

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO DE AÇUCARES FERMENTÁVEIS PARA PRODUÇÃO DE ETANOL
DE SEGUNDA GERAÇÃO UTILIZANDO ENDOGLUCANASES DE FUNGO
FILAMENTOSO**

MARTA MARIA OLIVEIRA DOS SANTOS GOMES

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió – AL

MARTA MARIA OLIVEIRA DOS SANTOS GOMES

**PRODUÇÃO DE AÇUCARES FERMENTÁVEIS PARA
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO
UTILIZANDO ENDOGLUCANASES DE FUNGO FILAMENTOSO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Maceió – Alagoas
2024

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

G633p Gomes, Marta Maria Oliveira dos Santos.
Produção de açúcares fermentáveis para produção de etanol de segunda geração utilizando endoglucanases de fungo filamentosos / Marta Maria Oliveira dos Santos Gomes. – 2024.
122 f. : il. color.

Orientador: Hugo Juarez Vieira Pereira.
Coorientador: Marcelo Franco.
Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2024.

Inclui bibliografias.

1. Açúcares fermentáveis – Produção. 2. Etanol de segunda geração. 3. Endoglucanases. 4. Fermentação em estado sólido. 5. Adsorção. 6. Pré-tratamento ácido. I. Título.

CDU: 54 : 661.722



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb@iqb.ufal.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Marta Maria Oliveira dos Santos Gomes** intitulada: “**Produção de açúcares fermentáveis para geração de etanol de segunda geração utilizando endoglucanases de fungos filamentosos**”, apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 19 de julho de 2024, às 14h, por meio de videoconferência.

Maceió, 19 de julho de 2024.

Comissão Examinadora:

<p>Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira Orientador (PPGQB/IQB/UFAL)</p> <p>Documento assinado digitalmente</p> <p> HUGO JUAREZ VIEIRA PEREIRA Data: 19/07/2024 16:41:05-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br</p>	<p>Prof. Dr. Marcelo Franco, (UESC)</p> <p>Documento assinado digitalmente</p> <p> MARCELO FRANCO Data: 21/07/2024 08:28:45-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br</p>
<p>Prof. Dra. Ruth Rufino do Nascimento (PPGQB/IQB/UFAL)</p> <p>Documento assinado digitalmente</p> <p> RUTH RUFINO DO NASCIMENTO Data: 23/07/2024 12:33:56-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br</p>	<p>Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva (CTEC/UFAL)</p> <p>Documento assinado digitalmente</p> <p> CARLOS EDUARDO DE FARIAS SILVA Data: 19/07/2024 17:35:56-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br</p>
<p>Prof. Dr. Francis Soares Gomes (PPGQB/IQB/UFAL)</p> <p>Documento assinado digitalmente</p> <p> FRANCIS SOARES GOMES Data: 19/07/2024 20:23:15-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br</p>	<p>Profa. Dra. Sonia Salgueiro Machado (PROFQUI/UFAL)</p> <p>Documento assinado digitalmente</p> <p> SONIA SALGUEIRO MACHADO Data: 20/07/2024 14:29:41-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br</p>

*Dedico esse trabalho a Deus, pois sem Ele eu nada seria!
A minha família e esposo pelo apoio incondicional.
Aos meus colegas de laboratório.
Aos mestres que me guiaram até aqui.
Vocês são a razão dessa conquista.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado chegar até aqui. Autor da minha vida e história. Muito obrigada Deus, sem Ti com toda certeza eu não chegaria a lugar nenhum. Toda honra e toda glória a Ele.

Agradeço a minha família que é minha base e sustentação, que sempre alimentou meu sonho de estudar e nunca duvidaram que eu conseguiria. Família amo vocês demais!

A meus pais Cláudio e Neuma, que sempre me apoiaram, em toda a minha trajetória. Tenho certeza que sem vocês jamais chegaria até aqui.

A meu esposo Wallace que atravessou comigo diversas barreiras (picos de alegrias, ansiedades e frustrações), sempre enxugou minhas lágrimas e vibrou comigo em cada nova conquista, sempre acreditou em mim até quando eu não acreditava. Você é um presente de Deus.

Meus amigos queridos que a vida me deu nesses anos de laboratório: Monizy, Alê, Cledson, Dávida, Edson, Marta, Delma, Josiel, Heloisa,(UFAL) e Marcia, Marise (UESB). E a minha amiga (irmã) de sempre Rebeca, obrigada por sempre acreditarem em mim. A Bíblia fala que existe amigos mais chegados que irmãos e na vida eu ganhei você!

Agradeço pelo apoio financeiro do CNPq, que está sendo fundamental durante o período de pesquisa. A Universidade Federal de Alagoas ao Programa de pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB).

Agradeço ao meu orientador Hugo Juarez e coorientador Marcelo Franco, por terem sido intermediários da relação construída com o conhecimento, e por toda dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Minha eterna gratidão a todos!

“Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;
glória, pois, a Ele ternamente. Amém”
Romanos 11:36

RESUMO

A crescente demanda global por etanol exige o desenvolvimento de tecnologias de segunda geração para evitar limitações na oferta e concorrência pelo uso da terra na produção de energia. Uma alternativa promissora é a produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, presente em resíduos agroindustriais e fontes renováveis. Este estudo explorou a produção de endoglucanases por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 e resíduos lignocelulósicos como bagaço de cana-de-açúcar (BCA), casca de coco (CC), coroa de abacaxi (CA) e farelo de trigo (FT) como substratos. A caracterização do extrato bruto enzimático incluiu a avaliação da termoestabilidade, estabilidade em diferentes pHs, atividade na presença de metais e solventes orgânicos, halotolerância e estabilidade de armazenamento. A enzima endoglucanase obtida foi aplicada na sacarificação de BCA, CC, FT, casca de fruto de cacau (CFC) e casca de semente de cacau (CSC), confirmando a eficiência do processo por microscopia eletrônica de varredura. A otimização dos fatores que influenciam a sacarificação foi realizada através do planejamento experimental Box-Behnken, identificando como condições ótimas 6 horas de incubação, 15% de substrato e 440 U/mL de concentração enzimática, resultando em 253,19 mg/g de açúcares redutores. Como alternativa, o extrato enzimático foi imobilizado em carvões ativos derivados da casca do cacau e tratados com fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium roqueforti* (CAPr), *Aspergillus niger* (CAAn) e controle (CAC). A adsorção da enzima foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura, e a caracterização indicou que a enzima imobilizada apresentou maior faixa de atividade a 80°C e pH 2 a 13, com 80% de atividade mantida após 120 dias. A enzima imobilizada manteve atividade relativa de 30%, 33% e 32% após cinco ciclos para CAPr, CAAn e CAC, respectivamente. Foi avaliada a eficiência do pré-tratamento de BCA e *Sargassum vulgare* (SVU) com ácido sulfúrico diluído antes da aplicação do extrato enzimático na sacarificação. A análise demonstrou que o BCA possui alto teor de hemicelulose e o SVU menos de 3% de lignina, favorecendo o uso deste sem tratamento prévio. Caracterizações via FTIR e XRD confirmaram os efeitos do pré-tratamento, e o HPLC identificou os tipos de açúcares produzidos. Esses resultados destacam o potencial da endoglucanase obtida para aplicação industrial.

Palavras-chave: Enzimas, Box-Behnken, Aplicações biotecnológicas, Pré-tratamento ácido, Imobilização enzimática.

ABSTRACT

The growing global demand for ethanol necessitates the development of second-generation technologies to avoid supply limitations and competition for land use in energy production. A promising alternative is the production of ethanol from lignocellulosic biomass, found in agro-industrial residues and renewable sources. This study explored the production of endoglucanases through solid-state fermentation using the fungus *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 and lignocellulosic residues such as sugarcane bagasse (SCB), coconut shell (CC), pineapple crown (PC), and wheat bran (WB) as substrates. The crude enzymatic extract was characterized by evaluating its thermostability, stability at different pH levels, and activity in the presence of metals and organic solvents. The enzyme was applied in the saccharification of SCB, CC, WB, cocoa fruit husk (CFH), and cocoa seed shell (CSS), with scanning electron microscopy confirming the efficiency of the process. The optimization of factors influencing saccharification was carried out using the Box-Behnken experimental design, identifying optimal conditions of 6 hours of incubation, 15% substrate, and 440 U/mL enzyme concentration, resulting in 253.19 mg/g of reducing sugars. As an alternative, the enzymatic extract was immobilized on activated carbons derived from cocoa shell and treated with solid-state fermentation using *Penicillium roqueforti* (CAPr), *Aspergillus niger* (CAAn), and a control (CAC). Enzyme adsorption was confirmed by scanning electron microscopy, and the characterization indicated that the immobilized enzyme exhibited a broader activity range at 80°C and pH 2 to 13, maintaining 80% activity after 120 days. The immobilized enzyme retained relative activity of 30%, 33%, and 32% after five cycles for CAPr, CAAn, and CAC, respectively. The efficiency of pre-treating SCB and *Sargassum vulgare* (SVU) with diluted acid before applying the enzymatic extract was also evaluated. The analysis demonstrated that SCB has a high hemicellulose content, while SVU has less than 3% lignin, favoring its use without prior treatment. Characterizations by FTIR and XRD confirmed the effects of the pre-treatment, and HPLC identified the types of sugars produced. These results highlight the potential of the obtained endoglucanase for industrial application.

Keywords: Enzymes, Box-Benhken, Biotechnological applications, Acid pretreatment, Enzyme immobilization.

ABREVEATURAS

BBD	box-Behnken Design
BCA	bagaço de cana de açúcar
BDA	Agar Batata Dextrose
BG	β -glicosidases /celobiase
CA	coroa de abacaxi
CA	carvões ativos
	carvões ativos da casca do cacau e tratados com FES utilizando os fungos
CAAn	<i>Aspergillus niger</i>
CAC	carvões ativos da casca do cacau
	carvões ativos da casca do cacau e tratados com FES utilizando os fungos
CAPr	<i>Penicilium roqueforti</i>
CBH	exo-glucanases
CC	casca de coco
CEL	Celulose
CFC	casca fruto cacau
CMC	Carboximetilcelulose
CSC	casca semente cacau
EC	concentração enzimática
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EEB	extrato enzimático bruto
EG	Endo-glucanases
FES	fermentação em estado sólido
FT	farelo de trigo
HC	Hemicelulose
LIG	Lignina
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PDA	agar-dextrose-batata
RSM	metodologias de superfície de resposta
SB	Substrato
SDS	dodecil sulfato de sódio
SVU	sargassum vulgare
TM	Temperatura
Triton X-100	t-octilfenoxipolietoxietanol
XRD	difração de raios X

LISTA DE FIGURAS

Seção 1- Revisão da literatura

Figura 1: (A) Casca do fruto cacau, (B) Casca da semente cacau, (C) Casca do coco verde, (D) Farelo de trigo, (E) Bagaço de cana-de-açúcar e (F) Coroa de abacaxi.....	20
Figura 2: Macroalga <i>Sargassum vulgare</i>	22
Figura 3. Moléculas de celulose unidas por ligações glicosídicas.....	24
Figura 4. Representação sistemática da utilização de biomassa lignocelulósica para produção de enzimas	26
Figura 5: Ilustrações do fungo <i>Penicillium roqueforti</i> . Aspectos das colônias crescidas em cultura no interior de placa de petri em meio BDA e micrografia obtida por microscópio óptico	28
Figura 6. Mecanismo de hidrólise enzimática da celulose	30
Figura 7. Aplicações da celulase	33
Figura 8: Principais técnicas de imobilização enzimática.....	35

Seção 2 – Artigo 1

Figura 1. Perfil da produção de endoglucanase (U/mL) em fermentações em estado sólido por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110, nos resíduos de casca de coco, cana-de-açúcar, farelo de trigo e coroa de abacaxi a 27°C e 60% de umidade. Barras representam o desvio das triplicatas e a figura foi obtida com o software OriginPro® v. 8.0	58
Figura 2. A) Atividade relativa da endoglucanase de <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em FT obtida em diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70 e 80 °C) em 60 min. A atividade mais alta obtida em 50 °C foi tomada como 100%. (B) Perfil de termoestabilidade da endoglucanase. As reações foram realizadas em tampão acetato de sódio 100 mM, pH5,0) nas temperaturas de 40 à 80 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.....	59
Figura 3. Atividade relativa da endoglucanase de <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em farelo de trigo e obtida em diferentes pHs, condições de reação: temperatura 50°C; tempo: 60 min.....	60
Figura 4. Perfil de estabilidade ao pH de endoglucanase por <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 cultivado em FT, condições de reação: temperatura 50°C; tempo: 300 min	61

Figura 5. Efeito da concentração de NaCl na atividade de hidrólise da endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 do extrato bruto. A atividade foi determinada na presença de diferentes concentrações de NaCl variando de 0 a 6,0 M (a atividade obtida utilizando a enzima sem NaCl foi tomada como 100% - controle). Os experimentos foram realizados em triplicata.63

Figura 6. Efeito da refrigeração e congelamento do extrato bruto enzimático a -20°C e 6°C sobre atividade de endoglucanase *P. roqueforti* ATCC 10110 (a atividade obtida no tempo 0h foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em duplicata....64

Figura 7. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, farelo de trigo, casca do fruto de cacau e casca da semente do cacau empregando endoglucanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110. A sacarificação foi realizada em 50 °C, tampão acetato de sódio 0,1M pH 5, por 24 h, utilizando uma carga de substrato de 1% e uma carga enzimática de 440 U/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata66

Figura 8. Micrografias eletrônicas de varredura de várias amostras de farelo de trigo (1), bagaço de cana-de-açúcar (2), casca do fruto de cacau (3), casca da semente do cacau (4) e casca de coco (5), sendo os resíduos divididos em in natura (A) e sacarificado (B).....68

Figura 9. Efeitos padronizados para fatores investigados (Gráfico de Pareto)70

Figura 10. Gráficos de contorno foram obtidos a partir de um modelo quadrático para as variáveis: tempo (TM), substrato (SB) e concentração enzimática (EC).....71

Seção 3 – Artigo 2

Figura 1. : Imobilização: (a) concentração proteica; (b) atividade da endoglucanase...85

Figura 2: Imagens MEV dos poros dos carvões ativos: CAC; (a) sem enzima imobilizada; (b) com endoglucanase imobilizada. CAAn; (c) sem enzima imobilizada; (d) com endoglucanase imobilizada. CAPr; (e) sem enzima imobilizada; (f) com endoglucanase imobilizada.....88

Figura 3: Espectroscopia de raio X por dispersão em energia (EDX) dos carvões ativos: Sem imobilização (a) CAC, (c) CAAn e (e) CAPr. Após imobilização (b) CAC, (d) CAAn e (f) CAPr.....90

Figura 4: Atividade relativa dos carvões ativos com a enzima endoglucanase imobilizada (CAC, CAAn e CAPr) e livre. (a) em diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70 e 80 °C) 60 min; (b) perfil de termoestabilidade da endoglucanase endoglucanase imobilizada (CAC, CAAn e CAPr) e livre, na temperatura de 50 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.....92

Figura 5. Atividade relativa dos carvões ativos com a enzima endoglucanase

imobilizada (CAC, CAAn e CAPr) e livre. (a) em diferentes pH (2 à 13) 60 min; (b) perfil de estabilidade ao pH de endoglucanase imobilizada (CAC, CAAn e CAPr) e livre, no pH 5. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.....94

Figura 6: Perfil da caracterização da endoglucanase imobilizada (a); Efeito da refrigeração 4 dos carvões imobilizados e livre; (b) Estudo do reaproveitamento dos carvões ativos CAC, CAAN e CAPr após ciclos sucessivos.....95

Seção 4 – Artigo 3

Figura 1: Perfil do pré-tratamento com ácido H₂SO₄ diluído (0.5%, 1%, 1.5% (v/v) com a quantidade de açúcar redutor liberado.....113

Figura2. Espectros de infravermelho médio do *Sargassum vulgare* antes e depois do tratamento.....114

Figura 3: Espectros de DRX (A) SVU in natura, (B) SVU pré-tratamento com ácido, (C) BCA in natura, (D) BCA pré-tratamento com ácido.....115

Figura 4: (A) Sacarificação do BCA, (B) Sacarificação da SVU. Resíduos pré-tratados com ácido utilizando a endoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110.....116

LISTA DE TABELAS

Seção 2 – Artigo 1

Tabela 1. Matriz experimental do Design Box-Behnken e resposta experimental (variáveis em valores reais e codificados)56

Tabela 2. Atividade da endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 frente a diferentes sais metálicos, compostos e solventes orgânicos (a atividade obtida utilizando o extrato bruto sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 2mM; temperatura: 50 °C; pH: 5; tempo: 60 min). Os experimentos foram realizados em triplicata.....62

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático.....69

Seção 3 – Artigo 2

Tabela 1: Parâmetros de imobilização da endoglucanase em partículas de carvões ativos obtidos da casca do cacau.....86

Seção 4 – Artigo 3

Tabela 1: Análise composicional dos resíduos, BCA (bagaço de cana) e VRU (*Sargassum vulgare*) “in natura” e após os pré-tratamento com ácido.....112

Tabela 2: Identificação e concentração dos açúcares redutores formados a partir dasacarificação dos resíduos BCA e VRU in natura e após o pré-tratamento ácido.....117

SUMÁRIO

SEÇÃO 1- REVISÃO DA LITERATURA	17
1 Introdução	18
1.1 Materiais lignocelulósicos.....	19
1.2 Pré-tratamento de resíduos	22
1.3 Estrutura da celulose	23
1.4 Fermentação em estado sólido	24
1.5 Microrganismos lignocelulolíticos.....	26
1.5.1 Penicillium roqueforti	27
1.6 Enzimas celulósicas	29
1.7 Importância econômica das celulases	31
1.8 Aplicação das celulases.....	32
1.9 Imobilização enzimática.....	34
2 Conclusão.....	36
3 Justificativa e Objetivos	37
3.1 Justificativa	37
3.2 Objetivo Geral	37
3.2.1 Objetivos específicos.....	38
4 Referências.....	39
SEÇÃO 2 – ARTIGO 1	48
2 ARTIGO 1: Optimization of enzymatic saccharification of industrial wastes using a thermostable and halotolerant endoglucanase through Box-Behnken experimental design.....	49
2.1 Introdução.....	50
2.2 Materiais e métodos	52
2.2.1 Substratos e microrganismo	53
2.2.2 Preparo inóculo e fermentação em estado sólido (FES).....	53
2.2.3 Obtenção do extrato enzimático.....	53
2.2.4 Determinação da atividade enzimática	53
2.2.5 Caracterização bioquímica	54
2.2.5.1 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima.....	54
2.2.5.2 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima.....	54
2.2.5.3 Efeito dos sais metálicos e solventes orgânicos.....	54
2.2.5.4 Halotolerância.....	55
2.2.5.5 Estabilidade do extrato bruto enzimático (congelada e resfriada).....	55
2.2.6 Aplicação do extrato bruto enzimático na sacarificação de resíduos lignocelulósicos.....	55
2.2.7 Microscopia eletrônica de varredura.....	56

2.2.8 Otimização multivariada.....	56
2.3 Resultados e discussão.....	57
2.3.1 Produção de endoglucanase.....	57
2.4 Caracterização do extrato enzimático bruto.....	58
2.4.1 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade.....	58
2.4.2 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade	60
2.4.3 Efeito sob a adição de sais e solventes orgânicos.....	61
2.4.4 Halotolerância.....	63
2.4.5 Estabilidade do extrato bruto enzimático.....	64
2.5 Sacarificação de resíduos agroindustriais.....	64
2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	67
2.5.2 Planejamento Box–Behnken para otimização da sacarificação do farelo de trigo.....	69
2.6 Conclusão.....	71
2.7 Referências bibliográficas.....	72

SEÇÃO 3 – ARTIGO 277

3. ARTIGO 2: Re-recycling agro-industrial waste: exploiting activated carbon from cocoa shells after solid-state fermentation as a support for endoglucanase immobilization.....	78
3.1 Introdução.....	79
3.2 Materiais e Métodos.....	81
3.2.1 Material.....	82
3.2.2 Métodos.....	82
3.2.2.1 Preparação de inóculo e FES.....	82
3.2.2.2 Obtaining the enzyme extract	82
3.2.2.3 Atividade enzimática	82
3.2.2.4 Concentração proteica das preparações extrato multienzimático.....	83
3.2.2.5 Imobilização da endoglucanase.....	83
3.2.2.6 Caracterização dos carvões Ativados (MEV e EDX).....	84
3.2.2.7 Caracterização da endoglucanase livre e imobilizada.....	84
3.2.2.8 Reutilização da endoglucanase imobilizada.....	84
3.2.2.9 Estatísticas.....	85
3.3 Resultados e discussão.....	85
3.3.1 Imobilização enzimática.....	85
3.3.2 Caracterização dos carvões ativos (CAPr, CAAn e CAC).....	83
3.3.3 Caracterização da enzima endoglucanase livre e imobilizado.....	91
3.3.4 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	91
3.3.5 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática.....	93
3.3.6 Estabilidade tempo armazenamento.....	94
3.3.7 Reutilização da endoglucanase imobilizada.....	95
3.4 Conclusão.....	96
3.5 Referências.....	97

SEÇÃO 4 – ARTIGO 3103

4. ARTIGO 3: Avaliação do pré-tratamento do bagaço da cana e a macroalga <i>Sargassum vulgare</i> com ácido diluído na sacarificação utilizando a endoglucanase do <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110.....	104
4.1 Introdução.....	105

4.2	Materias e Métodos	106
4.2.1	Coleta, preparação da matéria prima e microrganismo.....	106
4.2.2	Preparo do inoculo e fermentação em estado sólido (FES).....	107
4.2.3	Obtenção do extrato enzimático.....	107
4.2.4	Pré-tratamento ácido diluído.....	108
4.2.5	Análise de composição.....	108
4.2.6	Determinação de atividade da celulose.....	108
4.2.7	Análise FTIR.....	109
4.2.8	Análise de Raio-X e Cristalinidade.....	109
4.2.9	Microscopia eletrônica de varredura.....	109
4.2.10	Sacarificação dos resíduos.....	110
4.2.11	Identificação dos inibidores formados após os pré-tratamentos.....	110
4.3	Resultados e discussão.....	110
4.3.1	Pré-tratamento ácido diluído.....	111
4.3.2	Análise composicional da biomassa antes e após pré-tratamento.....	113
4.3.3	FTIR.....	113
4.3.4	Difração de Raio- X.....	114
4.3.5	Sacarificação dos resíduos.....	115
4.4	Conclusão.....	117
4.5	Referências.....	118
SEÇÃO 5 – CONCLUSÃO E PESPECTIVAS FUTURAS.....		121
5.1	Conclusão geral.....	122
5.2	Pespectivas.....	122
5.3	Anexos.....	122

Seção 1

Revisão da literatura

1 Introdução

Atualmente a dependência global de combustíveis fósseis vem causando efeitos desfavoráveis, devido ao declínio das reservas de petróleo bruto, e promovendo a diminuição da qualidade do ar e o aumento das temperaturas globais (MENEZES et al., 2019). A sustentabilidade e a independência dos combustíveis fósseis tem se tornado o objetivo dos pesquisadores, tendo em vista que definição de química verde tornou-se uma ferramenta para promover o desenvolvimento sustentável em laboratórios e indústria (TOBISZEWSKI et al., 2015) e visando a “economia de desperdício zero”, que utiliza resíduos como matéria-prima para novos produtos e aplicações, essa via se tornou necessária para o equilíbrio do meio ambiente e razões econômicas (DEDOUSI, DIAMANTOPOULOU, 2022).

