2018).

1.2.1.2 Composição do bagaço de cana

Alguns trabalhos avaliaram as composições de amostras de bagaço de cana *in natura* (I.n.) e após pré-tratamento por explosão a vapor (E.v.). Alguns dos resultados podem ser observados na tabela a seguir, na qual são omitidos os teores de cinzas e outros componentes (Tabela 1-1).

Tabela 1-1: Composições do bagaço de cana *in natura* (I.n.) e pré-tratado por explosão a vapor (E.v.). **Celulose: soma de glicanas, e anidrohexases não identificadas. *Hemicelulose: soma de xilanas, grupos acetil, arabinana e anidropentoses não identificadas. ***Lignina: soma de lignina solúvel e insolúvel em ácido. Condições do pré-tratamento por explosão a vapor (sem ácido): (1) 205°C, 7,5min; (2) 15bar, 8min; (3) 195°C, 7,5min; (4) 16,67bar, 8min. “ALD”: abaixo do limite de detecção do método. Fonte: próprio autor.

Composição (%)	FOCKINK; SÁNCHEZ; RAMOS (2018)		ESPÍRITO SANTO et al. (2019)		PITARELO et al. (2016)		ANDRADE et al. (2017)	
	I.n.	E.v. ⁽¹⁾	I.n.	E.v. ⁽²⁾	I.n.	E.v. ⁽³⁾	I.n.	E.v. ⁽⁴⁾
Celulose**	32,2	50,2	40,1	53,1	38	47,4	39,4 a 40,6	50,6 a 58,3
Hemicelulose*	18,9	3,2	27,2	8,2	25,7	ALD	21,9 a 28,1	8,1 a 13,5
Lignina***	29,5	34,9	23,6	29	20,8	33,5	19,6 a 22,7	28,2 a 31,6

Conforme descrito anteriormente, o pré-tratamento causa a diminuição da porcentagem de hemicelulose, que nesses trabalhos varia de valores entre 18,9 e 28,1% no bagaço *in natura* para 13,5 a 3,2% no bagaço pré-tratado. Já proporção de celulose aumenta de 32,2 a 40,6% no bagaço *in natura* para 47,4 a 58,3% após o pré-tratamento. A proporção de lignina também apresenta aumento em todos os casos, indo de 19,6 a 29,5% no bagaço *in natura* para 28,2 a 34,9% no bagaço pré-tratado. Esses aumentos se devem à solubilização e remoção grande parte da hemicelulose, o que eleva as proporções dos outros componentes. Além disso, o aumento da proporção de lignina condiz com o mecanismo descrito por LANGAN, et.al. (2014), no qual esse polímero se condensa em glóbulos, mas não se torna solúvel nem se desassocia da estrutura polimérica, então não é removido.

Como descrito na seção 1.1.1.2, a hemicelulose é um conjunto complexo de polímeros e sua exata composição varia de acordo com o material lignocelulósico. Por exemplo, em madeiras, a hemicelulose mais abundante é a xilana e, entre os tipos de xilana, o mais comum nesse material é a xilana linear, constituída somente de resíduos de D-xilose, 70% da qual é acetilada (BONECHI *et al.*, 2017). Já no bagaço de cana, a maior parte da hemicelulose é formada pela glucurono-arabinoxilana, constituída de uma principal de β -1,4-xilose com substituintes nas posições C3 e C4 que incluem resíduos arabinose, ácido urônico e grupos acetil. Entre estes, a pentose arabinose é o substituinte mais comum e se liga à cadeia principal por ligações α -1,2 e α -1,3. Substituintes de galactose também já foram encontrados em pequenas quantidades, ligados à cadeia principal de xilana por ligações β -1,5 (KHALEGHIPOUR *et al.*, 2021). Além disso, conforme descrito na seção 1.2.1.1, a presença dos grupos ácido urônico e, principalmente, de acetilações permite a auto-hidrólise ácida das cadeias de hemicelulose e celulose.

1.2.2 EXTRATO DE LEVEDURA

Além da indústria sucroalcooleira, há também produção de grandes quantidades de levedura residual por cervejarias. A produção de cerveja no Brasil no ano de, 2023, foi mais de 15,4 bilhões de litros, sendo 8,2 bilhões apenas na região sudeste. O estado do Rio de Janeiro tem 129 cervejarias, 7% do número total do país (MARCUSO *et al.*, 2024). Com uma grande produção de cerveja, também há como consequência uma grande quantidade de subprodutos gerados, destacando-se (i) o bagaço de malte, que é o resíduo da etapa de brassagem, com esgotamento do malte moído; (ii) o *trub* quente, constituído por proteínas coaguladas na cocção da cerveja e outros compostos insolúveis; (iii) e a levedura residual, descartada devido à perda da capacidade metabólica após a multiplicações sucessivas durante a fermentação alcohólica e ao número limitado de ciclos de reuso nas bateladas de produção de cerveja, ação essa necessária para garantir a qualidade da bebida. Estima-se a produção de 1,5 a 3Kg de levedura residual, com 85 a 90% de umidade, a cada 100 litros de cerveja (MATHIAS; DE MELLO; SERVULO, 2014). Ou seja, o Brasil produz cerca de 230 a 460 mil toneladas de levedura cervejeira residual.

Essa levedura residual pode ter vários usos, entre eles como nutriente em processos fermentativos, após passar por processo de hidrólise catalisada ou por autólise. Nesses casos, ela serve principalmente como fonte de nitrogênio e também fornece vários micronutrientes (JIANG *et al.*, 2010). Além disso, DHAKAR *et al.* (2015) observaram o aumento da produção de ligninases, em especial de lacases, com a adição de extrato de levedura em processo utilizando uma cepa de *Aspergillus niger* tolerante a pH ácido. Semelhantemente, GONZÁLEZ-BAUTISTA *et al.* (2020) observaram aumento da produção de lacases e degradação de compostos fenólicos em bagaço de cana suplementado com extrato de lêvedo, usando o basidiomiceto *Pycnoporus sanguineus*. Apesar de esses trabalhos não indicarem o mecanismo pelo qual esse aumento ocorre, ele pode se dever ao aumento da biomassa pelo fornecimento de nutrientes, incluindo nitrogênio, como observado por MIKIASHVILI *et al.* (2006). Assim, esses indícios de que o extrato de levedura age como potenciador da produção de ligninases mostram que essa suplementação também pode facilitar o acesso do microrganismo a celulose e hemicelulose, aumentando indiretamente a produção das celulases e xilanases.

1.3 ENZIMAS HOLOCELULOLÍTICAS

Holocelulose é a fração da lignocelulose composta de polissacarídeos insolúveis, que compreendem a celulose e hemicelulose. Assim, as holocelulases incluem principalmente as celulases e xilanases, enzimas com alto potencial de aplicação em vários setores industriais por sua capacidade de hidrolisar, respectivamente, a celulose e a hemicelulose mais abundante, que é a xilana (SINGHANIA *et al.*, 2021).

1.3.1 CELULASES

Celulases são hidrolases capazes de quebrar ligações β -1,4 entre resíduos (monômeros) de glicose. Dependendo da região das microfibrilas de celulose em que atuam, elas podem ser endo- β -1,4-D-glicanases (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-D-glicanases (EC 3.2.1.91), também chamadas celobiohidrolases, e β -D-glicosidases (EC 3.2.1.21), ou celobiasas (THAPA, S. *et al.*, 2020).

Essas enzimas atuam de forma sinérgica (Figura 1-2) para degradação da celulose. De modo geral, as endoglicanases atuam primeiro nas regiões mais

amorfas (menos cristalinas) das fibrilas de celulose, liberando oligossacarídeos de diferentes tamanhos e expondo extremidades das cadeias glicosídicas. Por sua vez, essas extremidades sofrem ação das exoglicanases, que na realidade são enzimas diferentes e específicas para a extremidade não redutora (CBH I) e redutora (CBH II). Por fim, a β -glicosidase atuam nos dissacarídeos liberados pela exoglicanase, chamados celobiose (MAFA; PLETSCHE, 2021).

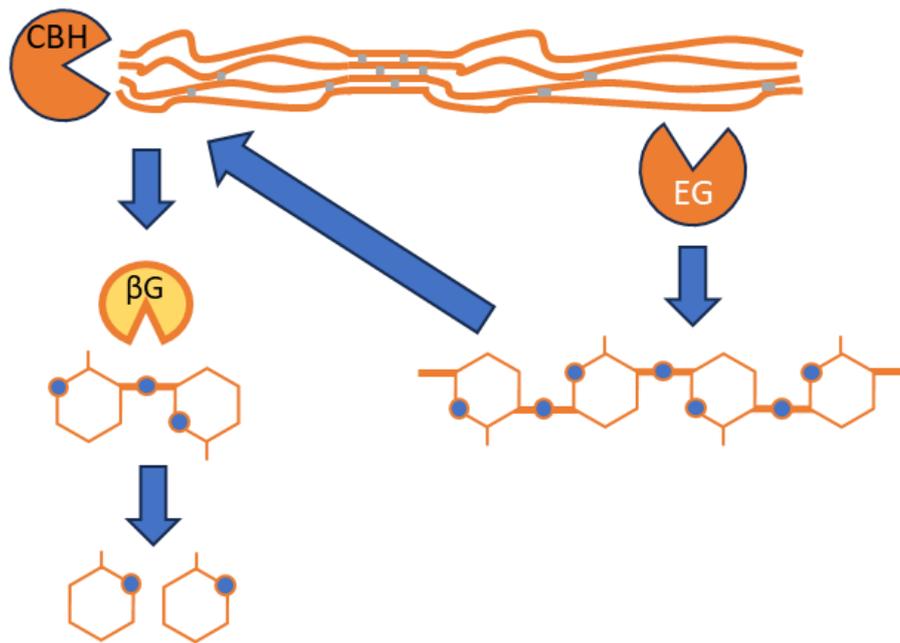


Figura 1-2: Representação esquemática da ação sinérgica das celulasas. CBH: celobiohidrolase (ou $\text{exo-}\beta$ -1,4-glicanase). EG: endoglicanase (ou $\text{endo-}\beta$ -1,4-glicanase). β G: β -glicosidase. Fonte: próprio autor.

1.3.2 XILANASES

As enzimas capazes de hidrolisar a xilana são a $\text{endo-}\beta$ -1,4-D-xilanase (endoxilanase - EC 3.2.1.8), β -xilosidase (EC 3.2.1.37) e uma série de enzimas desramificadoras, como a α -L-arabino-furanosidase (EC 3.2.1.55), α -D-glicuronidase (EC 3.2.1.139), acetilxilana esterase (EC 3.1.1.72), esterase de ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) e esterase de ácido p-coumárico (EC 3.1.1. B10). Assim como as celulasas, essas enzimas atuam de forma sinérgica entre si e com as próprias celulasas (Figura 1-3). A endoxilanase quebra as cadeias principais de β -1,4-xilana. Enquanto isso, as enzimas desramificadoras, como a arabinofuranosidase, atacam diferentes ramificações, facilitando ainda mais a ação da endoxilanase. Por fim, a β -xilanosidase atuam quebrando as ligações β -1,4 dos xilo-oligossacarídios (THAPA, S. et al., 2020).

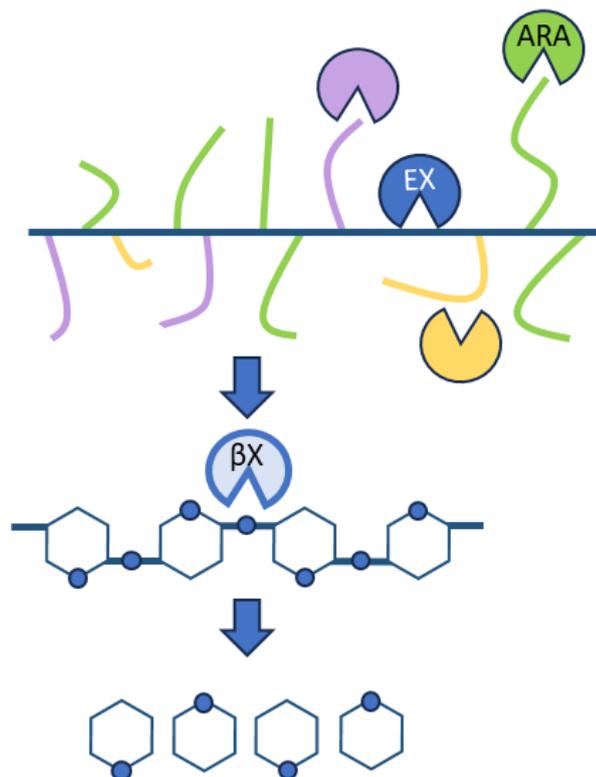


Figura 1-3: Representação esquemática da ação sinérgica das xilanases totais. EX: endo- β -1,4-xilanase. ARA: arabinofuranosidase. β X: β -xilosidase. Em roxo e amarelo: representação de outros tipos de ramificações e suas respectivas enzimas desramificadoras. Fonte: próprio autor.

1.3.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para avaliação de um processo de produção de enzimas, estas podem ser quantificadas em termos de sua atividade, isto é, a quantidade de solução contendo enzimas necessária para converter uma quantidade de substrato por unidade de tempo em determinadas condições previamente padronizadas (LABUDA *et al.*, 2018).

A atividade de uma enzima varia de acordo com o estado espacial e químico dessa proteína. Isto porque enzimas aceleram reações com alta especificidade devido ao modelo do ajuste induzido, o que depende da estrutura tridimensional e química do sítio catalítico. Este sítio assume diferentes conformações ao interagir com os substratos e intermediários da reação, reduzindo a energia de ativação para a transição de substrato a produto. Após a formação da estrutura transitória, o sítio catalítico libera os produtos. Todos esses eventos podem ser prejudicados caso o sítio catalítico não possa assumir suas conformações de forma estável (NELSON; COX, 2014).

A conformação enzimática é estável quando sua energia livre de Gibbs é minimizada, ainda que seja um mínimo local. Isto é obtido por uma ação conjunta de ligações covalentes e interações não covalentes. As ligações covalentes ocorrem entre aminoácidos cisteína (pontes dissulfeto). Já as não covalentes ocorrem entre aminoácidos ou com moléculas do solvente para minimização da entropia, sendo divididas em hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas. A desestabilização completa dessas interações e perda da estrutura tridimensional da enzima é chamada desnaturação. Este processo pode ou não ser reversível. Além da possibilidade de desnaturação, a conformação espacial e química dos sítios catalíticos pode ser alterada de forma sutil, afetando a catálise (NELSON; COX, 2014).

Dessa forma, a conformação das enzimas e, conseqüentemente, a atividade enzimática pode ser afetada por fatores como temperatura, polaridade, força iônica, ionização dos aminoácidos em função do pH e presença de substâncias capazes de reduzir pontes dissulfeto. Assim, existem valores ótimos desses parâmetros para maximização da atividade enzimática (LIMA *et al.*, 2001). Quanto ao parâmetro temperatura, existe um fenômeno além do conformacional para explicar o ponto ótimo: o aumento dessa variável leva ao aumento das colisões e velocidade de reação, segundo a lei de Arrhenius (FOGLER *et al.*, 2016), o que é limitado pela temperatura na qual ocorre a desnaturação.

Outras variáveis que podem mudar a atividade são a presença de outros ligantes além dos substratos. Um tipo de ligante são os moduladores alostéricos, moléculas que se ligam em um sítio diferente do sítio catalítico e provocam alterações nesse. Um modulador pode ser uma molécula diferente do substrato ou o próprio substrato e pode ativar ou inibir a atividade enzimática. Inibidores são ligantes que reduzem a velocidade de reação reversivelmente. Já os inativadores são ligantes que reduzem a velocidade de reação irreversivelmente. Em processos reais, a presença de inibidores pode ter efeitos significativos na cinética e rendimento das reações. Eles podem ser impurezas vindas de etapas anteriores, como compostos fenólicos do pré-tratamento do bagaço de cana (ANTUNES *et al.*, 2019), o próprio substrato ou o produto de uma enzima, como a celobiose, que pode inibir $\text{exo-}\beta\text{-1,4-glicanases}$ (GHAZALI *et al.*, 2019).

Além desses ligantes, existem os cofatores, que podem ser íons inorgânicos (Zn^{2+} , Mg^{2+} , etc), necessários em sítios catalíticos para facilitar interações iônicas ou transferências de elétrons, ou pequenas moléculas orgânicas chamadas coenzimas. Estas podem ser dissociáveis ou firmemente ligadas às enzimas, chamadas grupos prostéticos (BERG *et al.*, 2015).

1.3.4 SÍNTESE ENZIMÁTICA E EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS

Enxofre e nitrogênio são átomos necessários para a síntese dos aminoácidos que compõem as enzimas, além de carbono. Uma fonte de enxofre bastante usada é o íon sulfato. O enxofre contido no sulfato inorgânico é absorvido e passa pela via de assimilação de sulfato, onde é reduzido a sulfito (MENDOZA-CÓZATL *et al.*, 2005). Esse pode ser incorporado a moléculas orgânicas, em particular os aminoácidos cisteína e metionina, além das outras moléculas fundamentais como a coenzima A e centros de ferro-enxofre (ALBERTS *et al.*, 2015).

Exceto para os microrganismos fixadores de nitrogênio, esse elemento precisa ser assimilado na forma de amônia, nitrato ou associado a moléculas como aminoácidos, ácidos nucleicos, ureia e metilaminas. Após isso, o nitrogênio entra nas vias de biossíntese de aminoácidos por meio do glutamato ou glutamina. Estas vias derivam da via glicolítica, ciclo do ácido cítrico e da via das pentoses-fosfato (NELSON; COX, 2014). Ao longo dessa rede complexa de reações de biossíntese, o nitrogênio pode ser intercambiado entre diferentes moléculas, com custos energéticos variados, para obtenção final de um conjunto adequado de aminoácidos para produção das proteínas necessárias (LJUNGDAHL; DAIGNAN-FORNIER, 2012).

Além dos constituintes básicos das proteínas, outras moléculas precisam estar presentes para o funcionamento correto das vias metabólicas que levam à sua produção e para o crescimento da biomassa de fungos que irá produzi-las. São necessárias fontes de fósforo, potássio, sódio, cálcio e micronutrientes, como ferro, zinco, cobre, manganês, magnésio e cobalto. Também podem ser necessários fatores de crescimento, como alguns aminoácidos específicos, cofatores e vitaminas, como biotina e riboflavina. Todas essas exigências variam de acordo com o microrganismo utilizado e com os produtos de interesse (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Além das exigências tróficas, a presença de algumas substâncias ou condições estressoras pode induzir o aumento da expressão de alguns metabólitos, entre eles enzimas lignocelulolíticas. Por exemplo, a interação interespecífica entre fungos em um consórcio microbiano pode causar o aumento da produção de vários metabólitos secundários, entre eles enzimas lignocelulolíticas (BODDY; HISCOX, 2016; IJOMA; SELVARAJAN; TEKERE, 2019). A produção de lignocelulases também pode ser estimulada pela adição de surfactantes (FANG et al., 2013) ou pela presença de biosurfactantes, como rhamnolipídios (LIU et al., 2006) e soforolipídios (LO; JU, 2009).

Além disso, a produção de lignocelulases pode ser induzida pela presença dos substratos dessas enzimas. A produção de celulases, por exemplo, é induzida em *Trichoderma reesei* pela soforose intracelular, produzida a partir de celulose e seus oligossacarídeos em uma sequência de etapas que envolvem sua quebra em dissacarídeos, transporte destes para o interior da célula e transglicosilação a soforose. Ainda outra via de indução ocorre a partir da presença de lactose (YAN; XU; YU, 2021). A partir do conhecimento desses mecanismos, há o estudo de moléculas específicas para aumento da expressão dessas enzimas, como a soforose, lactose, celobiose, manobiose e moléculas derivadas destas (HUANG; WAGES, 2016; MA et al., 2024). Também devido a esses mecanismos de indução, todos os estudos encontrados na literatura para produção de enzimas lignocelulolíticas e citados no presente trabalho utilizam algum tipo de biomassa lignocelulósica ou produto derivado desse tipo de material para a indução da expressão das enzimas (KAUR et al., 2020; MA et al., 2024). Um exemplo é o próprio bagaço de cana, que serve não só como fonte de carbono, mas também como indutor de expressão lignocelulases.

1.3.5 APLICAÇÕES E MERCADO DE HOLOCELULASES

Celulases e hemicelulases têm aplicações em diversos setores industriais. Celulases podem ser adicionadas a sabões para rejuvenescimento de tecidos de algodão e usadas na indústria têxtil com função semelhante no condicionamento de fibras ou de forma mais intensa para abrasão de jeans. Na indústria de papel e celulose, podem modificar fibras, acelerar a descoloração e a drenagem da celulose. Na indústria de alimentos, celulases e hemicelulases auxiliam no condicionamento de massas, redução da viscosidade ou presença

de precipitados em bebidas, aumento do teor alcoólico ou de aromas, auxílio na extração de óleo de oliva, carotenóides, compostos fenólicos, entre outras aplicações. Há aplicação também na pecuária, onde podem ser adicionadas a grãos para alimentação animal (EJAZ; SOHAIL; GHANEMI, 2021; NOVOZYMES A/S, 2013; SINGHANIA et al., 2021).

Além destas, uma aplicação com interesse crescente é para produção de etanol de segunda geração. Nesses processos, pode-se utilizar holocelulases para a hidrólise da fração sacarídica de materiais lignocelulósicos, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar. Dessa forma, obtém-se monômeros fermentescíveis que podem ser transformados em outros compostos, como o bioetanol. O uso de biocombustíveis como esse pode ser uma estratégia importante para a transição da matriz fóssil para a renovável, com redução gradual das emissões de carbono (IPCC, 2023; CHUM et al., 2011).

Existe hoje um conjunto de empresas que fornecem celulasas específicas para conversão de biomassas, como a Novozymes, Genencode, Dupont, DSM e Dyadic (VAISHNAV et al., 2018). Em um processo de produção de etanol de segunda geração que utiliza hidrólise enzimática do material lignocelulósico, esses catalisadores têm sido a matéria-prima mais cara. Neste quadro, é importante observar a falta de produção nacional de holocelulasas, o que aumenta os custos do processo devido à necessidade de importação (DE OLIVEIRA RODRIGUES et al., 2020).

1.3.6 PRODUÇÃO DE HOLOCELULASES E O CONCEITO DE BIORREFINARIAS

Biorrefinarias são plantas industriais análogas a refinarias de petróleo, porém baseadas em biomassa. Ou seja, são unidades onde matérias-primas de origem sustentável e não fóssil são processadas para obtenção de bioenergia, biocombustíveis e uma série de produtos comercializáveis de base biológica (JONG et al., 2011; VANDENBERGHE et al., 2022).

Neste conceito, uma usina de cana-de-açúcar se tornaria uma planta com uma diversidade de unidades, para valorização máxima da biomassa. Em primeiro lugar, existe a possibilidade de uso de parte do bagaço de cana para produção de etanol de segunda geração, em contraste com o uso apenas para coprocessamento e produção de energia elétrica. LEAL; WALTER; SEABRA

(2013) fizeram, ainda na década passada, uma avaliação econômica que comparou essas opções e demonstrou que o etanol de segunda geração já era promissor. Ao longo dessa década, houve avanços tecnológicos e instalação de novas plantas que empregam essa tecnologia de forma a validar a viabilidade econômica desses empreendimentos. Além disso, existem vários bioprodutos com alto nível de maturidade tecnológica (*i.e.*, TRL 8) que já podem ser produzidos paralelamente em biorrefinarias de base sucroalcooleira (ROSALES-CALDERON; ARANTES, 2019). Essas alternativas podem robustecer a viabilidade econômica frente a pressões e riscos econômicos, como flutuações do preço do petróleo.

Com essa mesma finalidade, diferentes caminhos tecnológicos têm se apresentado para maior integração dos processos. Existe a possibilidade de produção de enzimas *on-site* (no próprio local), utilizando o próprio material lignocelulósico, o que apresenta vantagens sobre a produção *off-site* (fora do local). Uma vantagem dessa abordagem é que enzimas produzidas no local, podem ser mais eficientes para a sacarificação do mesmo substrato, uma vez que as isoformas de celulasas expressas são otimizadas para esse substrato. Além disso, essa estratégia reduz custos do processo como um todo, já que o substrato é barato, disponível e são necessárias menos etapas de purificação do extrato enzimático, assim como armazenamento e transporte (CARPIO et al., 2022; SIQUEIRA et al., 2020).

Integrações ainda mais profundas são os processos em etapa única, nos quais a hidrólise do material lignocelulósico e a fermentação acontecem em uma só operação por meio da ação conjunta de enzimas e leveduras no substrato. A empresa estadunidense Poet anunciou em 2017 a inauguração de um sistema chamado “Project LIBERTY”, no qual as enzimas são produzidas *on-site* e levadas diretamente para a fermentação, para a sacarificação da biomassa e produção de bio-etanol de forma integrada (POET-DSM, 2017). Alternativamente, existem estudos de processos consolidados, que utilizariam microrganismos modificados ou consórcios microbianos capazes de produzir etanol e também lignocelulasas (LIU et al., 2018).

1.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ENZIMAS HOLOCELULOLÍTIICAS

No mundo há pelo menos 157.497 espécies de fungos documentadas (KIRK, 2024; CUNNINGHAM *et al.*, 2024; HYDE, 2022). No Brasil, há pelo menos 8223 espécies de fungos documentadas (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2024). No ano de 2015, um levantamento dessa biodiversidade (MAIA *et al.*, 2015) apontou que a quantidade de fungos identificados depende da disponibilidade de especialistas em diferentes grupos (*i.e.* filos) e em diferentes regiões. Por exemplo, há mais especialistas em basidiomicetos do que em ascomicetos, de forma que estes poderiam estar sub-representados. Quanto às regiões, o levantamento apontou que no Sudeste há muitos especialistas e muitas novas espécies documentadas, enquanto em estados como Tocantins, os dados são quase não existentes. Ou seja, devido às dimensões do Brasil, limitações tecnológicas e de pessoal, a amostra de fungos conhecidos ainda não era representativa o suficiente. Dessa forma, segundo os autores, ainda teríamos um longo caminho a percorrer até termos boas estimativas sobre a real biodiversidade fúngica no país.

Assim sendo, é possível afirmar que se trata de uma grande biodiversidade, constituindo um potencial biotecnológico a ser explorado, para possível produção de diversos metabólitos de interesse (HYDE *et al.*, 2019). Soma-se a isso o fato de que o Brasil ainda depende da importação de muitos produtos biotecnológicos, como enzimas, que poderiam ser desenvolvidas e produzidas no país (DE OLIVEIRA RODRIGUES *et al.*, 2020). Assim, o acúmulo de conhecimentos e inovações biotecnológicas utilizando o patrimônio genético nacional são condições necessárias, apesar de não suficientes, para que se estabeleça um novo modelo de desenvolvimento agro-bio-industrial.

Nesse contexto, é possível encontrar enzimas capazes de fragmentar as frações polissacarídicas de materiais lignocelulósicos em diversos lugares da natureza, como em insetos, nas microbiotas de animais ruminantes, no solo, no mar e em ambientes extremos, com temperaturas, pH ou salinidades incomuns e hostis para a maioria das enzimas, exceto as adaptadas a esses ambientes. Essas enzimas são produzidas principalmente por microrganismos e muitos deles apresentam grandes possibilidades de aplicações no campo da

biotecnologia industrial (THAPA, S. et al., 2020). Para essas aplicações reais, utiliza-se principalmente fungos filamentosos, que produzem as enzimas com diferentes eficiências, porém, o estudo de novas linhagens continua sendo necessário (ELEGBEDE; LATEEF, 2018). Fungos produtores de holocelulases

A maior parte das grandes empresas que produzem celulases utilizam fungos do gênero *Trichoderma*, exceto pela Rovabio, produzida pela Adisseo (França) a partir de *Penicillium funiculosum* (VAISHNAV et al., 2018). Já entre os gêneros de fungos mais pesquisados para esta finalidade, o primeiro colocado é o *Trichoderma*, seguido do *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus* (PASSOS; PEREIRA; CASTRO, 2018).

A produção de xilanases pode ser observada em uma variedade de fungos e bactérias, como fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Chytridiomyces*, e as bactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Fibrobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*. Contudo, a maioria das preparações comerciais contendo xilanases, utilizadas em escala industrial ou laboratorial, é de origem fúngica, sendo a produção conduzida por linhagens de *Trichoderma* ou *Aspergillus* geneticamente modificadas (ROTH; HOELTZ; BENITEZ, 2020).