Assim, estratégias vêm surgindo para obter fontes alternativas de energia conhecidas como limpas e renováveis, este sendo um conceito amplo que incluem biocombustíveis como etanol de segunda geração (2G). (MASSARENTE et al., 2020). No processo de obtenção do 2G, a utilização de biomassa agroindustrial é essencial, sendo esta reconhecida como uma excelente matéria-prima material para a produção de várias enzimas industrialmente importantes (RAINA et al., 2022). A biomassa lignocelulósica, que é considerada o material mais abundante do planeta (SREENA e SEBASTIAN, 2019), constituída de celulose, lignina e hemicelulose.

Na utilização desses resíduos agroindustriais a fermentação no estado sólido (FES), surge como a vantagem de reaproveitar esses resíduos, pois trata-se de uma fermentação quase ausente de água livre que proporciona ao microrganismo cultivado um ambiente o mais próximo possível de seu ambiente natural (RAINA et al., 2022). Dentre os microrganismos que podem ser utilizados na FES, os fungos são capazes de produzir enzimas na desconstrução da lignocelulose, destacando os fungos filamentosos que são capazes de produzir altas concentrações de celulasas devido às condições da fermentação (SINGHANIA et al., 2010). Dessa forma o fungo filamentoso *Penicillium roqueforti* vem ganhando destaque por ser capaz de crescer em soluções salina, além de seu sistema enzimático que tem sido caracterizado bioquimicamente (Mioso et al., 2015). As enzimas do complexo celulolítico são da classe das hidrolases que clivam ligações oglicosídicas, assim enzimas celulasas constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua total hidrólise (NASCIMENTO et al., 2013; FLORENCIO, 2017; XUE et al., 2018; KUMAR et al., 2019).

As celulasas são a terceira enzima mais produzida economicamente no mundo

com crescimento constante devido a suas vastas aplicações nas indústrias (PRASAD et al., 2019; RAINA et al., 2022). O sistema enzimático das celulases é constituído principalmente por três componentes, endo-glucanases (EG) (EC 3.2.1.4), exo-glucanases (CBH) (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases/celobiase (BG) (EC 3.2.1.21), celulose fosforilases e celulases oxidativas (RAINA et al., 2022; KUMAR et al., 2019; LEKAKARN et al., 2021). Essas enzimas atuam em sigernismo na degradação da lignocelulose (SILVA, 2016; LEKAKARN et al., 2021).

O mercado das enzimas tem se mostrado promissor uma vez que foi avaliado em 2019 em US\$ 9,9 bilhões e crescimento anual projeções de 7,5% de 2020 à 2025 (ALMEIDA et al., 2021; CAVALCANTI et al., 2022; NUNEZ et al., 2022), e as celulases atualmente representam 20% da demanda mundial anual por enzimas (SRIVASTAVA et al., 2021). As aplicações das celulases são em diversas áreas nas indústrias como alimentícias, de rações animais, têxtil, de detergentes, na reciclagem de papel e atualmente como aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais para a produção de etanol (KUMAR et al., 2019). Esse trabalho buscou conhecimento sobre os resíduos estudados e o fungo, como também a sua aplicação na área industrial.

1.1 Materiais lignocelulósicos

A lignocelulose é considerada a fonte mais abundante de matéria orgânica, barato e renovável na terra, com produção anual de 5 milhões de toneladas métricas (SREENA e SEBASTIAN, 2019; RAINA et al., 2022). Em todo o mundo são produzidas toneladas de biomassas lignocelulósicas por meio de práticas florestais, agrícolas e agroindustriais, tendo como forma de descarte a queima ou depositadas em terrenos, assim causando poluição ambiental (SREENA e SEBASTIAN, 2019). A composição química da biomassa lignocelulósica é constituída por três polímeros principais, celulose (32-50%), lignina (23-32%) e hemicelulose (19-25%), além de uma parte pequena de ácidos orgânicos, sais e minerais (SREENA e SEBASTIAN, 2019; ZHANG et al., 2020).

Esse cenário instigou os pesquisadores a verificar opções de conversão dos resíduos lignocelulósicos em uma matéria-prima. Entre as aplicações desses resíduos, eles podem contribuir para produção de produtos de valor agregado como etanol, enzimas, ácidos orgânicos, aditivos alimentares e outras commodities produtos químicos (SREENA e SEBASTIAN, 2019; ZHANG et al., 2020). Com isso, a utilização e aplicação desses resíduos celulósicos vêm sendo amplamente discutida

devido as suas características e abundância de celulose, o que representa um potencial privilegiado para a produção de insumos de alto valor agregado. Dessa forma a aplicação biotecnológica da biomassa deve ser introduzido para melhorar o valor econômico da biomassa agrícola e reduzir sua queima (KUNTOTHON e CAIRNS, 2020; RAINA et al 2022). Entre as biomassas lignocelulosicos se destacam os resíduos que tem em sua composição uma boa fonte de celulose, hemicelulose e açúcares redutores. Esses resíduos são enormemente gerados a cada ano em todo o mundo e ainda são pouco explorados (SRIVASTAVA et al., 2021).

A produção de cana-de-açúcar em 2020 estimou que a safra contabilizou 713,2 milhões de toneladas de cana produzida (CONAB, 2024), o que também se destaca com essa produção é a quantidade de resíduos por ser a cultura que mais produz resíduo no país. O resíduo bagaço de cana (Figura 1-E) representa 25 a 30 % de cada tonelada de cana produzida (TORQUATO e RAMOS, 2013), isso faz as pesquisas e o mercado voltarem se às possibilidades de utilização deste material que se caracteriza como lignocelulósico para fins diversos. (TROMBETA e FILHO, 2017).



Figura 1: (A) Casca do fruto cacau, (B) Casca da semente cacau, (C) Casca do coco verde, (D) Farelo de trigo, (E) Bagaço de cana-de-açúcar e (F) Coroa de abacaxi. Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Já o cacau é uma planta que tem um destaque mundialmente pela importância das suas sementes, matéria prima principal do chocolate e da manteiga de cacau (SOUZA et al., 2018). Segundo dados do IBGE, até o momento a produção de cacau na safra de 2023 foi de 297,3 mil toneladas, entretanto a casca do cacau (pericarpo) é um resíduo (Figura 1-A) que corresponde cerca de 70% em peso seco do fruto, contudo o aproveitamento deste subproduto tem sido bastante estudado em diversos setores (SODRÉ et al., 2012). As amêndoas do cacau (Figura 1-B) são formadas por 85% de cotilédone e 15% de casca (tegumento) (TIMMS e STEWART, 1999) que é um resíduo gerado após a torra da amêndoa. No ano de 2016 a Organização Internacional de Cacau, estimou a geração mundial em 700 mil toneladas de casca da semente do cacau (OKIYAMA, NAVARRO e RODRIGUES, 2017), assim alguns estudos e patentes vem sendo desenvolvidas com o propósito de dar uma finalidade adequada para esse produto em várias áreas (MANCINI et al., 2016).

A produção do coco verde (Figura 1-E) tem ganhado destaque no Brasil com uma produção média de 477 mil ton de coco (MARTINS e JUNIOR, 2011). As maiores áreas brasileiras de produção de coco verde estão situadas na região nordeste, representando 255,163 ha de área plantada (IBGE, 2014), contudo como consequência do processo de obtenção da água de coco, é produzido cerca de 80 a 85% de resíduo da casca (ROSA et al., 2001). Atualmente, o descarte das cascas variam entre a queima (a céu aberto em áreas isoladas) e o seu retorno para o campo como fertilizante orgânico (ROSA et al., 2009).

Como gerador de resíduos temos também a produção do trigo (Figura 1-D) que tem peso na economia agrícola global, por o trigo ser o segundo cereal mais cultivado no mundo depois do milho. Na safra de 2023/24 (CONAB, 2024), foram produzidos no Brasil 8,4 milhões de ton. Assim a obtenção de 770 kg de trigo gera-se 230 kg de farelo (FETZER, 2005). Esse resíduo é utilizado por algumas indústrias como adubo, ração animal e fonte de energia para combustão (CANILHA, 2006).

Atualmente o Brasil ocupa lugar de destaque mundial na produção de abacaxi (Figura 1-F), de acordo com dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2014) no plano nacional, a produção em 2015 foi de 2,6 milhões de toneladas (IBGE, 2015), suas extensas formas de consumo acabam gerando grande quantidade de resíduos subproduto, pois o fruto apresenta apenas 22,5% de polpa, 77,5% são resíduos (cascas, folhas, caules, coroas e até frutos descartados), ou seja praticamente $\frac{3}{4}$ da fruta (MORENO, 2016). Alguns estudos já aplicam este resíduo

como alimentação animal devido à fibras presente (SANTOS, 2005).

As macroalgas como fonte de biocombustíveis de terceira geração têm atraído grande atenção recentemente, a parede celular das algas marinhas geralmente contém três componentes, ou seja, ácido algínico, celulose e outros polissacarídeos (ARDALAN et al.; 2018). As algas marrons como *Sargassum vulgare* (Figura 2) tem demonstrado potencial como biomassa para produção de bioetanol. O *Sargassum*, está amplamente distribuída em mares tropicais e subtropicais. Em março de 2023, foi constatado que o volume de *Sargassum* alcançou a extensão de 8 mil quilômetros (MACHADO, 2023).



Figura 2: Macroalga *Sargassum vulgare*.

Fonte: Elaborado pela autora, 2024

Dessa forma podemos afirmar que a biomassa agroindustrial tem sido reconhecida como uma excelente matéria-prima e pode ser utilizada na produção de várias enzimas importantes (PANESAR et al., 2016; Jain et al., 2021). A utilização desses resíduos renováveis como substratos é altamente apreciável devido à sua fácil disponibilidade e fontes abundantes de carbono e nitrogênio (RAINA et al 2022).

1.2 Pré-tratamento de resíduos

O pré-tratamento de resíduos visa diminuir a sua recalcitrância, uma vez que objetiva a migração da lignina e hemicelulose para a parte líquida da reação e aumenta a acessibilidade das enzimas na estrutura da celulose (CHANG E HOLTZAPPLE, 2000), o pré-tratamento também pode ser visto como uma etapa de fracionamento da biomassa, quando a celulose é separada da fração hemicelulósica, para que ambas possam ser fermentadas separadamente (DAS et al., 2015).

Na literatura, existem diversos tipos de pré-tratamento: físicos; químicos; biológicos ou físicos químicos, que buscam desenvolver metodologias eficientes e ecologicamente corretas.

Dentre os tipos de tratamento de resíduo se destaca o tratamento ácido, pois o pré-tratamento ácido é uma técnica muito difundida para solubilização dos açúcares da biomassa lignocelulósica e baseia-se na adição de ácido mineral ao material, e a mistura é submetida a diferentes condições de temperatura e tempo. Este tipo de pré-tratamento é muito utilizado para solubilizar a hemicelulose, na forma de monossacarídeo, e consequentemente tornando a celulose no material pré-tratado mais acessível a ação de enzimas (BRIENZO et al., 2017).

Diversas propriedades da biomassa estão relacionadas com a resistência a ação de agentes externos, portanto se faz necessário a utilização de pré-tratamento para modificar a estrutura do material de forma a tornar os componentes de interesse mais acessíveis (BRIENZO et al., 2017). O pré-tratamento pode ser feito com ácidos concentrados ou diluídos, porém o tratamento com ácido concentrado pode proporcionar formação de compostos inibidores de enzimas celulolíticas. O pré-tratamento com ácido diluído por outro lado, aparece como uma alternativa melhor para o uso em escala industrial. Este pré-tratamento pode ser utilizado para diferentes tipos de materiais lignocelulósicos (ALVIRA et al., 2010).

1.3 Estrutura da celulose

Diante aos problemas enfrentados mundialmente como escassez de alimentos, crises energéticas, poluição ambiental, entre outros, o reaproveitamento de materiais lignocelulósicos oferecem vantagens, porém se deparam com a complexidade dos processos de bioconversão da lignocelulose (CHEN et al., 2014). Isso deve-se a sua composição que é celulose, hemicelulose e lignina, sendo a soma desses componentes mais de 80% do seu peso total e estão interligados por ligações covalentes (CHEN et al., 2014). Sendo assim varia o tamanho e a forma da parede celular, bem como a composição química dos materiais lignocelulósicos de acordo com cada espécie.

A celulose se destaca como o polímero (macromolécula) mais abundante em nosso planeta com a fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ (Figura 3), composta por milhares de moléculas de glicose unidas por β -1,4 glicosídicas, representa a maior fração em materiais lignocelulósicos 30-50% a matéria seca. Por ano aproximadamente 4×10^9 toneladas de celulose estão sendo produzidas pelas plantas (PRASAD et al., 2019). Na

parede celular da planta, a celulose é formada em microfibrilas que estão ligados à rede de hemicelulose e blindados por lignina (LEKAKARN et al., 2021). A organização dessas cadeias de celulose acontece de forma fibrilar, com ligações de hidrogênio e Van der Waals (PÉREZ et al., 2005). Possuem regiões cristalinas e amorfas que ocorrem em intervalos irregulares, sendo aos quais as regiões amorfas estão relacionadas à hidrólise da celulose por via ácida ou enzimática e nelas as ligações de hidrogênio ocorrem em menor quantidade (CHAGAS, 2007).

O segundo polissacarídeo mais abundante na parede celular da planta é hemicelulose, que possui uma estrutura de cadeias ramificadas e amorfa, composta por vários heteropolímeros pentoses (β - d- xilose, α -L- arabinose), hexoses (β - D- manose, β - D - glicose, α - D- galactose) e ácidos urônicos (HOUFANI et al., 2020). De maneira geral as hemiceluloses são incorporadas nas paredes das células vegetais formando uma rede complexa de ligações fornecendo força estrutural ligando as fibras de celulose a microfibrilas e reticulação com lignina (TELEMAN, 2009).

Já as ligninas sua variabilidade se reflete no fato de que sua composição varia de acordo com a espécie vegetal, a duração do tempo de crescimento, bem como as partes das plantas. É um polímero não linear como a celulose e nem ramificado como a hemicelulose, mas sim uma rede tridimensional. Este complexo é hidrofóbico por natureza e se liga através de ligações covalentes à hemicelulose e celulose, o que gera a estrutura complexa da lignocelulose (TAIZ, et al., 2017).

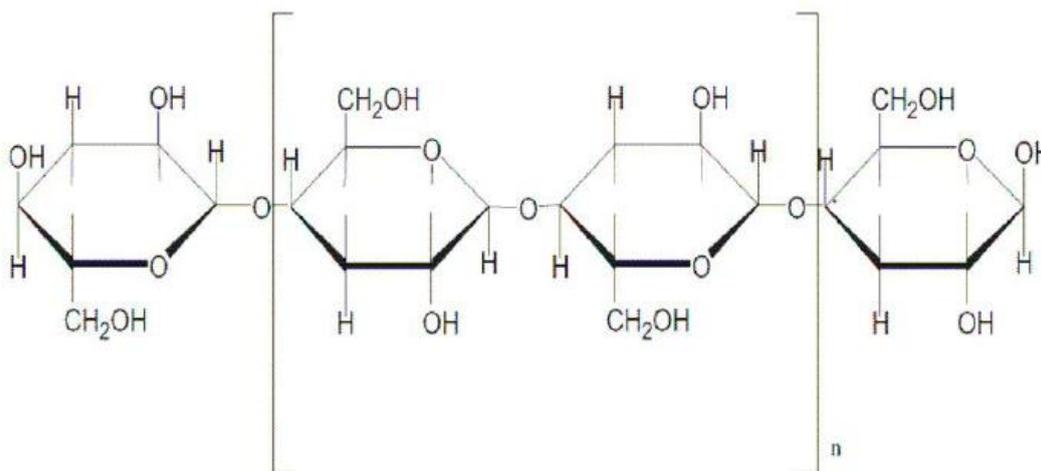


Figura 3: Moléculas de celulose unidas por ligações glicosídicas

Fonte: Klen et al, 2011.

1.4 Fermentação em estado sólido

A técnica de fermentação em estado sólido (FES) (Figura 4) é um processo

biotecnológico de baixo custo e consumo de energia, que consiste no cultivo de micro-organismos sobre superfícies sólidas, sendo usadas como fonte de nutrientes e com presença de pouca umidade (RAINA et al., 2022). A FES fornece ao microrganismo cultivado um ambiente similar ao habitat natural do qual está isolado, assim permitindo que os microrganismos tenham um melhor desempenho e obtenham-se maiores rendimentos e alta estabilidade operacional (SOCCOL et al., 2017). Do ponto de vista econômico e ambiental, a FES é promissora, pois possibilita a utilização de resíduos agroindustriais como matéria prima barata (ERGUN e UREK, 2017).

A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para processos de FES torna a técnica mais vantajosa do ponto de vista ambiental conforme ilustrado na figura 4, visto que a biomassa é gerada abundantemente em toneladas, o que pode ocasionar problemas ambientais devido ao acúmulo na natureza (PANDEY, 2003; COLLA *et al.*, 2010). Assim, usar a FES na produção de enzimas microbianas por fermentação é considerada uma opção relevante, pois o processo é adequado para a utilização de resíduos agroindustriais (bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, cora de abacaxi, casca de coco entre outros). A matriz sólida da FES pode atuar como fonte de carbono (e outros nutrientes), ou como material inerte que suporta o crescimento do microrganismo impregnado com a solução de crescimento (RAINA et al., 2022).

Nos últimos anos, tem despertado interesse nas indústrias biotecnológicas devido ao seu potencial em aplicações como a produção de metabólitos secundários ativos, além de alimentos, combustíveis, produtos químicos industriais etc. (SINGHANIA et al., 2009).

Algumas vantagens desta tecnologia é a menor suscetibilidade à contaminação bacteriana, permitindo maior produtividade enzimática para muitas enzimas (SONDHI e SAINI, 2019). Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato, possuindo ainda uma maior estabilidade a variações de temperatura e pH (ZHANG et al., 2013).

Sabendo que o crescimento de fungos filamentosos produtores de celulasas ocorre naturalmente em condições similares à FES, a aplicação dessa técnica na produção de celulasas atrai interesse por ser uma tecnologia com custo eficaz e pelo uso de micro-organismos, especialmente fungos filamentosos que produzem relativamente altas concentrações de celulasas (SINGHANIA et al., 2010). Dentre as indústrias de enzimas, o meio de fermentação sozinho atende cerca de 40% do custo da enzima. Dessa forma a utilização substrato barato é um objetivo final para minimizar o custo de

produção de enzimas (MARRAIKI et al., 2020).

Adicionalmente, o custo de produção de celulases usando FES é estimado em ~0,2 \$/kg, quase dez vezes menor que o custo envolvido na fermentação submersa SmF (20 \$/kg). E, portanto, FES pode ser economicamente viável para o custo-benefício produção de biocombustíveis (SRIVASTAVA et al., 2021).

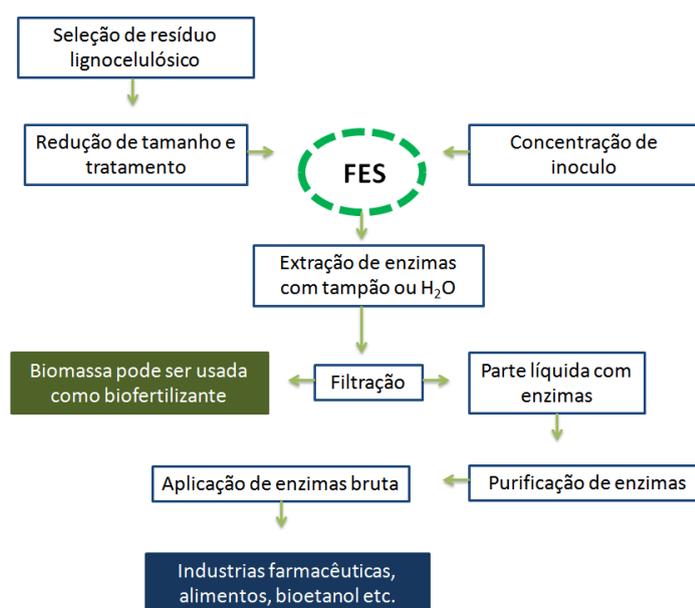


Figura 4. Representação sistemática da utilização de biomassa lignocelulósica para produção de enzimas.

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

1.5 Microrganismos lignocelulolíticos

Entre os microrganismos com capacidade de produzir enzimas com finalidade de desconstrução lignocelulósica, os fungos produtores de enzimas, são mais vantajosos em relação às bactérias, pois podem secretar as enzimas que degradam o substrato sobre o qual crescem para o meio extracelular (ORLANDELLI et al., 2012), além disso, estes fungos se adaptam a uma grande variedade de substratos, devido às suas características de reprodução e crescimento. Esses fungos são considerados decompositores naturais de material vegetal por sua capacidade de secretar uma grande variedade de enzimas, as quais têm sido produzidas e aplicadas industrialmente (GOMES et al., 1998).

Dentre as características dos microrganismos, os que apresentam temperatura ótima de crescimento em torno de 45 °C são classificados como termofílicos. Já os hipertermofílicos crescem em temperatura ótima em torno de 80 °C (MADIGAN et al., 2010). Sabendo das 50.000 espécies de fungos descritas, somente em torno de 30

crecem em temperaturas entre 40 °C e 45 °C, embora existam algumas com capacidade de crescer entre 60 à 62 °C (MORETTI, 2010). Além disso, as enzimas consideradas termoestáveis geralmente se apresentam mais resistentes à desnaturação, além de serem estáveis em amplas faixas de pH (GOMES et al., 2009).

Tanto os fungos quanto as bactérias são capazes de produzir celulases, entretanto os fungos são os mais utilizados, sendo que a maioria dos fungos produtores de celulose relatados são de origem mesofílica, destacam-se os que pertencem aos seguintes gêneros: *Trichoderma sp.*, *Acremonium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.* e *Chaetomium sp.*. No entanto, diferentes investigações relatam o *Penicillium*, como um gênero capaz de metabolizar a celulose como fonte de energia e secretar o complexo enzimático celulase (MARRAIKI et al., 2020).

Dentre os fungos utilizados, os filamentosos apresentam uma importante característica morfológica na produção e excreção de enzimas extracelulares, pois o crescimento micelial permite maior superfície de contato com o substrato (GIBBS; SEVIOUR). Sendo assim, os fungos filamentosos demonstram uma maior capacidade de degradação do substrato e maior excreção de enzimas extracelulares, contribuindo para o crescimento fúngico. E comercialmente, os fungos filamentosos são as principais fontes de enzimas que são conhecidos por serem poderosos degradadores de material liberando um sistema completo de celulase (SRIVASTAVA et al., 2021).

1.5.1 *Penicillium roqueforti*

Os microorganismos são fontes preferenciais de produção de celulases, por possuírem ampla diversidade bioquímica (YEOMAN et al., 2010). Assim os fungos filamentosos devido as suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas permitem seu crescimento em substratos sólidos e a bioconversão dos mesmos, aumentando assim a capacidade de hidrólise por estes micro-organismos em diversos processos biotecnológicos (KUMAR et al., 2008).

Dentre os fungos filamentosos, o *Penicillium roqueforti* vem ganhando destaque principalmente com sua utilização em FES devido as suas características tais como alta atividade biocatalítica e um elevado potencial biotecnológico, o que torna sua aplicação possível em diversos setores industriais, como químicos, alimentícios e farmacêuticos (MIOSO et al., 2015; RAINA et al., 2022).

O gênero *Penicillium* contém mais de 300 espécies, várias das quais são usadas por humanos como a penicilina foi descoberta em *P. Rubens* (CARON et al., 2021).

Também é considerado um dos mais extensos em espécies estudadas para seu uso tecnológico (DAGON e TEKINER, 2021).

O *Penicillium roqueforti* (Figura 5) pertence ao Reino Fungi, faz parte da classe Eurotomycetes, no filo Ascomycota, de ordem Eurotiales, família Trichocomaceae (VISAGIE et al., 2014). A morfologia do próprio organismo é baseada em características do cabeça de frutificação em forma de escova; tamanho, forma e número de conídios (DAGON e TEKINER, 2021). Seus conídios possuem coloração turquesa acinzentada ou verde maçante formados em cadeia nas fiálides após divisão nuclear miótica, ficam fixados nas métulas por meio dos esterigmas (MIOSO et al., 2015).

É comum encontrar O *Penicillium roqueforti* nos mais diversos tipos de habitat na natureza, em solos, silagens, madeiras, ambientes lácteos. Sendo a decomposição de matéria orgânica sua principal função na natureza (GILLOT et al., 2015).

A temperatura de crescimento pode ocorrer entre 4 e 35°C, mesmo em níveis baixos de oxigênio ou em altas concentrações de dióxido de carbono, além de possuir uma forte resistência ao pH, entre 3 e 10 (ABBAS; DOBSON, 2011). Dessa maneira o *P. roqueforti* é categorizado como um fungo GRAS (Generally Recognized como Safe) que é seguro para aplicações na indústria alimentícia e eficiente em excretar uma diversidade de enzimas como as lipolíticas, proteolíticas, decarboxilase e deaminase, tornando seu uso apropriado para várias aplicações nas industriais (MIOSO et al., 2014).



Figura 5: Ilustrações do fungo *Penicillium roqueforti*. Aspectos das colônias crescidas em cultura no interior de placa de Petri em meio BDA e micrografia obtida por microscópio óptico.

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

1.6 Enzimas celulósicas

As enzimas são proteínas responsáveis pela catálise de reações biológicas. Elas são altamente seletivas e atuam em condições específicas de temperatura e pH, são biodegradáveis e podem ser reutilizadas (MEDEIROS et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2020). Assim, quando comparadas aos catalisadores químicos, as enzimas são catalisadores mais potentes e eficazes (NASCIMENTO et al., 2013).

As enzimas do complexo celulolítico são da classe das hidrolases que clivam ligações glicosídicas. Enzimas celulases constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, assim promovendo sua total hidrólise (MASSARENTE et al., 2020). Estas enzimas são biocatalisadores com características específicas para atuar na liberação de açúcares, dos quais os polímeros de glicose (amilose e amilopectina) são o que desperta maior interesse nas indústrias (NASCIMENTO et al., 2013; FLORENCIO, 2017; XUE et al., 2018; KUMAR et al., 2019).

As enzimas celulases são muito comercializadas pois apresentam crescimento constante devido a suas vastas aplicações nas indústrias, em papel, lavanderia e detergente, têxtil, remédios, alimentos, indústrias agrícolas e biocombustíveis (PRASAD et al., 2019; RAINA et al., 2022).

Entretanto o que restringe o uso de celulases em escala industrial são as condições de estabilidade, tais como temperatura, alta salinidade, presença de solventes orgânicos que usados nas indústrias pode causar desnaturação de proteínas e assim torná-las inativas. Dessa forma o interesse por celulases altamente estáveis e ativas vem despertando interesses de pesquisadores (KUMAR et al., 2019). Uma vasta gama de resíduos, incluindo leguminosas, palha de cereais, resíduos de papel, bagaços etc., são utilizados para a produção comercial de celulase (RAINA et al., 2022).

As celulases são enzimas produzidas por microrganismos durante o seu crescimento em células celulósicas (BARBOSA et al., 2020). A produção de enzimas celulolíticas ocorre apenas na presença do substrato celulósico ou derivados, e é reprimida quando há açúcares de fácil acesso (RASTEGARI, 2018). Já a produção das celulases ocorre por indução sendo controlada pelo mecanismo de ativação e repressão (MEENU, SINGH e VISHWAKARMA, 2014). Assim as enzimas são liberadas da superfície da membrana plasmática para o espaço periplasmático, onde podem ser incorporadas à parede celular ou, no caso particular das celulases, são secretadas através da parede celular para o ambiente externo (PEBERDY, 1994).

A celulases por pertencerem a família de enzimas glicosil hidrolase atual em

sinergia (Figura 6) tendo o sistema enzimático constituído principalmente por três componentes, Endo-glucanases (EG) (EC 3.2.1.4), Exo-glucanases (CBH) (EC3.2.1.91) e β -glicosidases /celobiase (BG) (EC 3.2.1.21) (RAINA et al., 2022; KUMAR et al., 2019; LEKAKARN et al., 2021).

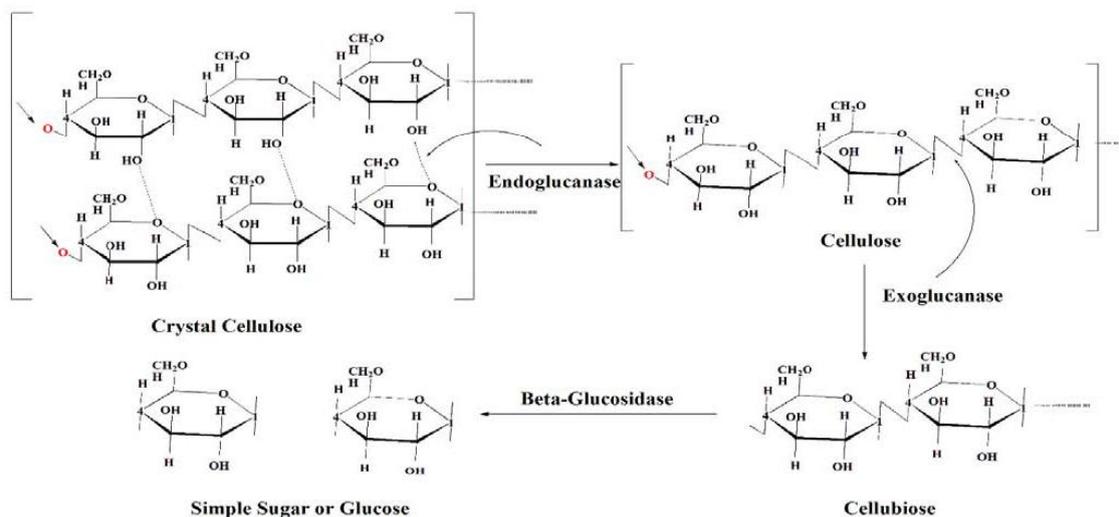


Figura 6. Mecanismo de hidrólise enzimática da celulose.

Fonte: SHER et al., 2021

As endoglucanases (EGs) ou endo-1,4- β -D-glucanases tem como função iniciar a hidrólise dos polímeros de celulose e acelera a taxa de hidrólise ao qual hidrolisam aleatoriamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica clivando ligações β -1,4-glicosídicas na região central para gerar oligossacarídeos solúveis, açúcares e novas extremidades de cadeia livre sendo um reductor e um não reductor, tendo como produto final celo oligossacarídeos, celobiose e glicose (LEKAKARN et al., 2021; KUMAR et al., 2019; PRASAD et al., 2019). Endoglucanases (EGs) estão espalhadas por 13 famílias de GH, incluindo GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH12, GH44, GH45, 192 GH48, GH51, GH61, GH74 e GH124 (AKRAM et al., 2018), estas enzimas parecem apresentar pouca capacidade de degradação de celulose cristalina, isso ocorre devido as fortes interações de hidrogênio que são presentes nas fibras, assim tornando o contato dessas enzimas inacessíveis (AKRAM et al., 2018).

A carboximetilcelulose (CMC) é utilizada como substrato preferencial para determinar a atividade dessas enzimas, devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (NARRA, 2014). As endoglucanases possuem características como diversificados tamanhos variando entre 22 a 45 kDa, podendo algumas apresentarem até 90 kDa (SADANA et al., 1984). A atividade dessa enzima ocorre entre as temperaturas

de 50 e 70 °C com pHs variando entre 4 e 5 (DING et al., 2006), já as endoglucanases consideradas termoestáveis são dominantes na família GH 12, enquanto outras podem pertencentes às famílias GH 5, 8 e 45 (AKRAM et al., 2018).

A exoglucanase (CBs) ou *exo-1,4-β-D-glucanases* atuam na região externa da celulose, ligando-se ao cristalino parte da celulose (NASCIMENTO et al., 2013; PRASAD et al., 2019; KUMAR et al., 2019). A liberação de moléculas solúveis de celobiose das extremidades livres que são liberadas pela atuação da exoglucanase, são depois clivada em glicose pela β glicosidase (BGL) que finaliza a sinergismo entre na degradação da lignocelulose na natureza e na concepção de formações ativas de celulase em bioindústrias. A β glicosidase também atua minimizando a ação inibitória que a presença de celobiose exerce sobre as atividades de endo e exoglucanases (SILVA, 2016; LEKAKARN et al., 2021).

Essas enzimas do complexo celulásico atuam em conjunto e apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais. (NASCIMENTO et al., 2013).

1.7 Importância econômica das celulases

A importância do mercado de proteínas foi avaliado em 2020 de US\$ 33,9 bilhões, com probabilidade de crescimento até US\$ 48,1 bilhões até 2026 (NUNEZ et al., 2022). Desse mercado de proteínas as enzimas tem cerca de 200 tipos comercializados e aplicados em processos com interesse biotecnológico, sendo 75% dessas enzimas hidrolíticas usadas em processos industriais. O mercado das enzimas foi avaliado em 2019 em US\$ 9,9 bilhões e crescimento anual projeções de 7,5% de 2020 a 2025 (ALMEIDA et al., 2021; CAVALCANTI et al., 2022; NUNEZ et al., 2022).

Atualmente o alto custo na produção de enzimas e suas amplas aplicações em processos biotecnológicos enfrentam dificuldades, pois a aplicação faz necessários grandes volumes de enzimas, tornou-se o sua utilização um obstáculo. Devido a isso se faz necessário o investimento em pesquisas na área de produção de enzimas, ao qual a utilização de biomassa lignocelulósica e cepas microbianas em determinadas condições de cultivo tornar uma estratégia viável para a obtenção de produtos de alto valor agregado a um baixo custo (REINEHR et al., 2014; MENEZES et al., 2019).

Dentre o mercado das enzimas (proteases, lipases, amilases e celulases) estas são as mais utilizadas comercialmente, assim o mercado industrial de enzimas cresce continuamente devido ao desenvolvimento de novas tecnologias e suas aplicações na

área de produtos de limpeza, alimentos e bebidas, produção de biocombustíveis e ração animal, entre outros (NUNEZ et al., 2022).

As celulasas ocupam a terceira posição no ranking mundial e representam 20% da demanda mundial anual por enzimas (SRIVASTAVA et al., 2021), esse crescimento celulase se dá não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais e sua diversibilidade em aplicações de vários segmentos industriais (REINEHR et al., 2014).

A demanda dessa enzima é atribuída as suas principais aplicações na indústria de papel e celulose, têxtil, alimentos e bebidas, indústria de detergentes e ração animal. Com o grande crescimento na produção de etanol 2G que é obtida através biomassa lignocelulósica, uma vez que essa demanda tende a crescer (YOON et al., 2014), assim é esperado que a busca por celulasas seja altamente motivada pelas indústrias de produção comercial de biocombustíveis no futuro (SRIVASTAVA et al., 2018).

1.8 Aplicação das celulasas

A produção comercial de celulase teve início na década de 1980 para aplicações industriais, sendo aplicados como aditivos para ração animal e lavagem com pedra de jeans, na década de 1980, a partir desse período as indústrias utilizam estas enzimas em larga escala (MASSARENTE et al., 2020).

As celulasas comercialmente disponíveis são uma formulação de endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases (MENEZES et al., 2019), que tem por função catalisar a hidrólise da celulose em açúcar e outras unidades oligoméricas (Pandey et al., 1999;MARRAIKI et al., 2020).

Devido ao seu grande potencial biotecnológico das celulasas (Figura 7) permite que essa enzima seja empregada nas indústrias alimentícias, de rações animais, têxtil e de detergentes, como também em processo de reciclagem de papel, onde conseguem remover, com eficácia, partículas de tinta aderidas à superfície das fibras e favorecendo a brancura do papel (YOON *et al.*, 2014), e por fim a aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais para a produção de etanol (KUMAR et al., 2019).

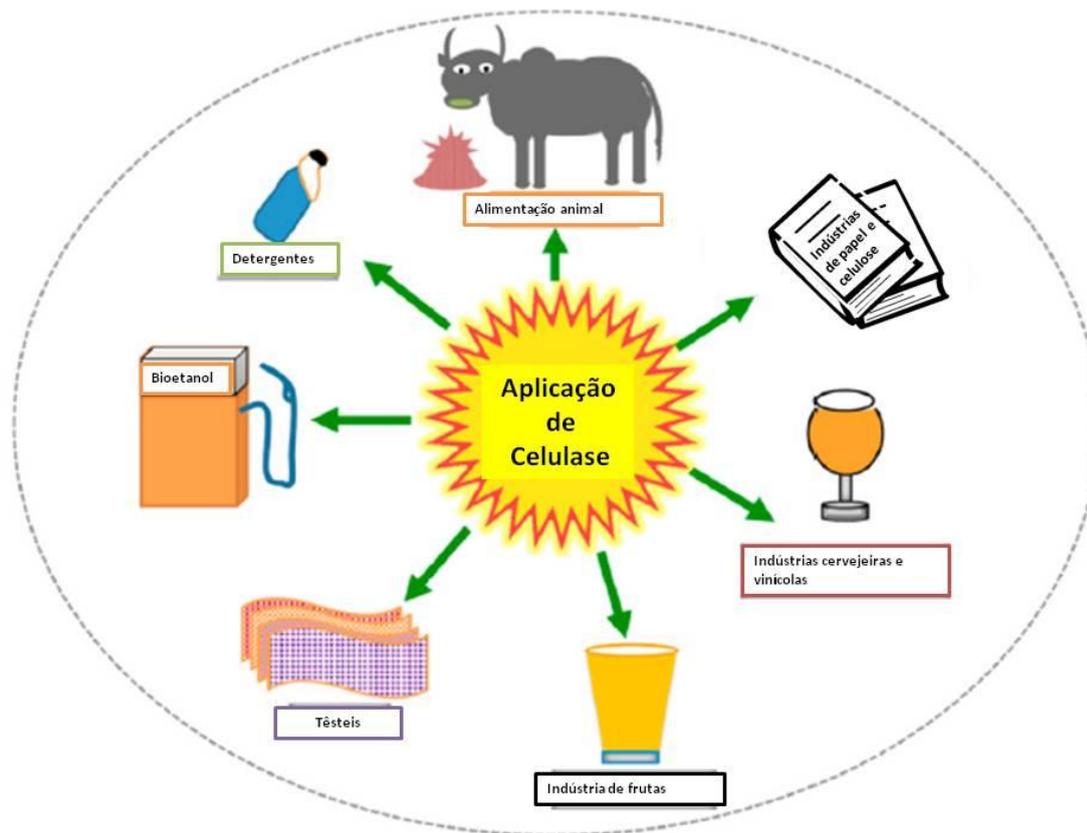


Figura 7. Aplicações de celulase.
 Fonte: SRIVASTAVA et al., 2021.

Atualmente a conversão enzimática de materiais lignocelulósicos renováveis em biocombustíveis se tornou uma alternativa ecologicamente correta e sustentável comparados a combustíveis derivados de fósseis. Assim a produção de bioetanol derivado da biomassa lignocelulósica pode contribuir de forma efetiva para a solução da dependência mundial pelas fontes de energia fóssil, destacando-se como alternativas energéticas promissoras. Entretanto, a viabilidade econômica é uma das principais restrições que limitam sua implementação prática até o momento (SRIVASTAVA et al., 2018).

A produção de biocombustíveis usando biomassa lignocelulósicos de resíduos lignocelulósicos enquadra-se nos biocombustíveis de segunda geração (SRIVASTAVA et al., 2018). O uso da celulase na sacarificação da biomassa celulósica se tornou uma abordagem mais promissora para obter um alto rendimento de fermentáveis, pois a aplicação mais importante e promissora da celulase é na bioconversão de resíduos lignocelulósicos em biocombustíveis (SRENNNA e SEBASTIÃO, 2019).

A maior parte da produção do etanol lignocelulósico acontece por hidrólise com

fermentação. Através da sacarificação enzimática da biomassa vegetal acontece a quebra da lignocelulose em açúcares, e o custo desta operação é considerado um dos principais gargalos na comercialização do álcool de segunda geração e tem sido apontado como o ponto mais caro em toda a cadeia de produção de bioetanol, respondendo por até 40% do custo total (MENEZES et al., 2019). Assim diminuir o custo das enzimas celulolíticas continua sendo um dos principais objetivos da pesquisa do bioetanol (MENEZES et al., 2019).

Para a conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol são necessárias as seguintes etapas: pré-tratamento, hidrólise (sacarificação), e recuperação de etanol. A etapa principal é a hidrólise da biomassa em açúcares fermentáveis, pois esses açúcares são posteriormente convertidos em álcool por um organismo fermentativo. O processo de hidrólise pode ser obtido por dois métodos: ácido e hidrólise enzimática, sendo a hidrólise ácida desvantajosa, pois pode ocorrer à formação de resíduos ácidos perigosos, o que torna a recuperação de açúcares difícil. Já o processo de hidrólise enzimática é mais eficiente e ocorre em condições ambientais sem gerar nenhum resíduo tóxico (SRENNNA e SEBASTIÃO, 2019).

Os processos de fermentação na indústria para obtenção de etanol 2G pode ser realizado por dois tipos: separados ou processo simultâneo de sacarificação. Assim na produção do bioetanol separado de sacarificação e fermentação, a enzima celulase é adicionada ao material de celulose sem levedura. Após hidrolisar celulose pela enzima, a levedura é adicionada para metabolizar a glicose para produzir bioetanol (XUE et al., 2018). Já para produzir bioetanol por processo simultâneo de sacarificação e fermentação, celulase e levedura são adicionadas simultaneamente ao material de celulose, assim glicose liberada do material celulósico é imediatamente metabolizada por fermento (XUE et al., 2018).

Sendo assim os investimentos em etanol 2G vem sendo um dos maiores investimentos do futuro, garantindo uma fonte renovável de combustíveis.

1.9 Imobilização enzimática

No ano de 1916, iniciou-se o processo de imobilização de enzimas, com trabalhos de Nelson e Griffin que observaram a enzima sacarose invertase (beta-frutofuranosidase) sendo adsorvida em carvão, catalisava a hidrólise da sacarose. Também ocorreu em 1926 com o Prof. James Sumner (Universidade de Cornell) que realizou o primeiro isolamento da enzima uréase via cristalização dessa enzima em NH_3

e CO₂. Com este trabalho o pesquisador ganhou o prêmio Nobel em 1946 (ALVES et al., 2016; ZHAO et al., 2015).

São conhecidos vários métodos de imobilização enzimática (Figura 8), aplicando diferentes protocolos no processo de imobilização em que suportes sólidos são baseados em imobilizações físicas e químicas. De maneira geral pode-se classificar os métodos de imobilização enzimática em 3 categorias, sendo elas: via interação física (adsorção), interação química (ligações iônicas, ligações covalentes, suporte e ligação cruzada) e na retenção física da mesma (aprisionamento e encapsulação) (NEKTARIA MARKOGLOU, 2003).

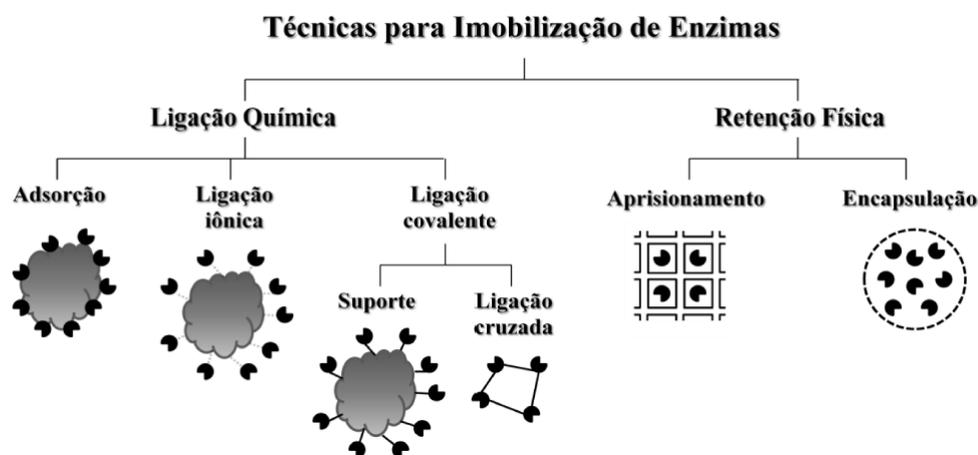


Figura 8: Principais técnicas de imobilização enzimática (Jegannathcan e Abang, 2008)

A adsorção física é considerado o método mais simples de imobilização, pois se trata uma mistura com condições apropriadas envolvendo o suporte insolúvel em uma determinada solução enzimática, ao qual é realizado posteriormente uma separação do derivado. Esse processo ocorre devido as interações dos grupos superficiais da enzima com os grupos superficiais do suporte através de atrações eletrostáticas e interações não-covalentes estão envolvidos nesse processo de imobilização: interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, força de Van der Waals, interações iônicas, adsorção física (ZHAO et al., 2015). Comparando a imobilização por adsorção física com as demais técnicas, a adsorção é vantajosa por seguintes aspectos: custo baixo dos materiais e procedimento, condições de fáceis operações, fácil regeneração para a reciclagem, recuperação de elevada atividade da enzima e nenhuma necessidade de utilização de aditivos químicos no processo de imobilização. (ZHAO et al., 2013).

2 Conclusão

Conforme abordado pelo referencial teórico, o sistema energético internacional é fortemente dependente de combustíveis fósseis, o que levou pesquisadores a buscar por combustíveis alternativos com equilíbrio do meio ambiente. Assim surgiram pesquisas na área de produção de etanol de segunda geração (2G) e terceira geração (3G) utilizando materiais lignocelulósicos. A biomassa lignocelulósica é o recurso biorrenovável mais abundante na terra, sua composição principal é a celulose, hemicelulose e lignina o que pode ser aplicadas para obtenção de combustíveis de fontes renováveis.

Entretanto para a produção de etanol utilizando de recursos lignocelulósicos ainda não é economicamente competitiva devido ao alto custo das enzimas. Assim a FES surge como uma proposta de reduzir custos e reaproveitamento de resíduos agroindustriais. Entre os fungos utilizados o *Penicillium roqueforti* se destaca por ser filamentosos, e a FES propõem o crescimento do fungo devido a ser semelhante ao seu habitat natural, sendo comprovado como eficiente o uso da FES para produção de celulases. As celulases são compostas por endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases que atuam em sinergia quebrando as ligações químicas existentes entre as unidades de glicose presente na celulose. Com isso o uso das enzimas celulases vem ganhando destaque em diversas áreas biotecnológicas, e se tornando uma das enzimas mais comercializadas no mundo. A utilização da imobilização vem destacando e promovendo meios de reduzir custos nas aplicações tecnológicas empregadas a endoglucanas.