Embora diferentes espécies do gênero *Trichoderma* sejam amplamente utilizadas e consideradas excelentes produtores de celulases, o coquetel enzimático obtido a partir desses fungos pode apresentar deficiência na atividade de β -glicosidase. Portanto, é necessário suplementar esse coquetel com enzimas provenientes de outras fontes, como, por exemplo, o extrato enzimático de *Aspergillus niger*. (GHAZALI et al., 2019). Enquanto isso, pesquisas indicam que linhagens de fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* podem ser substitutas promissoras para *Trichoderma*. Isso se deve ao fato de que esses fungos produzem um conjunto de celulases com uma melhor proporção de atividades de exoglucanase e β -glicosidase, além de serem capazes de produzir essas enzimas em altas quantidades (VAISHNAV et al., 2018).

1.4.1 PRODUÇÃO DE HOLOCELULASES POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Fermentação em estado sólido (FES) é um processo em que microrganismos se desenvolvem em um material particulado sólido, entre o qual há espaços preenchidos com fase gasosa, com ausência de água livre (MANAN; WEBB, 2017). Portanto, o processo difere-se da fermentação submersa, uma vez que nessa a fase gasosa não está presente, a não ser em bolhas resultantes de aeração forçada, e o meio consiste de uma suspensão somada ou não a um material particulado, o qual, se presente, está envolto apenas por líquido.

Se comparado à fermentação submersa, esse tipo de processo utiliza com maior facilidade resíduos sólidos pouco solúveis e apresenta melhor adaptação dos fungos filamentosos, baixo custo operacional, menor consumo de energia com agitação e esterilização do meio, menor risco de contaminação, obtenção de produto em concentração mais alta e com menor consumo de água, o que reduz os custos dos processos *downstream* (MORÁN-AGUILAR et al., 2021). Já a fermentação submersa tem água como principal componente. O meio reacional é continuamente agitado e todo o volume de água precisa ser esterilizado, o que representa um custo maior de energia. No entanto, ainda é o método mais usual devido à maior facilidade de controle e automação, maiores taxas de transferência de massa e calor, maior produtividade e grau de desenvolvimento tecnológico (PASSOS; PEREIRA; CASTRO, 2018). Atualmente, cerca de 80% da produção mundial de hemicelulases é feita por fermentação submersa, mas novas pesquisas podem mudar este número (ROTH; HOELTZ; BENITEZ, 2020).

Entre as variáveis de processo que influenciam a obtenção de enzimas por FES estão o pH, umidade, temperatura, agitação e aeração forçada. Durante o processo, o seio do fermentador pode alcançar altas temperaturas, o que é difícil de ser controlado. A agitação pode auxiliar na remoção desse calor, controle da quantidade de oxigênio e outras variáveis do processo. No entanto, com aumento da agitação, a morfologia do micélio pode ser alterada ou danificada (SINGH et al., 2021). Essa e outras dificuldades de controle no processo têm sido endereçadas com diferentes designs de biorreator. Além do reator mais simples de bandeja, existem os de leito fixo, leito agitado, leito fluidizado, tambor rotativo, tambor de balanço e tambor agitado (MANAN; WEBB, 2017).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de holocelulases por fermentação em estado sólido (FES), usando bagaço de cana da indústria sucroalcooleira, levedura residual de indústria cervejeira e as linhagens de fungo *Aspergillus niger* 5J, *Trichoderma asperellum* FEV e *Penicillium pedernalense* F4B1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do choque ácido e do tempo de incubação na eficiência de obtenção de extrato de levedura cervejeira por autólise, considerando como critérios a quantidade extraída, em termos de proteínas e massa seca.
- Realizar a triagem de fungos produtores de holocelulases por meio de avaliação do seu crescimento em meios contendo material lignocelulósico como fonte de carbono.
- Selecionar, entre o bagaço de cana tratado por explosão a vapor e bagaço *in natura*, qual substrato proporciona as maiores atividades enzimáticas das holocelulases FPase, CMCase, β -glicosidase e endoxilase, considerando diferentes espécies de Ascomycota por FES.
- Verificar a influência dos parâmetros concentração de extrato de levedura, nitrogênio inorgânico e concentração inicial de conídios através de um planejamento fatorial, com o objetivo de maximizar, dentro de um domínio de estudo pré-definido, as produtividades de holocelulases.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE EXTRATO DE LEVEDURA

Para obtenção do extrato de levedura, inicialmente o método foi padronizado, testando diferentes condições. Após isso, foi produzido o extrato a partir de todo o volume de levedura disponível.

3.1.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DA LEVEDURA CERVEJEIRA

A levedura cervejeira usada, da espécie *Saccharomyces pastorianus*, foi coletada em frasco previamente esterilizado com auxílio do mestre cervejeiro diretamente do fermentador da cerveja tipo pilsen, aquela produzida em mais larga escala pela Cervejaria Noi, em São Francisco, Niterói. A suspensão foi separada do mosto por centrifugação a 3.000rpm por 10min, lavada com água deionizada estéril, centrifugada novamente com os mesmos parâmetros e armazenada a 4°C por até 2 meses.

3.1.2 AUTÓLISE DE LEVEDURAS: AVALIAÇÃO DO CHOQUE ÁCIDO E TEMPO DE INCUBAÇÃO

O procedimento de autólise foi adaptado de (AVRAMIA; AMARIEI, 2022), usando os parâmetros otimizados por (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021): concentração de leveduras secas, condições de incubação e tratamento com choque ácido.

A suspensão de leveduras foi lavada mais uma vez com água destilada estéril (3.000rpm, 10min) e foi feita uma medida de massa seca em triplicata. Para isso, adicionou-se alíquotas de 1mL da suspensão a cápsulas previamente secas e pesadas, as quais foram colocadas em estufa a 80°C por 24h. O restante da suspensão foi armazenado sob refrigeração (4°C) durante este período. Considerando a concentração em massa seca verificada antes da diluição (CSAD), foi feita uma diluição da suspensão para que chegasse a 7,5% em massa de leveduras secas por volume, (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021). Foi feita mais uma medida de massa seca para verificar a concentração exata da nova suspensão obtida depois da diluição (CSDD).

Em seguida foram iniciadas autólises, com amostras de sacrifício em duplicata para o tempo de 0 h e triplicata para 24, 45 e 69 horas. Além disso,

comparou-se as autólises com e sem tratamento por choque ácido, totalizando 22 amostras. Para isso, transferiu-se 6,6,2mL da suspensão diluída (7,5% de leveduras secas), preparadas no dia, para tubos de ensaio 15x150mm com tampas vedadas. Para as amostras que receberam choque ácido, adicionou-se ácido sulfúrico concentrado para a concentração final de 10 μ L por grama de células secas, considerando CSAD.

Após isso, foi retirada uma amostra correspondente ao tempo 0h e as demais foram incubadas a 59°C e 120rpm com os tubos deitados. As amostras obtidas em cada tempo foram centrifugadas a 3.000rpm, 10min e retirou-se cuidadosamente 1mL do sobrenadante. Tanto o sobrenadante quanto o precipitado foram armazenados a -20°C.

3.1.3 AUTÓLISE DE LEVEDURA: PREPARO DE EXTRATO DE LEVEDURA PARA USO NAS FERMENTAÇÕES

Um novo lote de levedura cervejeira foi coletado, separado do mosto por centrifugação, lavado com água destilada e separado novamente a 3.000rpm por 10min. A massa seca deste novo lote foi determinada nas mesmas condições da seção anterior. Após isso, foi feita a diluição da suspensão para 7,5% em massa de células secas. Essa suspensão foi incubada por 24h a 59°C e 120rpm em frasco vedado.

Foi retirada uma amostra no tempo 0h a qual foi centrifugada a 3.000rpm por 10min. Em 24h, todo o conteúdo do frasco foi também centrifugado segundo os mesmos parâmetros e em ambiente estéril. As massas secas dos sobrenadantes obtidos em 0h e 24h foram determinadas por gravimetria (24h, 80°C). Os sobrenadantes foram homogeneizados, fracionados em tubos de 15mL e armazenados a -20°C até análise de concentrações de nitrogênio orgânico pelo método de Kjeldahl.

3.1.4 ANÁLISES PELO MÉTODO DE KJELDAHL

As concentrações de nitrogênio orgânico nas amostras de extrato de levedura (sobrenadante) foram analisadas usando o método de Kjeldahl (MARTÍN; SARRIA; ASUERO, 2017). Estas análises foram feitas no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia (UFF).

Foram retiradas alíquotas ($V_{aliquota}$) de 600 μ L para as amostras de 0h e 200 μ L para as demais amostras. A cada alíquota, adicionou-se 3mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 g de catalisador sulfato de cobre e sulfato de potássio em proporção 2:1, seguido de aquecimento a 450°C em bloco digestor, até que o líquido estivesse incolor, caracterizando a digestão completa do conteúdo orgânico.

Em outro dia, após o resfriamento das amostras, cada uma foi colocada em um sistema de destilação a vapor vedado. Na saída do sistema, foi colocado um frasco contendo 10mL de ácido bórico 4% e um indicador de pH composto de vermelho de metila e verde de bromocresol. Após isso, adicionou-se hidróxido de sódio ao tubo até mudança de coloração de incolor para preto, caracterizando a formação de hidróxido de amônio. Em seguida, foi feita a destilação a vapor, na qual toda a amônia foi absorvida pela solução de ácido bórico, formando borato. Essa espécie foi então titulada com solução padronizada de ácido sulfúrico 0,01N.

A padronização do ácido sulfúrico foi feita pela titulação em triplicata de soluções do padrão primário carbonato de sódio. Este foi seco a 105°C por pelo menos 2h e resfriado em dessecador. Pesou-se 0,0106g de carbonato de sódio para Erlenmeyers de 250mL e adicionou-se 75mL de água e 2 gotas de alaranjado de metila 0,1%(m/V). Esta mistura foi titulada com a solução de ácido sulfúrico até a viragem do indicador. O fator de correção da concentração de ácido sulfúrico ($F_{H_2SO_4}$) é dado por:

$$F_{H_2SO_4} = \frac{\text{Massa de } Na_2CO_3 \text{ (g)}}{0,053 \cdot V_P \text{ (mL)} \cdot \text{Norm(N)}}$$

V_P é o volume de solução de ácido sulfúrico gasta na titulação (padronização) e Norm é a normalidade da solução a padronizar.

A concentração de nitrogênio orgânico (C_{Norg}) nas amostras é dada por:

$$C_{Norg} \text{ (g/mL)} = \frac{V_{H_2SO_4} \text{ (mL)} \cdot F_{H_2SO_4} \cdot 10^{-5} \cdot MM_N \text{ (g/mol)}}{V_{aliquota} \text{ (mL)}}$$

$V_{H_2SO_4}$ é o volume de solução de ácido sulfúrico 0,01N usada na titulação do borato, MM_N é a massa molar do átomo de nitrogênio (14,0067g/mol) e $V_{aliquota}$ é o volume de alíquota de extrato de levedura usado.

O rendimento da autólise em massa estimada de proteínas por células secas usadas foi calculado considerando que as proteínas têm cerca de 16% de nitrogênio:

$$\text{Rendimento}\% \left(\frac{\text{massa de proteínas}}{\text{massa de células secas}} \right) = 100 \cdot \frac{C_{\text{Norg}}(\text{g/mL})}{(16/100) \cdot \text{CSDD}(\text{g/mL})} \%$$

3.2 BAGAÇO DE CANA UTILIZADO

O bagaço de cana, originário inicialmente do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM), foi cedido pelo Laboratório de Ecologia e Processos Microbianos, da Escola de Química, UFRJ. Foram utilizados bagaço de cana *in natura* e bagaço tratado por explosão a vapor a 200°C por 7 minutos.

3.2.1 UMIDADE DOS BAGAÇOS DE CANA

Foi feita a homogeneização por quarteamento de cada um dos bagaços, seguida da retirada de amostras para determinação da massa seca por gravimetria. Para isso, 3 amostras foram pesadas antes e depois da secagem a 105°C por 24h e determinou-se a porcentagem de umidade em cada uma.

Para determinação da massa úmida, foi utilizada a fórmula:

$$\text{UMIDADE}\% = 100 \cdot \frac{\text{CBU}(\text{g}) - \text{CBS}(\text{g})}{\text{CBU}(\text{g}) - \text{CS}(\text{g})} \%$$

CBU é a massa da cápsula com bagaço úmido, CBS é a massa da cápsula com bagaço seco e CS é a massa da cápsula seca vazia.

3.3 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Para produção de enzimas, foram utilizadas linhagens de fungos filamentosos anteriormente isolados no Laboratório de Tecnologia Microbiana, identificados morfológicamente e molecularmente como *Trichoderma asperellum*, *Penicillium pedernalense* e *Aspergillus niger*. As duas primeiras linhagens, denominadas de *Trichoderma asperellum* FEV e *Penicillium pedernalense* F4B1, foram isoladas de solo contaminado com finalidade de biorremediação autóctone de derramamento de petróleo na área de proteção ambiental da Bacia do Rio São João/Mico-Leão-Dourado, localizada no município de Silva Jardim, Rio de Janeiro (BLANC; DUARTE; FIAUX, 2024). Já a linhagem de *Aspergillus*, denominada *Aspergillus niger* 5J, foi isolada a partir

de fava d'anta umedecida exposta ao ar no jardim da Faculdade de Farmácia da UFF, no município de Niterói, Rio de Janeiro, durante pesquisa para produção de quercetina a partir de fava d'anta (DA SILVA, 2016). Número do cadastro SISGEN do projeto: AB12CB4.

As cepas foram mantidas congeladas. Para isso foram inoculadas em garrafas de cultura de 50 mL contendo meio ágar Sabouraud a 28°C. Após isso, os conídios foram extraídos usando solução estéril de Tween 0,01%. Toda a suspensão foi filtrada com gaze estéril para remoção de hifas. Posteriormente, adicionou-se quantidade suficiente de glicerol (50%) para obter a concentração final de 10%(m/V), seguida de contagem em câmara de Neubauer. As suspensões foram transferidas para tubos de microcentrífuga estéreis e armazenadas a -20°C.

3.4 DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO EM MEIOS SOLIDIFICADOS

Foram feitas as culturas dos fungos de interesse em meios solidificados, que foram avaliadas em termos da taxa de crescimento do micélio, medindo seu diâmetro. Também foram observadas informações como a aparência das colônias e o tempo até a formação de conídios visíveis a olho nú.

Os meios de cultivo contendo material lignocelulósico como única fonte de carbono foram compostos de 10g/L do material lignocelulósico, 15g/L de ágar e uma mistura de sais, segundo Mandel, modificada com a seguinte composição (LIN et al., 2011), em g/L: NaNO₃ 2; KH₂PO₄ 1,5; CaCl₂ 0,3; MgSO₄.7H₂O 0,3; FeSO₄.7H₂O 0,005; MnSO₄.H₂O 0,0016; ZnSO₄.H₂O 0,0014; CoCl₂ 0,0005. Os materiais lignocelulósicos usados foram o bagaço de cana tratado por explosão a vapor (meio MBtA), o bagaço não tratado (meio MBnA), carboximetilcelulose (meio MCA), e xilana (xilana de sabugo de milho, massa molecular 300-900 – Biosynth Carbosynth) (meio MXA). Para estes testes, os meios tiveram pH ajustado para 5,0 antes da adição do material lignocelulósico e de ágar.

Os fungos foram inoculados no centro de cada placa com auxílio de uma agulha de inoculação e o diâmetro foi medido ao longo do tempo, em intervalos variáveis de acordo com o fungo, até o preenchimento da placa ou interrupção do experimento. Todas as culturas foram feitas ao abrigo da luz, em recipiente

contendo algodão úmido, para manutenção da umidade, a temperaturas de 25°C ou 30°C.

3.5 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Os experimentos por fermentação em estado sólido foram realizados em Erlenmeyers de 250mL contendo 5g de bagaço de cana tratado por explosão a vapor ou *in natura*. Estes foram pesados após homogeneização por quarteamento, de modo a garantir distribuição semelhante de tamanhos de partículas entre as amostras. Os Erlenmeyers com bagaço foram esterilizados e umidificados em proporção 1:4 (20mL de líquido a cada 5g de bagaço) com solução de Mandel (conforme a seção 3.4) e extrato de levedura. Acrescentou-se solução de sais segundo Mandel previamente esterilizada, de modo a que a composição na solução umidificante do bagaço, após adição da solução de extrato de levedura, fosse igual à usada no item 3.4. Em alguns experimentos a concentração de NaNO₃ foi variada. Em seguida, adicionou-se extrato de levedura em quantidade definida pela quantidade de nitrogênio orgânico por grama de bagaço para cada experimento. O extrato de levedura não foi esterilizado, pois já havia passado por uma incubação a 59°C por 24h. A solução de sais segundo Mandel adicionada foi preparada em concentração um pouco maior, de modo a chegar à concentração final desejada apenas ao totalizar o volume final de 20mL, quando acrescidas do extrato de levedura.

Os fungos foram previamente cultivadas por 7 a 10 dias em ágar batata dextrose a 30°C a partir da cultura congelada. Os conídios obtidos no cultivo foram suspensos em solução de Tween 80 0,01%, contados em câmara de Neubauer e, se necessário (para facilitar a inoculação), diluídos na solução de Tween 80 para inoculação.

Cada Erlenmeyer contendo o meio foi inoculado com volume de suspensão de conídios suficiente para a concentração inicial de conídios especificada em cada experimento (seções 3.5.1 e 3.5.2). Em todos os experimentos, os frascos Erlenmeyers que seriam usados como amostras referentes ao dia 0 de cultivo não receberam inóculo fúngico. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30°C, sem agitação e sem luz em estufa contendo bandeja com lâmina de água, para manutenção da umidade. Após o cultivo, o meio sólido foi extraído

conforme item 3.6 e as atividades enzimáticas foram analisadas conforme item 3.7.

3.5.1 EXPERIMENTO CINÉTICO INICIAL: COMPARAÇÃO DE BAGAÇOS E FUNGOS

Para este experimento, foram testados o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor e o bagaço *in natura*, usando os fungos *Aspergillus niger* 5J, *Trichoderma asperellum* FEV e *Penicillium pedernalense* F4B1 em culturas axênicas. A fermentação em estado sólido foi realizada com amostras de sacrifício em triplicata nos dias 0, 5, 7 e 10 de incubação, totalizando 60 amostras.

A cada frasco com 5g de bagaço (Figura 3-1), adicionou-se 40mg de NaNO_3 (concentração final de 2g/L na solução de Mandel), extrato de levedura em quantidade equivalente a 15mg de nitrogênio orgânico e 10^6 conídios fúngicos.



Figura 3-1: Frascos contendo apenas bagaço de cana tratado por explosão a vapor (esquerda) e *in natura* (direita) após autoclavagem.

3.5.2 ESTUDO DE PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO: PLANEJAMENTO FATORIAL

Foi realizado um planejamento fatorial completo em dois níveis (2^3) com triplicata do ponto central para estudo das seguintes variáveis independentes: concentração de extrato de levedura preparado (medida em nitrogênio orgânico); nitrato de sódio, como fonte de nitrogênio; e quantidade inicial de conídios (Tabela 3-1; Tabela 3-2). Concentrações iniciais de conídios utilizadas foram (conídios/5g de bagaço): $2,5 \cdot 10^5$, $2,5 \cdot 10^6$ e $2,5 \cdot 10^7$. Estes valores tiveram que ser inseridos no modelo de forma linearizada, por meio de logaritmo.

Tabela 3-1: Domínio experimental do planejamento fatorial completo 2^3 para estudo dos parâmetros de FES que influenciam a atividade enzimática.

	Extrato de Levedura (mgN/5g de bagaço)	NaNO₃ (mg/5g bagaço)	Log₁₀ [conídios (quant/5g de bagaço)]
-1	5	40	5,40
0	15	220	6,40
1	25	400	7,40

Tabela 3-2: Planejamento fatorial completo 2^3 para estudo dos parâmetros de FES que influenciam a atividade enzimática.

Experimento	Extrato de Levedura	NaNO₃	Conídios
1	1	1	1
2	1	1	-1
3	1	-1	1
4	1	-1	-1
5	-1	1	1
6	-1	1	-1
7	-1	-1	1
8	-1	-1	-1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Foram retiradas amostras de sacrifício nos tempos de incubação de 3, 5, 7 e 10 dias para cada experimento. Foi feita também uma amostra inicial (dia 0) para cada condição, na qual não houve inoculação de fungos, totalizando 5 amostras, uma para cada grupo de experimentos com mesma mistura de extrato de levedura e NaNO₃: {1;2}, {3;4}; {5;6}; {7;8}; {9;10;11}. Assim, ao todo foram obtidas 49 amostras, que foram extraídas e analisadas para as atividades FPase, CMCase, β -glicosidase e endoxilanase.

Os dados obtidos no planejamento foram analisados tendo como variáveis resposta a produtividade de atividade enzimática, ou seja, a atividade por massa de bagaço dividida pelo tempo, em dias (em U/g/dia). O software STATISTICA™, versão 14.1 (Statsoft®) foi utilizado para a análise.

Para validar o planejamento fatorial, a fermentação foi repetida na condição que resultou na máxima produção no estudo de parâmetros. Esta condição foi validada em quadruplicata, seguindo o mesmo procedimento utilizado no ensaio anterior.

3.6 OBTENÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO

As extrações das enzimas após as fermentações foram realizadas de formas diferentes dependendo do experimento (Tabela 3-3). O procedimento geral consistiu na adição de tampão citrato 50mM, pH 5,0 em volume de 25mL (proporção 1:5) ou 50mL (proporção 1:10), seguida ou não do uso de espátula para quebra da massa de bagaço e micélio e homogeneização no tampão. Em seguida, foi feita agitação do Erlenmeyer por 30min a 250rpm e o conteúdo extraído foi filtrado com gaze estéril para um tubo de 50mL (Figura 3-2).

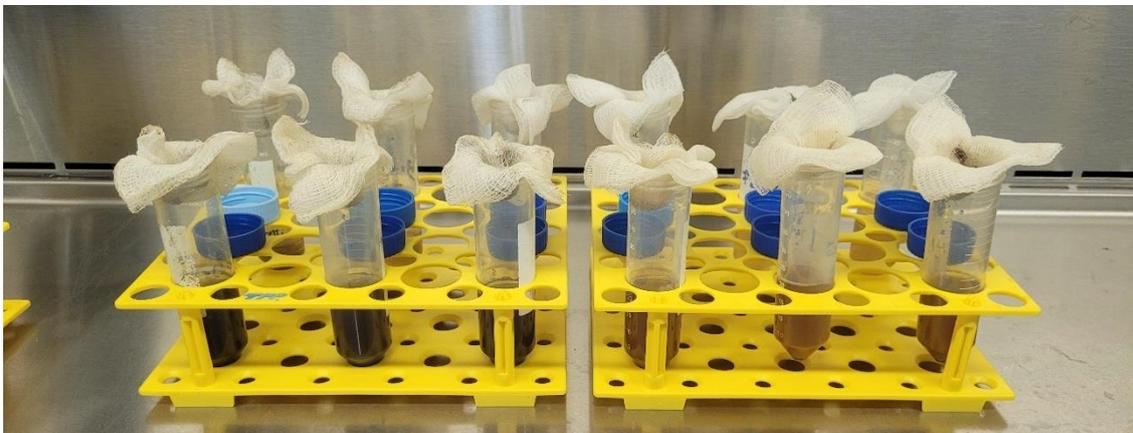


Figura 3-2: Esquema da filtração e recolhimento dos extratos enzimáticos.

Todo este procedimento, incluindo a extração, agitação e filtração com gaze, foi realizado apenas uma vez ou foi repetido, dependendo do experimento. Nos casos em que foram feitas extrações sequenciais, os conteúdos das mesmas podem ou não ter sido misturados, dependendo do experimento (Tabela 3-3). No experimento cinético inicial, com o intuito de garantir a extração de maior parte da enzima disponível no meio ao final da fermentação, no décimo dia utilizou-se uma quantidade maior de tampão (50mL) que nos outros dias

(25mL) e também foi feita uma homogeneização do bagaço com espátula, diferente dos dias anteriores. No estudo de parâmetros de cultivo por planejamento fatorial, para cada amostra foi feita apenas uma extração com 50mL, com o intuito de facilitar a comparação desses resultados com a literatura. A partir desse experimento, o volume de 25mL de tampão não foi mais usado porque com essa quantidade, não era possível garantir que todo o bagaço estivesse completamente submerso durante a extração em todos os frascos, uma vez que optou-se por não realizar a moagem do material. Na validação do planejamento fatorial, realizou-se uma extração a mais, a qual foi dosada em separado para avaliar quanto de enzima ainda restaria no bagaço após a primeira extração.

Tabela 3-3: Diferentes procedimentos de extração em cada experimento.

Experimento	Experimento cinético inicial: comparação de bagaços e fungos		Estudo de parâmetro de cultivo: planejamento fatorial	Validação do ponto máximo
Tempos de incubação	Dias 0, 5 e 7	Dia 10	Dias 0, 3, 5, 7 e 10	Dia 3
Volume de tampão na extração 1	25mL	50mL	50mL	50mL
Homogeneização com espátula na extração 1	Não	Sim	Sim	Sim
Tempo a 250rpm na extração 1	30min	30min	30min	30min
Filtração com gaze?	Sim	Sim	Sim	Sim
Volume de tampão na extração 2	25mL	50mL	Apenas 1 extração	50mL
Homogeneização com espátula na extração 2	Não	Não	Apenas 1 extração	Não
Tempo a 250rpm na extração 2	30min	30min	Apenas 1 extração	30min
Filtração com gaze?	Sim	Sim	Apenas 1 extração	Sim
Produtos das duas extrações misturados?	Sim	Sim	Apenas 1 extração	Não
Volume total das extrações misturadas	50mL	100mL	Apenas 1 extração	Extrações independentes

Após as filtrações com gaze, os tubos foram centrifugados a 3234g por 15min e os sobrenadantes foram filtrados a vácuo. Foram usadas membranas de éster celulose mista (MCE), com porosidade de 0,22 μ m para remoção de conídios dos extratos. Em seguida os extratos foram congelados para posteriores análises de atividade enzimática.

3.7 ANÁLISES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.7.1 ATIVIDADE FPase (CELULASE TOTAL)

A atividade de celulase total (FPase) foi medida por análise de liberação de açúcares redutores usando papel filtro como substrato. Para isso, foi usada uma metodologia em escala reduzida, adaptada de protocolos padronizados, porém estequiometricamente idêntica, exceto pela massa de papel filtro utilizada (ADNEY; BAKER, 1996; GHOSE, 1987). Segundo GHOSE (1987), a medida de atividade FPase não é linear em função da diluição, então ele sugere a seguinte padronização: para cada amostra, deve-se encontrar a diluição necessária para que se obtenha uma liberação de açúcares redutores equivalente a 2mg/mL de glicose. Assim o cálculo da atividade é feito considerando essa diluição necessária, o que só pode ser obtido ao se realizar a medida de atividade com pelo menos duas diluições diferentes para cada amostra. Esse procedimento, no mínimo, dobraria o esforço e material necessário para as análises. No entanto, o próprio autor indica que, caso as amostras tenham baixas atividades enzimáticas, de forma que mesmo sem serem diluídas, não levem à produção da quantidade crítica de açúcares redutores (equivalente a 2mg/mL de glicose), o método pode ser aproximado como linear, dispensando esse procedimento. Para as amostras analisadas, as atividades enzimáticas FPase encontradas foram baixas e apenas algumas ultrapassaram a quantidade crítica de açúcares redutores, de modo que as análises foram aproximadas como lineares.

Em banho de gelo, adicionou-se 20 μ L de extrato enzimático a 40 μ L de tampão citrato 50mM, pH 4,8, e discos de papel filtro 80g/m² com 6mm de diâmetro. A reação enzimática foi iniciada por incubação a 50°C por 60min e finalizada pela adição de 120 μ L de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% e tartarato de sódio e potássio 30% em hidróxido de sódio 1,6%) em banho de gelo. Após isso, o sistema foi incubado em água fervente por 5 min e

arrefecido em banho de gelo. Essas reações foram feitas em triplicata para cada amostra.

Foi preparado também, para cada amostra, um controle de substrato e enzima (t0) de forma semelhante ao descrito, porém com adição da solução de DNS antes de tudo para inativação enzimática. O controle usado para calibração do espectrofotômetro (branco) foi preparado com um disco de papel filtro, 60µL de tampão e 120µL de DNS, sendo também fervido para a reação do DNS.

Após as reações, adicionou-se 800µL de água destilada, os tubos foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex e foram feitas leituras a 540nm no prazo de até 2h após o fim das reações.

3.7.2 ATIVIDADE CMC_{Case} (CARBOXIMETILCELULASE)

As endo-β-1,4-glicanases foram medidas pela atividade carboximetilcelulase, usando uma metodologia em escala reduzida (GHOSE, 1987). Em triplicata para cada amostra, adicionou-se, em banho de gelo, 50µL de extrato enzimático a 50µL de substrato carboximetilcelulose 2% (preparado em tampão citrato 50mM pH 4,8). A reação enzimática foi iniciada pela incubação a 50°C e terminada após 15min pela adição de 300µL de solução de DNS em banho de gelo. Após isso, a reação com DNS foi realizada pela incubação em água fervente por 5min e o sistema foi arrefecido em banho de gelo.

De forma análoga à análise de FPase, foi feito um controle t0 para cada amostra, preparado pela adição do DNS antes da reação enzimática. O branco para calibração do espectrofotômetro foi preparado com 100µL de tampão citrato 50mM pH 4,8 e 300µL de solução de DNS, seguido de fervura por 5min.

Após as reações, adicionou-se 1.500µL de água destilada a cada amostra e foram feitas leituras de absorvância a 540nm no prazo de até 2h após o fim das reações.

3.7.3 ATIVIDADES β-GLICOSIDASE E β-XILOSIDASE

A atividade β-glicosidase foi determinada pela hidrólise enzimática de p-nitrofenil-β-D-glicopiranosídeo (PNG), liberando p-nitrofenol (ARAUJO SILVA et al., 2018). Uma mistura de 160µL de tampão acetato de sódio 0,5M, pH 5,0, 520µL de água destilada e 40µL de extrato enzimático foi incubada a 50°C por 5min para estabilização da temperatura. Em seguida, a reação foi iniciada pela

adição de 80µL de substrato (PNG 10mM em tampão de sódio 0,5M, pH5,0) e finalizada após 10min com a adição de 400µL solução de carbonato de sódio 1M.

Foi utilizado um controle negativo (t₀) nas mesmas condições da reação, porém com adição de água no lugar do substrato. Para calibração do espectrofotômetro, o branco usado foi água. Após as reações, as amostras foram homogeneizadas e a absorbância foi lida a 420nm.

A atividade β-xilosidase foi determinada adotando o mesmo procedimento, porém substituindo o PNG por p-nitrofenil-β-D-xilopiranosídeo.

3.7.4 ATIVIDADE ENDO-B-1,4-XILANASE (ENDOXILANASE)

A atividade endo-β-1,4-xilanase (aqui chamada apenas de endoxilanase ou apenas xilanase) foi medida pela hidrólise de xilana liberando açúcares redutores (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992).

Em banho de gelo, adicionou-se 90µL do extrato enzimático a 270µL do substrato constituído de xilana de madeira de faia (*beechwood*) 1% em tampão citrato 50mM pH 5,3. A reação enzimática foi iniciada pela incubação a 50°C e encerrada após 15min com a adição de solução de DNS em banho de gelo. Esse sistema foi preparado em triplicata para cada extrato enzimático.

Para cada amostra, foi preparado também um controle t₀ igual ao descrito, porém com adição do DNS antes de tudo. O controle usado para calibração do espectrofotômetro também foi igual às amostras, porém com tampão citrato (pH 5,3) no lugar do extrato enzimático.

Após isso, as amostras foram incubadas em água fervente por 5min, arrefecidas em banho de gelo e a absorbância foi lida a 540nm no prazo de até 2h após o fim das reações.

3.7.5 CURVAS PADRÃO E CÁLCULOS DE ATIVIDADE

Para determinação das atividades, foram utilizadas curvas padrão de acordo com a mesma metodologia das análises de amostras, porém sem incubação a 50°C e substituindo o extrato enzimático por padrões de glicose (FPase e CMCase), xilose (xilanase) em diferentes concentrações, expressas em mg/mL, ou p-nitrofenol (β-glicosidase e β-xilosidase) em concentrações variadas, expressas em µmol/mL.

3.7.5.1 Cálculos para medidas usando DNS: FPase, CMCCase e Xilanase

A partir das absorvâncias obtidas e das concentrações dos monossacarídeos, foram feitas curvas e regressões lineares, forçando a passagem pelo ponto (0,0). Assim, foram obtidos coeficientes angulares (Cof), que representam a razão entre a absorvância a 540nm e a concentração de glicose ou xilose mg/mL.

A unidade internacional de atividade enzimática (UI) é definida como μmol de substrato convertido (ou produto formado) por minuto (LABUDA et al., 2018). A partir disso, são definidas atividades enzimáticas padronizadas, em condições reacionais específicas e em termos de volume de enzima adicionado (GHOSE, 1987):

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Atividade} \\ \text{Enzimática} \end{array} \right\} (U/mL) = \frac{\{\text{produto liberado}\}(\mu\text{mol})}{t(\text{min}) \cdot \{\text{volume de enzima}\}(\text{mL})}$$

Aplicando a massa molar da glicose e a diluição das amostras nos ensaios, em comparação com a curva padrão, obtém-se a equação:

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Atividade} \\ \text{Enzimática} \end{array} \right\} (U/mL) = \frac{Abs_{540} \cdot V_{\text{mon}}(\text{mL}) \cdot Fd}{Cof(\text{mL/mg}) \cdot MM(\text{mg}/\mu\text{mol}) \cdot V_{\text{enz}}(\text{mL}) \cdot t(\text{min})}$$

Abs_{540} é a absorvância a 540nm. A absorvância considerada para os cálculos na realidade foi dada pela média das absorvâncias das análises (feitas em triplicata para cada amostra) subtraída da absorvância do controle t_0 . V_{mon} é o volume de monossacarídeo usado na curva padrão (glicose ou xilose), Fd é o fator de diluição do extrato enzimático, Cof é o coeficiente angular da curva padrão de cada método, MM é a massa molar do monossacarídeo usado na curva padrão (glicose ou xilose), V_{enz} é o volume de enzima utilizado na análise e t é o tempo de incubação a 50°C em minutos.

A equação pode ser simplificada, uma vez que foi pré-definido nos ensaios que $V_{\text{mon}}=V_{\text{enz}}$. Além disso, para processos de fermentação em estado sólido, é útil o uso da atividade enzimática por grama de substrato (bagaço de cana), o que pode ser obtido aplicando na equação anterior a massa de bagaço (M_b) e o volume total de tampão utilizado (V_t):

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Ativid. enzimática por} \\ \text{massa de substrato} \end{array} \right\} \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{Abs_{540} \cdot Fd \cdot V_t(\text{mL})}{Cof(\text{mL/mg}) \cdot MM(\text{mg}/\mu\text{mol}) \cdot t(\text{min}) \cdot M_b(\text{g})}$$

3.7.5.2 Cálculos para β -glicosidase e β -xilosidase

Para as atividades enzimáticas medidas pela liberação de p-nitrofenol, a unidade de atividade enzimática (U) corresponde a 1 μ mol de p-nitrofenol liberado por minuto. Nestes casos, fazendo as mesmas considerações feitas em 3.7.5.1, a equação utilizada encontra-se abaixo:

$$\left\{ \begin{array}{l} \textit{Atividade enzimática} \\ \textit{por massa de substrato} \end{array} \right\} \left(\frac{U}{g} \right) = \frac{Abs_{420} \cdot Fd \cdot Vt(mL)}{Cof(mL/\mu mol) \cdot t(min) \cdot M_b(g)}$$

3.7.5.3 Cálculos dos dados e análise estatística

Os resultados foram calculados a partir dos dados experimentais utilizando o software Excel® da Microsoft®. As análises dos dados dos planejamentos experimentais foram realizadas utilizando o software STATISTICA™, versão 14.1 (Statsoft®). Demais análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism v.9.5 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia USA).

4. RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA

Para obtenção do extrato de levedura, foi realizado experimento para comparar os tempos de incubação e também avaliar a efetividade do tratamento com ácido sulfúrico antes da incubação. Depois dessa avaliação, os melhores parâmetros foram usados para autólise de uma quantidade maior de levedura cervejeira para uso nas fermentações subsequentes.

4.1.1 AUTÓLISE DE LEVEDURAS: AVALIAÇÃO DO CHOQUE ÁCIDO E TEMPO DE INCUBAÇÃO

Após a lavagem das células a serem usadas para a obtenção do extrato, a concentração de material seco na suspensão de células foi de 9,75% (m/V). De acordo com a metodologia utilizada, essa concentração estava acima do valor ótimo e a suspensão foi diluída para a faixa desejada, obtendo-se após a diluição 7,42% (m/V) de material seco.

As concentrações de nitrogênio orgânico foram determinadas pelo método de Kjeldahl (Figura 4-1). Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) *two way* excluindo o tempo 0h, seguida de comparações múltiplas apenas com a variável relevante (tratamento) e pós-teste de Šídák com nível de significância $\alpha=0,1$ para avaliar a diferença estatística entre as medidas (Tabela 4-1, Figura 4-1). Os dados apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk $p=0,58$).

Tabela 4-1: Análise de variância *2way* para os tempos de incubação e tratamentos com ou sem choque ácido na autólise da levedura residual

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade (GL)	Quadrado médio	F (GLn, GLd)	P-valor
Tempo	0,437	2	0,219	F (2, 12) = 0,962	P=0,41
Tratamento	2,07	1	2,07	F (1, 12) = 9,11	P=0,01
Tempo x Tratamento	0,260	2	0,130	F (2, 12) = 0,573	P=0,58
Resíduo	2,73	12	0,227		

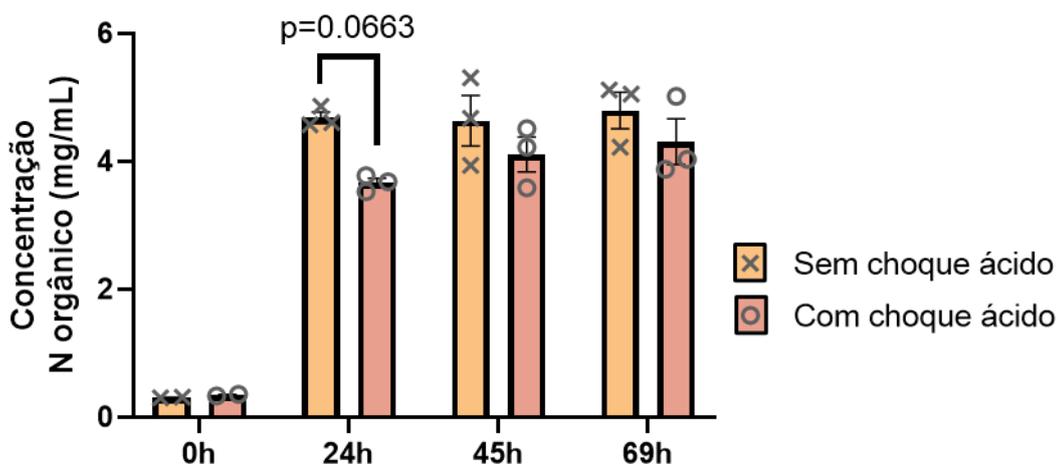


Figura 4-1: Concentração de nitrogênio orgânico no extrato de levedura (sobrenadante) em função do tempo de autólise (a 59°C) e tratamentos com e sem choque ácido.

Assim, observou-se que não houve diferença significativa entre os diferentes tempos de incubação para a autólise (Tabela 4-1, Figura 4-1). Desta forma, é possível optar pelo menor tempo, no caso, 24h. Para este tempo, o melhor tratamento foi sem choque ácido, com diferença significativa ($p < 0,1$). O valor médio obtido nestas condições foi de 4,69mg/mL de nitrogênio orgânico e o rendimento, em massa de proteínas por massa de células secas, foi de 39,1%.

4.1.2 AUTÓLISE DE TODA A LEVEDURA DISPONÍVEL

Foi feita, então, a autólise de toda a levedura disponível por 24h, sem choque ácido. Antes da autólise, a concentração de material seco na suspensão total de células obtida foi de 21,7% (m/V). Essa suspensão precisou ser diluída para a faixa otimizada, e após a diluição, obteve-se uma concentração de células secas de 7,67% (m/V).

A concentração de sólidos secos no sobrenadante antes da autólise foi 1,42% (m/V) e depois (após 24 h) foi 4,53% (m/V). Dividindo estes valores pela concentração inicial de células secas (7,67%), obtém-se o percentual de sólidos extraído (Figura 4-2 – esquerda). Assim, após 24h, o percentual médio de sólidos extraídos foi de 59,4%, com um rendimento de 40,7%, descontando o tempo 0.

A concentração de nitrogênio orgânico do sobrenadante no tempo zero foi de $1,14 \pm 0,05$ mg/mL. Já em 24h, a concentração de nitrogênio orgânico foi de $5,46 \pm 0,11$ mg/mL (Figura 4-2 – direita). O rendimento, em massa de proteínas

por células secas após 24h foi de 44,7%, sem descontar o tempo 0h, ou 35,4% descontando o tempo 0h.

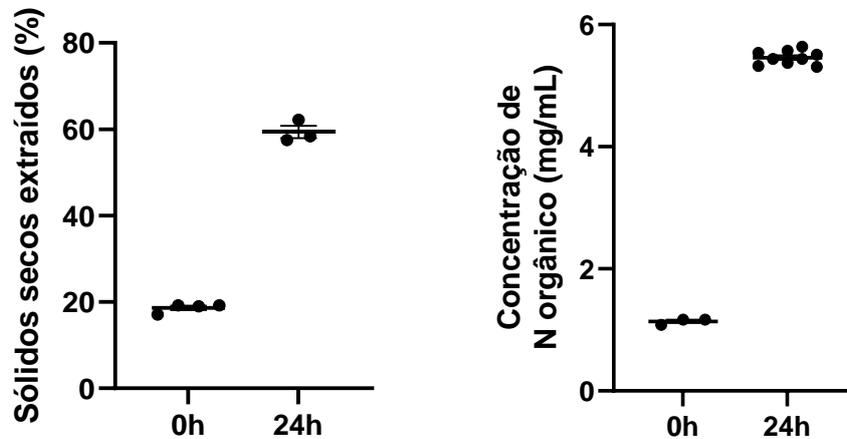


Figura 4-2: Percentual de sólidos extraído (esquerda) e concentrações de nitrogênio orgânico (direita) obtidas antes (0h) e após (24h) a autólise a 59°C. Barras de erro padrão da média (EPM).

4.2 DETERMINAÇÃO DAS TAXAS DE CRESCIMENTO EM MEIOS SOLIDIFICADOS

Foram feitos experimentos para medir as taxas de crescimento dos fungos indicados na seção 3.3 em placas de Petri contendo material lignocelulósico como única fonte de carbono e o resultado está apresentado na Figura 4-3.

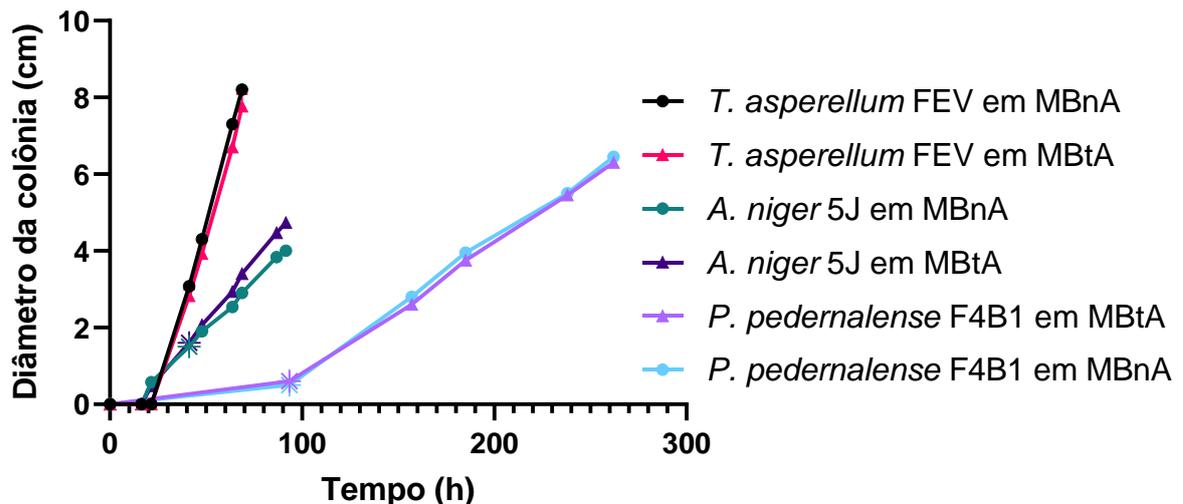


Figura 4-3: Crescimento de fungos em meios contendo bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (MBtA) e *in natura* (MBnA) como única fonte de carbono, a 30°C em placas de Petri de 9cm de diâmetro. Pontos com símbolo de asterisco: primeiros registros de formação de conídios. Barras de erro (EPM) não estão visíveis por serem pequenas.

As maiores taxas de crescimento foram vistas para o fungo *T. asperellum* FEV, no entanto seu micélio inicialmente era muito fino se comparado aos outros (Figura 4-4). Apenas após tomar toda a placa (9cm de diâmetro), o micélio desta cepa se tornou mais denso e formou conídios (Figura 4-5). Para o *A. niger* 5J (Figura 4-6), visualizou-se a olho nú conídios com cerca de 40h de incubação e para o *P. pedernalense* F4B1 (Figura 4-7), com cerca de 90h. Comparando entre os dois meios de cultivo, as taxas de crescimento são muito semelhantes para *P. pedernalense* F4B1 e *T. asperellum* FEV.

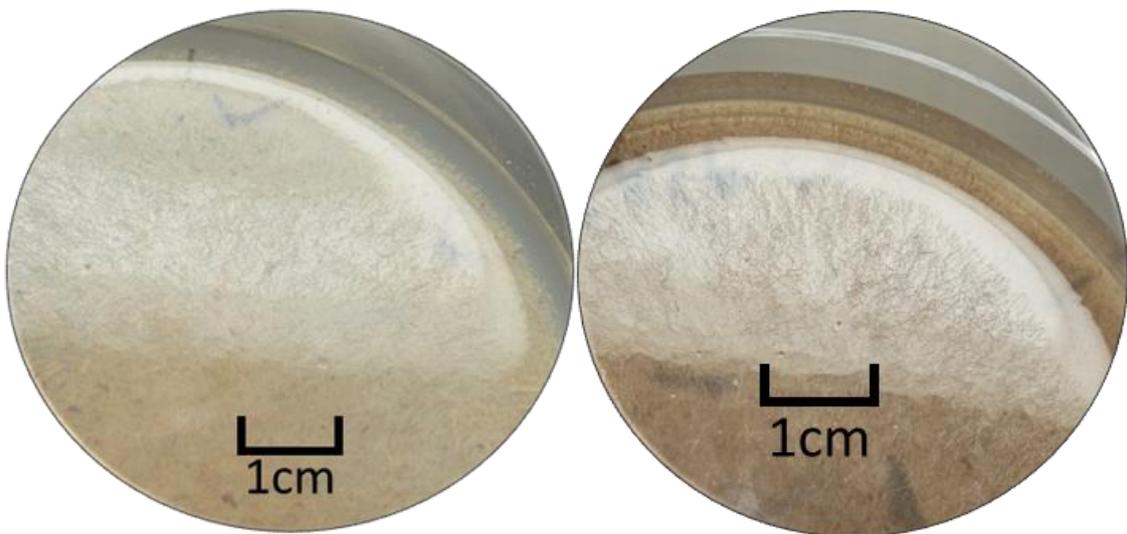


Figura 4-4: *Trichoderma asperellum* após 64h a 30°C em meio com bagaço *in natura* (MBnA – à esquerda) e com bagaço tratado por explosão a vapor (MBtA – à direita).

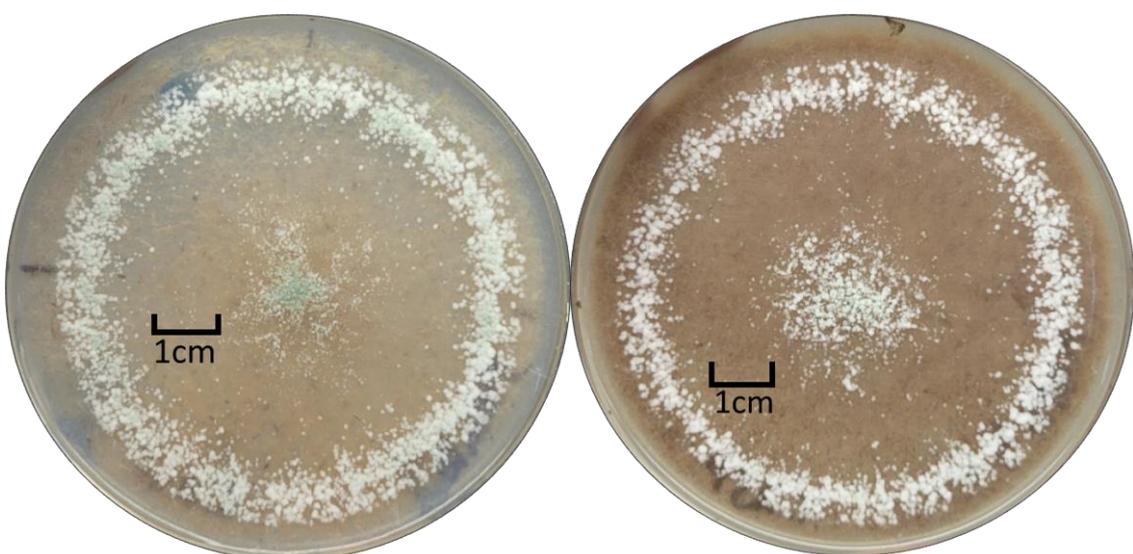


Figura 4-5: *Trichoderma asperellum* após 87h a 30°C em meio com bagaço *in natura* (MBnA – à esquerda) e com bagaço tratado por explosão a vapor (MBtA – à direita).

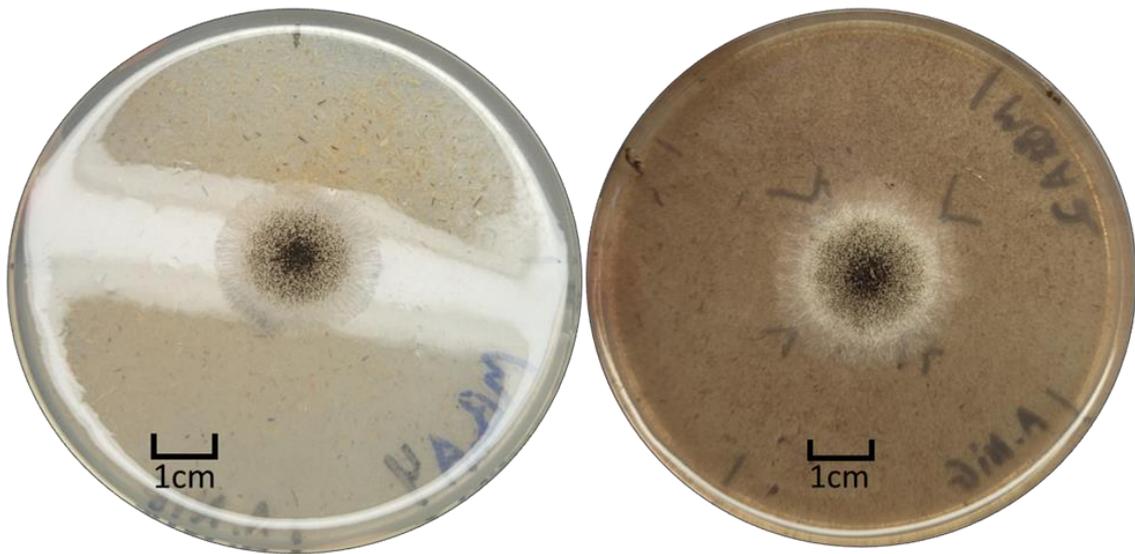


Figura 4-6: *Aspergillus niger* após 64h a 30°C em meio com bagaço *in natura* (MBnA – à esquerda) e com bagaço tratado por explosão a vapor (MBtA – à direita).

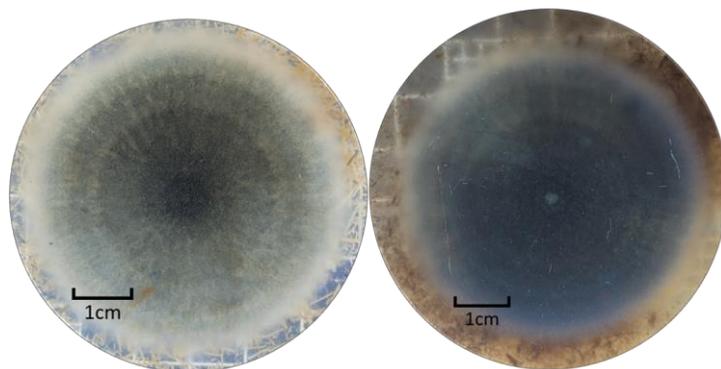


Figura 4-7: *Penicillium pedernalense* após 238h a 30°C, em meio com bagaço *in natura* (MBnA – à esquerda) e com bagaço tratado por explosão a vapor (MBtA – à direita).

4.3 EXPERIMENTO CINÉTICO INICIAL – COMPARAÇÃO DE BAGAÇOS E FUNGOS

4.3.1 UMIDADE INICIAL DO BAGAÇO

As umidades iniciais dos bagaços foram medidas por peso seco, como descrito em 3.2.1. Para o bagaço tratado por explosão a vapor, a umidade foi de 5,727% e para o bagaço *in natura*, a umidade foi de 7,266%.

4.3.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Foi realizado um experimento de fermentação inicial por 10 dias, para verificar a capacidade de produção das enzimas holocelulolíticas pelos três fungos que tiveram bons resultados de crescimento em placas de Petri com meios contendo material lignocelulósico como única fonte de carbono: *Aspergillus niger* 5J, *Trichoderma asperellum* FEV e *Penicillium pedernalense* F4B1. Durante os experimentos, foi possível observar crescimento considerável dos micélios fúngicos em todos os cultivos. Após os 10 dias de cultivo, os meios sólidos foram extraídos, centrifugados e filtrados de acordo com o item 3.6.

A partir dos extratos filtrados, foram medidas as atividades enzimáticas FPase, CMCase, endoxilanase e β -glicosidase. Foi feita uma ANOVA 2way para cada dia, para cada enzima, de forma a comparar entre os fungos, bagaços e suas interações em cada dia. Após isso, foram feitas comparações múltiplas com $\alpha=0,1$, considerando apenas as interações significativas. Foram usados os pós-testes de Tukey ou Šídák (Figura 4-8).

Os valores das atividades medidas, não descontadas do dia 0, estão apresentados na forma de tabelas no Apêndice 8.1 (Tabelas 8-1 a 8-4). As tabelas das ANOVAs encontram-se no Apêndice 8.2 (Tabelas 8-5 a 8-8).