3 Justificativa e Objetivos

3.1 Justificativa

A instabilidade política dos países produtores de petróleo, preocupações com a segurança energética, esgotamento de fontes de combustíveis fósseis, aliados aos efeitos negativos derivados da sua utilização e ao aumento da demanda de energia, tem motivado a busca por fontes renováveis de energia. O etanol de segunda geração (etanol 2G) é um biocombustível que pode ser produzido a partir dos resíduos que são descartados do processo produtivo do etanol de primeira geração e de culturas alimentares, destacam-se o bagaço da cana-de-açúcar, farelo de trigo, casca de coco, coroa do abacaxi e macroalgas para obtenção de etanol de 3G. Dessa forma os materiais lignocelulósicos representam a maior fonte de compostos orgânicos da biosfera que podem ser usados nesse processo. Diante disso pesquisadores e as indústrias tem se interessado pelo etanol de 2G como uma fonte de energia renováveis e do futuro. Nesse contexto o interesse no desenvolvimento tecnológico está sendo todas direcionadas para a hidrólise enzimática, as enzimas conhecidas utilizadas no processo sacarificação, entre elas a celulasas responsáveis por hidrolisar a celulose, liberando glicose para a produção de etanol. Assim é necessária a prospecção de tecnologias alternativas viáveis que possibilitem obter a aplicação de resíduos lignocelulósicos e a produção de açúcares fermentáveis.

3.2 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente projeto consiste em investigar a produção de açúcares fermentáveis para obtenção de etanol de segunda geração utilizando *Penicillium roquefort* em fermentação estado sólido (FES) dos resíduos bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, casca de coco e coroa de abacaxi para produção da enzima endoglucanase, seguido caracterização do extrato enzimático, imobilização via adsorção física e aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais e macroalgas.

3.2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar os resíduos agroindustriais;
- Analisar a produção da enzima endoglucanase, através da fermentação no estado sólido;
- Caracterizar o extrato enzimático;
- Aplicar o extrato enzimático na produção de açúcares fermentáveis;
- Imobilizar a enzima endoglucanase em carvões orgânicos.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento ácido dos resíduos agroindustriais e da microalga na sacarificação.

4 Referências

ABBAS, A.; DOBSON, A. D. W. Yeasts and Molds: *Penicillium roqueforti*. In: FUQUAY JW (Ed.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. San Diego: Academic Press, p. 772-775, 2011.

ARDALAN, Y., JAZINI, M., & KARIMI, K. (2018). *Sargassum angustifolium* brown macroalga como um substrato de alto potencial para produção de alginato e etanol com exigência mínima de nutrientes. *Algal research*, 36, 29-36.

AKRAM, F., HAQ, I. UL, IMRAN, W., MUKHTAR, H. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review. *Renewable Energy*, 122, 225–238, 2018.

ALVES, M. D. et al. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2016

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., & NEGRO, MJ (2010). Tecnologias de pré-tratamento para um processo eficiente de produção de bioetanol baseado em hidrólise enzimática: uma revisão. *Bioresource technology*, 101 (13), 4851-4861.

BARBOSA, K. L., DOS SANTOS MALTA, V. R., MACHADO, S. S., JUNIOR, G. A. L., DA SILVA, A. P. V., ALMEIDA, R. M. R. G., DA LUZ, J. M. R. Bacterial cellulase from the intestinal tract of the sugarcane borer. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 161, p. 441-448, 2020.

BEHERA, B. C.; SETHI, B. K.; MISHRA, R. R; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Microbial cellulases – Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 15, p. 197–210, 2017.

BRASIL, Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos, V. 7 - SAFRA 2019/20 - N. 8 - Oitavo levantamento | MAIO 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/grãos>.

BRIENZO, M., FIKIZOLO, S., BENJAMIN, Y., TYHODA, L., & GÖRGENS, J. (2017). Influence of pretreatment severity on structural changes, lignin content and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse samples. *Renewable Energy*, 104, 271-280.

BÜCKA, A., CASCIATORIB, F.P., THOMÉOB, J.C., TSOTSASA, E. Model-based control of enzyme yield in solid-state fermentation. *Procedia Engineering*, v. 102, p. 362– 371. 2015.

CANILHA, L. Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo. 2006. 171 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

CARON, T.; PIVER, M. L.; PÉRON, A.-C.; LIEBEN, P.; LAVIGNE, R.; BRUNEL, S.; ROUEYRE, D.; PLACE, M.; BONNARME, P.; GIRAUD, P.; BRANCA, A.; LANDAUD, S.; CHASSARD, C. Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, v. 354, p.109174, 2021.

CASTRO, A. M. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*, v. 33, n.1, p. 181-188, 2010.

CAVALCANTI, M. H. S.; ALVES, L. B.; DUARTE, A.; MENDES, A. A.; DA SILVA, J. M. S. F.; DA SILVEIRA, N. J. F.; VIRTUOSO, L. S. Imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* via adsorção iônica em nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro: síntese fácil e desempenho catalítico melhorado. *Chemical Engineering Journal*, v. 431, p. 134128, 2022.

CHAGAS, C. F. D. Técnica de processo para a viabilização econômica do processo de hidrólise. In: I SEMINÁRIO DE ETANOL CELULÓSICO, São Paulo, 2007.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 84, 2000.

CHEN, X., GU, X., ZHOU, X., ZANG, Y. Asparagus stem as a new lignocellulosic biomass feedstock for anaerobic digestion: Increasing hydrolysis rate, methane production and biodegradability by alkaline pretreatment. *Bioresource Technology*, v.164, p. 78-85, 2014.

COLLA, L. M. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 21, p. 8308-8314, 2010.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Séries históricas. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=30>. Acesso em: fevereiro 2024.

DAS, S.; BHATTACHARYA, A.; HALDAR, S.; GANGULY, A.; SAI GU.; TING. Y. P.; CHATTERJEE, P. K. Optimization of enzymatic saccharification of water hyacinth biomass for bio-ethanol: Comparison between artificial neural network and response surface methodology. *Sustainable Materials and Technologies*. 2015, 3, 17–28.

DEDOUSI, M. M., DIAMANTOPOULOU, P. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. *Carbon Resources Conversion*, v.5, p. 61–70, 2022.

DING, S.; GE, W.; BUSWELL, J. A. Cloning of multiple cellulase cDNAs from *Volvariella volvacea* and their differential expression during substrate colonization and fruiting. *FEMS Microbiology Letters*, v. 263, n. 2, p. 207–213, 2006.

DOS SANTOS, M. M. O.; GAMA, R. S.; TAVARES, I. M. C.; SANTOS, P. H.;

GONÇALVES, M. S.; DE CARVALHO, M. S.; VILAS BOAS, E. V. B.; OLIVEIRA, J. R.; MENDES, A. A.; FRANCO, M. Application of lipase immobilized on a hydrophobic support for the synthesis of aromatic esters. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 68, p. 538-546, 2020.

ERGUN, S. O.; UREK, R. O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Annals of Agrarian Science*, v. 15, p.273-277, 2017.

F.L.C. ALMEIDA.; M.P.J. CASTRO.; B.M. TRAV´ALIA.; M.B.S. Forte, Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis, *Process Biochem.*, v. 110, p. 37–51, 2021.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE. 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: julho 2022.

FETZER, F. A. Uma proposta para ser discutida. Disponível em <[HTTP://WWW.agromil.com.br/triticultura.htm](http://WWW.agromil.com.br/triticultura.htm)>. Acesso em maio 2022.

FLORENCIO, C.; BANDIO, A. C.; FARINAS, C. S. Desafios relacionados à produção e aplicação das enzimas celulolíticas na hidrólise da biomassa lignocelulósica. *Química Nova*, v. 40, n. 9, p. 1082–1093, 2017.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GILLOT, G.; JANY, J. L.; COTON, M.; LE FLOCH, G.; DEBAETS, S.; ROPARS, J.; COTON, E. Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. *PLOS ONE*, v. 10, n. 6, p. 1-21, 2015.

GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M. Ligninases production by basidiomicetes strains on lignocellulosic agricultural residues and decolorization of synthetic dyes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, n. 1, p. 31-39, 2009.

GOMES, E.; SILVA, R.; SERZEDELLO, A. Ribonuclease production by *Aspergillus* species. *Revista de Microbiologia*, v. 29, p. 187-192, 1998.

HOUFANI, A. A.; ANDERS, N.; SPIESS, A. C.; BALDRIAN, P.; BENALLAOUA, S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentables sugars –a review. *Biomass and Bioenergy*, v. 134, p. 105-481. 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola – LSPA. Rio de Janeiro, v. 27, n. 11, p. 1-86, 2014.

IBGE. PRODUÇÃO AGRÍCOLA MUNICIPAL – PAM 2015. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=1613&z=t&o=11>. Acesso em: maio

2022.

KNIPP, L. H.; SOKATCH, J.R. A composição química do envelope celular de *Streptobacillus moniliformis*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 15 (7), p. 665-669, 1969.

KUMAR, N.; KOUR SUDAN, S.; GARG, R.; SAHNI, G. Enhanced production of novel halostable recombinant endoglucanase derived from the metagenomic library using fed-batch fermentation. *Process Biochemistry*, v. 78, p. 1-7, 2019.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008.

KUNTOTHOM, T.; CAIRNS, JK. Expressão e caracterização de TbCel12A, uma endoglucanase termofílica com potencial em hidrólise de biomassa. *Biocatálise e Biotecnologia Agrícola*, v. 30, p. 101835, 2020.

LEKAKARN, H.; BUNTERNGSOOK, B.; LAOTHANACHAREON, T.; CHAMPREDA, V. Functional characterization of endoglucanase (CelB) isolated from lignocellulose-degrading microbial consortium for biomass saccharification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 31, p. 101888, 2021.

MACEDO, E. P.; CERQUEIRA, C. L. O.; SOUZA, D. A. J.; BISPO, A. S. R.; COELHO, R.R.R.; NASCIMENTO, R. P. Production of cellulose-degrading enzyme on sisal and other agro-industrial residues using a new Brazilian actinobacteria strain *Streptomyces* sp. SLBA-08. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30 (4), p. 709-735, 2013.

MACHADO, M. C. Painel global, 25 abr 2023, <<https://www.painelglobal.com.br/noticias>>, acesso em 20 jan 2024.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. *Microbiologia de Brock*. Porto Alegre, Brasil.: Editora Artmed, 2010.

MANCINI, G.; PAPIRIO, S.; LENS, P. N. L.; ESPOSITO, G. Effect of n-methylmorpholine-n-oxide pretreatment on biogas production from rice straw, cocoa shell, and hazelnut skin. *Environmental Engineering Science*, v. 33, n. 11, p. 843-850, 2016.

MARRAIKI, N.; VIAYARAGHAVAN, P.; ELGORBAN, A. M.; DEEPADHAS, D. S.; AL-RASHED, S.; YASSIN, M. T. Low cost feedstock for the production of Endoglucanase in solid state fermentation by *Trichoderma hamatum* NGL1 using response surface methodology and saccharification efficacy. *Journal of King Saud University – Science*, v. 32, n. 2, pág. 1718-1724, 2020.

MARRAIKI, N.; VIJAYARAGHAVAN, P.; ELGORBAN, A.M.; DEPPA DHAS, D.S.; AL-RASHED, S.; YASSIN, M.T. Low cost feedstock for the production of endoglucanase in solid state fermentation by *Trichoderma hamatum* NGL1 using response surface methodology and saccharification efficacy. *J King Saud Univ Sci*, v.

32, p. 1718-1724, 2020.

MARTINS, C. R.; LUCIANO JUNIOR, J. A. Evolução da produção de coco no Brasil e o comércio internacional – panorama 2010 – Aracajé: Embrapa Tabuleiros Costeiros, v. 28, 2011.

MASSARENTE, V.S.; ZANONI, J.A.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Biochemical characterization of endoglucanases produced by *Myceliophthora thermophila* M.7.7 in solid-state culture. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, v. 27, p. 101684, 2020.

MEDEIROS, G. A.; GONÇALVES, S. B.; RODRIGUES, D. S.; NETO, B. A. D. Enzimas e Líquidos Iônicos: Uma Combinação Promissora para um Biodiesel Limpo. *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 1, p.74-94, 2013.

MEENU, K.; SINGH, G.; VISHWAKARMA, R.A. Chapter 22 - Molecular Mechanism of Cellulase Production Systems in *Trichoderma*. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, v. 1, p. 319-324, 2014.

MENEZES, F. S. R.; CRUZ, G. G. D.; LOPES, M. D. O.; NELSON, D. L.; MARTINS, T. Q. G.; LAIA, M. L. D. Avaliação da produção de endoglucanase e β -glicosidase por bactérias e leveduras isoladas de um plantio de eucalipto no cerrado de Minas Gerais. *Revista Ambiente & Água*, v. 14, 2019.

MIOSO, R.; MARANTE, F.J.; TOLEDO, LAGUNA, I.H.B., 2015. *Penicillium roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. *J. Appl. Microbiol.*, v.118(4), p. 781-791, 2014.

MIOSO, R.; MARANTE, T. F. J.; LAGUNA, I. H. B. *Penicillium roqueforti*: a multifunctional cell factory of high value-added molecules. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, p. 781-791, 2014.

MIOSO, R.; MARANTE, T.; DE LAGUNA, H. B. *Penicillium roqueforti*: A multifunctional cell factory of high value-added molecules. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, p.781–791, 2015.

MORENO, J. Obtenção, caracterização e aplicação de farinha de resíduos de frutas em cookies. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2016.

MORETTI, M. M. S. Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana-de-açúcar em açúcares fermentescíveis. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2010.

NARRA, M.; DIXIT, G.; DIVECHA, J.; KUMAR, K.; MADAMWAR, D.; SHAH, AR. Production, purification and characterization of a novel GH 12 family endoglucanase from *Aspergillus terreus* and its application in enzymatic degradation of delignified rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 88, p. 150-161, 2014.

NEKTARIA, M, et al. Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: on-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery. *Bioanalytical separations*, v. 4, n. 1, p. 233–234, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 7. ed. Ed. Artmed, 2019.

NÚÑEZ, D., OULEGO, P., COLLADO, S., RIERA, FA, & DÍAZ, M. Técnicas de separação e purificação para a recuperação de biocompostos de valor agregado de lodos ativados de resíduos. Uma revisão. *Recursos, Conservação e Reciclagem*, v. 182, p. 106327, 2022.

OKIYAMA, D. C. G.; NAVARRO, S. L. B.; RODRIGUES, C. E. C. Cocoa shell and its compounds: Applications in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, v. 63, p. 103–112, 2017.

OLIVEIRA, P. C.; DE BRITO, A. R.; PIMENTEL, A. B.; SOARES, G. A.; PACHECO, C. S. V.; SANTANA, N. B.; DA SILVA, E. G. P.; FERNANDES, A. G. A.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. *Rev. Mex. Ing. Quim*, v. 18 (3), p.777-787, 2019.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 7, n. 3, 2012.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PEBERDY, J. F. Protein secretion in filamentous fungi — trying to understand a highly productive black box. *Trends in Biotechnology*, v. 12(2), p. 50–57, 1994.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol*, v. 5, p. 53–63, 2005.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*, Ed. Manole, Barueri, cap. 1, p. 1-5, 2005.

PRASAD, R. K.; CHATTERJEE, S.; MAZUMDER, P.B.; SHARMA, S.; DATTA, S.; VAIRALE, M.G.; DWIVEDI, S.K. Study on cellulase (B-1,4-endoglucanase) activity of gut bacteria of *Sitophilus oryzae* in cellulosic waste biodegradation. *Bioresource Technology Reports*, v. 7, p. 100274, 2019.

RAINA, D.; KUMAR, V.; SARAN, S. A critical review on exploitation of agro-industrial biomass as substrates for the therapeutic microbial enzymes production and implemented protein purification techniques. *Chemosphere*, v. 294, p. 133712, 2022.

RASTEGARI, A. A. Molecular Mechanism of Cellulase Production Systems in *Penicillium*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and*

Bioengineering . Elsevier, p. 153-166, 2018.

REINEHR, C.O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D. D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. *Quimica Nova*, v. 37, n. 3, p. 454-460, 2014.

ROSA, M. F.; MATTOS, A. L. A.; CRISOSTOMO, L. A.; FIGUEIREDO, M. C. B.; BEZERRA, F. C.; VERAS, L. G. C.; CORREIA, D. Aproveitamento da casca de coco verde. In: CARVALHO, J. M. M. (Org.). Apoio do BNB à pesquisa e desenvolvimento da fruticultura regional. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, p.165-190, 2009.

SADANA, J. C.; LACHKE, A. H.; PATIL, R. V., Endo-(1,4)- β -D-glucanases from *Sclerotium rolfsii*. Purification, substrate specificity, and mode of action. *Carbohydr. Res.*, v. 133, p. 297–312, 1984.

SANTOS, J. C. B. Avaliação de qualidade do abacaxi ‘Pérola’ minimamente processado armazenado sob atmosfera modificada. *Ciência Agro técnica*, Lavras, v. 29 (2), 2005.

SHER, H., Zeb, N., Zeb, S., Ali, A., Aleem, B., Iftikhar, F., ... & Rashid, M. H. (2021). Microbial cellulases: a review on strain development, purification, characterization and their industrial applications. *J Bacteriol Mycol*, 8(5).

SILVA, J. Enzymatic catalysis in the production of second generation ethanol. Monografia. Universidade Federal de São João del-Rei Coordenadoria do Curso de Química, 2016.

SINGHANIA, R. R.; KUMAR PATEL, A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid- state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44, 13–18, 2009.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SOCCOL, C. R.; DA COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A.L.;VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, p. 52-71, 2017.

SODRÉ, G. A.; VENTURINI, M. T.; RIBEIRO, D. O.; MARROCOS, P. C. L. Extrato da casca do fruto do cacauieiro como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacauieiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, p. 881–887. 2012.

SONDHI, S.; SAINI, K. Response surface based optimization of laccase production from *Bacillus sp.* MSK-01 using fruit juice waste as an effective substrate. *Heliyon*. V 5, p 01718, 2019.

SOUZA, L.O.; BRITO, A.R.; BONOMO, R.C.F.; SANTANA, N.B.; FERRAZ, J. L. A. A.; OLIVEIRA, E. A.; FERNANDES, A. G. A.; FERREIRA, M. O.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 16, p. 277-284, 2018.

SREENA, C. P.; SEBASTIÃO, D. Casca externa de jaca: uma matéria-prima sustentável para a produção de açúcar fermentável usando endoglucanase recombinante de *Bacillus subtilis* MU S1. *Tecnologia e Inovação Ambiental*, v. 16, p. 100448, 2019.

SREENA, C.P., SEBASTIAN, D. Jackfruit outer rind: A sustainable feedstock for fermentable sugar production using recombinant endoglucanase from *Bacillus subtilis*MUS1. *Environmental Technology & Innovation*, v. 16, p. 100448, 2019.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; ALHAZMI, A.; KAUSAR, T.; HAQUE, S.; SINGH, R.; RAMTEKE, P. W.; MISHRA, P. K.; TUOHY, M.; LEITGEB, M.; GUPTA, V. K. Technological advances for improving fungal cellulase production from fruit wastes for bioenergy application: A review. *Environmental Pollution*, v. 287, p. 117370, 2021.

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.; MOLINA, G.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; MANIKANTA, A.; RAMTEKE, P. W. Aplicações de celulases fúngicas na produção de biocombustíveis: avanços e limitações. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 82, p. 2379-2386, 2018.

TAIZ, L. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. 6. ed. São Paulo: ARTMED, 2017.

TELEMAN, A. *Hemicellulose and Pectins. Wood chemistry and Wood biotechnology*. Berlin: Walter de Gruyter, v.1, 2009.

TIMMS, R. E.; STEWART, I. M. Cocoa butter, a unique vegetable fat. *Lipid Technology Newsletter*, v. 5, n. 5, p. 101-107, 1999.

TOBISZEWSKI, M.; MARC, M.; GALUSZKA, A.; NAMIEŚNIK, J. Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry. *Molecules*, v. 20(6), p.10928-10946, 2015.

TORQUATO S. A.; RAMOS, R. C. Biomassa da cana-de-açúcar e a geração de bioeletricidade em São Paulo: usinas signatárias ao Protocolo Agroambiental Paulista. *Informações Econômicas*, SP, v. 43, 2013.

TROMBETA N. C.; FILHO J. V. C. Potencial e Disponibilidade de Biomassa de Cana-de-açúcar na Região Centro-Sul do Brasil: indicadores agroindustriais. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 55, p. 479-496, 2017.

VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J. C.; HONG, S. B.; KLAASSEN, C. H. W.; PERRONE, G.; SAMSON, R. A. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, v. 78, p. 343-371, 2014.

XUE, D. G.; ZENG, X.; LIN, D.; YAO, S. Ethanol tolerant endoglucanase from *Aspergillus niger* isolated from wine fermentation cellar. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 15, p. 19–24, 2018.

YEOMAN, C.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; MACKIE, R. I.; CANN, I. K. Thermostable Enzymes as Biocatalysts in the Biofuel Industry. *Advances in applied microbiology*, cap. 1, v. 70, p. 1-55, 2010.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *biomass and bioenergy*, v. 67, p. 319-338, 2014.

ZANONI, J. A. Produção, isolamento e caracterização bioquímica de xilanases produzidas pelo fungo termofílico *Rasamsonia emersonii* por cultivo em estado sólido. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista, 2017.

ZHAO, X. et al. Enzyme and Microbial Technology Kinetics of lipase recovery from the aqueous phase of biodiesel production by macroporous resin adsorption and reuse of the adsorbed lipase for biodiesel preparation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, n. 4–5, p. 226–233, 2013.

ZHAO, X. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 44, p. 182–197, 2015.

ZHANG, J.; KOUBAA, A.; XING, D.; WANG, H.; WANG, Y.; LIU, W.; ZHANG, Z.; WANG, X.; WANG, Q. Conversion of lignocellulose into biochar and furfural through boron complexation and esterification reactions. *Bioresource Technology*, v. 312, p. 123586, 2020.

ZHANG, X.; YUN, L. J.; PENG, L. B.; LU, Y.; MA, K. P.; TANG, F. Optimization of Douchi fibrinolytic enzyme production by statistical experimental methods. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences*, v. 33, n. 1, p. 153-158, 2013.

ZUÑIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A., ROJAS; E. E. G. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de Biomoléculas. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 21(1), 2003.

Seção 2

Artigo 1

Publicado na revista: Preparative Biochemistry & Biotechnology -
Qualis B1 na Química

Doi: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2201936>

2 ARTIGO 1: Optimization of enzymatic saccharification of industrial wastes using a thermostable and halotolerant endoglucanase through Box-Behnken experimental design.

Resumo

O presente estudo visa à produção da endoglucase em extrato bruto pelo fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 utilizando resíduos lignolulosicos como substrato em FES, caracterizando, aplicando e otimizando. A caracterização da endoglucanase frente a temperatura e pH obteve maior atividade em 50 °C e pH 4 e 5, com estabilidade nas temperaturas (40-80 °C) e diferentes pHs , já a adição de metais os íons Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} e Cu^{2+} contribuíram para aumento da atividade, em solventes orgânicos a atividade manteve > que 91%. A característica de halotolerante favoreceu aumento da atividade 35% em NaCl (2M). Na aplicação a endoglucase foi capaz de sacarificar todos os resíduos que foi exposta, e microscopia eletronica de varredura confirmou ação da enzima. O Box-Behnken avaliou parâmetros: tempo, substrato e concentração de enzima, sob condições ideais obteve-se 255,621 mg/g açúcar redutor. Este estudo mostra o extrato bruto com endoglucanase pode ser aplicado em indústrias.

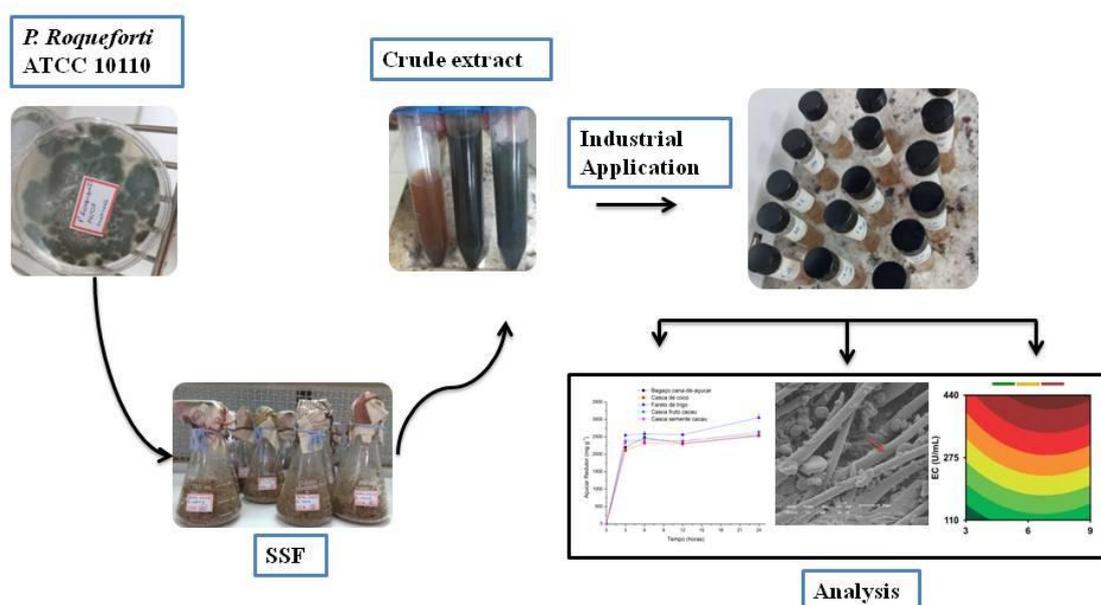
Palavras-chave: Enzimas, Metodologia de superfície de resposta, Resíduos lignocelulosicos.

Abstract

This study describes the production, characterization and application of an endoglucanase from *Penicillium roqueforti* using lignocellulosic agro-industrial wastes as the substrate during solid-state fermentation. The endoglucanase was generated after culturing with different agro-industrial wastes for 96 h without any pretreatment. The highest activity was obtained at 50 °C and pH 4.0. Additionally, the enzyme showed stability in the temperature and pH ranges of 40–80 °C and 4.0– 5.0, respectively. The addition of Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} and Cu^{2+} increased enzymatic activity. Halotolerance as a characteristic of the enzyme was confirmed when its activity increased by 35% on addition of 2M NaCl. The endoglucanase saccharified sugarcane bagasse, coconut shell, wheat bran, cocoa fruit shell, and cocoa seed husk. The Box-Behnken design was employed to optimize fermentable sugar production by evaluating the following parameters: time, substrate, and enzyme concentration. Under ideal conditions, 253.19mg/g of fermentable sugars were obtained following the saccharification of wheat bran, which is 41.5 times higher than that obtained without optimizing. This study presents a thermostable, halotolerant endoglucanase that is resistant to metal ions and organic solvents with the potential to be applied in producing fermentable sugars for manufacturing biofuels from agro-industrial wastes.

Keywords: Enzymes, Response surface methodology, Lignocellulosic residues.

Graphical Abstract



Keywords: Enzymes, Response surface methodology, Lignocellulosic residues.

2.1 Introdução

A dependência de combustíveis fósseis tem gerado efeitos desfavoráveis como aumento da liberação de carbono na atmosfera, a diminuição da qualidade do ar e o aumento das temperaturas globais (Massarente et al 2020, Castillo et al., 2020, Khaire et al., 2021) o que tem despertado interesse crescente na utilização de fontes alternativas de energia "limpas e renováveis", como biocombustíveis tipo etanol de segunda geração (2GE) com finalidade de promover a sustentabilidade e a independência dos combustíveis fósseis (Toogood e Scrutton, 2018; Massarente et al 2020; Thakur et al., 2020). A obtenção do etanol 2GE ocorre através fermentação de açúcares liberados por enzimas nos resíduos lignocelulósicos que são derivados de atividades agrícolas como processamento industrial (Sadh et al., 2018; Melanouri et al., 2022).

A biomassa lignocelulósica representa uma fonte promissora de energia renovável (Squinca et al., 2018), sendo composta de celulose que é o recurso renovável mais abundante do planeta (Xue et al., 2018). Presente na biomassa a celulose pode transformar-se em glicose, um fonte de carbono amplamente utilizada para produzir bioetanol (Madhuri et al., 2017; Xue et al., 2018). Na degradação do complexo lignocelulósico o uso de enzimas tem sido adotado com objetivo de quebrar as paredes celulares das plantas, promovendo a liberação de monômeros de carboidratos (Gupta et

al., 2016). Com isso tem aumentado a busca por enzimas eficientes e resistentes que sejam produzidos por microrganismos, dentre os fungos capazes de produzir essas destaca-se os fungos filamentosos ao qual pertence o gênero *Penicillium* que contém mais de 300 espécies (Massarente et al., 2020; Caron et al., 2021).

O fungo *Penicillium roqueforti* pertence ao grupo das treze espécies de fungos filamentosos, sendo um dos mais extensos com estudos tecnológico (Kure & Skaar., 2019; Dogan e Tekiner., 2021) e aplicação nas industriais (el-shishtawy et al., 2015). Este fungo é capaz de produzir enzimas promissoras através de fermentação de estado sólido (FES), ao qual recentemente tem surgido interesse significativo no uso de sólidos fermentáveis, tendo por principais características baixo custo e baixo consumo de energia, levando a uma redução no valor comercial das enzimas produzidas (Merillon & Ramawat, 2017; Sondhi & Saini, 2019), pois o mercado global de enzimas em 2019 representou US\$ 9,9 bilhões com projeções anuais de 7,5% de 2020 à 2025, assim deve chegar a US \$ 17,50 bilhões até 2024 (Pellis et al., 2018; Dos Santos et al., 2020; Cavalcanti et al., 2022).

A celulase destaca-se em entre as enzimas produzidas por FES por serem hidrolases de glicosídeos (GH), quebra a celulose, que é um polímero insolúvel em água composto por unidades repetidas de β -D-glicose ligadas por β -1,4 glicosídica, (Valdés et al., 2020; Melanouri et al., 2022). As celulasas são divididas em exoglucanase, endoglucanase e β -glucosidase (Xue et al., 2018), sendo a endoglucanase indispensável para hidrolisar a celulose (Xue et al., 2017; Ramos et al., 2022), devido a sua alta eficiência e baixa poluição ambiental comparada com a hidrólise química da celulose, destacando pelo seu potencial catalítico (Madhuri et al., 2017; Xue et al., 2018; Ramos et al., 2022). Por ser a terceira no ranking mundial como mais produzidas e a sua demanda está em constante crescimento devido à sua versatilidade catalítica (Juturu e Wu, 2014; Ramos et al., 2022) e variedade de aplicações como agricultura (Liu e Kokare, 2017), reciclagem de papel (Pathak et ai. (2014), indústria têxtil (Anish et al., 2007) , extração e clareamento de sucos de frutas (Melanouri et al., 2022), produção de ração animal (Merillon and Ramawat, 2017), e biocombustíveis por sacarificação de açúcares fermentáveis (Liu e Kokare, 2017; Massarente et al., 2020). Assim a sacarificação tem atraído à atenção dos pesquisadores, pois este foi o primeiro passo da bioconversão de matéria orgânica em produtos valiosos como açúcar, produtos químicos e biocombustíveis (El-shishtawy et al., 2015).

Aplicando o uso da metodologias de superfície de resposta (RSM) como

ferramenta estatística em processos biotecnológicos (Oliveira et al., 2019), tem obido êxito, como na otimização do processo de sacarificação, pois possibilita a obtenção de modelos matemáticos com capacidade de descrever um comportamento de uma resposta experimental de acordo com avariação dos níveis dos fatores investigados (Brito et al., 2017; Ferraz et al., 2019; Filipe et al., 2019). O planejamento Box-Behnken possibilita investigar de forma independente e simultânea três ou mais fatores em três níveis, conforme foi utilizado no processo de sacarificação os fatores tempo, substrato e carga enzimática.

Neste sentido, a produção de endoglucanase fúngica sob fermentação em estado sólido (FES) aplicado à sacarificação de açúcares fermentáveis é uma opção com ganhos econômicos e ambientais. Este trabalho teve por objetivo, investigar a produção de endoglucanase pelo fungo *P. roqueforti* usando casca de coco (CC), bagaço de cana-de-açúcar (BCA), farelo de trigo (FT) e coroa de abacaxi (CA). Para a avaliação das características da endoglucanase produzida foram analisados estabilidade em diferentes pHs e tempo, halotolerância e avaliação do desempenho da enzima frente a adição de metais e solventes orgânicos. Posteriormente realizada a aplicação da enzima em processos de sacarificação dos resíduos lignocelulósicos bagaço de cana-de-açúcar (BCA), casca de coco (CC), farelo de trigo (FT), casca do fruto de cacau (CFC) e casca da semente do cacau (CSC), em seguida sendo utilizando o delineamento experimental Box–Behnken para otimização da sacarificação do farelo de trigo.

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Substratos e microrganismo

Os resíduos industriais utilizados nesse trabalho foram bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, cascas de coco, estes fornecidos por indústrias localizadas na cidade de Maceió, Alagoas, Brasil, a coroa de abacaxi foi obtida em uma fazenda localizada em Coruripe, Alagoas, Brasil, já a casca do fruto do cacau (pericarpo) e casca da semente do cacau foi obtida em uma fazenda localizada no distrito de Sambaituba, Ilhéus, Bahia, Brasil. Estes resíduos foram secos em estufa (SX 1.0 DTMC, Sterilifer, Diadema, SP, Brasil) a 50 °C por 24 h em seguida triturados em moinho de facas da marca Wiley (ACB, Labor, São Paulo, Brasil) até se obter partícula de tamanho 2 mm e armazenados em recipiente até serem utilizados.

O fungo filamentososo *Penicillium roqueforti* foi fornecido pelo Instituto Nacional

de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro, RJ, Brasil sob o número de registro 40075 e número de lote 079840075.

2.2.2 Preparo inoculo e fermentação em estado sólido (FES)

O microrganismo foi cultivada em meio de agar-dextrose-batata (PDA), em Erlenmeyer de 250 mL em estufa bacteriológica (SL 222, Solab, Piracicaba, Brasil) a 27°C por sete dias em seguida armazenado em ambiente refrigerado a 4 °C. Já a fermentação em estado sólido FES foi realizada utilizando os resíduos bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, farelo de trigo e coroa de abacaxi como substrato. A FES foi realizada em erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de resíduos seco, em seguida adicionado aos recipientes água estéril para atingir a umidade desejada (80, 85, 60 e 75% respectivamente). Os frascos foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C 1 atm por 20 minutos e depois resfriado à temperatura ambiente e inoculado com quatro discos de micélio (5 mm) da cepa fúngica (Patel e Shah 2021). O conteúdo dos frascos foram bem misturados e incubados em câmara de germinação (SX 1.0 DTMC, Sterilifer, Diadema, SP, Brasil) em temperatura controlada de 27 °C por 240 horas.

2.2.3 Obtenção do extrato enzimático

Após período de fermentação foi adicionado a cada elernmeyer da fermentação 5 mL de água estéril para cada 1 g de resíduo levados a agitação em incubadora (TECNAL) por 20 minutos a 170 rpm e 25°C. O extrato obtido foi submetido à filtração seguida de uma centrifugação de 5 minutos (15.000 g), assim sobrenadante que chamaremos de extrato bruto enzimático foi separado e utilizado para determinação das atividades enzimática.

2.2.4 Determinação da atividade enzimática

Para determinar a atividade da endoglucanase (CMCase, endo-1,4-β-D-glucanase; EC 3.2.1.4) foi determinado em um meio de reação de total 1 mL conduzidos pela adição de 10 µL de extrato bruto enzimático, 100 µL de solução de Carboximetilcelulose 2% (CMC) (p/v) e 190 µL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5). As amostras foram incubadas a 50 ° C por 60 min que foi interrompida pela adição de 200 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS (Sigma-Aldrich). Depois disso, os tubos foram aquecidos em água fervente por 5 min adicionando 500 µL de água destilada. A

liberação de açúcares redutores (equação 1) foi determinada usando o método de Miller (1959) medição de absorvância em 540 nm usando espectrofotômetro Fex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

$$\text{Atividade celulase (U/mL)} = AR \times \frac{VT}{0,18 \times VC \times TH} \quad (\text{Eq.1})$$

Onde, AR: açúcar redutor (mg/g), VT: volume total utilizado na hidrólise (mL), VC: volume do extrato (mL), TH: tempo da hidrólise (min) e 0,18: 1 μ mol de glicose (mg).

2.2.5 Caracterização bioquímica

2.2.5.1 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima

A temperatura ótima de reação para a atividade enzimática da endoglucanase foi realizada em meio padrão para a determinação da atividade enzimática da enzima (item 2.3.2), alterando a temperatura de incubação (40 à 80°C). Já a estabilidade térmica foi avaliada pela incubação do extrato enzimático bruto (10 μ L) em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) sob diferentes temperaturas (40 à 80°C) por 5 h. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 1 h e submetidas à determinação da atividade da endoglucanase. Todas as respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática de maior valor obtido.

2.2.5.2 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima

Para medir o efeito do pH de reação foi avaliado na faixa de 2 à 13 usando os tampões pH 2 e 3 citrato de sódio, 0,05 M; pH 4 à 6 acetato de sódio, 0,05 M; pH 7, 12 e 13 fosfato de sódio, 0,05 M; pH 8 tris-HCl, 0,05 M; e pH 9 à 11 glicina, 0,05 M. A atividade da endoglucanase foi realizada a 50 °C. Para os ensaios de estabilidade foram realizados na mesma faixa de pHs com amostras incubadas em banho maria a 50 °C por 5 h, e em intervalos de 1h alíquotas foram retiradas e realizadas análises conforme a atividade enzimática (seção 2.2.2). As respostas foram expressas como atividade relativa (%), com a maior atividade enzimática considerada como 100%.

2.2.5.3 Efeito dos sais metálicos e solventes orgânicos

Foram avaliados os efeitos dos sais metálicos CaCl₂, Na₂CO₃, NaCl, ZnCl₂, MgCl₂, CuSO₄, os reagentes EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), Triton X-100

(t-octilfenoxipoliétoxietanol) e SDS (dodecil sulfato de sódio) na atividade enzimática, aplicando a concentração foi de 2 mM por 60 min em temperatura de 50 °C. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade da endoglucanase obtida utilizando se apenas o extrato enzimático bruto.

O efeito na adição de solventes orgânicos para atividade da endoglucanase foi determinado adicionando cada solvente selecionado (álcool metílico, álcool etílico e diclorometano, acetona e heptano). Foi adicionado a cada meio reacionário, 5 µL de cada solvente para medida de atividade conforme seção 2.3.2. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade da endoglucanase obtida utilizando se apenas o extrato enzimático bruto.

2.2.5.4 Halotolerância

A adição de sal no extrato bruto com atividade da enzima endoglucanase foi avaliado utilizando aplicando o tampão de acetato de sódio (100 mM, pH 5) com varias concentrações de NaCl (0 M, 0,01 M, 0,05 M, 0,1 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M e 7 M), a atividade enzimática foi verificada conforme seção 2.3.2. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade da endoglucanase obtida utilizando se apenas o extrato enzimático bruto.

2.2.5.5 Estabilidade do extrato bruto enzimático (congelada e resfriada)

A atividade enzimática da endoglucanase foi verificada conforme o armazenamento congelado (-20 °C) e resfriada (4 °C) no período de 120 dias em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5. Alíquotas foram avaliadas no intervalo de 30 dias. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade da endoglucanase obtida antes do armazenamento.

2.2.6 Aplicação do extrato bruto enzimático na sacarificação de resíduos lignocelulósicos

A endoglucanase contida no extrato enzimático bruto produzido por *P. roqueforti* ATCC 10110 com atividade de 440 U/mL foi aplicada na sacarificação dos resíduos “in natura” bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, farelo de trigo, cacas do fruto do cacau e casca da semente do cacau. O meio reacional consistiu em 1% de substrato e 5 mL do extrato enzimático bruto e 5 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5). Já o controle foram utilizados 1% do resíduo sem adição do extrato enzimático

bruto. A sacarificação foi realizada em banho à 50°C em diferentes tempos (3, 6, 12 e 24 horas) para estimar a quantidade de açúcares redutores liberados (Miller, 1959) com base em uma curva padrão de glicose (0 a 1 µmol/mL) em espectrofotômetro a 540 nm Fex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

2.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise MEV, as amostras dos resíduos ”bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, farelo de trigo, cacas do fruto do cacau e casca da semente do cacau in natura e pós sacarificação foram fixadas a um suporte “Stub” e em seguida foram metalizadas com uma fina camada de ouro, cerca de 20 a 30 nm de espessura por um sistema de evaporação “sputtering” utilizando equipamento SSX-550 Superscan, da Shimadzu (Quioto, Quioto, Japão), conforme procedimento padrão.

2.2.8 Otimização multivariada

As condições experimentais foram otimizadas usando um Box-Behnken Design (BBD). As variáveis (tempo, substrato e concentração enzimática) (Tabela 1) foram estudadas em três níveis (-1, 0 e +1) e as repetições dos pontos centrais (n = 3) foram incluídas para obter estimativas de erro experimental e parâmetros estatísticos. Modelos matemáticos foram gerados e avaliados a partir de análise e variância (ANOVA) com nível de confiança de 95%.

O modelo preditivo foi definido a partir do coeficiente de determinação (R^2) e o ajuste do modelo aos dados experimentais foi verificado a partir do teste de falta de ajuste (FERREIRA et al, 2007). Todos os dados foram processados no software Statistica12 (StatSoft, Tulsa, EUA) com nível de confiança de 95%.

Tabela 1. Matriz experimental do Design Box-Behnken e resposta experimental (variáveis em valores reais e codificados)

Experimento	Tempo (h)	Substrato (%)	Concentração enzimática (U/mL)	Açúcar redutor (mg/g)
1	3 (-1)	5 (-1)	275 (0)	35.07
2	9 (1)	5 (-1)	275 (0)	40.29
3	3 (-1)	15 (1)	275 (0)	176.59
4	9 (1)	15 (1)	275 (0)	188.60
5	3 (-1)	10 (0)	110 (-1)	69.20
6	9 (1)	10 (0)	110 (-1)	81.56
7	3 (-1)	10 (0)	440 (1)	124.50
8	9 (1)	10 (0)	440 (1)	144.07
9	6 (0)	5 (-1)	110 (-1)	24.54
10	6 (0)	15 (1)	110 (-1)	152.90
11	6 (0)	5 (-1)	440 (1)	46.87
12 ^b	6 (0)	15 (1)	440 (1)	244.75
13 ^a	6 (0)	10 (0)	275 (0)	122.32
14 ^a	6 (0)	10 (0)	275 (0)	115.78
15 ^a	6 (0)	10 (0)	275 (0)	117.36

^a Ponto central (CP)

^b Ótima condição selecionada.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Produção de endoglucanase

O perfil da curva de produção de endoglucanase foi utilizado os resíduos de casca de coco, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e coroa de abacaxi, foram analisados de 0 até 240 horas, coletando amostras a cada 24 horas. Conforme figura 1 as maiores atividades detectadas nos resíduos de casca de coco, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e coroa de abacaxi foram, 0,229 U mL⁻¹ após 72 h, 0,045 U mL⁻¹ após 168 h, 0,879 U mL⁻¹ após 96 h e 0,294 U mL⁻¹ após 240 h respectivamente. O resíduo farelo de trigo apresentou maior atividade por ser um substrato balanceado para crescimento de fungos por conter celulósico, hemicelulósico, proteína e lignina, também é rico em fatores de crescimento e vitaminas (Bagewadi et al., 2017). Os oligossacarídeos presentes em sua composição são indutores eficientes para a produção de celulases e hemicelulases (Sun et al., 2008; Massarente et al., 2020). Em comparação ao resíduo de cana-de-açúcar que obteve o menor resultado, o farelo de trigo se destacou por conter mais proteína em sua composição do que o bagaço de cana-de-açúcar, oferecendo mais nitrogênio e assim estimulando a síntese de endoglucanases e outras enzimas lignocelulósicas; o nitrogênio representa cerca de 1,98 % por g e o

bagaço de cana-de-açúcar 0,15% por g (Juturu e Wu, 2012; Massarente et al., 2020).

Em geral, as atividades enzimáticas das endoglucanases neste trabalho formam semelhantes as de outros organismos produtores de celulases, como foi obtido por Mohapatra et al. (2018) que avaliou a produção de celulase por *Aspergillus fumigatus* usando resíduos celulósicos obtendo uma maior atividade de endoglucanase ($0,287 \text{ U mL}^{-1}$), já Carvalho (2013) obteve $0,164 \text{ U mL}^{-1}$ cultivando *Cryptococcus laurentii* em farelo de trigo.

Aplicando biomassa na produção de enzimas além de obter um bom resultado, o custo do meio de cultura reflete no custo do produto final de enzimas. Assim, o uso de um substrato de baixo custo é sempre desejado em um ponto de vista comercial (Marraki et al., 2020). Assim resíduo farelo de trigo foi adotado para a produção de maiores volumes de extrato enzimático usado em análises subsequentes.

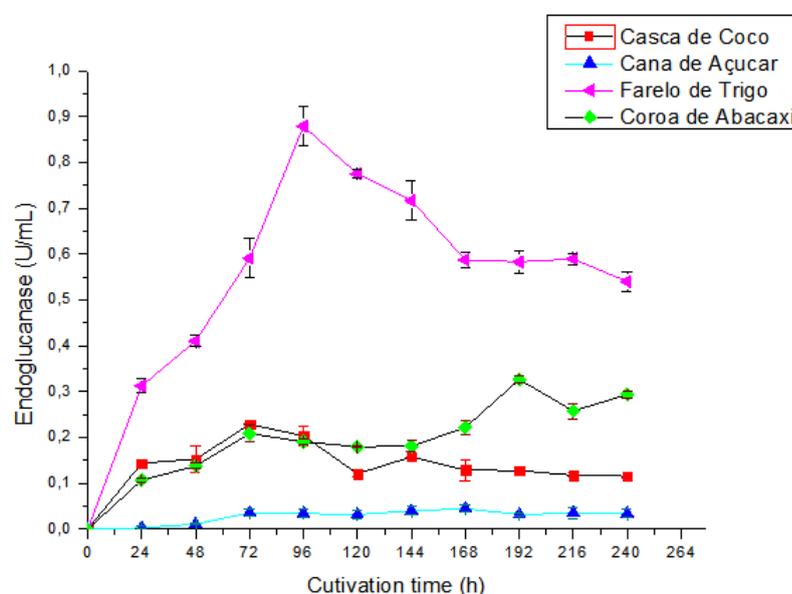


Fig. 1. Perfil da produção de endoglucanase (U/mL) em fermentações em estado sólido por *P. roqueforti* ATCC 10110, nos resíduos de casca de coco, cana-de-açúcar, farelo de trigo e coroa de abacaxi a 27°C e 60% de umidade. Barras representam o desvio das triplicatas e a figura foi obtida com o software OriginPro® v. 8.0.