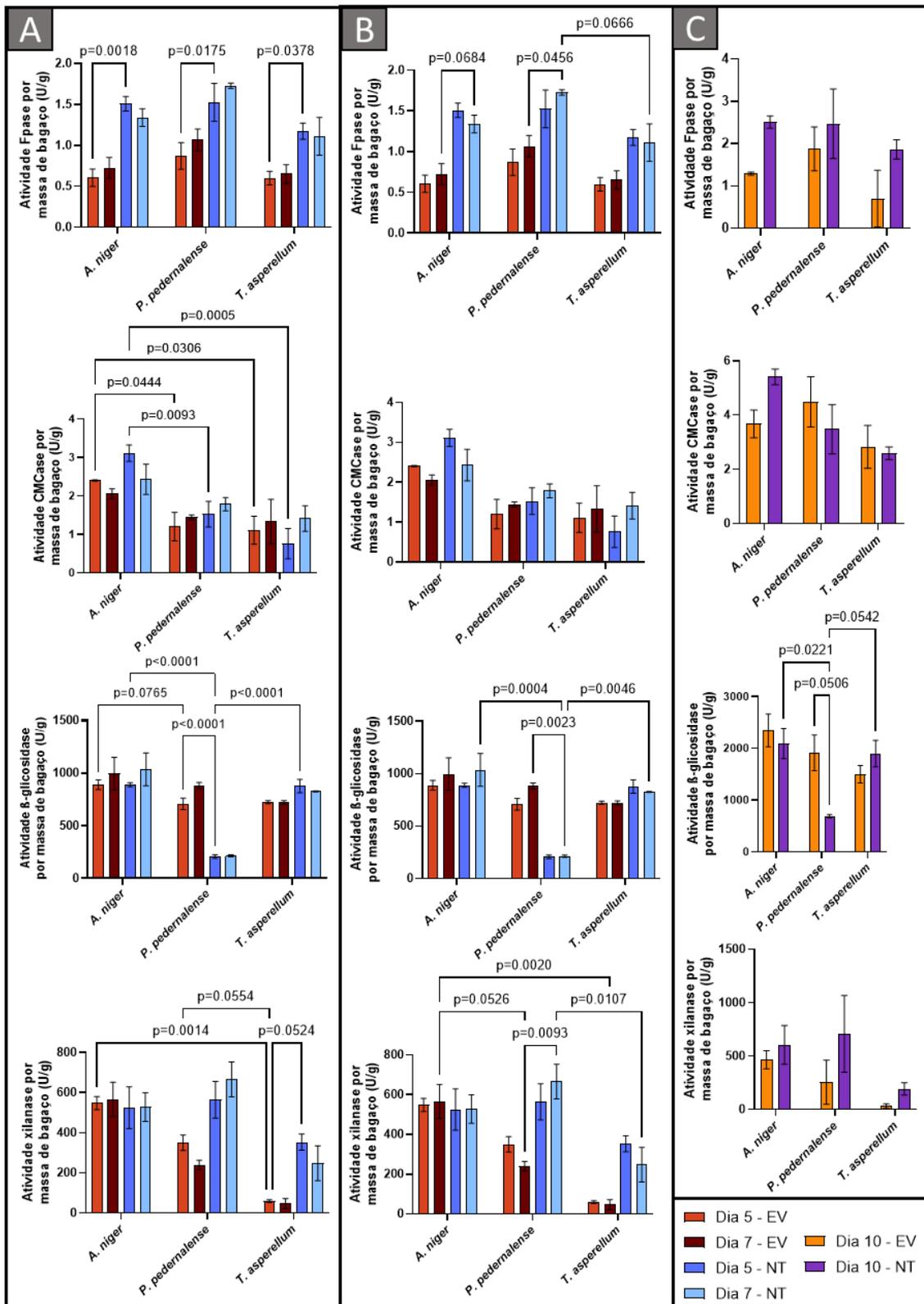


Figura 4-8: Atividades enzimáticas produzidas por *A. niger* 5J, *T. asperellum* FEV e *P. pedernalense* F4B1, com respectivas análises estatísticas. São apresentados os resultados das comparações múltiplas para os dias 5 (A), 7 (B) ou 10 (C). São mostradas apenas as comparações par-a-par nas quais é alternada uma variável por vez. Onde não há comparações, não houve diferença significativa ($p > 0,1$). Barras de erro: EPM. “EV”: bagaço pré-tratado por explosão a vapor; “NT”: bagaço *in natura*.

Os resultados (Figura 4-8) mostram que entre os fungos estudados, *T. asperellum* FEV apresentou as menores produções ou sem diferença significativa detectada, exceto na comparação com *P. pedernalense* F4B1 para produção de β -glicosidase usando bagaço não tratado nos dias 5, 7 e 10.

Já os melhores resultados foram da cepa de *A. niger*, que apresentou produções maiores do que os outros fungos, ou sem diferença significativa em todas as comparações. Apenas para atividades FPase e para endoxilanase usando bagaço de cana *in natura* as médias dos resultados de *P. pedernalense* foram maiores que de *A. niger*, mas com p-valores maiores que 0,1. Quanto aos bagaços usados, obteve-se atividades maiores ou semelhantes em quase todos os casos utilizando o bagaço *in natura*, exceto para produção de β -glicosidase utilizando *P. pedernalense*.

Quanto aos tempos, não é possível comparar o dia 10 com os outros dias, uma vez que a extração foi realizada de forma muito diferente. Para cada enzima, foram realizados também análises de variância *1way* apenas com os dados dos dias 5 e 7, todos lado a lado, e comparações múltiplas apenas entre os pares onde foi usado o mesmo fungo e bagaço, diferenciando apenas os dias (e.g. "*A. niger in natura* dia 5" vs "*A.niger in natura* dia 7"). Todas essas comparações rejeitaram a hipótese de médias iguais ($\alpha=0,1$) e o menor p-valor foi de $p=0,23$, para a comparação entre os dias 5 e 7 com *P. pedernalense* usando bagaço pré-tratado por explosão a vapor.

As atividades apresentadas foram descontadas da média das atividades no dia 0, então estes valores não foram explicitados nos gráficos. Por isso, é importante ressaltar que foram medidas atividades maiores nos dias 0 utilizando bagaço tratado por explosão a vapor do que no bagaço não tratado (*in natura*). Essas medidas fazem diferença, especialmente para as análises de FPase e CMCase. Para FPase, a média das atividades no dia 0 foi de 1,02U/g usando o bagaço pré-tratado, e 0,21U/g usando o bagaço *in natura*. Para CMCase, estes valores foram, respectivamente, 1,17U/g e 0,10U/g. Novas amostras de tempos 0 foram preparadas, extraídas, filtradas e analisadas em diferentes laboratórios (LEPM e LTM), com resultados semelhantes se repetindo. Para endoxilanase, a média dos dias 0 usando bagaço pré-tratado também foi um pouco maior do que para o bagaço *in natura*, mas esta diferença foi muito pequena, se

comparada ao valor total de atividade das amostras (40U/g). Para β -glicosidase, esse fenômeno não aconteceu.

Em todas as análises desta seção, as amostras apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk $p < 0,5$), exceto para as análises de β -glicosidase do dia 7, em particular nas amostras de *A. niger* usando o bagaço pré-tratado e *in natura* (Shapiro-Wilk $p = 0,0071$ e $0,0327$) e *T. asperellum* usando bagaço pré-tratado (Shapiro-Wilk $p = 0,0201$). Neste caso, os resultados das análises múltiplas onde a hipótese de médias iguais é rejeitada só foram considerados porque os p-valores obtidos nas comparações múltiplas são muito menores que o nível de significância definido.

4.4 ESTUDO DE PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO: PLANEJAMENTO FATORIAL

A partir dos resultados anteriores, foi realizado um planejamento fatorial completo para o estudo de 3 fatores em dois níveis (2^3), com triplicata do ponto central, usando apenas o fungo *Aspergillus niger* 5J e o bagaço de cana *in natura*. Foram estudadas as variáveis concentração de extrato de levedura preparado (medido como nitrogênio orgânico), concentração de NaNO_3 e concentração inicial de conídios. Para estes experimentos, o pH inicial foi medido, sendo este igual a 4,7. Foram dosadas as atividades FPase, CMCase, β -glicosidase e endoxilase.

A seguir são apresentadas algumas fotografias dos cultivos, após um, dois e três dias de fermentação em estado sólido, apresentando o crescimento do micélio de *Aspergillus niger* 5J nos experimentos 9, 10 e 11, que correspondem ao ponto central (Figuras 4.9 a 4.11). Ao longo das 72h de fermentação, observou-se que houve crescimento expressivo do micélio fúngico em todos os experimentos. Isso pode ser verificado nas fotografias por meio do escurecimento do bagaço, característico da formação de conídios de *Aspergillus*.

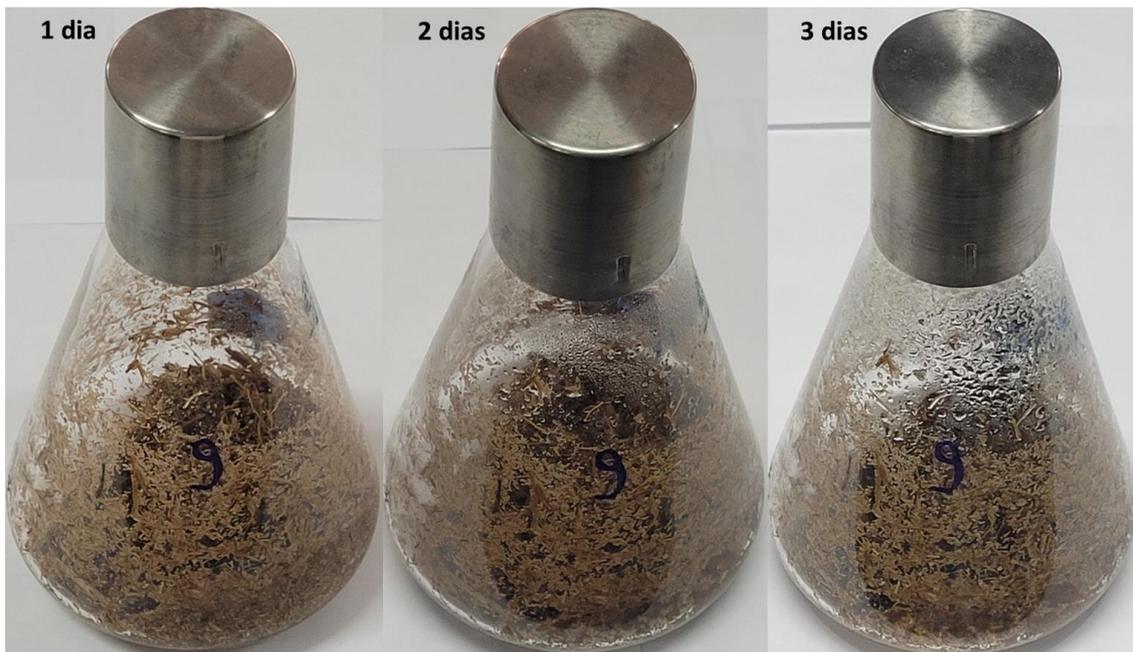


Figura 4-9: Fotografias do experimento 9 (ponto central) do planejamento fatorial 2^3 após 1, 2 e 3 dias de fermentação em estado sólido.

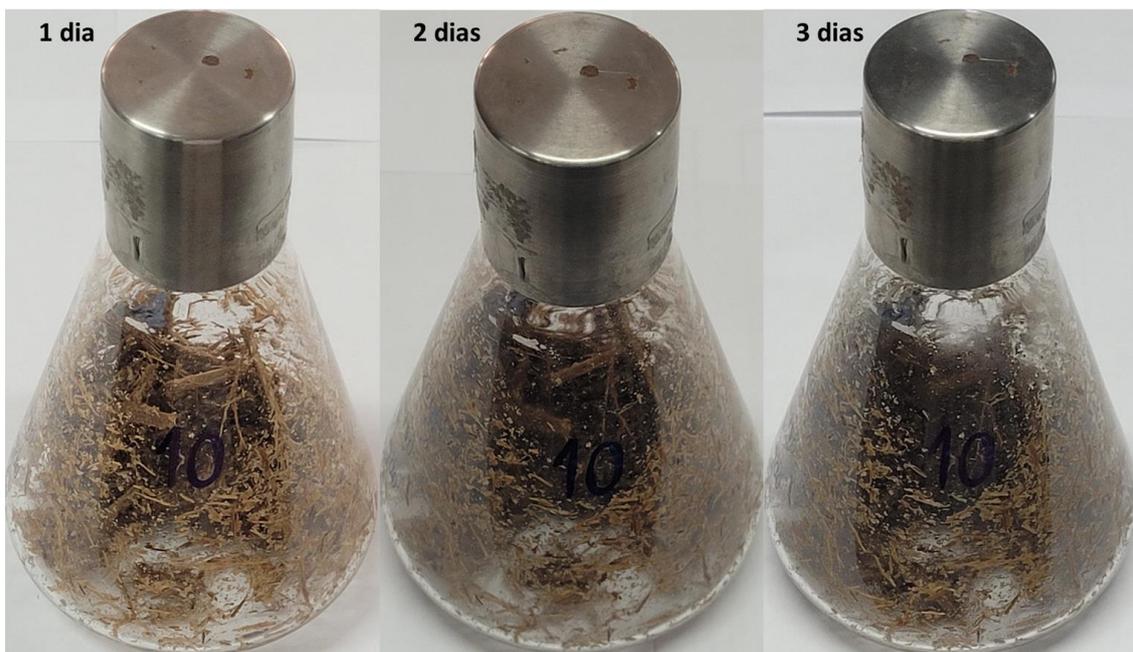


Figura 4-10: Fotografias do experimento 10 (ponto central) do planejamento fatorial 2^3 após 1, 2 e 3 dias de fermentação em estado sólido.

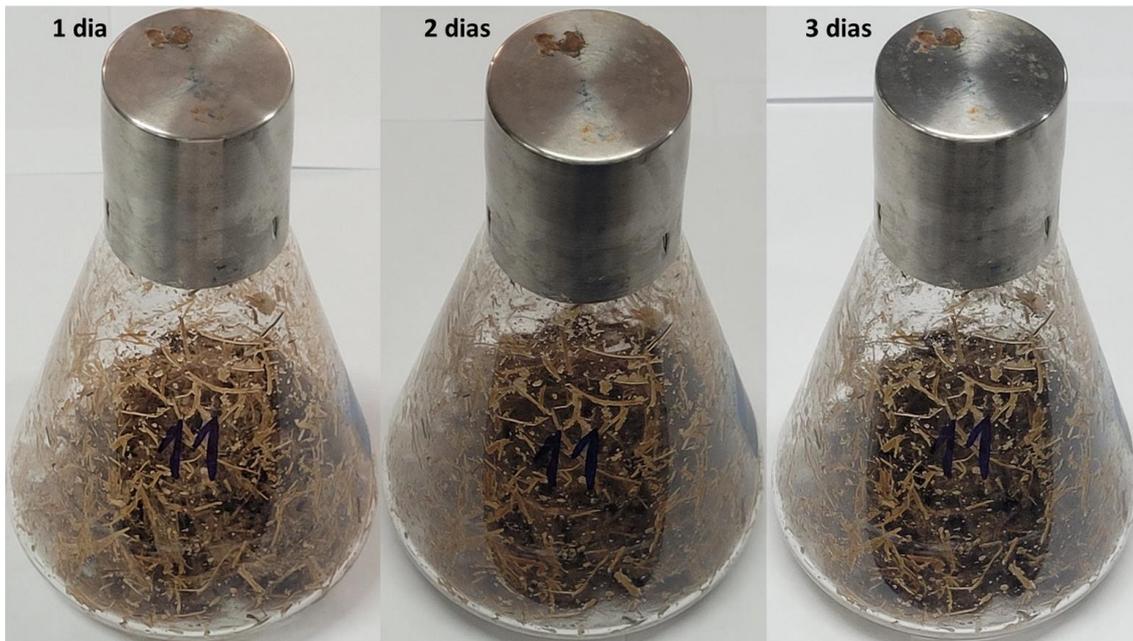


Figura 4-11: Fotografias do experimento 11 (ponto central) do planejamento fatorial 2^3 após 1, 2 e 3 dias de fermentação em estado sólido.

4.4.1 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Os valores de atividade para cada enzima e experimento estão apresentados na forma das tabelas 8-9 até 8-12 (Apêndice 3). Aqui estão apresentados os resultados na forma de gráfico para melhor visualização (Figura 4-12, Figura 4-13, Figura 4-14 e Figura 4-15).

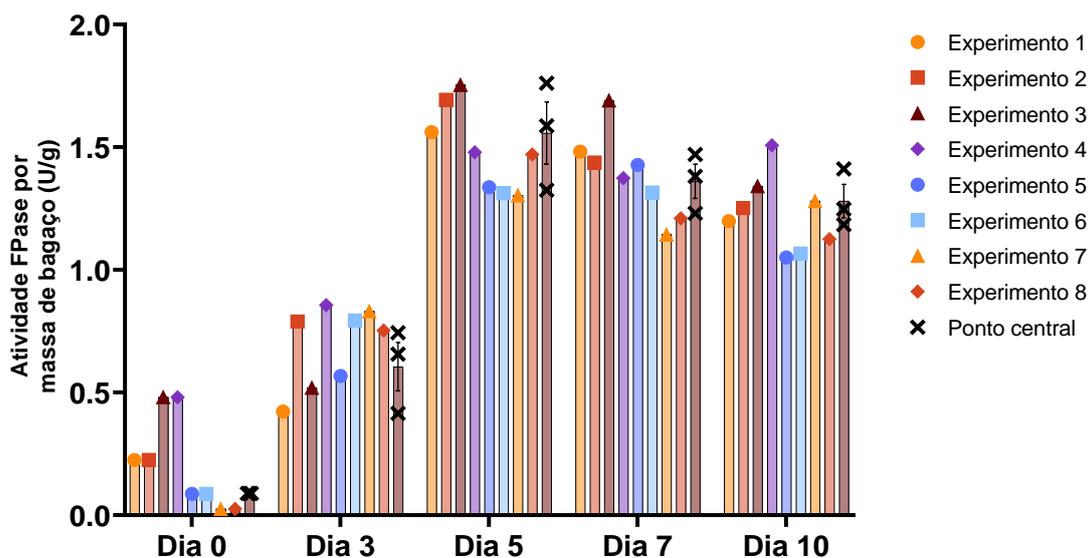


Figura 4-12: Atividades FPase produzidas por *A. niger* 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais. Barras de erro: EPM.

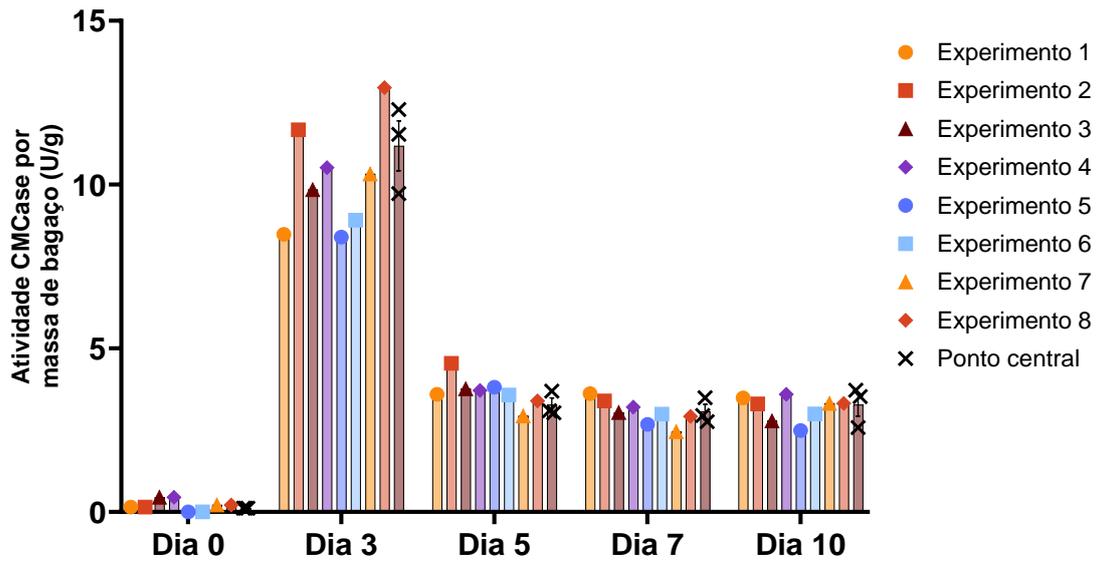


Figura 4-13: Atividades CMCase produzidas por *A. niger* 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais. Barras de erro: EPM.

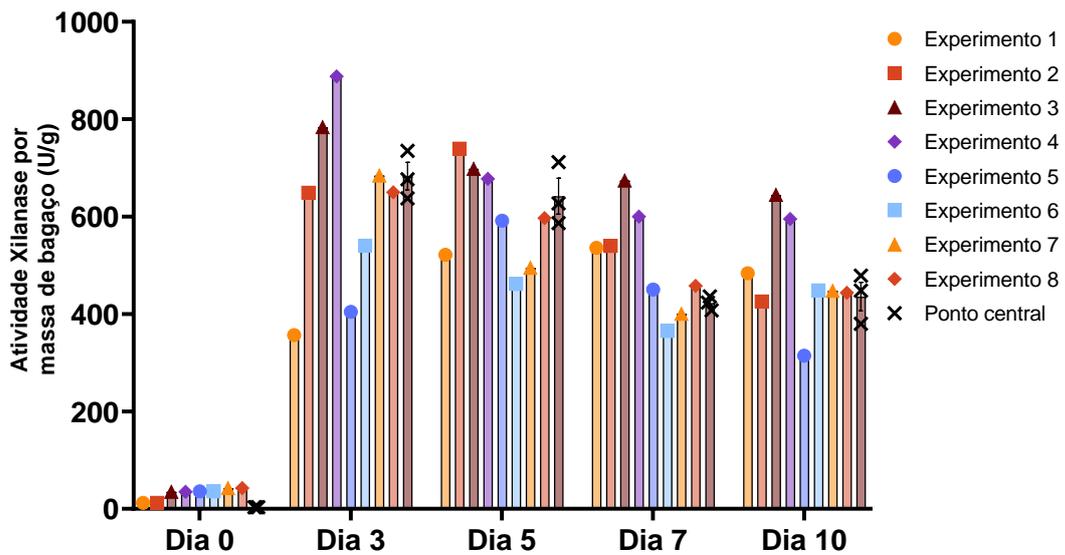


Figura 4-14: Atividades endoxilanase produzidas por *A. niger* 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais. Barras de erro: EPM.

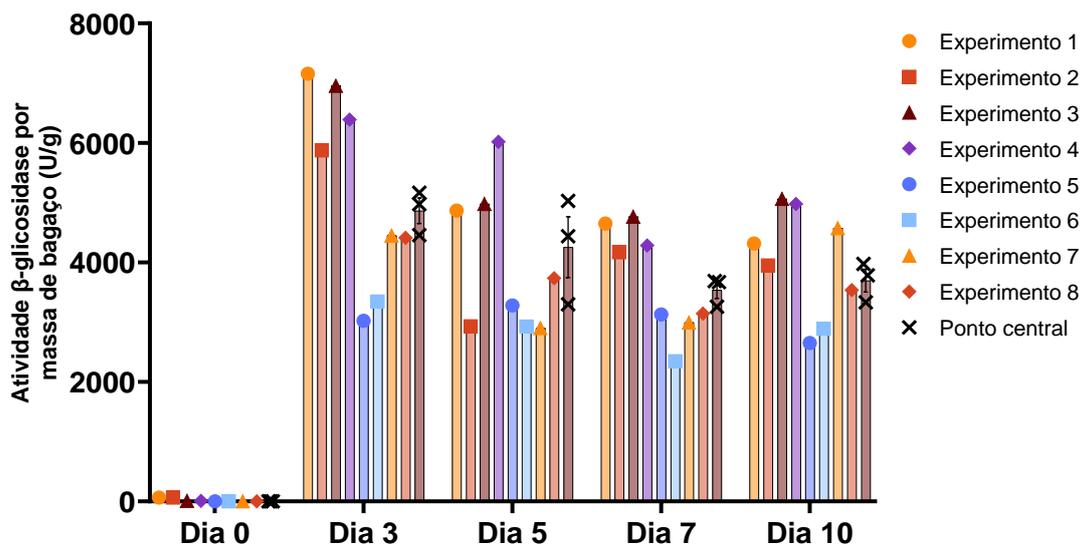


Figura 4-15: Atividades β-glicosidase produzidas por *A. niger* 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais. Barras de erro: EPM.

A partir desses resultados, observou-se que as maiores atividades enzimáticas máximas (entre os experimentos 1 a 11) foram obtidas no 3º dia de cultivo, exceto para a atividade FPase. Para esta atividade, o valor máximo foi obtido no experimento 11, do dia 5, que faz parte das réplicas do ponto central. No entanto, a média dessas réplicas (1,56U/g) foi menor do que o valor de 1,75U/g, obtido no experimento 3 deste mesmo dia, o qual teve as variáveis codificadas (1; -1; 1). O valor máximo para CMCase, de 12,96U/g, ocorreu no experimento 8 (-1; -1; -1) do dia 3. Para β-glicosidase, o máximo foi 7155U/g, ocorrido no experimento 1 do dia 3 (1; 1; 1). Para endoxilanase, o máximo de 888,0U/g foi alcançado no experimento 4 (1; -1; -1) do dia 3.

4.4.2 PRODUTIVIDADES DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Foram calculadas também as produtividades, ou seja, as atividades enzimáticas obtidas por tempo de cultivo. Para isso, descontou-se os resultados do dia 0 das amostras correspondentes e esses resultados foram divididos pelo número de dias de incubação, ajustados pelas horas exatas de retirada de amostras.

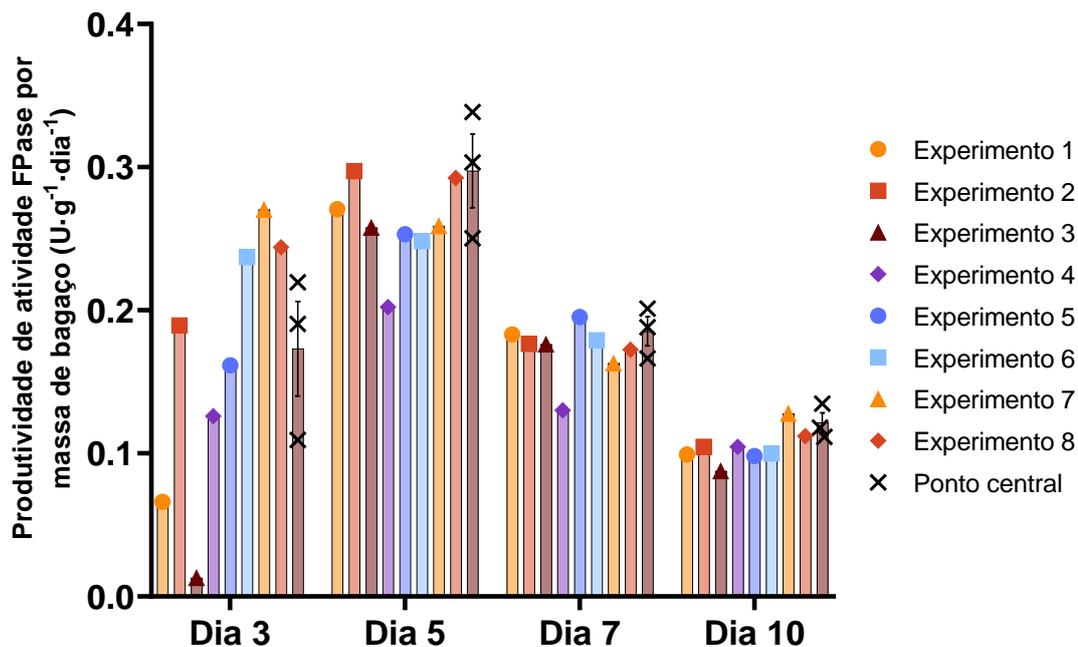


Figura 4-16: Produtividades de atividade FPase obtidas por *A. niger* 5J no experimento de planejamento fatorial 2³, com 3 pontos centrais. Barras de erro: EPM.

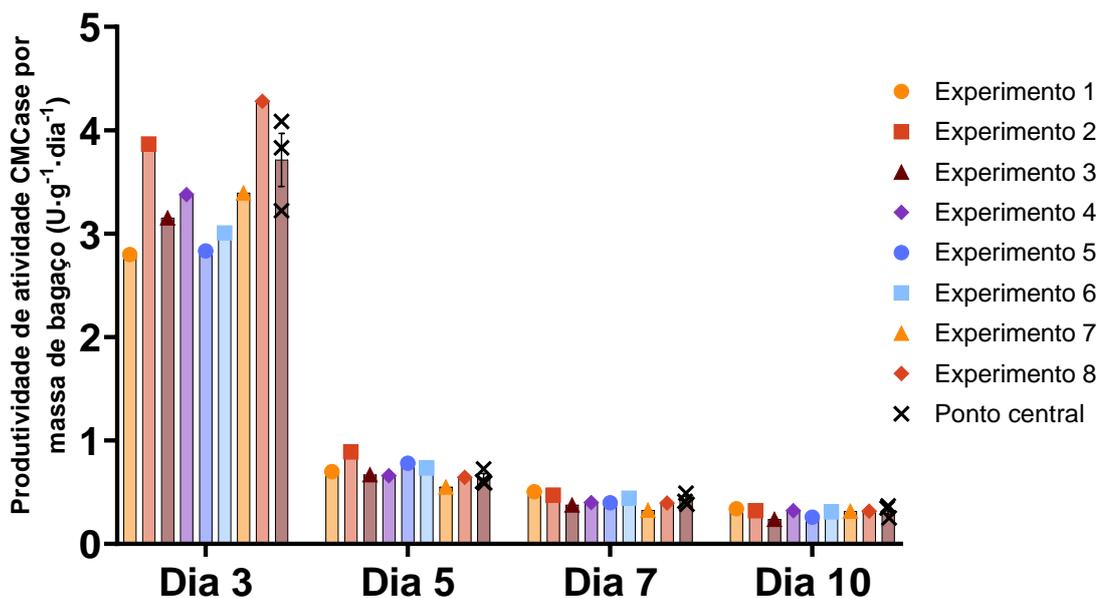


Figura 4-17: Produtividades de atividade CMCase obtidas por *A. niger* 5J no experimento de planejamento fatorial 2³, com 3 pontos centrais. Barras de erro: EPM.