2.4 Caracterização do extrato enzimático bruto

2.4.1 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade

A temperatura e sua estabilidade foi determinado pela realização do ensaio para determinar atividade da endoglucanase em diferentes temperaturas ($40- 80^{\circ}\text{C}$). As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo o maior resultado considerado como 100%. Na figura 2A, podemos observar que o maior valor de atividade foi alcançada na temperatura 50°C apresentando declínio quando esta foi

elevada. E ainda mantendo 80% de sua atividade em 70 °C, sendo inativa a 80 °C com atividade < 10%. Temperaturas a partir de 50 °C são consideradas ideais para que as enzimas celulolíticas fúngicas realizem hidrólise (Silva et al., 2018). Enzimas celulolíticas oriundas de fungos termofílicos, geralmente possuem termoestabilidade na faixa de 50 °C à 80 °C (Patel et al., 2019). Esses resultados encontrados comprovam que a endoglucanase encontrada de *P. roquefort* manteve atividade alta o que comprova sua estabilidade (Fig. 2B).

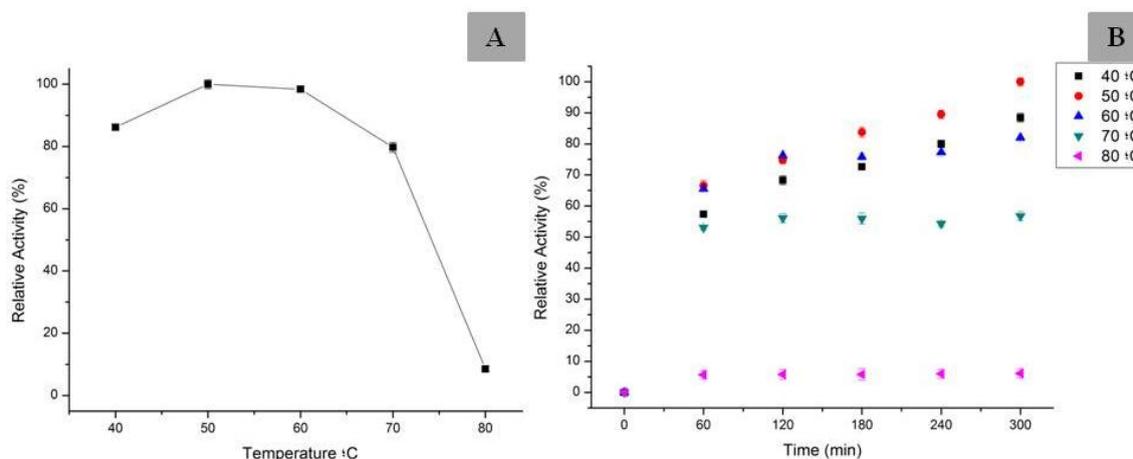


Fig. 2. (A) Atividade relativa da endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 cultivado em FT obtida em diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70 e 80 °C) em 60 min. A atividade mais alta obtida em 50 °C foi tomada como 100%. (B) Perfil de termoestabilidade da endoglucanase. As reações foram realizadas em tampão acetato de sódio 100 mM, pH5,0) nas temperaturas de 40 à 80 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.

Em relação à termoestabilidade (figura 2B) observamos que com o passar do tempo à atividade nas temperaturas 50 e 60 °C se manterão estáveis ou elevadas (5 horas), demonstrando grande estabilidade térmica desta enzima e potencial para aplicações industriais, por demonstrar característica termoestável. Essa característica pode ocorrer devido a se tratar de um extrato bruto de enzimas, em que as outras enzimas presentes no extrato são susceptíveis de exercer um comportamento protetor sobre a endoglucanase, assim protegendo contra o efeito do aumento da temperatura e do tempo (Oliveira et al., 2019). Esses resultados são semelhantes a resultados encontrados por Silva et al. (2018) que produzindo a endoglucanase por *Botrytis ricini* URM 5627 e a atividade enzimática em 70 °C foi capaz de resistir com 75% de sua atividade.

2.4.2 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade

O efeito do pH na atividade da endoglucanase obtido de *P. roqueforti* ATCC 10110 foi verificado na faixa de 2,0 a 13,0 (figura 3). Observamos que os melhores resultados foram na faixa de pH 4 e 5 com atividade 100 e 97,5% respectivamente, no pH 2 não foi registrada nenhuma atividade e pH 8 atividade > 12%. Através desses resultados, sugeriu tratar-se de endoglucanases acidófilas (Oliveira et al., 2019). Mohapatra et al. (2018), afirmou que celulases fúngicas da literatura são principalmente ativo em pH 3,7 a 7,0, porém diferentes sequências de aminoácidos de endoglucanases levaram a diferentes pH e temperaturas ótimos de atividade da endoglucanase (Xue et al., 2018).

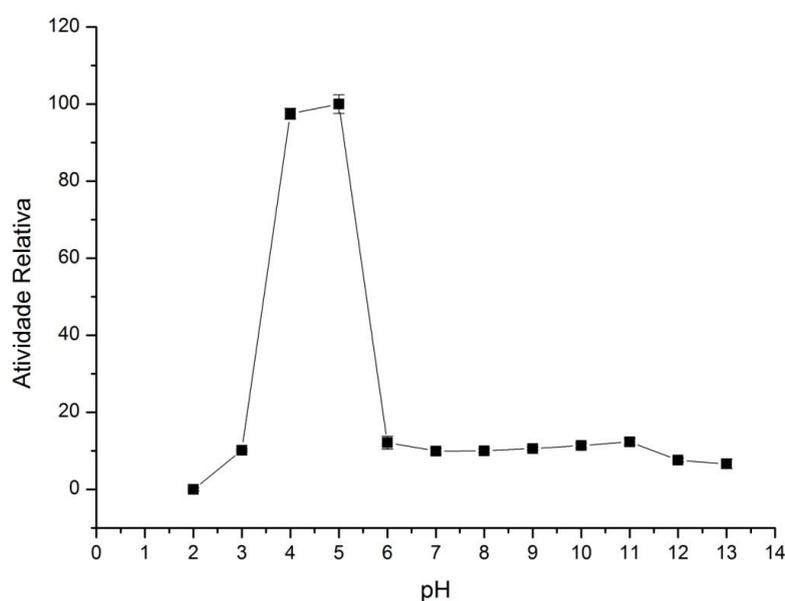


Fig. 3. Atividade relativa da endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 cultivado em farelo de trigo e obtida em diferentes pHs, condições de reação: temperatura 50°C; tempo: 60 min.

A estabilidade foi avaliada (figura 4), por 5 horas, assim apresentou estabilidade em todas as faixas de pHs, obtendo os melhores resultados para atividade nos pHs 4 e 5 com resultados de atividade > 90% para pH 4 e > 80% para pH 5. Estes resultados demonstraram que a endoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 é estável em uma ampla faixa de pH quando comparado às endoglucanases obtidas de outras espécies de *Penicillium* (Ire et al., 2018). Oliveira et al. (2019), encontraram a estabilidade do extrato bruto enzimático produzido por *P. roqueforti* ATCC 10110 da endoglucanase

nos pHs 4-8, com a atividade da enzima sendo mantida a cerca de 80% após 5 h de incubação a 50 ° C.

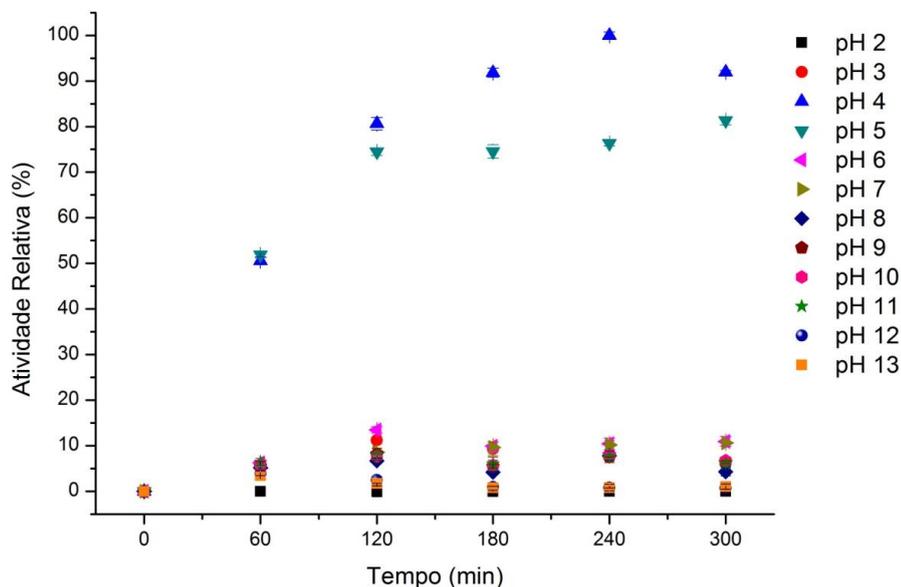


Fig. 4. Perfil de estabilidade ao pH de endoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 cultivado em FT, condições de reação: temperatura 50°C; tempo: 300 min.

2.4.3 Efeito sob a adição de sais e solventes orgânicos

Entre os compostos orgânicos investigados (tabela 2), não influenciam significativamente a atividade da enzima mantendo-o em 96,97 e 91,44%. Estabilidade da enzima na presença de substâncias solventes orgânicas é importante, uma vez que a maioria enzimas são facilmente desnaturadas e inativadas, pois dependendo da polaridade do solvente, pode criar uma interface na enzima molécula e permitir uma conformação aberta para ligação, estimulando sua ativação (Irfan et al., 2017; Oliveira et al., 2018).

É importante a atividade enzimática ser verificada contra todos esses moduladores como estes estão envolvidos no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Os solventes de pré-tratamento inclui metanol, etanol, acetona e etileno glicol e trietilenoglicol (Kumar et al., 2019).

Tabela 2. Atividade da endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 frente a diferentes sais metálicos, compostos e solventes orgânicos (a atividade obtida utilizando o extrato bruto sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 2mM; temperatura: 50 °C; pH: 5; tempo: 60 min). Os experimentos foram realizados em triplicata.

	Atividade Relativa (%)
Controle	100
CaCl ₂	118,33 ± 0,023
Na ₂ CO ₃	79,09 ± 0,009
NaCl	101,57 ± 0,010
ZnCl ₂	102,44 ± 0,007
MgCl ₂	108,92 ± 0,015
CuSO ₄	102,68 ± 0,052
EDTA	83,49 ± 0,008
Triton x-100	99,26 ± 0,046
SDS	82,02 ± 0,022
Acetona	96,97 ± 0,041
Diclorometano	91,44 ± 0,004
Etanol	92,65 ± 0,010
Heptano	91,80 ± 0,022
Metanol	95,30 ± 0,010

A enzima na presença dos íons Ca²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ e Cu²⁺ se comportaram como um ativador aumentando a atividade catalítica em cerca de 118,33, 102,44, 108,92 e 102,68% respectivamente. Essas soluções foram necessárias para aumentar a afinidade de ligação ao substrato da enzima e estabilizar a conformação do sítio catalítico (Xue et al., 2018). O aumento na atividade catalítica por íons metálicos é devido à manutenção de arquitetura enzimática (Karnchanat et al., 2008; Kumar et al., 2019), podendo atuar como cofatores, ou podem agir reversivelmente com a formação de complexos que não são ativos (Ferraz et al. 2019). Segundo Silva e colaboradores (2018), os íons bivalentes usado em baixas concentrações pode estabilizar a estrutura terciária da proteína, promovendo a formação de ligações cruzadas e proporcionando maior.

A atividade não foi afetada em soluções de Na, Triton-100, a endoglucanase permaneceu acima de 90% de atividade. Já na presença de SDS, Na₂CO e EDTA a endoglucanase manteve a atividade acima de 79%. O agente quelante EDTA diminuiu a atividade da endoglucase, assim fez não abolir completamente a atividade enzimática mostrou que a enzima não é uma metaloproteína. (Kumar et al., 2019).

No presente estudo, verificou-se que todos os íons e solventes testados não

inibem completamente a atividade da endoglucanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 confirmando ainda mais como um potencial candidato que pode ser usado para hidrólise de biomassa (Kumar et al., 2019).

2.4.4 Halotolerância

A natureza halofílica da enzima foi confirmada pela realização do ensaio enzimático na presença de diferentes concentrações de sais. A atividade da endoglucanase aumentou em todas as concentrações de adição do NaCl. Na concentração 2 M pode observar o maior crescimento da atividade em 35% (Fig. 5). A halotolerância é uma propriedade essencial de qualquer enzima potencialmente útil explorável em diferentes indústrias de processamento de biomassa, pois no processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica requer celulase que pode atuar tanto em pH 4,0-6,0, e na presença de sais e solventes sendo tais condições frequentemente usadas na etapa de pré-tratamento para remover a lignina (Kuhad et al., 2011; Kumar et al., 2019). Relatos que enzimas resistentes a grandes quantidades de sal são oriundas principalmente de microrganismos halofílicos, em prováveis em bactérias, sendo muito raras em fungos (Silva et al., 2018). Assim há uma necessidade aguda de tais enzimas hidrolíticas que podem funcionar eficientemente na presença de condições de alta salinidade, a endoglucanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 é um potencial candidato devido à sua extrema halotolerância.

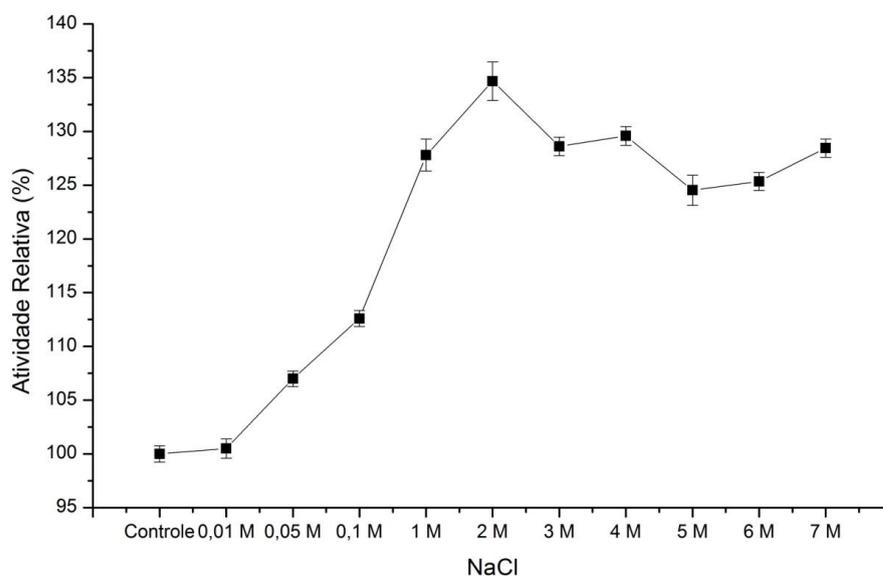


Fig. 5. Efeito da concentração de NaCl na atividade de hidrólise da endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 do extrato bruto. A atividade foi determinada na presença de

diferentes concentrações de NaCl variando de 0 a 6,0 M (a atividade obtida utilizando a enzima sem NaCl foi tomada como 100% - controle). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4.5 Estabilidade do extrato bruto enzimático

O armazenamento do extrato bruto em temperaturas de resfriamento (6 °C) e congelamento (-20 °C) foi avaliado por 120 dias para análise da atividade de endoglucanase *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, com medições nos intervalos de 30 dias. Na figura 6, podemos observar que nos primeiros 30 dias a atividade de congelamento se manteve em 100% enquanto para resfriamento 80%, já no intervalo de 120 dias em temperatura de congelamento a atividade permaneceu em 40% e resfriamento 7%. O método de congelamento se mostrou satisfatório por conservar a enzima com melhor atividade após os 120 dias, confirmando que o congelamento é o método mais comum e eficaz de armazenamento de proteínas. Celulases produzidas por *Botrytis ricini* URM 5627 também se mantiveram ativas após período de 120 dias (Silva et al., 2018), dessa forma podemos afirmar que a endoglucanase obtida por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 se mostrou apta para estocagem e uso.

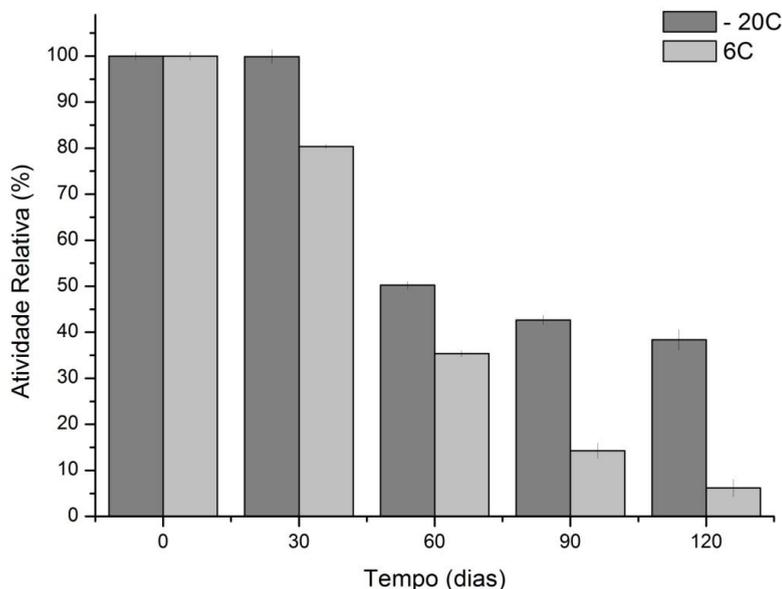


Fig. 6. Efeito da refrigeração e congelamento do extrato bruto enzimático a -20°C e 6°C sobre atividade de endoglucanase *P. roqueforti* ATCC 10110 (a atividade obtida no tempo 0h foi tomada como 100%). Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.5 Sacarificação de resíduos agroindustriais

A endoglucanase contida no extrato enzimático bruto produzido por *P.*

roqueforti foi aplicada na sacarificação dos resíduos “in natura” bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, farelo de trigo, cacas do fruto do cacau e casca da semente do cacau. Os resultados dispostos na figura 7 demonstram que a enzima sacarificou todos os resíduos que foi exposta. A sacarificação desses resíduos podem estar relacionados com a taxa de concentração de hemicelulose nos materiais, além do fator da utilização de um extrato enzimático bruto, o que permite um sinergismo entre a endoglucanase e as outras enzimas (Ferraz et al., 2018), assim promovendo a eficiência no resultado da sacarificação. O farelo de trigo foi o resíduo que apresentou os melhores resultados com a maior produção de açúcares redutores, chegando a 5.11 mg/g nas 3 primeiras horas de sacarificação e finalizando em 24h com 6.1 mg/g. A sacarificação do resíduos bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, casca do fruto de cacau e casca da semente do cacau nas 3 primeiras horas foram de 4.4 mg/g, 4.23 mg/g, 4.76 mg/g e 4.69 mg/g respectivamente,esses valores de sacarificação foram obtidos sem aplicar nenhum método de tratamento para os resíduos.

O uso da endoglucanase associadas a celulases em processos de sacarificação apresenta grande eficiência, pois pode melhorar significativamente os rendimentos da sacarificação de resíduos lignocelulósicos, justamente por aumentar a acessibilidade da celulase (Mukasekuru et al., 2020). Essa técnica vem sendo utilizada principalmente para a produção de açúcares fermentáveis para a de bioetanol (Ferraz et al., 2017 ; Silva et al., 2018). Em outro estudo a endoglucanase purificada de *C. josui* foi usado na sacarificação de palha de arroz (Lekakarn et al., 2021), e a endoglucanase de *Fusarium verticillioides* em sacarificação do resíduo bagaço de cana (De Almeida et al., 2019).

Já Gundupalli e colaboradores (2021) avaliou a enzima celulase purificada no processo de sacarificação, aplicando 1 mg/mL de bagaço de cana e obteve 1.250 mg/mL de açúcar redutor. Este resultado baixo foi atribuído ao impedimento causado pela lignina e camadas de hemicelulose presentes no resíduo que não passou por tratamento. Assim o aumento na sacarificação dos resíduos depende de alguma forma de pré-tratamento para aumentar a hidrólise dos resíduos (De Carvalho et al., 2022). Nossos resultados forneceram perspectivas promissoras sendo submentido a otimização.

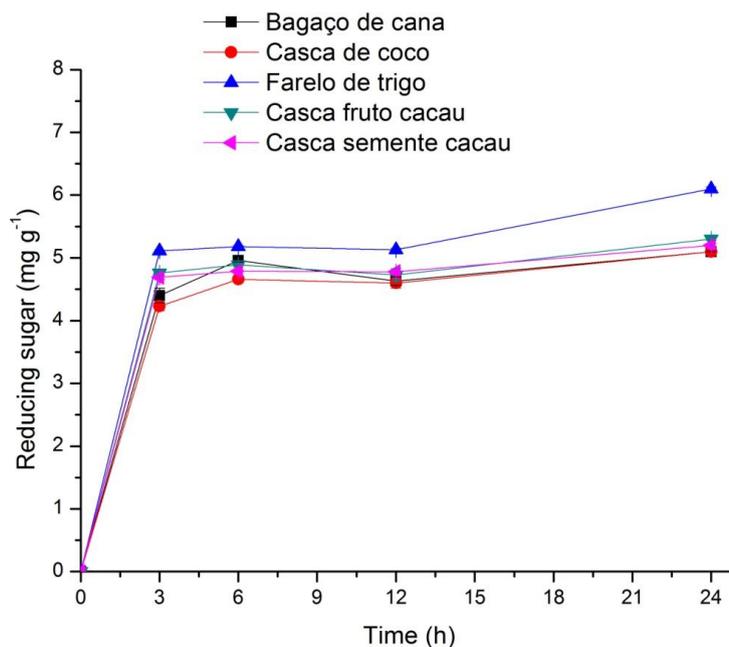


Fig. 7. Sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, farelo de trigo, casca do fruto de cacau e casca da semente do cacau empregando endoglucanase bruta produzida por *P. roqueforti* ATCC 10110. A sacarificação foi realizada em 50 °C, tampão acetato de sódio 0,1M pH 5, por 24 h, utilizando uma carga de substrato de 1% e uma carga enzimática de 440 U/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

A ultra-estrutura dos resíduos bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, farelo de trigo, casca do fruto de cacau e casca da semente do cacau foram analisada por microscopia eletrônica de varredura para observar os efeitos do pós sacarificação. As imagens Figura 8. 1(A), 2(A), 3(A), 4(A) e 5(A), revelou duas características morfológicas, ou seja, estruturas de fibra e medula, com uma morfologia organizada, porém irregular com estruturas fibrosas disformes, revestimento fragmentado e fibras de celulose rodeadas por uma estrutura composta de hemicelulose e lignina. A sacarificação Figura 8. 1(B), 2(B), 3(B), 4(B) e 5(B) promoveu ao resíduo a formação de poros nas fibras e além de rompimento de fibras e medulas. Então, após a análise MEV pode-se concluir que a sacarificação alterou significativamente a estrutura resíduos, diminuindo a parece celular dos resíduos promovendo desestruturação e afrouxamento de estruturas matriz dos resíduos. Esse resultado é ainda mais expresso quando analisado o resíduo farelo de trigo (fig 8. 1(A)), pois é possível visualizar as fibras de celulose com estruturas rígidas, enquanto pós sacarificação (fig 8. 1(B)) essas mesmas estruturas se apresentam fragmentadas, confirmando os resultados superiores

obtidos na sacarificação por esse resíduo.

Sabendo que diversos fatores podem influenciar os rendimentos da conversão de holocelulose em açúcares e subprodutos, como por exemplo: tamanho de partícula, relação líquido/sólido, pré-tratamento realizado, coquetel enzimático utilizado, temperatura, tempo de reação, grau de polimerização e configuração da cadeia de celulose (BINOD et al., 2010).

Os resultados encontrados nesse estudo foram satisfatórios, uma vez que a partir da MEV pós sacarificação, os valores obtidos de açúcares redutores aplicando a enzima endoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110 teve um grande potencial para sacarificação de biomassas no bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, farelo de trigo, casca do fruto de cacau e casca da semente do cacau , sem a necessidade de um tratamento prévio desses substrato. Os resultados são semelhantes aos estudos encontrados sobre aplicação de resíduos lignocelulosicos na sacarificação como o trigo (Razak e Banergee, 2016; Mohapatra et al., 2018).

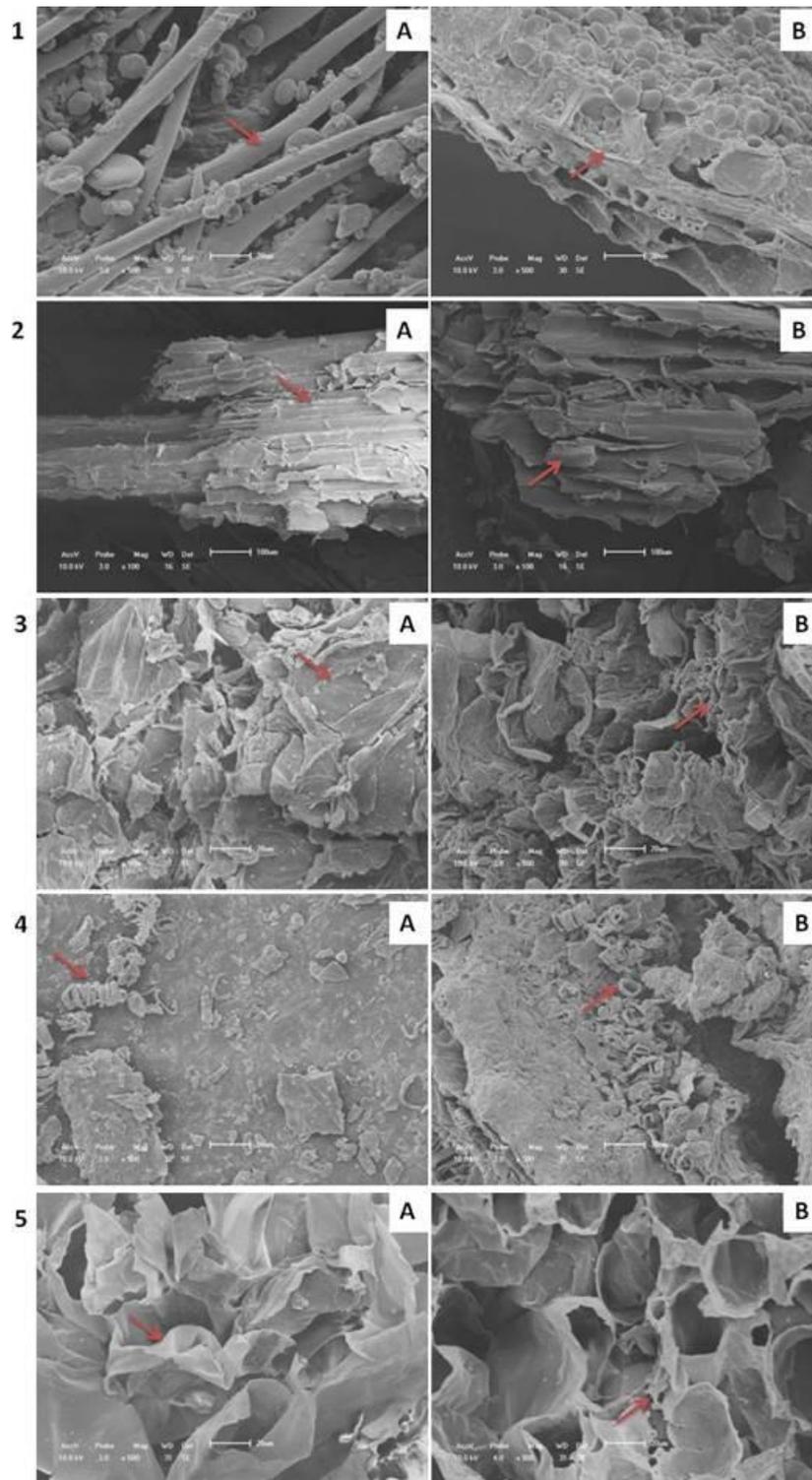


Fig. 8. Micrografias eletrônicas de varredura de várias amostras de farelo de trigo (1), bagaço de cana-de-açúcar (2), casca do fruto de cacau (3), casca da semente do cacau (4) e casca de coco (5), sendo os resíduos divididos em in natura (A) e sacarificado (B).

2.5.2 Planejamento Box-Behnken para otimização da sacarificação do farelo de trigo.

O estudo das condições experimentais é necessário para determinar o melhor desempenho. Neste estudo, o extrato bruto contendo endoglucase foi investigada para aplicação na produção de açúcares redutores. No procedimento foram estudados o tempo de fermentação (h), teor de substrato (%) e concentração de enzima (U/mL) aplicada no sistema. O delineamento BBD foi utilizado e os experimentos foram realizados para avaliar simultaneamente o comportamento da resposta experimental em função da variação dos níveis das variáveis estudadas. A matriz de dados e a resposta experimental (açúcar redutor) nos experimentos individuais.

Os modelos matemáticos foram gerados a partir do conjunto de dados e avaliados considerando os parâmetros estatísticos da ANOVA (Tabela 3). O modelo quadrático apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais e melhor descreveu o comportamento experimental. A regressão foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) e apresentou alta capacidade descritiva ($R^2 = 0,996$). Além disso, o modelo não apresentou uma falta de ajuste significativa ($p = 0,076$). Esses resultados indicam que o modelo quadrático obtido apresentou bom ajuste e alta capacidade preditiva.

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático.

Source of variation	SS	Df	MS	F-calculated	<i>p-value</i>
Regression	5.61E10	9	6.24E09	152.20	<0.001
Lack of fit	1.94E08	3	6.48E07	19.16	0.076
Pure error	1.06E07	2	5.31E06		
Total	5.63E10	14			

Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), coeficiente de determinação (R^2).
*Nível de confiança de 95%.

Com base no modelo obtido, foram estimados os efeitos padronizados (SE) das variáveis e interações (Fig. 9). O substrato (SB) apresentou o efeito padronizado de maior magnitude, sugerindo uma alta influência na resposta experimental. Além disso, a concentração da enzima (EC) e a interação entre SB e EC foram significativas ($p > 0,05$) com valores elevados de SE. Já a temperatura (TM) apresentou pouca significância isso significa que esta variável não influencia positiva nem negativamente na resposta desejada. Portanto, a seleção de níveis mais elevados dessas variáveis

favorecerá a obtenção da melhor produção de açúcares redutores.

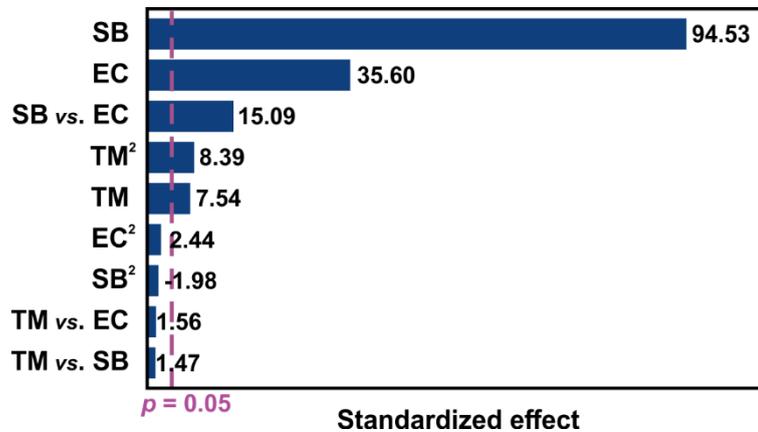


Fig. 9. Efeitos padronizados para fatores investigados (Gráfico de Pareto)

Finalmente, os gráficos de contorno foram gerados a partir do modelo quadrático (Eq. 1) e são mostrados na Fig. 10. Foi possível observar que no processo de sacarificação o efeito combinado do substrato e concentração de enzimas foi importante, isso deve que a presença de uma maior quantidade de biomassa lignocelulósica na sacarificação é favorável, pois pode liberar vários açúcares, como glicose, celodextrinas, e pentoses (Pereira et al, 2021), como também o aumento da concentração de biocatalisador aumenta a quantidade de sítios ativos disponíveis para a reação (Gawas et al., 2018).

(Eq. 1)

Reducing sugar (mg/g)

$$= 1.18E5 + 6145TM + 77010SB + 29000EC + 17381SB \times EC - 10056TM^2$$

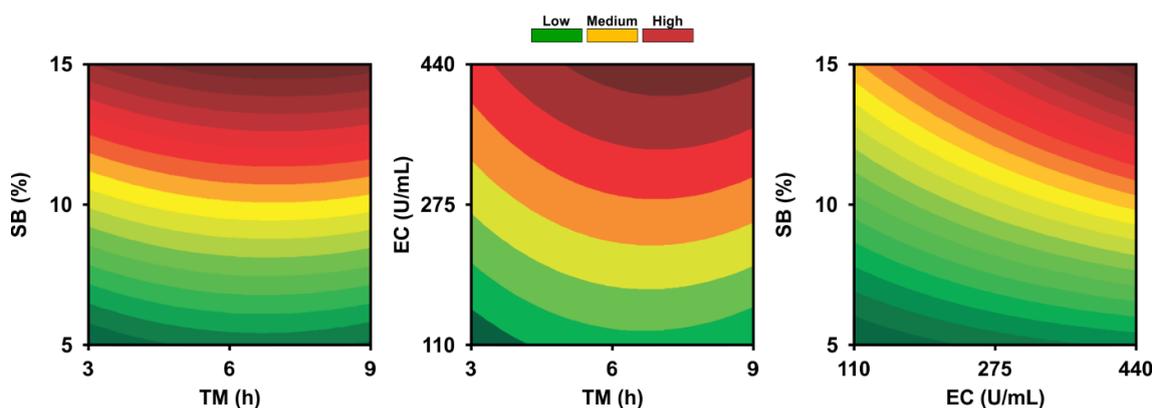


Fig. 10. Gráficos de contorno foram obtidos a partir de um modelo quadrático para as variáveis: tempo (TM), substrato (SB) e concentração enzimática (EC).

Uma região de valores altos para uma resposta experimental foi obtida nos níveis máximos de SB (15%) e EC (440 U /mL), enquanto para TM foi o nível central (6 h). Assim, a melhor condição experimental foi determinada e a resposta experimental obtida 253,19 mg/g não apresentou diferença significativa (valor $t = 2,89$, $n = 3$, $p = 0,05$). Esses valores indicam que essas condições determinadas e os resultados obtidos usando o modelo de desenvolvimento de software confirmam que foi útil na otimização da sacarificação do farelo de trigo (Tan et al., 2011; Lu et al., 2021).

Lu e colaboradores (2021) utilizou o desing Box–Behnken aplicando a enzima celulase com carga de 20 FPU/g e 40 FPU/g no resíduo de cana de açúcar e obteve 41,16 % e 56,67 % de rendimento de açúcar redutor após 72 horas.

Já Khaire et al (2021), sob condições otimizadas pela metodologia de superfície de resposta aplicando na sacarificação, este utilizou combinações das enzimas endo-1,4- β -glucanase, cellobiohydrolase e β -glucosidase obtendo o total de açúcar redutor de 265 mg/g após 36 h. Este resultado é semelhante ao encontrado em nosso trabalho, assim comprovando o métodos de otimização como eficaz na produção de açúcar redutor.

2.6 Conclusão

Os achados do presente estudo demonstraram que o fungo filamentoso *P. roqueforti* ATCC 10110 em resíduos lignocelulósicos para obtenção da endoglucanase foi promissora. A endoglucase produzida apresentou características alcalinas, termoestáveis e halotolerante com ênfase na alta estabilidade para íons metálicos e solventes orgânicos. A aplicação do extrato bruto enzimático resultou na sacarificação de todos os resíduos a que foi exposto, além disso, a análise MEV revelou alterações na morfologia da superfície após sacarificação. As condições otimizadas pelo Box-

Behnken resultaram em altos valores de açúcares redutores sem aplicação de nenhum tipo de pré-tratamento nos resíduos, demonstrando a eficiência da endoglucase produzida.

2.7 Referências bibliográficas

Anish, R., Rahman, M.S., Rao, M., 2007. Application of cellulases from the alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims. *Biotechnol. Bioeng.* 96 (1), 48–56.

Bagewadi, Z.K., Mulla, S.I., Ninnekar, H.Z., 2017. Optimization of laccase production and its application in delignification of biomass. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 6 (4), 351–365.

De Brito, A.R., Reis, N.S., Bonomo, F.C.R., Uetanabaro, T. P. A., Assis, S.A., Silva, P.G.E., Águiar-Oliveira, E., Oliveira, R.J., 2017. Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization of the endoglucanase produced in the solid-state fermentation by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. *Prep Biochem Biotech.* 47, 977-985.

De Almeida, M.N., Falkoski, D.L., Guimarães, V.M., De Rezende, S.T., 2019. Study of gamba grass as carbon source for cellulase production by *Fusarium verticillioides* and its application on sugarcane bagasse saccharification. *Ind. Crops Prod.* 133, 33-43.

De Carvalho, M.S., De Menezes, L.H.S., Pimentel, A.B., Costa, F.S., Oliveira, P.C., Dos Santos, M.M.O., Tavares, I.M.C., Irfan, M., Bilal, M., Dias, J.C.T., De Oliveira, J.R., Franco, F., 2022. Application of Chemometric Methods for the Optimization Secretion of Xylanase by *Aspergillus oryzae* in Solid State Fermentation and Its Application in the Saccharification of Agro-industrial Waste. *Waste Biomass Valorization.* 1, 11.

Dogan, M., Tekiner, I.H., 2021. Evaluating starter culture potential of wild *Penicillium roqueforti* strains from moldy cheeses of artisanal origin. *Food Bioscience.* 43, 101253

Dos Santos, M.M.O. Gama, R.S., Tavares, I.M.C., Santos, P.H., Gonçalves, M.S., De Carvalho, M.S., Vilas Boas, E.V.B., Oliveira, J.R., Mendes, A.A., Franco, M., 2020. Application of lipase immobilized on a hydrophobic support for the synthesis of aromatic esters. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 68, 538-546.

Caron, T., Le Piver, M., Péron, A., Lieben, P., Lavigne, R., Brunel, S., Roueyre, D., Place, M., Bonnarme, P., Giraud, T., Branca, A., Landaud, S., Chassard, C., 2021. Strong effect of *Penicillium roqueforti* populations on volatile and metabolic compounds responsible for aromas, flavor and texture in blue cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 354, 109174.

Castillo, A.M., Alavez, V., Castro-Porras, L., Martínez, Y., Cerritos, R., 2020. Analysis

of the current agricultural production system, environmental, and health indicators: necessary the rediscovering of the pre-hispanic mesoamerican diet? *Front. Sustain. Food Syst.* 4 (5), 1-12.

Cavalcanti, M.H.S., Alves, L.B., Duarte, A., Mendes, A.A., Da Silva, J.M.S.F., Da Silveira, N.J.F., Escote, M.T., Virtuoso, L.S., 2022. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase via ionic adsorption on superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Facile synthesis and improved catalytic performance. *Chem. Eng. J.* 431, 134128.

El-Shishtawy¹, R.M., Mohamed, S.A, Asiri, A.M., Gomaa, A.M., Ibrahim, I.H., Al-Talhi, H.A., 2015. Saccharification and hydrolytic enzyme production of alkali pre-treated wheat bran by *Trichoderma virens* under solid state fermentation. *BMC Biotechnol.* 15 (1), 37.

Ferraz, J.L.A., Souza L.O., Fernandes, A.G.A., Ferreira, M.L.O., Oliveira, J.R., Franco, M., 2019. Optimization of the solid-state fermentation conditions and characterization of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 using yellow mombin residue (*Spondias mombin* L.). *Chem Eng Commun.* 206, 1-12.

Ferraz, J.L.A.A., Souza, L.O., Soares, G.A., Coutinho, J.P., de Oliveira, J.R., Aguiar-Oliveira, E., Franco, M., 2017. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. *Bioresour. Technol.* 248, 214-220.

Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., Da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., Dos Reis, P.S., Souza, A.S., Dos Santos, W.N.L., 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Anal. Chim. Acta.* 597, 179-186.

Filipe, D., Fernandes, H., Castro, C., Peres, H., Oliva-Teles, A., Belo, I., Salgado, J. M., 2019. Improved lignocellulolytic enzyme production and antioxidant extraction using solid-state fermentation of olive pomace mixed with winery waste. *Biofuel Bioprod Bior.* 14, 78-91.

Garai, D., Kumar, V.A., 2013. Box–Behnken design approach for the production of xylanase by *Aspergillus candidus* under solid state fermentation and its application in saccharification of agro residues and *Parthenium hysterophorus* L. *Ind. Crops Prod.* 44, 352- 363.

Gawas, S.D., Lokanath, N., Rathod, V.K., 2018. Optimization of enzymatic synthesis of ethyl hexanoate in a solvent free system using response surface methodology (RSM). *Biocatal. Biotransform.* 4, 14-26.

Gupta, V.K., Kubicek, C.P., Berrin, J.-G., Wilson, D.W., Couturier, M., Berlin, A., Filho, E.X.F., Ezeji, T., 2016. Fungal Enzymes for Bio-Products from Sustainable and Waste Biomass. *Trends Biochem. Sci.* 41, 633-645.

Ire, F.S., Okoli, A.O., Ezebuoro, V., 2018. Production and optimization of cellulase from *Penicillium sp.* using corn-cob and pawpaw fibre as substrates. *J. adv. microbiol.* 8, 1-

10.

Irfan, M., Tayyab, A., Hasan, F., Khan, S., Badshah, M., Shah, A.A., 2017. Production and characterization of organic solvent-tolerant cellulase from *Bacillus amyloliquefaciens* AK9 isolated from hot spring. Appl. Biochem. Biotechnol. 182, 1390-1402.

Juturu, V., Wu, J.C., 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. Biotechnol. Adv. 30, 1219-1227.

Khaire, K.C., Moholkar, V.S., Goyal, A., 2021. Alkaline pretreatment and response surface methodology based recombinant enzymatic saccharification and fermentation of sugarcane tops. Bioresour. Technol. 341, 125837.

Klemm, D. et al.. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. Angewandte Chemie - International Edition, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

Kure, C.F., Skaar, I., 2019. The fungal problem in cheese industry. Curr. Opin. Food Sci. 29, 14-19.

Lekakarn, H., Bunternngsook, B., Laothanachareon, T., Champreda, V., 2021. Functional characterization of endoglucanase (CelB) isolated from lignocellulose-degrading microbial consortium for biomass saccharification. Biocatal. Agric. Biotechnol. 31, 101888.

Liu, X., Kokare, C., 2017. Chapter 11 – Microbial Enzymes of Use in Industry. Enzyme Microb. Technol. 267-298.

Lu, S., Wang, Q., Wang, W., Liang, C., Wang, Z., Yuan, Z., Lan, P., Qi, W., 2021. Saccharification of sugarcane bagasse by magnetic carbon-based solid acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. Ind Crops Prod. 160, 113159.

Madhuri, N., Jyoti, D., Disha, S., Velmurugan, B., Bipin, V., Manisha, H., Kumud, M., 2017. Cellulase production, simultaneous saccharification and fermentation in a single vessel: A new approach for production of bio-ethanol from mild alkali pre-treated water hyacinth. J. Environ. Chem. Eng. 5, 2176-2181.

Marraiki, N., Vijayaraghavan, P., Elgorban, A.M., Deppa Dhas, D.S., Al-Rashed, S., Yassin, M.T., 2020. Low cost feedstock for the production of endoglucanase in solid state fermentation by *Trichoderma hamatum* NGL1 using response surface methodology and saccharification efficacy. J King Saud Univ Sci. 32, 1718-1724.

Massarente, V.S., Zanoni, J.A., Gomes, E., Bonilla-Rodriguez, G.O., 2020. Biochemical characterization of endoglucanases produced by *Myceliophthora thermophila* M.7.7 in solid-state culture. Biocatal. Agric. Biotechnol. 27, 101684.

Melanouri, E., Dedousi, M., Diamantopoulou, P., 2022. Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation. Part I: Screening for growth, endoglucanase, laccase and biomass production in the colonization phase. Carbon Resour. Convers. 5, 61-70.

Mérillon J.-M., Ramawat K.G., 2017. Fungal Metabolites. Springer; New York, NY, USA.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31, 426-428.

Mohapatra, S., Padhy, S., Mohapatra, P. K. D., Thatoi, H. N., 2018. Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass, *Pennisetum* species through cellulose from a newly isolated *Aspergillus fumigatus*. Bioresource Technology. 253, 262-272.

Oliveira, P.C., De Brito, A.R., Pimentel, A.B., Soares, G.A., Pacheco, C.S.V., Santana, N.B., Da Silva, E.G.P., Fernandes, A.G.A., Ferreira, M.L.O., Oliveira, J.R., Franco, M., 2019. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. Rev. Mex. Ing. Quim. 18 (3), 777-787.

Patel, A., Shah, A., 2021. Purification and characterization of novel, thermostable and non-processive GH5 family endoglucanase from *Fomitopsis meliae* CFA 2. Int J Biol Macromol. 182, 1161-1169.

Patel, A.K., Singhania, R.R., Sim, S.J., Pandey, A., 2019. Thermostable cellulases: review and perspectives. Bioresour. Technol. 279, 385-392

Pathak, P., Bhardwaj, N.K., Singh, A.K., 2014. Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. Appl. Biochem. Biotechnol. 172 (8), 3776-3797.

Pellis, P., Cantone, S., Ebert, C., Gardossi, L., 2018. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. N. Biotechnol. 40, 154-169.