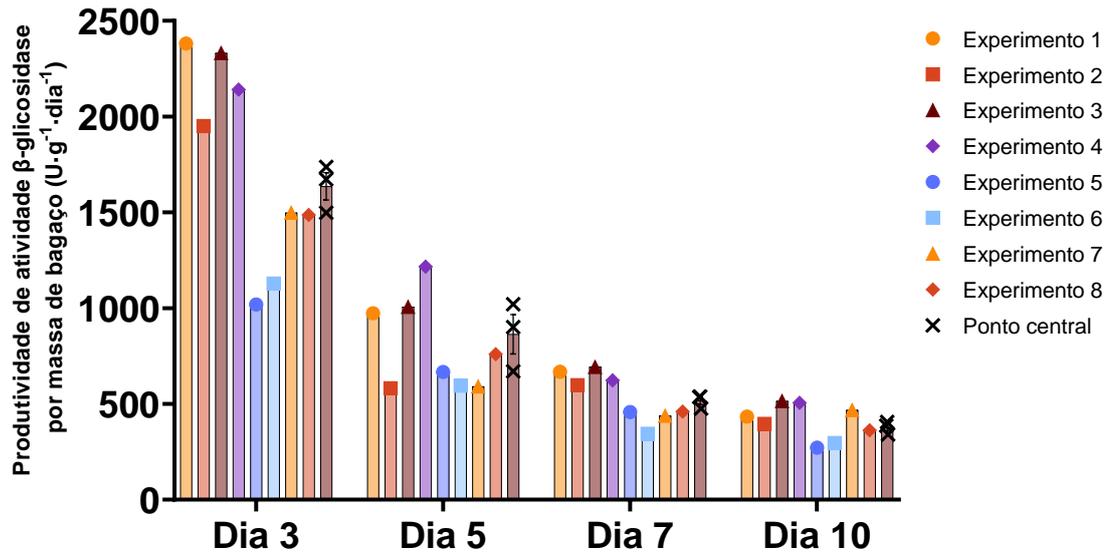


Figura 4-18: Produtividades de atividade β -glicosidase obtidas por *A. niger* 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais. Barras de erro: EPM.

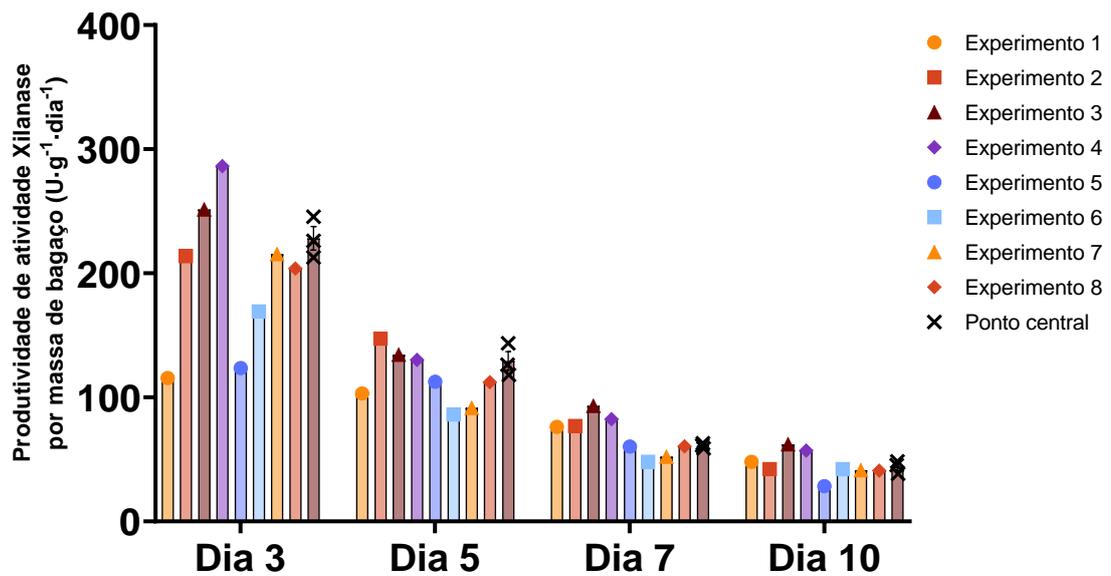


Figura 4-19: Produtividades de atividade endoxilanase obtidas por *A. niger* 5J no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com 3 pontos centrais. Barras de erro: EPM.

A partir desses cálculos, observa-se que os experimentos que levaram aos valores máximos de produtividade são os mesmos que levaram aos valores máximos de produção, exceto para a produtividade de atividade FPase. Nesta, o máximo experimental encontra-se no ponto central do dia 5, com média de 0,30 U/g/dia. No entanto, este valor foi quase igual ao alcançado no experimento 2 (1; 1; -1), com diferença apenas na quarta casa decimal. Para esta enzima, é possível observar também que a produtividade máxima obtida no dia 3 ocorreu

no experimento 7 (1; -1; 1), que alcançou 0,27 U/g/dia, mesmo valor da média das amostras do dia 5.

4.4.3 ANÁLISES DE VARIÂNCIA CONSIDERANDO TODOS OS FATORES

A partir das produtividades obtidas para o dia 3, foram feitas as análises de variância a partir do modelo de planejamento experimental fatorial. A seguir são apresentados apenas os gráficos de Pareto relativos às análises de variância completas, incluindo todos os fatores e interações possíveis, tendo como variáveis resposta (variáveis dependentes) a produtividade de cada enzima. Com esses gráficos, é possível visualizar quais variáveis independentes provocam maiores alterações nas variáveis dependentes e com que grau de significância. Também pode-se observar em que sentido essas correlações estão, baseado nos valores dos efeitos estimados. A cada análise, obteve-se também o coeficiente de determinação, ou de correlação (R^2) e o valor desse coeficiente ajustado pelo número de variáveis preditoras disponíveis no modelo ($R^2_{ajustado}$). Essas duas medidas variam de 0 a 1 e demonstram maior ajuste ao modelo quanto mais próximo de 1 estiverem.

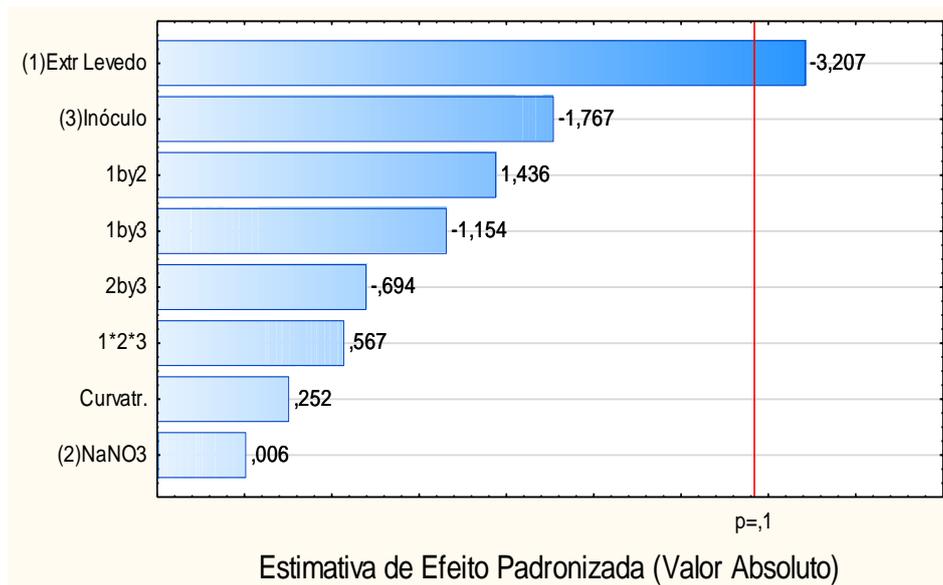


Figura 4-20: gráfico de Pareto completo da produtividade de atividade FPase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

O fator que interfere na produtividade de atividade FPase com maior significância é o extrato de levedura, com um efeito negativo, enquanto o fator

mais distante de provocar alterações na variável dependente é o NaNO_3 . Para este modelo, o valor de R^2 é 0,898 e R^2_{ajustado} é igual a 0,492.

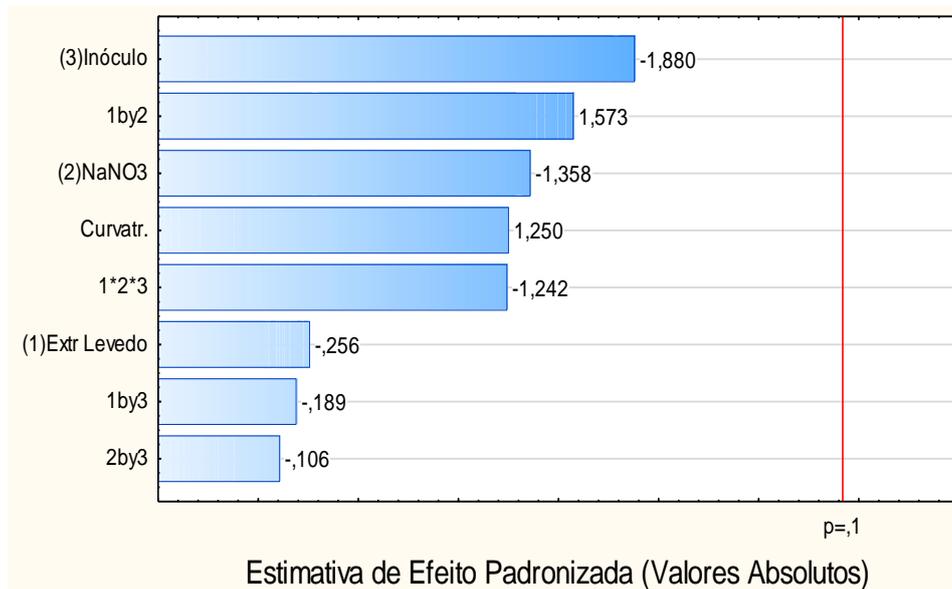


Figura 4-21: gráfico de Pareto completo da produtividade de atividade CMCCase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

Para CMCCase a análise de variância considerando todas os fatores possíveis apresentou um R^2_{ajustado} muito distante de 1 (0,235) e $R^2=0,847$. Nenhuma das variáveis teve efeito significativo sobre a produtividade da atividade enzimática.



Figura 4-22: gráfico de Pareto completo da produtividade de atividade β -glicosidase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

Para β -glicosidase, o extrato de levedura tem um efeito positivo e altamente significativo. O NaNO_3 está próximo de α , sendo apenas marginalmente significativo. $R^2=0,985$ e $R^2_{\text{ajustado}}=0,925$, podendo ser considerado um bom ajuste aos dados.



Figura 4-23: gráfico de Pareto completo da produtividade de atividade endoxilanase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

Para a produtividade de atividade endoxilanase, todas as variáveis principais foram significativas, mas não as interações. A curvatura esteve próxima de α , mas não foi significativa. Os valores de R^2 e de R^2_{ajustado} foram 0,903 e 0,758, respectivamente.

4.4.4 ANÁLISES DE VARIÂNCIA E MODELOS SIMPLIFICADOS BASEADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3

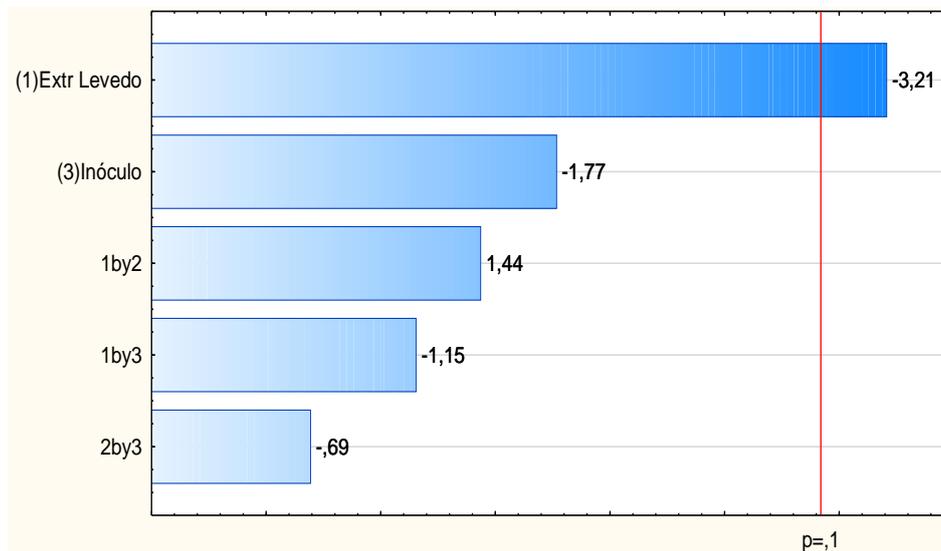
Após essas análises, os modelos foram simplificados, removendo os efeitos não significativos com menores valores de p , um por vez, e tendo como critério principal o valor de R^2_{ajustado} e, em segundo lugar, a falta de ajuste ao modelo (*lack of fit*). Isso porque o coeficiente de determinação ajustado permite a comparação de ajuste ao modelo com diferentes números de variáveis preditoras, diferente do R^2 simples. Em todas as simplificações, algumas

variáveis não significativas ($p > 0,1$) ainda tiveram que ser consideradas no modelo porque ao ignorar alguma delas, o $R^2_{ajustado}$ diminuía.

Nas análises apresentadas, em nenhum dos casos a curvatura teve efeito significativo e em nenhum momento durante todas essas simplificações isso deixou de ser verdade. Então por fim, o efeito da curvatura também foi ignorado, de forma que os modelos podem ser considerados lineares.

Tabela 4-2: Análise de variância (ANOVA) do modelo simplificado de produtividade de atividade FPase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central. $R^2=0,8788$; $R^2_{ajustado}=0,7575$.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
(1) Extrato de Levedo	0,033591	1	0,033591	10,28475	0,085016
(3) Log10 (conídios)	0,010200	1	0,010200	3,12309	0,219224
1 by 2	0,006738	1	0,006738	2,06305	0,287428
1 by 3	0,004350	1	0,004350	1,33181	0,367761
2 by 3	0,001574	1	0,001574	0,48185	0,559377
Falta de ajuste	0,001257	3	0,000419	0,12825	0,935194
Erro puro	0,006532	2	0,003266		
Total SS	0,064242	10			



Estimativa de Efeito Padronizada (Valor Absoluto)

Figura 4-24: gráfico de Pareto do modelo simplificado de produtividade de atividade FPase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

Simplificando o modelo, o mesmo fator continuou significativo, com efeito no mesmo sentido: extrato de levedura. A coeficiente de determinação ajustado

aumentou para $R^2_{ajustado}=0,757$ e o R^2 simples diminuiu um pouco, para 0,879. Além disso, a falta de ajuste (*lack of fit*) não foi significativa.

Tabela 4-3: Análise de variância (ANOVA) do modelo simplificado de produtividade de atividade CMCCase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central. $R^2=0,7239$; $R^2_{ajustado}=0,4478$.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
(1) Extrato de Levedo	0,012903	1	0,012903	0,065781	0,821553
(2) NaNO ₃	0,361705	1	0,361705	1,844017	0,307388
(3) Log10 (conídios)	0,693052	1	0,693052	3,533267	0,200907
1*2	0,485646	1	0,485646	2,475883	0,256252
1*2*3	0,302748	1	0,302748	1,543449	0,340017
Falta de ajuste	0,315595	3	0,105198	0,536314	0,702326
Erro puro	0,392301	2	0,196151		
Total SS	2,563951	10			

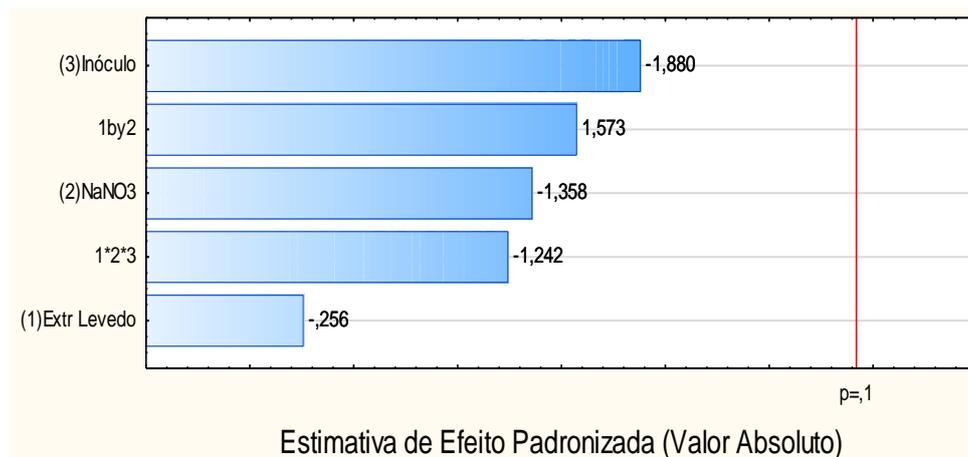


Figura 4-25: gráfico de Pareto do modelo simplificado de produtividade de atividade CMCCase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

Para CMCCase, apesar de ainda muito baixo, o $R^2_{ajustado}$ aumentou um pouco com a simplificação, sendo este valor igual a 0,448 e $R^2=0,724$. O p-valor da falta de ajuste não apresentou significância. Apesar disso, nenhum fator se tornou significativo, o que significa que qualquer valor das variáveis no domínio estudado leva à máxima produção.

Tabela 4-4: Análise de variância (ANOVA) do modelo simplificado de produtividade de atividade β -glicosidase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central. $R^2=0,9722$; $R^2_{ajustado}=0,9304$.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
(1) Extrato de Levedo	1684637	1	1684637	110,4813	0,008930
(2) NaNO_3	119928	1	119928	7,8651	0,107103
(3) Log10 (conídios)	34256	1	34256	2,2465	0,272657
1*2	60399	1	60399	3,9611	0,184837
1*3	64521	1	64521	4,2314	0,175958
1*2*3	16368	1	16368	1,0734	0,409014
Falta de ajuste	26206	2	13103	0,8593	0,537836
Erro puro	30496	2	15248		
Total SS	2036811	10			

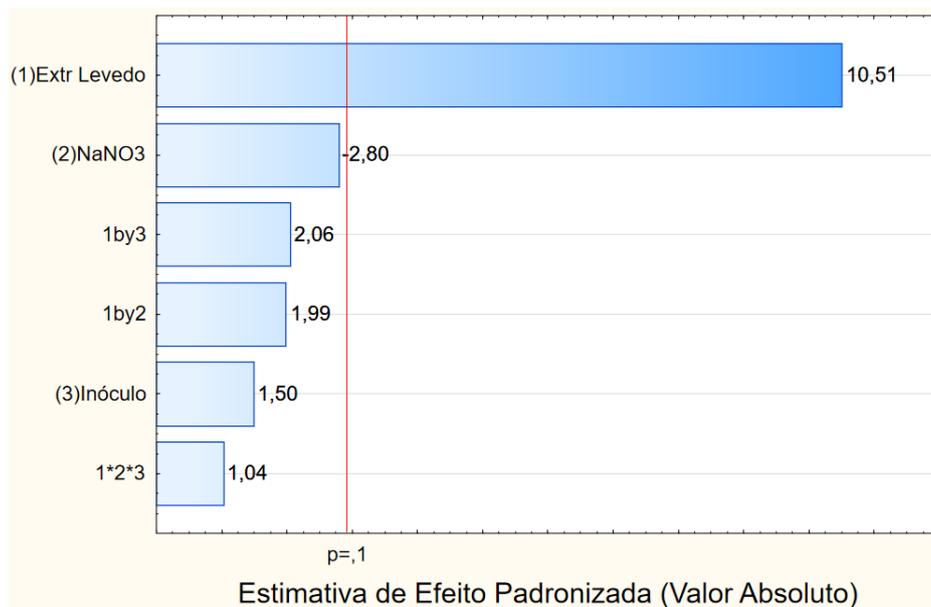


Figura 4-26: gráfico de Pareto do modelo simplificado de produtividade de atividade β -glicosidase obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

Para β -glicosidase, o modelo simplificado apresentou $R^2=0,97216$ e $R^2_{ajustado}=0,9304$, muito próximos da análise de variância envolvendo todos os fatores. Apenas a variável extrato de levedura foi significativa, com efeito positivo. O nitrato de sódio esteve próximo do nível de significância, com $p=0,107$, sendo apenas marginalmente significativo.

Tabela 4-5: Análise de variância (ANOVA) do modelo simplificado de produtividade de atividade endoxilanas obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central. $R^2=0,9034$; $R^2_{ajustado}=0,7585$.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	p-valor
(1) Extr Levedo	2998,44	1	2998,44	10,97307	0,080307
(2) NaNO_3	14012,54	1	14012,54	51,28027	0,018948
(3) Log10 (conídios)	3494,53	1	3494,53	12,78859	0,070075
1*2	843,20	1	843,20	3,08577	0,221061
1*3	1227,03	1	1227,03	4,49044	0,168222
2*3	1812,59	1	1812,59	6,63334	0,123450
Falta de ajuste	2060,91	2	1030,45	3,77105	0,209598
Erro puro	546,51	2	273,25		
Total SS	26995,74	10			

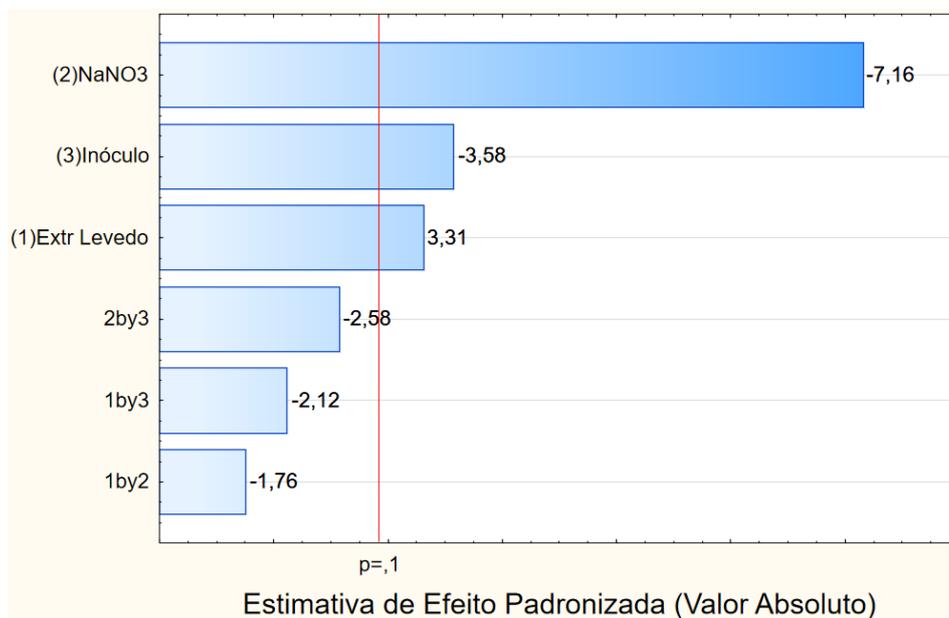


Figura 4-27: gráfico de Pareto do modelo simplificado de produtividade de atividade endoxilanas obtida com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

Para endoxilanas, a concentração de nitrato de sódio apresentou o maior p-valor, com efeito no sentido negativo. Após ele está a quantidade de conídios adicionada, também com efeito negativo e então a quantidade de extrato de levedura, com efeito positivo. Nenhuma das interações entre fatores foi significativa. $R^2=0,903$ e $R^2_{ajustado}=0,758$, demonstrando um ajuste do modelo simplificado um pouco pior do que o modelo com todos os fatores. Isto ocorreu após o efeito da curvatura ser ignorado, o qual havia apresentado um p-valor próximo do nível de significância definido ($p=0,111$), mas ainda não significativo. Apesar disso, esse efeito permaneceu sendo ignorado para que fosse possível

calcular os coeficientes de regressão considerando válida a hipótese de linearidade.

Assim, determinados os modelos, foi possível calcular os efeitos estimados dos fatores nas variáveis dependentes, bem como seus coeficientes de regressão. Com estes, é possível estabelecer as equações que correlacionam os fatores com cada variável dependente (Tabela 4-6). As estimativas de efeitos são feitas com base no modelo normalizado, no qual as variáveis estão no intervalo entre -1 e 1. Também são apresentadas as equações, com coeficientes calculados com as variáveis normalizadas e absolutas (entre os intervalos definidos no domínio - Tabela 3-1).

Tabela 4-6: Efeitos estimados, e equações obtidas com planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central. Eq norm: equação para fatores normalizados [-1;1]. Eq absol: equações para os valores absolutos das variáveis, em termos de quantidade adicionada por 5g de bagaço. “n/a”: fatores ignorados nos modelos. As variáveis dependentes, na primeira coluna, são produtividades de atividade enzimática (U/g/dia). Em vermelho estão os fatores significativos ($p < 0,1$) em cada modelo.

		Fatores							
		Linear	Extr. lev (1)	NaNO ₃ (2)	Inóculo (3)	1*2	1*3	2*3	1*2*3
FPase	Efeito	0,166	-0,130	n/a	-0,0714	0,0580	-0,0466	-0,0281	n/a
	p-valor	0,011	0,085	n/a	0,219	0,287	0,368	0,559	n/a
	Eq norm	$y = ,166 - ,0648x_1 - ,0357x_3 + ,0290x_1x_2 - ,0233x_1x_3 - ,0140x_2x_3$							
	Eq absol	$y = ,268 + ,00470x_1 + ,0082x_3 + ,000017x_1x_2 - ,00233x_1x_3 - ,00004x_2x_3$							
CMCase	Efeito	3,44	-0,0803	-0,425	-0,589	0,493	n/a	n/a	-0,389
	p-valor	0,002	0,822	0,307	0,201	0,256	n/a	n/a	0,340
	Eq norm	$y = 3,44 - ,0402x_1 - ,213x_2 - ,294x_3 + ,246x_1x_2 - ,194x_1x_2x_3$							
	Eq absol	$y = 5,463 - ,0341x_1 - ,00323x_2 - ,195x_3 + ,000328x_1x_2 - ,0000299x_1x_2x_3$							
β -glicosidase	Efeito	1713	918	-245	131	174	180	n/a	90,5
	p-valor	0,0005	0,009	0,107	0,273	0,185	0,176	n/a	0,409
	Eq norm	$y = 1713 + 458,9x_1 - 122,4x_2 + 65,4x_3 + 86,9x_1x_2 + 89,8x_1x_3 + 45,2x_1x_2x_3$							
	Eq absol	$y = 1777 - 5,980x_1 - 1,4x_2 - 69,3x_3 - ,0254x_1x_2 + 6,45x_1x_3 + ,0115x_1x_2x_3$							
Endoxilianase	Efeito	206	38,7	-83,7	-41,8	-20,5	-24,8	-30,1	n/a
	p-valor	0,001	0,0803	0,0189	0,0701	0,221	0,168	0,123	n/a
	Eq norm	$y = 206 + 19,4x_1 - 41,9x_2 - 20,9x_3 - 10,3x_1x_2 - 12,4x_1x_3 - 15,1x_2x_3$							
	Eq absol	$y = 106 + 11,1x_1 + ,388x_2 + 16,1x_3 - ,0057x_1x_2 - 1,24x_1x_3 - ,0836x_2x_3$							

A partir da informação de que a curvatura não foi significativa e o ajuste do modelo foi bom para todas as produtividades, podemos considerar lineares os modelos que descrevem a dependência da produtividade de cada enzima com as variáveis independentes. Para determinar as condições ótimas de produção, o modelo é sempre utilizado. No caso de modelos lineares, podem ser levados em conta os sinais (direção) das estimativas de efeito de cada fator, já que demonstram sua contribuição no cálculo final da produtividade a partir do modelo normalizado. Nesta análise e tomada de decisões, pode-se olhar apenas para os valores das variáveis com efeitos significativos ($p < 0,1$) (valores em vermelho - Tabela 4-6) e ignorar as outras variáveis.

Para a produtividade de endoxilanase, o efeito estimado da concentração de extrato de levedura é positivo, enquanto os efeitos para a concentração de NaNO_3 e de inóculo são negativos. Assim, o ponto máximo de produtividade de atividade para a endoxilanase dentro do domínio estudado deverá ocorrer no valor máximo de extrato de levedura (25mgN/5g de bagaço), mínimo de NaNO_3 (40mg/5g de bagaço) e mínimo de inóculo (10^5 conídios/5g de bagaço).

Tabela 4-7: Valores das variáveis independentes para produtividade máxima de atividade endoxilanase dentro do domínio.

Variável independente	Valor no ponto máximo escolhido
Extrato de levedura	25 mgN/5g bagaço
NaNO_3	40mg/5g de bagaço
Inóculo	$2,5 \cdot 10^5$ conídios/5g de bagaço

Para a β -glicosidase o efeito estimado da concentração de extrato de levedura também é positivo, então o valor máximo de extrato de levedura (25mgN/5g de bagaço) deve ser o escolhido para sua produção. Já as concentrações de NaNO_3 e de conídios não foram significativas. Isso quer dizer que podem ser escolhidos quaisquer valores para essas variáveis dentro do domínio estudado. A melhor escolha é o valor mínimo de concentração de NaNO_3 e de conídios, o que pode contribuir para diminuir o custo da produção e também representa a mesma condição de produtividade máxima de endoxilanase (Tabela 4-7).

Para a CMCase o valor de cada variável independente pode ser qualquer um dentro do domínio, uma vez que nenhum dos fatores teve efeito significativo.

Considerando que a produção de todas as enzimas será realizada ao mesmo tempo, a melhor escolha é a que considera os mesmos valores escolhidos para a β -glicosidase e endoxilanase (Tabela 4-7).

No entanto, para atividade FPase, o efeito estimado da concentração de extrato de levedura é contrário à sua produtividade, o que está em conflito com os efeitos para β -glicosidase e endoxilanase. Em comparação com outros resultados encontrados na literatura, a produção de celulasas totais neste trabalho, medida pela atividade FPase, está entre as mais baixas. Já as produções de endoxilanase e β -glicosidase encontram-se próximas das mais altas já relatadas (GRIGOREVSKI-LIMA et al., 2013; KAUR et al., 2020; MORÁN-AGUILAR et al., 2021; TEIXEIRA et al., 2021). Assim, optou-se por privilegiar estas duas últimas enzimas nos experimentos subsequentes, com a escolha do ponto máximo mencionada anteriormente (Tabela 4-7).

4.4.5 VALIDAÇÃO DO PONTO MÁXIMO ESCOLHIDO

As condições escolhidas para a produção foram: 72h de fermentação, concentração de extrato de levedura de 25mgN/5g de bagaço, concentração de NaNO_3 de 40mg/5g de bagaço e concentração inicial de conídios de 10^5 conídios/5g de bagaço. Os valores de atividade enzimática previstos pelo modelo para esta condição são (obtidos multiplicando as produtividades previstas pelo modelo por 3 dias): 0,370U/g para FPase; 10,8U/g para CMCase; 6.312,0U/g para β -glicosidase; e 887,0U/g para endoxilanase. Para validar este resultado, o experimento foi repetido nas mesmas condições em quadruplicata.

Assim, após a fermentação por 72h, foram dosadas atividades endoxilanase e β -glicosidase. Além disso, foram dosadas atividades β -xilosidase, com a finalidade de obter um quadro mais geral da produção de endoxilanase (Tabela 4-8 e Tabela 4-9). Atividades FPase e CMCase não foram dosadas, uma vez que o modelo indica produtividades mais baixas dessas atividades, em comparação com as outras e com a literatura. Adicionalmente, foi realizada uma extração a mais, com o mesmo volume da anterior, para avaliar a presença de enzima remanescente no bagaço.

Tabela 4-8: Atividades enzimáticas obtidas na repetição do ponto máximo do planejamento fatorial e sua estatística descritiva.

Atividades enzimáticas (U/g)		
Endoxilanase	β-xilosidase	β-glicosidase

	Extr.1	Extr.2	Extr.1	Extr.2	Extr.1	Extr.2
Réplica A	572	292	3617	1066	3950	2159
Réplica B	721	272	4643	855	4498	1991
Réplica C	713	242	4420	1213	5058	2240
Réplica D	759	244	3872	973	4430	2173
Média	691	263	4138	1027	4484	2141
Mediana	717	258	4146	1019	4464	2166
Desvio padrão	81,7	23,8	474,9	151,0	454,1	106,2
EPM	40,8	11,9	237,4	75,5	227,0	53,1

Tabela 4-9: Produtividades enzimáticas obtidas na repetição do ponto máximo do planejamento fatorial e sua estatística descritiva.

	Produtividades (U/g/dia)					
	Endoxilanase		β-xilosidase		β-glicosidase	
	Extr.1	Extr.2	Extr.1	Extr.2	Extr.1	Extr.2
Réplica A	191	97	1206	355	1317	720
Réplica B	240	91	1548	285	1499	664
Réplica C	238	81	1473	404	1686	747
Réplica D	253	81	1291	324	1477	724
Média	230	88	1379	342	1495	714
Mediana	239	86	1382	340	1488	722
Desvio padrão	27,2	7,9	158	50,3	151	35,4
EPM	13,6	4,0	79,1	25,2	75,7	17,7

As produtividades de atividades endoxilanase e β -glicosidase podem ser comparadas com as predições dos respectivos modelos (Tabela 4-10).

Tabela 4-10: Produtividades de atividade enzimática experimentais e preditas pelo modelo. Intervalos de confiança com $\alpha=0,1$.

	Produtividade (U/g/dia) – 1ª extração somente			
	Experimento de validação		Modelo do experimento fatorial	
	Média	Interv. de confiança	Previsto	Interv. de confiança
β-glicosidase	1495	(1317; 1673)	2104	(1751; 2457)
endoxilanase	230	(198,5; 262,5)	295,5	(251,2; 339,8)
β-xilosidase	1379	(1193; 1566)		

Nessas comparações, apenas a primeira extração foi considerada, visto que o modelo também foi elaborado com apenas uma extração. O resultado

previsto pelo modelo não foi reproduzido para β -glicosidase nem para endoxilanase, sendo observadas atividades abaixo do previsto. Mesmo com nível de confiança de 90% ($\alpha=0,1$), em nenhum dos casos, a média do experimento de validação está dentro do intervalo de confiança do modelo, e o valor central previsto pelo modelo também não está dentro do intervalo de confiança do experimento em nenhum dos casos. No caso da endoxilanase, apesar de a média do experimento de validação não estar dentro do intervalo de confiança do modelo, o valor máximo obtido entre as 4 réplicas (253 U/g/dia) está dentro do intervalo.

5. DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE LEVEDURA

O extrato de levedura é capaz de fornecer nitrogênio orgânico, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos e outros fatores de crescimento para um processo fermentativo, o que motivou sua escolha como parte do meio de cultivo. Grande parte da levedura residual produzida no Rio de Janeiro é proveniente da indústria cervejeira, uma vez que na indústria sucroalcooleira, pode-se utilizar o reciclo dessas células por mais gerações. Por isso, optou-se pela levedura cervejeira. No entanto, em um processo fermentativo sucroalcooleiro, as células se multiplicarão e eventualmente também se tornarão resíduos. Isso abre a possibilidade do seu uso em um processo integrado de produção de enzimas *on-site* a partir de bagaço de cana para produção de etanol de segunda geração com parâmetros semelhantes aos estudados neste trabalho.

5.1.1 AUTÓLISE DE LEVEDURAS: AVALIAÇÃO DO CHOQUE ÁCIDO E TEMPO DE INCUBAÇÃO

O experimento de autólise das leveduras foi baseado sobretudo no artigo de (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021). Nesse trabalho, também foi utilizada uma levedura utilizada na produção de cerveja do tipo *lager* (pilsen) e aqui tentou-se reproduzir as condições ótimas da autólise obtidas naquele trabalho: concentração de células secas durante a autólise de 7,5% e temperatura de 59°C. O êxito da autólise foi medido como nitrogênio orgânico. No trabalho citado, obteve-se o máximo de nitrogênio orgânico com o uso de um tratamento com choque ácido, utilizando 10µL de ácido sulfúrico concentrado por grama de células secas. No entanto, isso não foi reproduzido aqui. Além disso, no trabalho citado, a produção máxima ocorreu em 48h, enquanto no presente trabalho não houve diferença entre esses tempos.

O próprio artigo discute que a autólise é caracterizada pela elevação da atividade de enzimas como quitinases, proteases, lipases, nucleases, glicanases, manases, entre outras. Cada enzima tem temperaturas e pHs ótimos, de modo que a exposição a uma temperatura elevada ocasiona uma

ação enzimática sinérgica que degrada a parede celular, organelas e macromoléculas. Assim, todas essas características podem variar muito dependendo do mosto cervejeiro e da cepa de levedura utilizada. Além disso, o artigo realiza um tratamento prévio para precipitação de peptídeos (sobretudo apolares) e outras moléculas relacionadas ao amargor (*debittering*) (HU et al., 2023; RAHMA; RAO, 1984) por meio da lavagem com solução diluída de NaOH (seguida de mais uma lavagem com água), o que não foi realizado aqui. Isto pode ter influenciado no resultado, uma vez que peptídeos apolares não removidos neste processo podem ter facilitado a precipitação de outras proteínas e sua remoção na centrifugação pós-autólise.

Ainda assim, a produção máxima total de nitrogênio orgânico no experimento foi de 39,1%, em massa de proteínas por células secas. Este experimento se seguiu da autólise completa de quantidade maior de leveduras, nas mesmas condições da produção máxima. Neste caso, o rendimento alcançado foi de 44,7%. Já o percentual de sólidos secos solubilizados e extraídos no sobrenadante chegou a 59,36%. Esses números são mais altos que os resultados máximos do artigo de referência, que foram entre 36,8% e 41,2% de proteínas e entre 48,5% e 58,5% de sólidos extraídos. Assim, mesmo sem o tratamento prévio de *debittering* e sem o tratamento com choque ácido, obteve-se rendimentos maiores que o esperado.

5.2 DETERMINAÇÃO DAS TAXA DE CRESCIMENTO EM MEIOS SOLIDIFICADOS

Os resultados obtidos para os testes em placas de Petri permitem a comparação de um mesmo fungo em diferentes meios de cultivos, no entanto, a comparação entre diferentes fungos deve ser feita com cautela, uma vez que a medida do diâmetro foi utilizada como parâmetro de acompanhamento, mas como será exposto a seguir, o volume micelial aparente (não medido, apenas verificado a olho nu) e outras características das colônias, como a formação de conídios, são observações que também devem ser consideradas.

Observou-se que o crescimento do fungo *Trichoderma asperellum* FEV foi o mais rápido nos meios contendo bagaço como fonte de carbono. No entanto seu micélio se apresentou muito fino e sem conídios até que a placa foi completamente tomada, de forma que o volume de micélio aparente foi o menor

entre os 3 fungos que apresentaram crescimento. Já *Aspergillus niger* 5J e *Penicillium pedernalense* F4B1 apresentaram micélios volumosos, mas *P. pedernalense* F4B1 apresentou crescimento claramente mais lento e fase de adaptação mais longa.

Quanto às diferenças entre os bagaços, apenas *A. niger* apresentou crescimento mais rápido em meio de cultivo contendo bagaço de cana pré-tratado do que no bagaço *in natura*, o que pode ter vários significados. Algumas possibilidades seriam: (1) este fungo teria baixa produção de ligninases, o que seria um problema menor no bagaço pré-tratado, pois este tem fibras mais desestruturadas; (2) o fungo teria produção mais alta de endo-glicanases do que de outras celulases, de forma que o bagaço a celulose mais acessível (pré-tratado) estaria mais suscetível em um primeiro momento; (3) o fungo teria baixa produção de hemicelulases, o que permitiria um crescimento maior em bagaço pré-tratado, com menor teor de hemicelulose e maior e acesso à celulose. Além dessas, pode haver outros fatores, relacionados à regulação da produção de enzimas na presença de diferentes proporções entre fontes de carbono, entre outras possibilidades. Quanto à possibilidade (3), sabe-se que os fungos do gênero *Aspergillus* são bons produtores de hemicelulases (Tabela 5-2). Apesar disso, dadas essas hipóteses, não é possível chegar a uma conclusão sobre o motivo dessa diferença apenas com esse experimento.

5.3 EXPERIMENTO CINÉTICO INICIAL – COMPARAÇÃO DE BAGAÇOS E FUNGOS

O experimento cinético inicial, que comparou diferentes fungos, tempos de cultivo e o bagaço pré tratado e *in natura* teve como ponto de partida os resultados obtidos por DA SILVA (2021), que produziu holocelulases utilizando *Aspergillus niger* 5J. A partir deste trabalho, definiu-se a quantidade inicial de conídios, a quantidade de bagaço por frasco e a umidade inicial. A solução de sais de Mandel partiu do trabalho de LIN et al. (2011). Já a quantidade de extrato de levedura foi uma estimativa próxima à média encontrada em diferentes trabalhos, convertidos para quantidade de nitrogênio orgânico (DESAI; IYER, 2020; FARRAG; EL-HAW; AL-BOKHOMY, 2021; MARTÍNEZ-PACHECO et al., 2020; NANJUNDASWAMY; OKEKE, 2020; NAVANEETHAPANDIAN et al., 2021; NAWAZ et al., 2018).

O fungo que produziu, de modo geral, menores atividades enzimáticas foi *T. asperellum* FEV, o que corrobora o resultado do teste anterior em placas de Petri, no qual o micélio fúngico observado foi muito fino até que preenchesse toda a placa. Apenas em um caso este fungo conseguiu superar a produção de alguma atividade enzimática: β -glicosidase, em comparação com *P. pedernalense* F4B1, utilizando bagaço de cana *in natura*. Esse resultado é intrigante porque normalmente os fungos do gênero *Trichoderma* não são bons produtores de β -glicosidase (VAISHNAV et al., 2018). No entanto, essa comparação deve levar em consideração que as produções dessa enzima foram muito baixas para *Penicillium* em todos os tempos de fermentação, o que não ocorreu ao utilizar o bagaço de cana pré-tratado. Ou seja, para que este fungo produza essa enzima, aparentemente é necessário o pré-tratamento do bagaço.

O oposto ocorreu para a produção de endoxilanase por *P. pedernalense* F4B1: as atividades foram maiores no bagaço *in natura*. Isto pode ser explicado pelo maior teor de hemicelulose (FOCKINK; SÁNCHEZ; RAMOS, 2018), constituída majoritariamente por xilana, neste bagaço. Esta combinação de fungo e bagaço produziu nos dias sétimo e décimo, as maiores atividades médias de endoxilanase entre todas as análises. Apesar disso, não foi possível verificar diferença significativa ($p > 0,1$) entre esses resultados e os obtidos para *A. niger* 5J em nenhum dos dias avaliados, de modo que esta diferença pode se dever apenas ao erro de análise. O fungo *T. asperellum* FEV também produziu mais endoxilanase no bagaço *in natura*, possivelmente pelo mesmo motivo elucidado.

A cepa *Aspergillus niger* 5J produziu, de modo geral, as maiores atividades enzimáticas, em todos os casos, exceto o citado acima e também para FPase. Para essa atividade enzimática, os valores médios produzidos por *P. pedernalense* F4B1 foram maiores em ambos os bagaços e em todos os dias. Apesar disso, não foi possível verificar diferença significativa ($p > 0,1$), então essa diferença pode ter ocorrido apenas devido ao erro experimental.

Diferente dos outros, *A. niger* 5J foi praticamente insensível a diferenças no bagaço para a produção de β -glicosidase e endoxilanase. O mesmo não aconteceu para FPase e CMCase.

Todos os fungos apresentaram produção maior de FPase no bagaço *in natura* que no bagaço pré-tratado, com diferenças significativas detectadas para

os dias 5 e 7, exceto para *T. asperellum* FEV no dia 7. Para CMCCase, houve uma tendência de produção maior no bagaço *in natura*, que se repetiu em todos os tempos, para os fungos *A. niger* 5J e *P. pedernalense* F4B1. No entanto, a diferença foi pequena e apenas no valor da média, podendo ter ocorrido devido ao erro experimental ($p > 0,1$).

A estimação do crescimento da biomassa fúngica em fermentação em estado sólido pode ser feita, mas envolve processos caros ou difíceis de serem escalonados, como dosagem de N-acetil-glicosamina, que compõe a parede celular fúngica, e a aplicação do PCR quantitativo (AIDOO; HENDRY; WOOD, 1981; SIMENG et al., 2015). Nesse contexto, a comparação com taxas de crescimento em meio solidificado, apesar de limitada, pode ser útil para buscar entender o processo. Como o micélio fúngico de *T. asperellum* FEV era muito fino até cobrir todo o meio de cultivo, as comparações a seguir se limitarão a *P. pedernalense* F4B1 e *A. niger* 5J.

O crescimento do fungo *P. pedernalense* F4B1 em meio solidificado foi mais lento que *A. niger* 5J. Apesar disso, as produções de enzimas por estes fungos estiveram próximas. Além disso, devido a este crescimento mais lento, seria esperado observar diferenças entre os dias 5 e 7 para o *P. pedernalense* F4B1, o que não foi visto, indicando que a produção de enzimas pode não estar associada à taxa de crescimento neste fungo.

Para *A. niger* 5J, a maior atividade β -glicosidase média foi 2348U/g, produzida no décimo dia com bagaço pré-tratado, e as maiores atividades FPase, CMCCase e endoxilanase, obtidas também no décimo dia, mas usando o bagaço *in natura*, foram 2,48U/g, 5,38U/g e 590U/g, respectivamente (após descontadas da atividade média no dia 0). Já KAUR et al. (2020) utilizou *A. niger* P-19 em bagaço de cana, por fermentação em estado sólido e obteve as atividades β -glicosidase, FPase, CMCCase e endoxilanase, iguais a, respectivamente, 2,81U/g, 7,15 U/g, 12,15U/g e 138U/g. Comparando esses dados com as produções de *A. niger* 5J, observa-se que esse é melhor produtor de β -glicosidase e endoxilanase do que de endoglucanase (atividade CMCCase) e celulasas totais (atividade FPase).

5.4 ESTUDO DE PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO: PLANEJAMENTO FATORIAL

A partir dos resultados obtidos no estudo cinético que comparou diferentes fungos e bagaços, conclui-se que as maiores atividade enzimáticas foram obtidas usando *A. niger* 5J com bagaço de cana *in natura*. O primeiro tempo de fermentação utilizado nesses estudos cinéticos foi de 5 dias e é possível que antes desse dia a produção de algumas enzimas tenha sido maior utilizando o bagaço tratado por explosão a vapor, sobretudo para as atividades FPase e CMCase. Ainda assim, considera-se que a utilização do bagaço *in natura* é mais apropriada, pois se o pré-tratamento for desnecessário, os custos do processo em uma usina ou biorrefinaria serão reduzidos sensivelmente.

Para a escolha do domínio do processo, foram levados em conta alguns trabalhos que utilizaram quantidades iniciais de conídios próximos à faixa escolhida no presente trabalho (DA SILVA, 2021; KAUR et al., 2020; MORAN-AGUILAR et al., 2021b). As quantidades de extrato de levedura foram definidas tendo o experimento anterior como ponto central, enquanto para a quantidade adicionada de NaNO₃, tomou-se o experimento anterior como o ponto mínimo.

5.4.1 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Em princípio, podem ser analisadas as cinéticas das atividades obtidas para cada enzima. Para atividade de FPase, a maioria dos experimentos mostrou um padrão de atividade maior para o quinto dia do que para o terceiro, seguido de queda constante nos dias seguintes. As exceções foram os experimentos 4 e 7, que tiveram aumentos no do sétimo para o décimo dia. Esses experimentos têm em comum somente a quantidade de NaNO₃ adicionado, que foi mínima (40mg/5g de bagaço), enquanto os outros parâmetros foram opostos. A maior produção foi obtida no experimento 3, quinto dia (1,75U/g), que recebeu o máximo de extrato de levedura e o mínimo dos outros parâmetros (Figura 5-1).

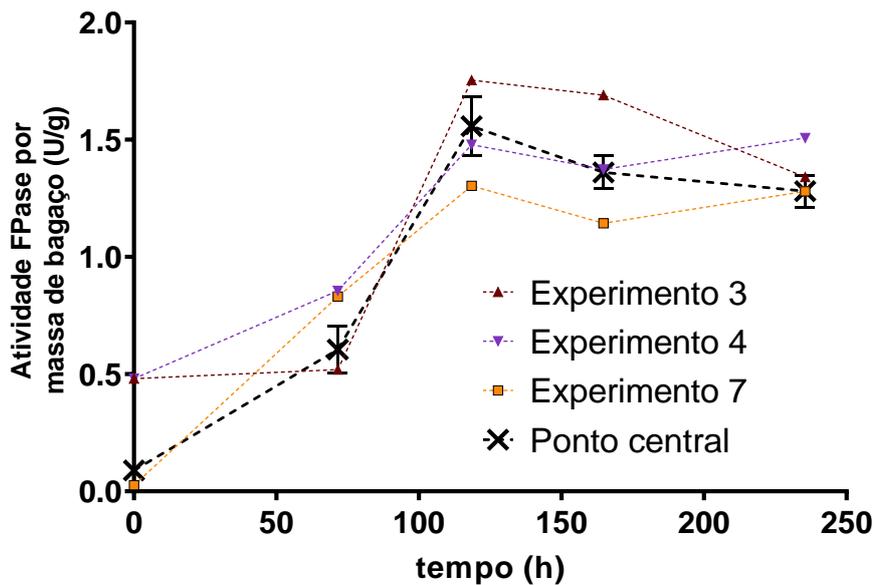


Figura 5-1: Cinética de produção de FPase para algumas amostras e ponto central no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com triplicata do ponto central. Barras de erro: EPM.

Para CMCase, em todos os experimentos, a cinética foi de produção máxima no terceiro dia, drástica queda do terceiro para o quinto dia, seguida de estabilização ou ligeira queda do quinto dia para os dias subsequentes. A maior produção foi obtida no experimento 8, terceiro dia (12,96U/g), que recebeu a quantidade mínima de todos os parâmetros (Figura 5-2).

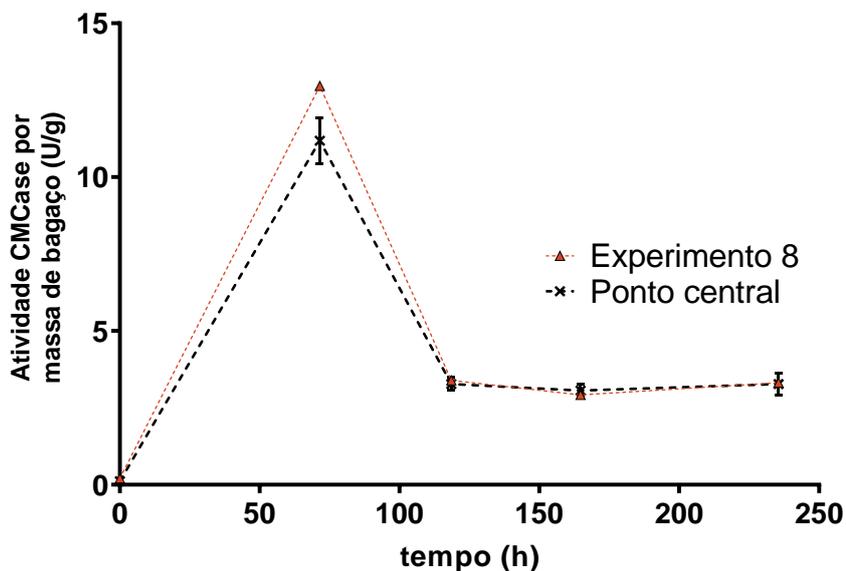


Figura 5-2: Cinética de produção de CMCase para algumas amostras e ponto central no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com triplicata do ponto central. Barras de erro: EPM.

Para β -glicosidase, as cinéticas da maioria dos experimentos também apresentaram máximas no terceiro dia, seguidas de queda. Duas exceções foram os experimentos 5 e 6, nos quais as produções do terceiro dia foram as menores entre todos os experimentos neste tempo e muito próximas ao obtido nos dias subsequentes. Esses dois experimentos têm em comum a quantidade mínima de extrato de levedura e máxima de NaNO_3 . Além desses, os experimentos 2 e 7 apresentaram aumentos da atividade enzimática depois da queda, ou seja, depois do quinto dia. Para o experimento 2, houve aumento entre o quinto e sétimo dia; e o experimento 7 apresentou aumento do sétimo para o décimo dia. Apesar disso, esses dois experimentos não têm nada em comum. O experimento 2 recebeu o máximo de extrato de levedura, máximo de NaNO_3 e mínimo de inóculo, enquanto o experimento 7 recebeu o oposto desses parâmetros. A maior produção foi obtida no experimento 1, terceiro dia (7.155U/g), que recebeu a quantidade máxima de todos os parâmetros (Figura 5-3).

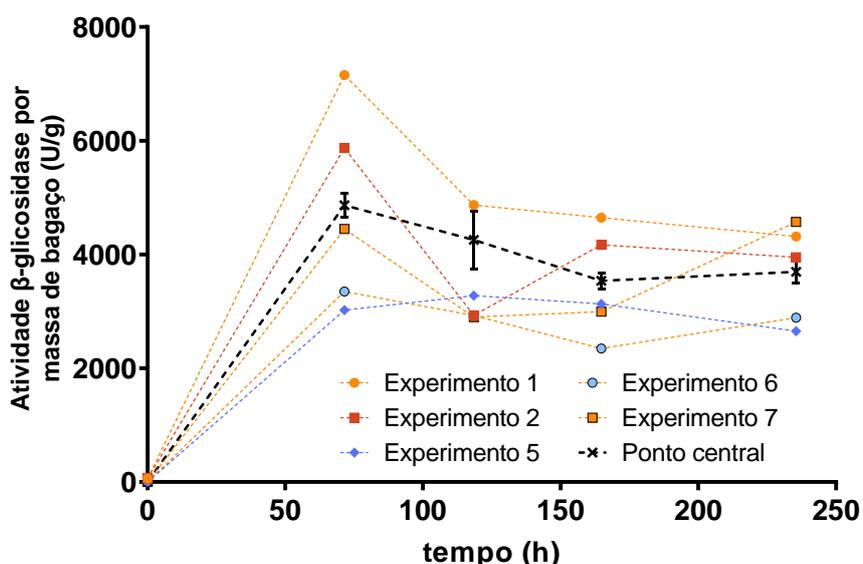


Figura 5-3: Cinética de produção de β -glicosidase para algumas amostras e ponto central no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com triplicata do ponto central. Barras de erro: EPM.

Para atividade endoxilânase, a maioria dos experimentos teve seu máximo no terceiro dia. O experimento 1 foi uma exceção, pois teve aumento do terceiro para o quinto dia, seguido de pouca variação. Este recebeu a quantidade máxima de todas as variáveis. Além desse, os experimentos 2 e 5, tiveram máximos no quinto dia, seguidos de quedas nos dias subsequentes. Apesar

dessa semelhança, os valores absolutos das atividades do experimento 2 foram maiores que do experimento 5. Esses dois experimentos só têm em comum a quantidade de NaNO_3 , que foi máxima. Já a quantidade de extrato de levedura foi máxima no experimento 2 e mínima no experimento 5, enquanto inóculo usado foi o mínimo no experimento 2 e máximo no experimento 5. A maior produção foi obtida no experimento 4, terceiro dia (888,0 U/g), que recebeu o máximo de extrato de levedura e mínimo dos outros parâmetros (Figura 5-4).

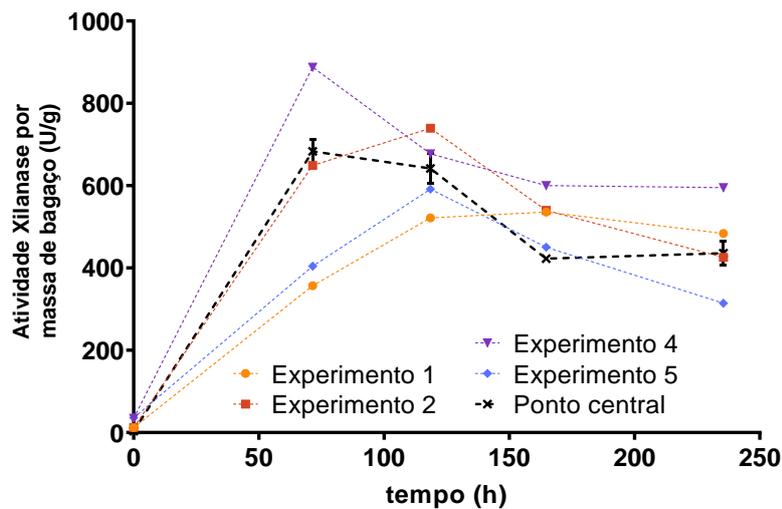


Figura 5-4: Cinética de produção de endoxilanase para algumas amostras e ponto central no experimento de planejamento fatorial 2^3 , com triplicata do ponto central. Barras de erro: EPM.

A partir desses resultados, é possível afirmar que o melhor dia para a produção da maioria das enzimas é o terceiro. A FPase é a única exceção, que apresentou atividades maiores no quinto dia.

5.4.2 PRODUTIVIDADES DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A produtividade é uma forma usual de medir a performance de um processo fermentativo, pois representa quanto de um produto pode ser obtido por tempo (SCHMIDELL et al., 2001). No presente trabalho, foi possível verificar que as produtividades máximas e médias de quase todas as enzimas ocorrem no terceiro dia de fermentação, exceto para FPase. No entanto, como já foi discutido anteriormente (seção 5.3), *A. niger* 5J não foi um bom produtor destas enzimas nas condições de cultivo utilizadas até aqui. O mesmo ocorreu em um trabalho anterior, no qual foram dosadas holocelulases produzidas por este

fungo utilizando o fruto da fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) como substrato (DA SILVA, 2021). Assim, optou-se por privilegiar as outras enzimas e realizar as análises subsequentes considerando apenas as produtividades obtidas no terceiro dia.

5.4.3 ANÁLISES DE VARIÂNCIA E MODELOS BASEADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³

A partir das análises de variância considerando todos os fatores, verificou-se que, para todas as enzimas, nenhuma das curvaturas checadas tiveram efeito significativo nas variáveis de resposta ($p > 0,1$). Assim, foi possível considerar que no domínio estudado, o modelo é linear. Isso significa dizer que, dentro do domínio estudado não deve haver curvatura, então não haveria inflexão, ponto de máximo ou mínimo dentro desse domínio, o que do contrário caracterizaria um modelo quadrático e seriam necessários mais experimentos para a determinação do modelo.

O coeficiente de determinação ajustado ($R^2_{ajustado}$) indica a correlação entre as variáveis independentes (fatores) e a variável dependente (produtividade enzimática). Ou seja, significa o quanto da variação das produtividades enzimáticas pode ser explicado pela variação dos fatores. Após a simplificação dos modelos e a consideração de linearidade, obteve-se os seguintes valores de $R^2_{ajustado}$ para cada produtividade de atividade enzimática: FPase, 0,7575; CMCCase, 0,4478; β -glicosidase, 0,9304; endoxilase, 0,7585. Considera-se que para sistemas complexos como os biológicos, valores acima de 0,7 indicam a existência de correlação. Tendo um valor de $R^2_{ajustado}$ abaixo disso, segundo o modelo, a produtividade de CMCCase não foi impactada de forma linear pela variação dos fatores.

Desta forma, considerando que não há inflexão dentro do domínio estudado, para as produtividades de atividade FPase, β -glicosidase e endoxilase, entende-se que o ponto ótimo para as variáveis estudadas no domínio estudado estará exatamente nos limites desse domínio. Já para CMCCase, o $R^2_{ajustado}$ e nenhum fator teve efeito significativo ($p > 0,1$). Assim, é possível que todo o domínio amostral esteja em um platô constante de produtividade para esta atividade enzimática. Dessa forma, nenhuma variação

seria percebida e o modelo estaria tentando se ajustar somente ao ruído experimental.

As interações entre os fatores estudados não foram significativas para nenhuma das produtividades de atividades enzimáticas. Quanto aos fatores principais, a avaliação de quais foram significativos para cada enzima está explicitada no item 4.4.4. Para CMC_{ase}, nenhum dos fatores principais foi significativo. Já para FPase e β -glicosidase, o fator extrato de levedura foi significativo, porém com efeitos estimados em sentidos opostos: no sentido negativo para FPase e positivo para β -glicosidase. Assim, entende-se que, no domínio estudado, os fatores concentração de NaNO₃ e concentração inicial de conídios não têm efeito na produção das celulasas.

Para endoxilanase, todos os fatores principais foram significativos, com efeito estimado positivo para extrato de levedura e negativo para NaNO₃ e concentração inicial de inóculo.

É interessante observar as diferenças nos efeitos do extrato de levedura e NaNO₃ em cada atividade enzimática obtida, considerando que ambos são fontes de nitrogênio. Para compreender isso, é necessário levar em conta que o extrato de levedura também é fonte de diversos fatores de crescimento, nucleotídeos, minerais e vitaminas (ALVES; DE SOUZA; DE OLIVA NETO, 2021), além de peptídeos bioativos, compostos voláteis, entre outras substâncias (DEMIRGÜL et al., 2022; MIRZAEI et al., 2021). Esse conjunto complexo de componentes pode ter impactos diversos no crescimento fúngico e produção de enzimas.

Outra diferença entre o extrato de levedura e o NaNO₃ é a forma como eles fornecem nitrogênio para as células. O extrato de levedura é um componente complexo e seu nitrogênio está associado principalmente a aminoácidos. Assim, sua entrada no metabolismo dos fungos não passa pelas etapas que o nitrato precisa passar, que incluem sua redução a amônia, síntese de glutamato, seguida de glutamina, da qual derivam os outros aminoácidos (NELSON; COX, 2014). Segundo TUDZYNSKI et al. (2014), NH₄⁺ ou aminoácidos como glutamina são fontes de nitrogênio favorecidas energeticamente, consumidos preferencialmente, em contraponto a fontes que exigem maior custo energético, como nitrato, ureia, ácido úrico, aminas, amidas, purinas e pirimidinas.

Os valores de atividade enzimática previstos pelo modelo com os parâmetros escolhidos (Tabela 4-7) e três dias de cultivo foram: 0,370U/g para FPase; 10,8U/g para CMCase; 6312U/g para β -glicosidase; e 887U/g para endoxilanase.

5.4.4 VALIDAÇÃO DO PONTO MÁXIMO ESCOLHIDO

Muitos outros estudos foram feitos com produção de celulases e xilanases por FES (Tabela 5-1 e Tabela 5-2).

Tabela 5-1: Atividades celulases de alguns trabalhos encontrados na literatura.

Referência	Substrato	Fungo	Atividade (U/g de substrato) e tempo de cultivo em dias		
			FPase	CMCase	β -glicosidase
(KAUR et al., 2020)	Bagaço de cana	<i>A. niger</i> P-19	7,15 (5d)	12,15 (5d)	2,81 (5d)
(KAUR et al., 2020)	Palha de arroz	<i>A. niger</i> P-19	68,95 (5d)	25,12 (5d)	34,45 (5d)
(KAUR et al., 2020)	Farelo de trigo	<i>A. niger</i> P-19	58,35 (5d)	15,72 (5d)	22,25 (5d)
(DHILLON et al., 2012)	Bagaço de maçã	<i>A. niger</i> NRRL-567	133,68 (2d)	172,31 (2d)	60,09 (2d)
(GAO et al., 2008)	Palha de milho	<i>Aspergillus terreus</i> M11	243 (4d)	581 (4d)	128 (4d)
(HERCULANO et al., 2011)	Farelo de mamona	<i>Aspergillus japonicus</i> URM5620	953,4 (5d)	191,6 (5d)	88,3 (5d)
(KALOGERIS et al., 2003)	Palha de trigo	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	–	1235 (7d)	105 (7d)
(KANG et al., 2004)	Palha de arroz	<i>A. niger</i> KK2	19,5 (4d)	129 (5d)	100 (6d)
(SANDHU et al., 2013)	Palha de arroz/ bagaço de trigo (4:1)	<i>A. niger</i> HN-1	36,7 (4d)	416,3 (4d)	252,3 (4d)
(CAMASSOLA; DILLON, 2010)	Bagaço de cana e palha de trigo	<i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1	45,82 (3d)	290,47 (3d)	40,13 (3d)
(GUTIERREZ-CORREA; TENDERDY, 1997, 1998)	Bagaço de cana	<i>Trichoderma reesei</i> LM-UC4E1	13,3 (3d)	22,6 (4d)	9,1 (4d)

Tabela 5-2: Atividades xilanases de alguns trabalhos encontrados na literatura.

Referência	Substrato	Fungo	Atividade em U/g de substrato (tempo de cultivo em dias)	
			Endoxilanase	β -xiloxidase
(KAUR et al., 2020)	Bagaço de cana	<i>A. niger</i> P-19	138,16 (5d)	–
(KAUR et al., 2020)	Palha de arroz	<i>A. niger</i> P-19	536,45 (5d)	–
(KAUR et al., 2020)	Farelo de trigo	<i>A. niger</i> P-19	615,69 (5d)	–
(MORÁN-AGUILAR et al., 2021)	Dreche cervejeira	<i>A. niger</i> CECT 2700	2210,23 (5d)	–
(DHILLON et al., 2012)	Bagaço de maçã	<i>A. niger</i> NRRL-567	1412,58 (3d)	–
(KANG et al., 2004)	Palha de arroz	<i>A. niger</i> KK2	5070 (5d)	193 (6d)
(SANDHU et al., 2013)	Palha de arroz/ bagaço de trigo (4:1)	<i>A. niger</i> HN-1	2593,5 (4d)	8,9 (4d)
(LEMOS; MARIA; PEREIRA, 2001)	Bagaço de cana	<i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3112	1125 (2,5d)	87,5 (2,5d)
(CAMASSOLA; DILLON, 2010)	Bagaço de cana e palha de trigo	<i>P. echinulatum</i> 9A02S1	37,87 (3d)	–
(GUTIERREZ-CORREA; TENERDY, 1997, 1998)	Bagaço de cana	<i>T. reesei</i> LM-UC4E1	1968 (3d)	–

A partir dos resultados do planejamento fatorial, constatou-se que o *A. niger* 5J, aliado às condições de cultivo utilizadas, produziu pouca quantidade de endo e exo-celulases, mas apresentou quantidades altas das outras enzimas. De fato, as maiores atividades FPase e CMCase encontradas no planejamento fatorial (seção 5.4.1) são menores que todos os valores apresentados na Tabela 5-1.

Assim, foi feita uma validação das condições de cultivo escolhidas, repetindo os mesmos parâmetros, mas sem analisar FPase e CMCase. Ao invés disso, foi analisada uma atividade enzimática adicional: β -xiloxidase. As produtividades obtidas para β -glicosidase, endoxilanase e β -xiloxidase, com intervalos de confiança dados com nível de significância $\alpha=0,1$, foram, respectivamente (U/g/dia): 1.495 ± 178 ; $230\pm 32,5$; e 1.379 ± 187 . Em termos de atividade com 3 dias de produção, isto equivale a, respectivamente (U/g): 4.484 (β -glicosidase); 691 (endoxilanase); e 4.138 (β -xiloxidase). Comparando esses valores com os obtidos em trabalhos anteriores (Tabela 5-1 e Tabela 5-2), observa-se que a endoxilanase produzida nessa validação está próxima à média

desses trabalhos, sendo uma produção relevante, enquanto as atividades β -glicosidase e β -xilosidase do presente trabalho estão muito acima dos valores que já foram obtidos. As produtividades obtidas na validação ficaram abaixo do previsto pelo modelo, provavelmente devido a diferenças no bagaço de cana. Diferente de outros trabalhos na literatura (Tabela 5-1 e Tabela 5-2), aqui optou-se por não realizar a moagem deste substrato, de modo que o mesmo apresentou tamanhos de partícula muito variados. Esta estratégia foi adotada na tentativa de obter uma melhor representação do que poderia ocorrer em uma aplicação em processo real. No entanto, a desvantagem foi a menor homogeneidade entre as amostras, mesmo com procedimentos de homogeneização do material particulado e uso de vidrarias iguais (Erlenmeyers da mesma marca, geometria e tamanho). Além disso, foram usados bagaços de lotes diferentes, armazenados por tempos diferentes, para o planejamento fatorial e para a validação, apesar de serem ambos provenientes do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM).

Atualmente, a maior parte da celulase comercial é obtida utilizando *Trichoderma reesei*. No entanto, as enzimas deste fungo têm sido complementadas com β -glicosidase produzida por outros fungos, por exemplo, do gênero *Aspergillus* (GHAZALI et al., 2019). De fato, segundo VAISHNAV et al. (2018), o produto Cellic® Ctec2, da empresa Novozyme, apresenta melhor performance do que seu antecessor na linha de celulases dessa empresa, o Celluclast®. Os autores atribuem essa melhoria a uma maior quantidade de β -glicosidase no produto atualizado. Este aumento é necessário para evitar a inibição por produto que pode acontecer no processo enzimático com acúmulo do dissacarídeo celobiose, o qual é capaz de inibir as atividades exoglucanases (medidas junto com as celulases totais por meio da atividade FPase) e endoglucanases (CMCase) (LIN et al., 2023). Ou seja, a suplementação de outras enzimas celulolíticas é uma boa possibilidade de aplicação do extrato enzimático obtido no presente trabalho.

Tendo em vista essa proposta, uma quantidade apreciável de xilanases também pode ajudar na suplementação de celulases comerciais. Segundo ROTH; HOELTZ; BENITEZ (2020), a suplementação de uma mistura enzimática que continha apenas celulases com xilanases foi capaz de aumentar em 25% a sacarificação de palha de arroz pré-tratada com álcali.

Segundo ROHMAN; DIJKSTRA; PUSPANINGSIH (2019), a β -xilosidase é responsável pela hidrólise de mais ligações glicosídicas do que qualquer outra enzima xilanolítica. Além disso, os mesmos autores dizem que essas enzimas hidrolisam xilo-oligossacarídeos, que são potentes inibidores de xilanases e celulasas. Desta forma, a suplementação dessas enzimas junto com outras holocelulasas também pode gerar um conjunto de enzimas mais eficiente para a hidrólise de hexoses e pentoses no material lignocelulósico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível obter extrato de levedura a partir de levedura residual de processo cervejeiro do tipo *lager* (pilsen), com eficiência maior do que o relatado anteriormente (44,7% de proteínas e 59,4% de sólidos extraídos da massa seca inicial) a 59°C por 24h, sob agitação, sem necessidade de tratamentos adicionais.

O novo isolado fúngico *Aspergillus niger* 5J é o melhor produtor de holocelulases dentre os diferentes fungos testados. Utilizando esse fungo, é possível obter boa produção de holocelulases a partir de bagaço de cana *in natura* como substrato por fermentação em estado sólido

Por meio de planejamento fatorial utilizando *A. niger* 5J e considerando a cinética da fermentação, a melhor condição para obtenção de β -glicosidase e endoxilânase dentro do domínio experimental é a fermentação por três dias, utilizando (para 5g de bagaço): 25mgN de extrato de levedura, 40mg de NaNO₃, 2,5·10⁵ conídios. No entanto, o fungo apresenta baixas produtividades de CMCase e FPase.

O extrato de levedura obtido a partir de levedura residual da indústria cervejeira tem efeito positivo sobre a produção da maioria das holocelulases analisadas, no domínio experimental estudado.

A enzima endoxilânase (691U/g) é produzida com bom rendimento e as enzimas β -glicosidase (4.138U/g) e β -xilosidase (4.484U/g) são obtidas com rendimentos excepcionais utilizando o fungo e as condições selecionadas no trabalho, se comparados a outros dados da literatura. Assim, considera-se que os extratos enzimáticos obtidos têm aplicações potenciais, sobretudo para suplementação de outras misturas enzimáticas.

Nesse sentido algumas perspectivas futuras incluem testes de estabilidade dessas enzimas, estudo dos pontos ótimos de temperatura e pH de atividade, purificação ou enriquecimento, testes de hidrólise de material lignocelulósico em conjunto com outras enzimas comerciais e busca de parcerias para produção, imobilização e funcionalização das enzimas purificadas. Além disso, pode-se estudar o co-cultivo, sobretudo com outros microrganismos que sejam bons produtores de exo e endo celulasas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH; HAMID; CHRISTWARDANA, M.; HADIYANTO, H. Optimization of cellulase production by *Aspergillus niger* ITBCC L74 with bagasse as substrate using response surface methodology. HAYATI Journal of Biosciences, v. 25, n. 3, p. 115–125, 2018.
- ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP). Colorado: National Renewable Energy Laboratory - NREL, 1996. 1–8 p.
- AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. B. Microbiology and Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. European J Appl Microbiol Biotechnol, v. 12, p. 6–9, 1981.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of THE CELL. 6. ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2015.
- ALVES, E. M.; DE SOUZA, J. F.; NETO, P. de O. Advances in yeast autolysis technology - A faster and safer new bioprocess. Brazilian Journal of Food Technology, v. 25, 2021.
- ANDERSON, C. T.; KIEBER, J. J. Dynamic Construction, Perception, and Remodeling of Plant Cell Walls. Annu. Rev. Plant Biol., v. 71, p. 39–69, 2020.
- ANDRADE, L. P.; CRESPIM, E.; DE OLIVEIRA, N.; DE CAMPOS, R. C.; TEODORO, J. C.; GALVÃO, C. M. A.; MACIEL FILHO, R. Influence of sugarcane bagasse variability on sugar recovery for cellulosic ethanol production. Bioresource Technology, v. 241, p. 75–81, 2017.
- ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; TERÁN-HILARES, R.; INGLE, A. P.; RAI, M.; DOS SANTOS MILESSI, T. S.; DA SILVA, S. S.; DOS SANTOS, J. C. Overcoming challenges in lignocellulosic biomass pretreatment for second-generation (2G) sugar production: emerging role of nano, biotechnological and promising approaches. 3 Biotech, v. 9, n. 6, p. 230–246, 2019.
- ARAUJO SILVA, J. C.; SALES ALVIANO, D.; SALES ALVIANO, C.; DA SILVA BON, E. P.; DO NASCIMENTO, R. P. β -Glucosidase, β -Xylosidase and α -L-Arabinofuranosidase Production by Mutant *Trichoderma atroviride* 102C1 in Different Lignocellulosic Biomass Sources. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 7, n. 03, p. 962–970, 2018.

- AVRAMIA, I.; AMARIEI, S. A Simple and Efficient Mechanical Cell Disruption Method Using Glass Beads to Extract β -Glucans from Spent Brewer's Yeast. *Applied Sciences (Switzerland)*, v. 12, n. 2, p. 648, 2022.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, v. 23, p. 257–270, 1992.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; GATTO, G. J.; STRYER, L. *Biochemistry*. 8th ed. New York: W.H. Freeman, 2015. 1–1194 p.
- BLANC, D. C.; DUARTE, J. A.; FIAUX, S. B. Indigenous fungi with the ability to biodegrade hydrocarbons in diesel-contaminated soil are isolated and selected using a simple methodology. *Environmental Pollution*, v. 357, 2024.
- BODDY, L.; HISCOX, J. *Fungal Ecology: Principles and Mechanisms of Colonization and Competition by Saprotrophic Fungi*. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 6, 2016.
- BONECHI, C.; CONSUMI, M.; DONATI, A.; LEONE, G.; MAGNANI, A.; TAMASI, G.; ROSSI, C. Biomass: An overview. *Em: Bioenergy Systems for the Future: Prospects for Biofuels and Biohydrogen*. Amsterdam: Elsevier Ltd., 2017. p. 3–42.
- BUDZIANOWSKI, W. M. High-value low-volume bioproducts coupled to bioenergies with potential to enhance business development of sustainable biorefineries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 70, p. 793–804, 2017.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulases and Xylanases Production by *Penicillium echinulatum* Grown on Sugar Cane Bagasse in Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, n. 7, p. 1889–1900, 2010.
- CARPIO, R. R.; SECCHI, S. G.; BARROS, R. O.; OLIVEIRA, R. A.; QUEIROZ, S.; TEIXEIRA, R. S. S.; BON, E. P. S.; SECCHI, A. R. Techno-economic evaluation of second-generation ethanol from sugarcane bagasse: Commercial versus on-site produced enzymes and use of the xylose liquor. *Journal of Cleaner Production*, v. 369, 2022.
- CHILAKAMARRY, C. R.; MIMI SAKINAH, A. M.; ZULARISAM, A. W.; SIROHI, R.; KHILJI, I. A.; AHMAD, N.; PANDEY, A. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added

- products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*, v. 343, n. 126065, 2022.
- CHUM, H.; FAAIJ, A.; MOREIRA, J.; BERNDEN, G.; DHAMIJA, P.; DONG, H.; GABRIELLE, B.; ENG, A. G.; LUCHT, W.; MAPAKO, M.; CERUTTI, O. M.; MCINTYRE, T.; MINOWA, T.; PINGOUD, K. *Bioenergy. Em: IPCC Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation*. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2011. p. 119–138.
- CONAB-OBSERVATÓRIO AGRÍCOLA. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar - safra 2023/24, v. 11, n. 4. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento – Conab, 2024.
- CUNNINGHAM, J. A.; PADAMSEE, M.; WILSON, S.; COSTELLO, M. J. Fungi species description rates confirm high global diversity and suggest half remain unnamed. *Frontiers of Biogeography*, v. 16, n. 2, 2024.
- DA SILVA, G. A. R. Seleção de fungos filamentosos com o potencial de produção do antioxidante quercetina a partir da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* BENTH.). 2016. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2016.
- DA SILVA, G. A. R. Desenvolvimento de Processo Biotecnológico para Obtenção de Quercetina a Partir de Fava D'anta. 2021. Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2021.
- DE BHOWMICK, G.; SARMAH, A. K.; SEN, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*, v. 247, p. 1144–1154, 2018.
- DE OLIVEIRA RODRIGUES, P.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; BADOTTI, F.; GÓES-NETO, A.; BAFFI, M. A. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among *Ascomycetes* and *Basidiomycetes*. *Renewable Energy*, v. 145, p. 2683–2693, 2020.
- DEMIRGÜL, F.; ŞİMŞEK, Ö.; BOZKURT, F.; DERTLI, E.; SAĞDIÇ, O. Production and characterization of yeast extracts produced by *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* and *Kluyveromyces marxianus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 52, n. 6, p. 657–667, 2022.

- DESAI, D. I.; IYER, B. D. Optimization of medium composition for cellulase-free xylanase production by solid-state fermentation on corn cob waste by *Aspergillus niger* DX-23. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 12, n. 4, p. 1153–1165, 2020.
- DHAKAR, K.; KOOLIYOTTIL, R.; JOSHI, A.; PANDEY, A. Simultaneous production of ligninolytic enzymes by a temperature and pH tolerant strain of *Aspergillus niger* under different cultural conditions. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 14, n. 1, p. 81–86, 2015.
- DHILLON, G. S.; KAUR, S.; BRAR, S. K.; VERMA, M. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, v. 38, p. 6–13, 2012.
- EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*, v. 6, n. 3, p. 44, 2021.
- ELEGBEDE, J. A.; LATEEF, A. Valorization of Corn-Cob by Fungal Isolates for Production of Xylanase in Submerged and Solid State Fermentation Media and Potential Biotechnological Applications. *Waste and Biomass Valorization*, v. 9, n. 8, p. 1273–1287, 2018.
- ELISEU NICULA DE CASTRO, R.; MARIA DE BRITO ALVES, R.; AUGUSTO OLLER DO NASCIMENTO, C.; GIUDICI, R. Assessment of Sugarcane-Based Ethanol Production. Em: Fuel Ethanol Production from Sugarcane. London: IntechOpen, 2019.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Balanço Energético Nacional 2023: Ano base 2022. Rio de Janeiro: Empresa de Pesquisa Energética – EPE, 2023.
- ESPÍRITO SANTO, M. C. do; CARDOSO, E. B.; GUIMARAES, F. E. G.; DEAZEVEDO, E. R.; CUNHA, G. P. da; NOVOTNY, E. H.; PELLEGRINI, V. de O. A.; CHANDEL, A. K.; SILVEIRA, M. H. L.; POLIKARPOV, I. Multifaceted characterization of sugarcane bagasse under different steam explosion severity conditions leading to distinct enzymatic hydrolysis yields. *Industrial Crops and Products*, v. 139, 2019.
- FARRAG, A. A.; EL-HAW, M. H.; AL-BOKHOMY, A. A. K. Biochemical and biotechnological studies on xylanase and β -xylosidase enzymes produced by

- Trichoderma viride* under solid state fermentation. Journal of Pure and Applied Microbiology, v. 15, n. 1, p. 138–154, 2021.
- FANG, H.; ZHAO, C.; SONG, X. Y.; CHEN, M.; CHANG, Z.; CHU, J. Enhanced cellulolytic enzyme production by the synergism between *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02 and by the addition of surfactants. Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 18, n. 2, p. 390–398, 2013.
- FLORA E FUNGA DO BRASIL. Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/consulta/>>. Acesso em: 4 maio. 2024.
- FOCKINK, D. H.; SÁNCHEZ, J. H.; RAMOS, L. P. Comprehensive analysis of sugarcane bagasse steam explosion using autocatalysis and dilute acid hydrolysis (H₃PO₄ and H₂SO₄) at equivalent combined severity factors. Industrial Crops and Products, v. 123, p. 563–572, 2018.
- FOGLER, H. S.; AME VENNEMA; CATHERINE VENNEMA; ARTHUR F. THURNAU. Elements of Chemical Reaction Engineering. 5. ed. New York: Prentice Hall, 2016.
- GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. Bioresource Technology, v. 99, n. 16, p. 7623–7629, 2008.
- GHAZALI, M. F. S. M.; ZAINUDIN, N. A. I. M.; AZIZ, N. A. A.; MUSTAFA, M. Screening of lignocellulolytic fungi for hydrolyzation of lignocellulosic materials in paddy straw for bioethanol production. Malaysian Journal of Microbiology, v. 15, n. 5, p. 379–386, 2019.
- GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. Pure & Appl. Chem, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- GONZÁLEZ-BAUTISTA, E.; ALARCÓN-GUTIERREZ, E.; DUPUY, N.; GAIME-PERRAUD, I.; ZIARELLI, F.; FARNET-DA-SILVA, A. M. Influence of yeast extract enrichment and *Pycnoporus sanguineus* inoculum on the dephenolisation of sugar-cane bagasse for production of second-generation ethanol. Fuel, v. 260, n. 116370, 2020.
- GRIGOREVSKI-LIMA, A. L.; DE OLIVEIRA, M. M. Q.; DO NASCIMENTO, R. P.; DA SILVA BON, E. P.; COELHO, R. R. R. Production and partial characterization of cellulases and xylanases from *Trichoderma atroviride* 676

- using lignocellulosic residual biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 169, n. 4, p. 1373–1385, 2013.
- GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnology Letters*, v. 19, n. 7, p. 665–667, 1997.
- GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. R. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnology Letters*, v. 20, n. 1, p. 45–47, 1998.
- HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; MOREIRA, K. A.; PINTO, G. A. S.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. F. Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 165, n. 3–4, p. 1057–1067, 2011.
- HUANG, T. T.; WAGES, J. M. New-to-nature sophorose analog: A potent inducer for gene expression in *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 85, p. 44–50, 2016.
- HU, X.; ZHANG, Q.; ZHANG, Q.; DING, J.; LIU, Y.; QIN, W. An updated review of functional properties, debittering methods, and applications of soybean functional peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 63, n. 27, p. 8823–8838, 2023.
- HYDE, K. D. The numbers of fungi. *Fungal Diversity*, v. 114, n. 1, p. 1, 2022.
- HYDE, K. D.; XU, J.; RAPIOR, S.; ET. AL. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, v. 97, p. 1–136, 2019.
- IJOMA, G. N.; SELVARAJAN, R.; TEKERE, M. The potential of fungal co-cultures as biological inducers for increased ligninolytic enzymes on agricultural residues. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 16, n. 1, p. 305–324, 2019.
- IPCC. Summary for Policymakers. Em: CORE WRITING TEAM; LEE, H.; ROMERO, J. *Climate Change 2023: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. 1. ed. Geneva, Switzerland: Intergovernmental Panel on Climate Change, 2023. p. 1–34.
- IRA N. LEVINE. *Equilíbrio Material*. Em: *Físico-Química*. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. p. 104–132.

- JIANG, M.; CHEN, K.; LIU, Z.; WEI, P.; YING, H.; CHANG, H. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using spent brewer's yeast hydrolysate as a nitrogen source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 160, n. 1, p. 244–254, 2010.
- JONG, E. de; HIGSON, A.; WALSH, P.; WELLISCH, M. Task 42 Biobased Chemicals - Value Added Products from Biorefineries. A report prepared for IEA Bioenergy-Task, p. 36, 2011.
- KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 7, p. 1099–1104, 2003.
- KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 91, n. 2, p. 153–156, 2004.
- KAUR, J.; CHUGH, P.; SONI, R.; SONI, S. K. A low-cost approach for the generation of enhanced sugars and ethanol from rice straw using in-house produced cellulase-hemicellulase consortium from *A. niger* P-19. *Bioresource Technology Reports*, v. 11, 2020.
- KHALEGHIPOUR, L.; LINARES-PASTÉN, J. A.; RASHEDI, H.; RANAEI SIADAT, S. O.; JASILIONIS, A.; AL-HAMIMI, S.; SARDARI, R. R. R.; KARLSSON, E. N. Extraction of sugarcane bagasse arabinoxylan, integrated with enzymatic production of xylo-oligosaccharides and separation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, v. 14, n. 1, 2021.
- KIRK, P. M. *Species Fungorum Plus* (version Apr 2024). Em: O. Bánki, Y. Roskov, M. Döring, et.al., *Catalogue of Life (Annual Checklist 2024)*. Amsterdam: Catalogue of Life, 2024.
- LABUDA, J.; BOWATER, R. P.; FOJTA, M.; GAUGLITZ, G.; GLATZ, Z.; HAPALA, I.; HAVLIŠ, J.; KILAR, F.; KILAR, A.; MALINOVSKÁ, L.; SIRÉN, H. M. M.; SKLÁDAL, P.; TORTA, F.; VALACHOVIČ, M.; WIMMEROVÁ, M.; ZDRÁHAL, Z.; HIBBERT, D. B. Terminology of bioanalytical methods (IUPAC Recommendations 2018). *Pure and Applied Chemistry*, v. 90, n. 7, p. 1121–1198, 2018.

- LANGAN, P.; PETRIDIS, L.; O'NEILL, H. M.; PINGALI, S. V.; FOSTON, M.; NISHIYAMA, Y.; SCHULZ, R.; LINDNER, B.; LEIF HANSON, B.; HARTON, S.; HELLER, W. T.; URBAN, V.; EVANS, B. R.; GNANAKARAN, S.; RAGAUSKAS, A. J.; SMITH, J. C.; DAVISON, B. H. Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. *Green Chemistry*, v. 16, n. 1, p. 63–68, 2014.
- LEAL, M. R. L. V.; WALTER, A. S.; SEABRA, J. E. A. Sugarcane as an energy source. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 3, n. 1, p. 17–26, 1 mar. 2013.
- LE MOS, J. L. S.; MARIA, M. C.; PEREIRA, N. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, v. 91–93, n. 1, p. 681–689, 2001.
- LI, X. Plant Cell Wall Chemistry: Implications for Ruminant Utilisation. *Journal of Applied Animal Nutrition*, v. 9, n. 1, p. 31–56, 2021.
- LIMA, U. de A.; SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Engenharia Bioquímica. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2001. v. 1
- LIN, C. A.; CHENG, C.; CHEN, L. W.; CHEN, C. W.; DUAN, K. J. Ethanol production using the whole solid-state fermented sugarcane bagasse cultivated by *Trichoderma reesei* RUT-C30 supplemented with commercial cellulase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 50, p. 102667, 2023.
- LIN, H.; WANG, B.; ZHUANG, R.; ZHOU, Q.; ZHAO, Y. Artificial construction and characterization of a fungal consortium that produces cellulolytic enzyme system with strong wheat straw saccharification. 2011.
- LIU, J.; YUAN, X.; ZENG, G.; SHI, J.; CHEN, S. Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 11, p. 2347–2351, 2006.
- LIU, H.; SUN, J.; CHANG, J. S.; SHUKLA, P. Engineering microbes for direct fermentation of cellulose to bioethanol. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 38, n. 7, p. 1089–1105, 2018.
- LJUNGDAHL, P. O.; DAIGNAN-FORNIER, B. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, v. 190, n. 3, p. 885–929, 2012.

- LO, C. M.; JU, L. K. Sophorolipids-induced cellulase production in cocultures of *Hypocrea jecorina* Rut C30 and *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44, n. 2, p. 107–111, 2009.
- MAFA, M. S.; PLETSCHE, B. I.; MALGAS, S. Defining the Frontiers of Synergism between Cellulolytic Enzymes for Improved Hydrolysis of Lignocellulosic Feedstocks. *Catalysts*, v. 11, p. 1343, 2021.
- MAIA, L. C.; CARVALHO JÚNIOR, A. A. de; CAVALCANTI, L. de H.; *et.al.* Diversity of Brazilian Fungi. *Rodriguésia*, v. 66, n. 4, p. 1033–1045, 2015.
- MANAN, M. A.; WEBB, C. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. *J Appl Biotechnol Bioeng*, v. 4, n. 1, p. 511–532, 2017.
- MARCUSSO, E. F.; DE OLIVEIRA, V. C.; CARUSO, H.; ANDRÉ, J. A. Anuário da cerveja 2024. Brasília: MAPA - Ministério da Agricultura e Pecuária, 2024. 1–51 p.
- MARTÍN, J.; SARRIA, L. F.; ASUERO, A. G. The Kjeldahl Titrimetric Finish: On the Ammonia Titration Trapping in Boric Acid. *Em: Advances in Titration Techniques*. 1. ed. London: InTech, 2017. p. 23–58.
- MARTÍNEZ-PACHECO, M. M.; FLORES-GARCÍA, A.; ZAMUDIO-JARAMILLO, M. A.; CHÁVEZ-PARGA, M. C.; ALVAREZ-NAVARRETE, M. Optimization of production of xylanases with low cellulases in *Fusarium solani* by means of a solid state fermentation using statistical experimental design. *Revista Argentina de Microbiología*, v. 52, n. 4, p. 328–338, 2020.
- MATHIAS, T. R. S.; DE MELLO, P. P. M.; SERVULO, E. F. C. Caracterização de Resíduos Cervejeiros. Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ, 2014.
- MA, X.; LI, S.; TONG, X.; LIU, K. An overview on the current status and future prospects in *Aspergillus* cellulase production. *Environmental Research Academic Press Inc.*, 2024.
- MENDOZA-CÓZATL, D.; LOZA-TAVERA, H.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, A.; MORENO-SÁNCHEZ, R. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, n. 4, p. 653–671, 2005.

- MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 22, p. 999–1002, 2006.
- MIRZAEI, M.; SHAVANDI, A.; MIRDAMADI, S.; SOLEYMANZADEH, N.; MOTAHARI, P.; MIRDAMADI, N.; MOSER, M.; SUBRA, G.; ALIMORADI, H.; GORIELY, S. Bioactive peptides from yeast: A comparative review on production methods, bioactivity, structure-function relationship, and stability. *Trends in Food Science and Technology*, v. 118, p. 297–315, 1 dez. 2021.
- MMA - SECRETARIA DE BIODIVERSIDADE. Estratégia e Plano de Ação Nacionais para a Biodiversidade. Brasília: Secretaria da Biodiversidade - MMA, 2017.
- MORÁN-AGUILAR, M. G.; CALDERÓN-SANTOYO, M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Optimization of cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* CECT 2700 using brewery spent grain based on Taguchi design. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 13, p. 7983–7991, 2021.
- MORAN-AGUILAR, M. G.; COSTA-TRIGO, I.; CALDERÓN-SANTOYO, M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Production of cellulases and xylanases in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse and brewery spent grain. *Biochemical Engineering Journal*, v. 172, n. 108060, fev. 2021a.
- NANJUNDASWAMY, A.; OKEKE, B. C. Comprehensive Optimization of Culture Conditions for Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes of *Trichoderma* SG2 in Submerged and Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 191, n. 1, p. 444–462, 1 maio 2020.
- NAVANEETHAPANDIAN, U.; KUMAR, A. G.; LIDUJA, K.; JAYACHITHRA, R.; GOPAKUMARAN, N. Biocatalyst: Cellulase production in solid state fermentation (SSF) using rice bran as substrate. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, v. 11, n. 1, p. 7689–7699, 1 jan. 2021.
- NAWAZ, S.; NELOFER, R.; TAHIR, A.; SYED, Q. Production of Cellulase for Ethanol Fermentation from Pretreated Wheat Straw. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, v. 42, n. 2, p. 321–329, 1 jun. 2018.

- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. v. 11–1220 p.
- NOVOZYMES A/S, R. & D. Enzymes at Work. Bagsvaerd: Novozymes, 2013.
- OLIVEIRA, L. M.; VALDÉS SERRA, J. C.; MAGALHÃES, K. B. Estudo Comparativo das Diferentes Tecnologias Utilizadas para Produção de Etanol. *Geoambiente On-line*, v. 1, n. 19, 2013.
- PASSOS, D. de F.; PEREIRA, N.; 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. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, v. 14, p. 60–66, 2018.
- PITARELO, A. P.; DA FONSECA, C. S.; CHIARELLO, L. M.; GÍRIO, F. M.; RAMOS, L. P. Ethanol production from sugarcane bagasse using phosphoric acid-catalyzed steam explosion. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 27, n. 10, p. 1889–1898, 2016.
- POET-DSM ADVANCED BIOFUELS. POET-DSM Achieves cellulosic biofuel breakthrough. Disponível em: <<https://poet.com/pr/poet-dsm-achieves-cellulosic-biofuel-breakthrough>>. Acesso em: 29 maio. 2024.
- RABELO, S. C.; DA COSTA, A. C.; VAZ ROSSEL, C. E. Industrial waste recovery. *Em: Sugarcane: Agricultural Production, Bioenergy and Ethanol*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier Inc., 2015. p. 365–381.
- RAHMA, E. H.; RAO, M. S. N. Effect of debittering treatment on the composition and protein components of lupine seed (*Lupinus termis*) flour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 32, n. 5, p. 1026–1030, 1984.
- RAÍZEN S.A. Raízen inaugura maior planta de Etanol de Segunda Geração do mundo. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/sala-de-imprensa/raizen-inaugura-maior-planta-de-etanol-de-segunda-geracao-do-mundo>>. Acesso em: 29 maio. 2024.
- ROHMAN, A.; DIJKSTRA, B. W.; PUSPANINGSIH, N. N. T. β -Xylosidases: Structural Diversity, Catalytic Mechanism, and Inhibition by Monosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 22, p. 5524, 2019.
- ROSALES-CALDERON, O.; ARANTES, V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnology for Biofuels*, v. 12, n. 1, 2019.

- ROTH, J. C. G.; HOELTZ, M.; BENITEZ, L. B. Current approaches and trends in the production of microbial cellulases using residual lignocellulosic biomass: a bibliometric analysis of the last 10 years. *Archives of Microbiology*, v. 202, n. 5, p. 935–951, 2020.
- SANDHU, S. K.; OBEROI, H. S.; BABBAR, N.; MIGLANI, K.; CHADHA, B. S.; NANDA, D. K. Two-Stage Statistical Medium Optimization for Augmented Cellulase Production via Solid-State Fermentation by Newly Isolated *Aspergillus niger* HN-1 and Application of Crude Cellulase Consortium in Hydrolysis of Rice Straw. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 61, n. 51, p. 12653–12661, 2013.
- SCARANO, F. R.; SANTOS, A. S. (Eds.). *Potência Ambiental da Biodiversidade: um caminho inovador para o Brasil. Relatório Especial do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas e da Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos*. 1. ed. Rio de Janeiro: PBMC/BPBES, 2018. 1–62 p.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Engenharia Bioquímica*. 1. ed. São Paulo: Blucher, 2001. v. 21–541 p.
- SIMENG, Z.; SACHA, G.; ISABELLE, H.-G.; MARIE-NOËLLE, R. A PCR-based method to quantify fungal growth during pretreatment of lignocellulosic biomass. *Journal of Microbiological Methods*, v. 115, p. 67–70, 2015.
- SINGH, A.; BAJAR, S.; DEVI, A.; PANT, D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, v. 14, n. 100652, 2021.
- SINGHANIA, R. R.; RUIZ, H. A.; AWASTHI, M. K.; DONG, C. Di; CHEN, C. W.; PATEL, A. K. Challenges in cellulase bioprocess for biofuel applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 151, n. 111622, 2021.
- SIQUEIRA, J. G. W.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. *Biomass and Bioenergy*, v. 132, n. 105419, 2020.
- TEIXEIRA, W. F. A.; BATISTA, R. D.; DO AMARAL SANTOS, C. C. A.; JÚNIOR, A. C. F.; TERRASAN, C. R. F.; DE SANTANA, M. W. P. R.; DE SIQUEIRA, F. G.; DE PAULA-ELIAS, F. C.; DE ALMEIDA, A. F. Minimal Enzymes Cocktail Development by Filamentous Fungi Consortia in Solid-State

- Cultivation and Valorization of Pineapple Crown Waste by Enzymatic Saccharification. *Waste and Biomass Valorization*, v. 12, n. 5, p. 2521–2539, 2021.
- THAPA, S.; MISHRA, J.; ARORA, N.; MISHRA, P.; LI, H.; O’HAIR, J.; BHATTI, S.; ZHOU, S. Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation. *Rev Environ Sci Biotechnol*, v. 19, p. 621–648, 2020.
- TUDZYNSKI, B.; KELLER, N.; COUTINHO DOS SANTOS, P.; MA, L. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in microbiology*, v. 5, n. 656, 2014.
- VAISHNAV, N.; SINGH, A.; ADSUL, M.; DIXIT, P.; SANDHU, S. K.; MATHUR, A.; PURI, S. K.; SINGHANIA, R. R. *Penicillium*: The next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports*, v. 2, p. 131–140, 2018.
- VANDENBERGHE, L. P. S.; VALLADARES-DIESTRA, K. K.; BITTENCOURT, G. A.; ZEVALLOS TORRES, L. A.; VIEIRA, S.; KARP, S. G.; SYDNEY, E. B.; DE CARVALHO, J. C.; THOMAZ SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. Beyond sugar and ethanol: The future of sugarcane biorefineries in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 167, n. 112721, 2022.
- YAN, S.; XU, Y.; YU, X. W. From induction to secretion: a complicated route for cellulase production in *Trichoderma reesei*. *Bioresources and Bioprocessing*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021.
- ZHANG, B.; GAO, Y.; ZHANG, L.; ZHOU, Y. The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 63, n. 1, p. 251–272, 2021.

8. APÊNDICES

8.1 APÊNDICE 1: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS NO EXPERIMENTO CINÉTICO INICIAL – COMPARAÇÃO DE BAGAÇOS E FUNGOS

Tabela 8-1: Atividades FPase produzidas por *A. niger* 5J, *T. asperellum* FEV e *P. pedernalense* F4B1.

<i>Aspergillus niger</i> 5J						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	1,006	1,106	0,940	0,131	0,270	0,237
5º dia	1,810	1,444	1,613	1,618	1,648	1,896
7º dia	1,981	1,547	1,700	1,744	1,369	1,540
10º dia	2,302	2,377	2,255	2,452	2,761	2,958
<i>Penicillium pedernalense</i> F4B1						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	1,006	1,106	0,940	0,131	0,270	0,237
5º dia	1,639	2,194	1,828	1,927	2,009	1,278
7º dia	1,899	2,016	2,340	1,880	1,946	1,995
10º dia	1,974	3,755	2,958	1,064	3,258	3,732
<i>Trichoderma asperellum</i> FEV						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	1,006	1,106	0,940	0,131	0,270	0,237
5º dia	1,484	1,768	1,601	1,252	1,329	1,578
7º dia	1,568	1,542	1,896	0,952	1,275	1,744
10º dia	1,050	–	2,384	–	1,852	2,307

Tabela 8-2: Atividades CMCase produzidas por *A. niger* 5J, *T. asperellum* FEV e *P. pedernalense* F4B1.

<i>Aspergillus niger</i> 5J						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	1,197	1,066	1,249	-0,033	0,216	0,105
5º dia	3,552	3,611	3,565	3,604	2,875	3,146
7º dia	3,483	3,094	3,110	3,297	1,982	2,309
10º dia	5,612	3,872	5,050	5,952	5,599	4,971
<i>Penicillium pedernalense</i> F4B1						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	1,197	1,066	1,249	-0,033	0,216	0,105
5º dia	1,681	2,930	2,512	1,694	2,165	1,011
7º dia	2,708	2,486	2,649	1,903	2,172	1,576
10º dia	7,339	5,494	4,147	2,002	5,141	3,571
<i>Trichoderma asperellum</i> FEV						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	1,006	1,106	0,940	0,131	0,270	0,237
5º dia	1,484	1,768	1,601	1,252	1,329	1,578
7º dia	1,568	1,542	1,896	0,952	1,275	1,744
10º dia	1,050	–	2,384	–	1,852	2,307

Tabela 8-3: Atividades β -glicosidase produzidas por *A. niger* 5J, *T. asperellum* FEV e *P. pedernalense* F4B1.

<i>Aspergillus niger</i> 5J						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	8,3	6,5	18,5	34,3	6,0	5,6
5º dia	993	848	861	945	885	885
7º dia	854	1316	852	890	1363	899
10º dia	2678	2683	1724	1827	1816	2691
<i>Penicillium pedernalense</i> F4B1						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	8,3	6,5	18,5	34,3	6,0	5,6
5º dia	635	824	699	192	224	252
7º dia	929	836	915	220	248	218
10º dia	2616	1552	1613	766	700	659
<i>Trichoderma asperellum</i> FEV						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	8,3	6,5	18,5	34,3	6,0	5,6
5º dia	754	744	706	797	1014	869
7º dia	751	696	750	843	850	834
10º dia	1200	1564	1774	1663	1658	2428

Tabela 8-4: Atividades Endoxilanase produzidas por *A. niger* 5J, *T. asperellum* FEV e *P. pedernalense* F4B1.

<i>Aspergillus niger</i> 5J						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	35,2	-10,3	79,4	-0,8	-16,5	-0,2
5º dia	648	545	556	375	461	722
7º dia	739	443	620	663	432	472
10º dia	569	333	601	273	624	901
<i>Penicillium pedernalense</i> F4B1						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	35,2	-10,3	79,4	-0,8	-16,5	-0,2
5º dia	342	352	462	662	637	378
7º dia	244	259	322	625	532	826
10º dia	702	121	50	19	853	1235
<i>Trichoderma asperellum</i> FEV						
	Bagaço: Explosão a vapor			Bagaço: <i>In natura</i>		
Dia 0	35,2	-10,3	79,4	-0,8	-16,5	-0,2
5º dia	95	82	105	286	333	423
7º dia	121	11	89	97	232	398
10º dia	20	60	106	218	75	270

8.2 APÊNDICE 2: ANOVAS *TWO-WAY* PARA EXPERIMENTO CINÉTICO INICIAL – COMPARAÇÃO DE BAGAÇOS E FUNGOS

Tabela 8-5: Análises de variância *two-way* para atividades FPase do experimento cinético inicial, comparando os fatores Fungo e Bagaço.

Dia 5					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	0,0884	2	0,0442	F (2, 12) = 0,765	P=0,4865
Fungo	0,290	2	0,145	F (2, 12) = 2,51	P=0,1226
Bagaço	2,27	1	2,27	F (1, 12) = 39,4	P<0,0001
Resíduo	0,693	12	0,0578		
Dia 7					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	0,0331	2	0,0166	F (2, 12) = 0,295	P=0,7498
Fungo	0,845	2	0,423	F (2, 12) = 7,53	P=0,0076
Bagaço	1,50	1	1,50	F (1, 12) = 26,8	P=0,0002
Resíduo	0,673	12	0,0561		
Dia 10					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	0,343	2	0,171	F (2, 10) = 0,253	P=0,7813
Fungo	1,94	2	0,968	F (2, 10) = 1,43	P=0,2845
Bagaço	3,80	1	3,80	F (1, 10) = 5,61	P=0,0394
Resíduo	6,78	10	0,678		

Tabela 8-6: Análises de variância *two-way* para atividades CMCase do experimento cinético inicial, comparando os fatores Fungo e Bagaço.

Dia 5					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	0,862	2	0,431	F (2, 12) = 1,49	P=0,2645
Fungo	10,9	2	5,45	F (2, 12) = 18,8	P=0,0002
Bagaço	0,231	1	0,231	F (1, 12) = 0,800	P=0,3888
Resíduo	3,47	12	0,289		

Dia 7					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	0,0798	2	0,0399	F (2, 12) = 0,122	P=0,8859
Fungo	2,42	2	1,21	F (2, 12) = 3,72	P=0,0554
Bagaço	0,318	1	0,318	F (1, 12) = 0,977	P=0,3425
Resíduo	3,91	12	0,326		

Dia 10					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	5,95	2	2,97	F (2, 10) = 2,20	P=0,1611
Fungo	8,21	2	4,11	F (2, 10) = 3,04	P=0,0929
Bagaço	0,100	1	0,100	F (1, 10) = 0,0744	P=0,7906
Resíduo	13,5	10	1,35		

Tabela 8-7: Análises de variância *two-way* para atividades β -glicosidase do experimento cinético inicial, comparando os fatores Fungo e Bagaço.

Dia 5					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	352495	2	176248	F (2, 12) = 34,4	P<0,0001
Fungo	623654	2	311827	F (2, 12) = 60,9	P<0,0001
Bagaço	60126	1	60126	F (1, 12) = 11,7	P=0,0050
Resíduo	61453	12	5121		
Dia 7					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	554102	2	277051	F (2, 12) = 11,2	P=0,0018
Fungo	656325	2	328162	F (2, 12) = 13,2	P=0,0009
Bagaço	137256	1	137256	F (1, 12) = 5,54	P=0,0365
Resíduo	297358	12	24780		
Dia 10					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	1997789	2	998894	F (2, 12) = 5,00	P=0,0263
Fungo	2547108	2	1273554	F (2, 12) = 6,38	P=0,0130
Bagaço	581032	1	581032	F (1, 12) = 2,91	P=0,1137
Resíduo	2395157	12	199596		

Tabela 8-8: Análises de variância *two-way* para atividades endoxilanase do experimento cinético inicial, comparando os fatores Fungo e Bagaço.

Dia 5					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	81492	2	40746	F (2, 12) = 3,49	P=0,0640
Fungo	357338	2	178669	F (2, 12) = 15,3	P=0,0005
Bagaço	117889	1	117889	F (1, 12) = 10,1	P=0,0080
Resíduo	140212	12	11684		
Dia 7					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	161719	2	80859	F (2, 12) = 5,62	P=0,0189
Fungo	523576	2	261788	F (2, 12) = 18,2	P=0,0002
Bagaço	173798	1	173798	F (1, 12) = 12,1	P=0,0046
Resíduo	172502	12	14375		
Dia 10					
Fator	SQ	GL	GM	F (GLn, GLd)	P valor
Interação	91470	2	45735	F (2, 12) = 0,424	P=0,6636
Fungo	636149	2	318075	F (2, 12) = 2,95	P=0,0906
Bagaço	282897	1	282897	F (1, 12) = 2,63	P=0,1311
Resíduo	1292931	12	107744		

8.3 APÊNDICE 3: ATIVIDADES ENZIMÁTICAS NO ESTUDO DE PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO: PLANEJAMENTO FATORIAL

Tabela 8-9: Atividades FPase produzidas por *A. niger* 5J em planejamento fatorial completo 2³ com triplicata do ponto central.

	Extrato de Levedura (mgN/5g de bagaço)	NaNO ₃ (mg/5g bagaço)	Conídios (quant/5g de bagaço)	Atividades enzimáticas (U/g de bagaço)				
				0h	71,5h	118,5h	164,75h	235,5h
Exp.1	25	400	2,5E+07	0,225	0,422	1,561	1,482	1,198
Exp.2	25	400	2,5E+05	0,225	0,789	1,693	1,437	1,252
Exp.3	25	40	2,5E+07	0,481	0,519	1,753	1,690	1,341
Exp.4	25	40	2,5E+05	0,481	0,856	1,479	1,374	1,507
Exp.5	5	400	2,5E+07	0,087	0,568	1,336	1,428	1,050
Exp.6	5	400	2,5E+05	0,087	0,793	1,313	1,315	1,067
Exp.7	5	40	2,5E+07	0,026	0,831	1,303	1,144	1,280
Exp.8	5	40	2,5E+05	0,026	0,753	1,470	1,210	1,125
Exp.9	15	220	2,5E+06	0,089	0,657	1,587	1,381	1,411
Exp.10	15	220	2,5E+06	0,089	0,743	1,324	1,470	1,247
Exp.11	15	220	2,5E+06	0,089	0,415	1,761	1,231	1,184

Tabela 8-10: Atividades CMCase produzidas por *A. niger* 5J em planejamento fatorial completo 2³ com triplicata do ponto central.

	Extrato de Levedura (mgN/5g de bagaço)	NaNO ₃ (mg/5g bagaço)	Conídios (quant/5g de bagaço)	Atividades enzimáticas (U/g de bagaço)				
				0h	71,5h	118,5h	164,75h	235,5h
Exp.1	25	400	2,5E+07	0,147	8,480	3,595	3,615	3,484
Exp.2	25	400	2,5E+05	0,147	11,67	4,538	3,392	3,301
Exp.3	25	40	2,5E+07	0,452	9,842	3,759	3,037	2,777
Exp.4	25	40	2,5E+05	0,452	10,51	3,713	3,202	3,595
Exp.5	5	400	2,5E+07	-0,046	8,394	3,811	2,678	2,489
Exp.6	5	400	2,5E+05	-0,046	8,911	3,576	2,986	2,993
Exp.7	5	40	2,5E+07	0,210	10,32	2,934	2,449	3,314
Exp.8	5	40	2,5E+05	0,210	12,96	3,392	2,921	3,314
Exp.9	15	220	2,5E+06	0,118	11,53	3,091	3,490	3,523
Exp.10	15	220	2,5E+06	0,118	12,29	3,032	2,947	2,580
Exp.11	15	220	2,5E+06	0,118	9,721	3,693	2,757	3,720

Tabela 8-11: Atividades β -glicosidase produzidas por *A. niger* 5J em planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

	Extrato de Levedura (mgN/5g de bagaço)	NaNO ₃ (mg/5g bagaço)	Conídios (quant/5g de bagaço)	Atividades enzimáticas (U/g de bagaço)				
				0h	71,5h	118,5h	164,75h	235,5h
Exp.1	25	400	2,5E+07	63	7155	4868	4649	4317
Exp.2	25	400	2,5E+05	63	5873	2932	4170	3950
Exp.3	25	40	2,5E+07	8	6955	4976	4764	5063
Exp.4	25	40	2,5E+05	8	6387	6018	4282	4977
Exp.5	5	400	2,5E+07	-15	3021	3278	3129	2651
Exp.6	5	400	2,5E+05	-15	3347	2927	2348	2891
Exp.7	5	40	2,5E+07	-15	4450	2902	2993	4572
Exp.8	5	40	2,5E+05	-15	4413	3735	3142	3538
Exp.9	15	220	2,5E+06	-10	4455	4438	3669	3331
Exp.10	15	220	2,5E+06	-10	4972	3298	3687	3784
Exp.11	15	220	2,5E+06	-10	5166	5030	3258	3974

Tabela 8-12: Atividades endoxilanase produzidas por *A. niger* 5J em planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central.

	Extrato de Levedura (mgN/5g de bagaço)	NaNO ₃ (mg/5g bagaço)	Conídios (quant/5g de bagaço)	Atividades enzimáticas (U/g de bagaço)				
				0h	71,5h	118,5h	164,75h	235,5h
Exp.1	25	400	2,5E+07	12,3	356,6	521,8	535,7	483,9
Exp.2	25	400	2,5E+05	12,3	649,1	739,4	539,8	425,7
Exp.3	25	40	2,5E+07	34,8	783,8	698,2	674,1	644,4
Exp.4	25	40	2,5E+05	34,8	888,0	677,4	600,2	595,3
Exp.5	5	400	2,5E+07	35,8	404,2	591,6	450,3	314,3
Exp.6	5	400	2,5E+05	35,8	540,2	461,8	365,2	448,7
Exp.7	5	40	2,5E+07	42,6	684,4	494,7	400,5	447,4
Exp.8	5	40	2,5E+05	42,6	649,9	596,7	458,0	443,7
Exp.9	15	220	2,5E+06	3,5	676,9	627,2	423,7	380,1
Exp.10	15	220	2,5E+06	3,5	637,3	586,5	436,2	448,3
Exp.11	15	220	2,5E+06	3,5	735,2	712,0	407,6	479,0