Pereira, L.M.S., Milan, T.M., Tapia-Blácido, D.R., 2021. Using Response Surface Methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review. Biomass Bioenergy. 151, 106166.

Rajak, R.C., Banerjee, R. 2016. Enzyme mediated biomass pretreatment and hydrolysis: A biotechnological venture towards bioethanol production. RSC Adv. 6. 61301–61311.

Ramos, M.D.N., Milessi, T.S., Candido, R.G., Mendes, A.A., Aguiar, A., 2022. Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: Current status and perspectives. Energy Sustain Dev. 68, 103-119.

Sadh, P.K., Duhan, S., Duhan, J.S., 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review, Bioresour. Bioprocess. 5 (1), 1.

Silva, T.P., Albuquerque, F.S., Santos, C.W.V., Franco, M., Caetano, L.C., Pereira,

H.J.V., 2018. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. *Bioresour. Technol.* 270, 263-269.

Sondhi, S., Saini, K., 2019. Response surface based optimization of laccase production from *Bacillus sp.* MSK-01 using fruit juice waste as an effective substrate. *Heliyon.* 5, 01718.

Squinca, P., Badino, A.C., Farinas, C.S., 2018. A closed-loop strategy for endoglucanase production using sugarcane bagasse liquefied by a home-made enzymatic cocktail. *Bioresour Technol.* 249, 976-982.

Sun, X., Liu, Z., Qu, Y., Li, X., 2008. The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by *Penicillium decumbens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 146, 119-128.

Tan, H.T., Lee, K.T., Mohamed, A.R., 2011. Pretreatment of lignocellulosic palm biomass using a solvent-ionic liquid [BMIM]Cl for glucose recovery: an optimisation study using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* 83 (4), 1862-1868.

Thakur, A., Sharma, K., Khaire, K. C., Moholkar, V. S., Goyal, A., 2020. Enzymes: Key role in the conversion of waste to bioethanol. *Microbial Fermentation and Enzyme Technology*. primeira edição. Boca Raton, Florida.

Valdés, G., Mendonça, R.T., Aggelis, G., 2020. Lignocellulosic biomass as a substrate for oleaginous microorganisms: a review. *Appl. Sci.* 10 (21) 7698.

Toogood, H.S., Scrutton, N.S., 2018. Retooling microorganisms for the fermentative production of alcohols. *Curr. Opin. Biotechnol.* 50, 1-10

Xue, D., Zeng, X., Lin, D., Yao, S., 2018. Ethanol tolerant endoglucanase from *Aspergillus niger* isolated from wine fermentation cellar. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 15, 101684.

Xue, D.S., Liang, L.Y., Lin, D.Q., Yao, S.J., 2017 b. Thermal inactivation kinetics and secondary structure change of a low molecular weight halostable exoglucanase from a marine *Aspergillus niger* at high salinities. *Appl Biochem Biotechnol.* 183, 1111-1125.

Seção 3

Artigo 2

Publicado na revista: Biomass Conversion and Biorefinery - Qualis
A4 na Química.

Doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05748-2>

3 ARTIGO 2: Re-recycling agro-industrial waste: exploiting activated carbon from cocoa shells after solid-state fermentation as a support for endoglucanase immobilization

Resumo

A utilização da enzima endoglucanase em processos industriais tem crescido constantemente, porém o alto custo na produção e dificuldade na recuperação para reutilização tem elevado o custo na sua aplicação. Assim nesse estudo a endoglucanase contida em extrato bruto enzimático foi immobilizada em carvões ativos derivados da casca do cacau e tratados com fermentação estado sólido, utilizando os fungos *Penicillium roqueforti* (CAPr), *Aspergillus Níger* (CAAn) e o controle (CAC). As propriedades da enzima immobilizada foram investigadas e comparadas com as da enzima livre. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmou a adsorção da endoglucanase nos carvões. A caracterização da enzima immobilizada e livre mostraram que a enzima immobilizada obteve melhores valores para temperatura e pH ideal para endoglucanase, sendo favorecido com o processo de immobilização, aumentando a faixa de atividade na temperatura 80°C, e pH 2 ao 13. A conservação da enzima immobilizada em 120 dias manteve a atividade > 80% para todos os carvões. A estabilidade da temperatura e pH foram semelhantes immobilizada e livre. A reutilização da enzima immobilizada após cinco ciclos manteve a atividade relativa para CAPr, CAAn e CAC em 30, 33 e 32% respectivamente. Estes resultados indicam a endoglucanase pode ser immobilizada em carvões obtidos da casca do cacau, substituindo aos suportes sintéticos, aplicando um protocolo simples de immobilização, reduzindo custos e melhorando as possibilidades de aplicações industriais para o biocatalizador.

Palavra – chave: Casca de cacau • Açúcar fermentável • Adsorção física • Reutilização

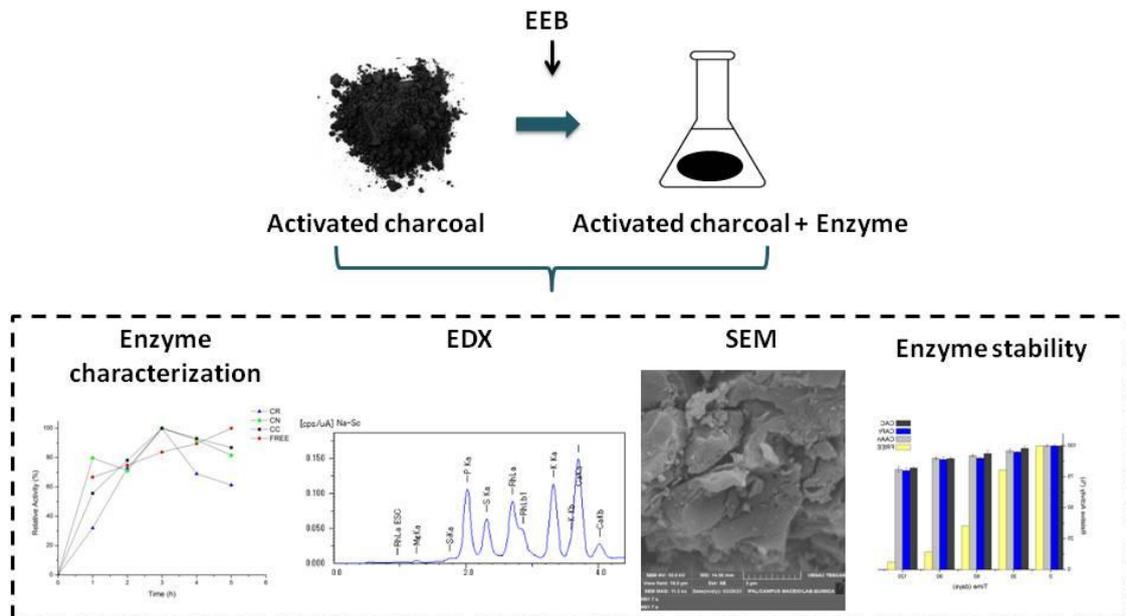
Abstract

Endoglucanases have been increasingly applied in industrial processes but have high production costs and recovery difficulties. Using agro-industrial waste as an alternative growth media and employing immobilization techniques for enzyme reuse and stabilization may greatly reduce production expenses. We examined the potential of reusing cocoa shells, an alternative growth medium and abundant agro-industrial waste in the north and northeast regions of Brazil, as a substrate for enzyme immobilization. Endoglucanase from *Penicillium roqueforti* was immobilized on activated carbon derived from cocoa shells pretreated by solid-state fermentation with *P. roqueforti* (ACPr) or *Aspergillus niger* (ACAn) and without fermentation pretreatment (ACC). At 80 °C and pH 6–13, immobilized endoglucanase showed high catalytic activity, whereas approximately 90% of enzyme activity was lost in solution. The immobilized enzyme maintained its activity for 120 days of storage at 4 °C (> 80% activity on all supports); 10% of the enzymatic activity was maintained in solution. After reusing the immobilized enzyme for three reaction cycles, endoglucanase activity remained above 50% on all immobilization supports; after five cycles, the relative enzyme activities for ACPr, ACAn, and ACC were 30%, 33% and 32%, respectively. Thus, endoglucanase from *P. roqueforti* can be immobilized on activated carbon from cocoa shells to maintain its activity at high temperature and various pH levels and can be reused for up to five cycles with a four-fold longer storage time. This simple adsorption protocol can reduce production costs and increase industrial applications of the biocatalyst, enabling

reuse of agro-industrial waste after solid-state fermentation in fermentable sugar production.

Keywords: Cocoa shell · Fermentable sugar · Physical adsorption · Reuse

Graphic abstract



Keyword: biocatalysis, reuse, physical adsorption.

3.1 Introdução

As atividades agrícolas e florestais geram volumes consideráveis de resíduos da produção obtida (TRIPATHI et al., 2019). Anualmente, são gerados milhões de toneladas de resíduos agrícolas (JI et al., 2018) totalizando 5.280 megatoneladas em todo o mundo durante o período de 2020-2021 (SHINDE et al., 2022). A maioria desses resíduos são queimados ou descartados incorretamente no meio ambiente (DEY et al., 2020; HOUFANI et al., 2020) contribuindo com uma parcela da poluição e degradação ambiental. Atualmente biomassas são consideradas como as matérias-primas mais previsíveis para a transição da matriz global de processos fósseis para processos sustentáveis (Ramos et al., 2023).

A produção de carvão ativado (CA) utilizando resíduos lignocelulósicos, compostos com alto teor de lignina, é uma alternativa sustentável e econômica para a utilização desses materiais, produzindo um produto de alto valor agregado e contribuindo para redução dos impactos ambientais (Gonçalves et al., 2023).

A valorização de resíduos agrícolas como matéria-prima para a produção de

produtos comerciais com alto valor agregado tem recebido atenção crescente nos últimos anos (SANTOS, et al., 2023). A produção de carvão ativado utilizando resíduos lignocelulósicos, compostos com alto teor de lignina, é uma alternativa sustentável e econômica para a utilização desses materiais, produzindo um produto de alto valor agregado e contribuindo para redução dos impactos ambientais (Gonçalves et al., 2023). A fermentação em estado sólido (FES) também tem se destacado como um bioprocessamento notável, pois trata-se de uma fermentação realizada na ausência ou quase ausência de água livre, simulando o habitat natural de muitos fungos, bactérias e leveduras (RAINHA et al., 2022). Essa técnica utiliza subprodutos da agroindústria como meio de baixo custo ou de nenhum valor econômico, sendo uma técnica prática, apropriada para produção de enzimas, compostos bioativos, bioplásticos e biocombustíveis a partir dos resíduos agroindustriais (CHILAKAMARRY et al., 2022; POSTIGO et al., 2021).

As enzimas são catalisadores biológicos com uma ampla gama de aplicações industriais, podendo ser empregados de forma mais eficiente e sustentável do que os processos químicos tradicionais (CUNHA, et al., 2023). As celulases são um complexo enzimático de três enzimas diferentes (endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases) capazes de clivar a ligação β -1,4-glicosídica da molécula de celulose (LIMA, et al., 2021). As exoglucanases agem clivando ligações glicosídicas nas extremidades da cadeia dos polissacarídeos, as endoglucanases clivam as ligações nas regiões mais internas e as β -glicosidases atuam clivando os dissacarídeos e liberando glicose (WANG et al., 2014). A celulase tem um grande apelo econômico por ser amplamente utilizadas na indústria de papel, detergentes, indústria têxtil e alimentícias. Além disso, elas desempenham um papel importante na produção de biocombustíveis (SRIVASTARA et al., 2018; DADWAL et al., 2021; RAJNISH et al., 2021; ROTH et al., 2020; Lv et al., 2021).

Mesmo com uma variedade de aplicações industriais, o uso de enzimas livres em operações industriais é comumente restrito por questões relacionadas à sua instabilidade em ambientes industriais extremos, à capacidade de recuperação em meios aquosos e aos custos elevados (GIRELLI et al., 2020; RIBEIRO et al., 2021; XIE et al., 2022). Uma das abordagens desenvolvidas para contornar as limitações associadas ao uso de enzimas livres é o processo de imobilização (LIU et al., 2021). A imobilização envolve fixar as enzimas em um suporte sólido, facilitando sua separação do meio reacional, possibilitando seu reuso subsequente, preservando a sua atividade catalítica e diminuindo custo (RAJNISH et al., 2021; RESHMY et al., 2023).

Os métodos comumente adotados relacionados à imobilização de enzimas são: aprisionamento, ligação covalente, adsorção física e reticulação (QAMAR *et al.*, 2021; RAJNISH *et al.*, 2021). A adsorção física é um método simples, fácil e econômico para imobilização enzimática, na qual a enzima adere ao suporte sólido por meio de interações fracas, como ligações de hidrogênio, interação eletrostática ou força de van der Waals (HUANG *et al.*, 2020). Entre os suportes utilizados na adsorção física, o carvão ativado ganha destaque, pois apresenta elevada área superficial, estrutura porosa interna desenvolvida, bem como grande número de grupos funcionais oxigenados, estabilidade química e alta resistência mecânica (QUESADA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2022). Suas propriedades físico-químicas o torna um suporte catalítico eficiente para ser utilizado processos de imobilização enzimática (KAUR *et al.*, 2021; LEWOYEHU, 2021).

Nesse contexto, em busca de novas tecnologias para redução de custos e maior rentabilidade, o objetivo desse trabalho foi imobilizar a enzima endoglucanase (EEB) produzido a partir da fermentação em estado sólidos (FES) utilizando o fungo filamentosso *Penicilium roqueforti* ATCC 10110, através do método de adsorção física utilizando os carvões ativos (CA) que foram tratados FES com os fungos *Penicilium roqueforti* (CAPr), *Aspergillus niger* (CAAn) e o controle (CAC) como suporte sólido. O biocatalizador foi caracterizado em relação à atividade retida após imobilização, pH e temperatura ótima, estabilidade térmica comparados a enzima livre. Até onde sabemos não há estudos que comparem a imobilização via adsorção física da endoglucanase por EEB em CA obtidos da casca do cacau.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Material

O resíduo agroindustrial farelo de trigo (FT) foi doado pelos produtores agrícolas (obtidos em Maceió, AL, Brasil). O fungo filamentosso *P. roqueforti* (lote 079840075) foi fornecido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro, RJ, Brasil sob o número de registro 40075 e número de lote 079840075. Os carvões ativos (Carvão ativo oriundo da fermentação do fungo *Penicilium Roqueforti* – CAPr, carvão ativo oriundo da fermentação do fungo *Aspergillus Níger* – CAAn e o carvão ativo controle – CAC), ambos obtidos da casca de cacau foram doados pelo Grupo de Pesquisa em Biotransformação e Biocatálise Orgânica da Universidade Estadual de Santa Cruz

(Ilhéus, BA, Brazil). Albumina bovina (BSA) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os demais reagentes químicos e solventes orgânicos eram de qualidade analítica fornecidos pela Synth (São Paulo, SP, Brasil).

3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Preparação de inóculo e FES

No cultivo do microrganismo foi utilizado meio ágar batata dextrose em frasco Erlenmeyer de 250 mL em estufa bacteriológica (SL 222, Solab, Piracicaba, Brasil) com temperatura de 27 °C por 7 dias. Em seguida a cultura foi armazenada em ambiente refrigerado a 4 °C. A FES foi conduzida em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g do resíduo seco FT como substratos e água estéril para atingir um nível de umidade de 65%. Os frascos foram esterilizados em autoclave vertical a 121 °C e 1 atm por 20 min em seguida resfriados até a temperatura ambiente (25 °C). Os meios foram inoculados com quatro discos de micélio (5 mm) da cepa fúngica (Patel e Shah 2021). O conteúdo dos frascos foi misturado e incubado em câmara de germinação (SX 1.0 DTMC, Sterilifer, Diadema, SP, Brasil) com temperatura controlada de 27 °C por 96 h, conforme Gomes e colaboradores (2023).

3.2.2.2 Obtenção do extrato enzimático

Após a FES foi adicionado a cada frasco de Erlenmeyer 5 mL de água estéril para cada 1 g de resíduo, levados a agitação em incubadora (TECNAL) por 20 minutos a 170 rpm e 25°C. O extrato bruto enzimático obtido foi submetido à filtração seguida de uma centrifugação de 5 minutos (15.000 g), assim o sobrenadante chamaremos de extrato enzimático bruto (EEB) foi separado e utilizado para determinação das atividades enzimática.

3.2.2.3 Atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada usando o método de Miller (1959). Assim para determinar a atividade da endoglucanase (CMCase, endo-1.4-β-D-glucanase; EC 3.2.1.4) em um meio de reação de total 1 mL conduzidos pela adição de 10 μL de extrato multienzimático, 100 μL de solução de carboximetilcelulose 2% (CMC) (p/v) e 190 μL de tampão acetato de sódio (0.1 M, pH 5). As amostras foram incubadas a 50 °C por 60 min que foi interrompida pela adição de 200 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS (Sigma-Aldrich). Em seguida os tubos foram aquecidos em água

fervente por 5 min e adicionando 500 μL de água destilada, posteriormente realizados a medição de absorvância em 540 nm usando espectrofotômetro Fex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

3.2.2.4 Concentração proteica das preparações extrato multienzimático

A concentração proteica do extrato multienzimático foi determinado pelo método de Bradford (1976), e a BSA foi usada como padrão proteico.

3.2.2.5 Imobilização da endoglucanase

O processo de imobilização foi realizado de acordo com o método descrito por Mendes et al, 2012. Um grama de carvão ativado (suporte) foi imerso em 25 mL de etanol (95%) sob condições estáticas à temperatura ambiente durante 24 h. O suporte foi posteriormente lavado com água destilada e filtrada sob pressão reduzida. Em seguida 19 mL de solução enzimática (em tampão acetato de sódio 100 mM em pH 5.0) foi preparado contendo uma concentração inicial de proteína de 0,757 mg/mL. O suporte úmido foi então incubados em solução proteica e inseridos em agitador orbital Quimis (Diadema, SP, Brasil) a 150 rpm e 25 °C, por 24 horas. Os biocatalisadores foram filtrados sob pressão reduzida lavado com água destilada (1:5) e armazenado a 4 °C por 24 h para futuras aplicações. Todos os experimentos foram realizados em triplicado. A eficiência do processo de imobilização para atividade enzimática da endoglucanase (Y) (Eq. 1) foi definida como sendo a proporção percentual da atividade da endoglucanase imobilizada (AE_R) à atividade da endoglucanase antes do processo de imobilização (AE_0):

(1)

$$Y = \frac{AE_0 - AE_R}{AE_0} \times 100$$

Já a determinação da eficiência da imobilização pelo teor de proteína (X) (Eq. 2), foi determinada pela quantificação de proteínas presentes no sobrenadante após a imobilização (C_f) e pela concentração de proteínas fornecidas antes da imobilização (C_0).

(2)

$$X = \frac{C_0 - C_f}{C_0} \times 100$$

3.2.2.6 Caracterização dos carvões Ativados (MEV e EDX)

Para a análise SEM, as amostras dos carvões ativados (CAPr, CAAn e CAC) inatura e pós imobilização foram fixados em um stub SEM e então revestido com uma camada de ouro de 20-30 nm de espessura em um sistema de pulverização catódica JEOL JSM-6610LV (Peabody, MA, EUA), de acordo com o método padrão. O detector EDX (Horiba Silicon Drift X-ray Detector) também foi usado para conduzir a análise elementar dos carvões.

3.2.2.7 Caracterização da endoglucanase livre e imobilizada

A temperatura ótima de reação para a atividade enzimática da endoglucanase tanto livre quanto imobilizada foi realizada em meio padrão (item 2.2.3) pH fixo de 5,0 a uma temperatura variando de 40 a 80 °C. Já a estabilidade térmica foi avaliada pela incubação do extrato multienzimático conforme item 2.2.3 para a melhor temperatura resultante como ótima nos intervalos de 60 a 300 min. O perfil do pH foi determinado por ensaios de atividade a uma temperatura definida de 50 °C e pH variando de 2 à 13 conforme item 2.2.3. A estabilidade do pH foi realizada de acordo com item 2.2.3 para a melhor atividade resultante como ótima nos intervalos de 60 a 300 min. A estabilidade de armazenamento a 4 °C foi monitorado por medição de atividade enzimática por 120 dias, alíquotas foram avaliadas no intervalo de 30 dias. Todas as respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática de maior valor obtido.

3.2.2.8 Reutilização da endoglucanase imobilizada

Os testes de reutilização foram realizados após 5 ciclos sucessivos de 150 min para ensaios de atividade enzimática no pH e temperatura ideais. Após cada ciclo, a enzima imobilizada foi recuperada por centrifugação, lavado com tampão 3x iniciado um novo ciclo (item 2.2.3). A atividade enzimática no primeiro ciclo foi definido como 100%, e a atividade relativa foi calculado para os ciclos seguintes (LIMA et al, 2021).

3.2.2.9 Estatísticas

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como valor médio \pm desvio padrão. Microsoft Excel 2010 (Redmond, WA, EUA) e Origin Pro 8.0 (Northampton, MA, EUA) foram utilizados para análise estatística.

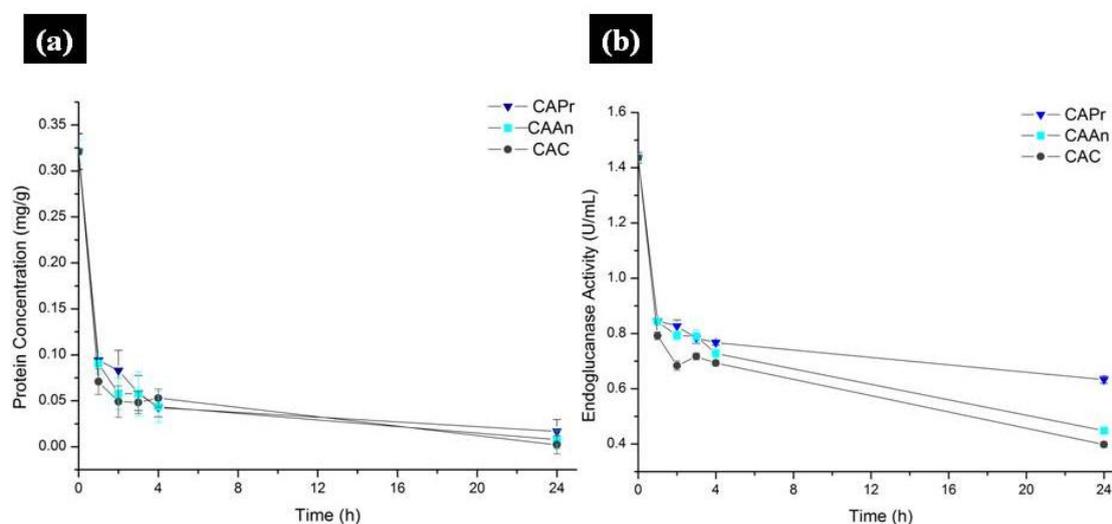
3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Imobilização enzimática

A imobilização da enzima endoglucanase através do EEB foi realizada via adsorção física, onde em contato com os suportes (CAPr, CAAn e CAC) obtidos a partir da biomassa casca do cacau gerou as figuras 1, sob condições experimentais fixas (tampão acetato de sódio (0.1 M, pH 5, a 25 °C e 24 h de tempo de contato, usando uma carga de proteína fixa de 0,757 mg mL).

Na figura 1a pode ser observado que o sobrenadante após o processo de imobilização a concentração de proteína diminuiu logo no tempo inicial, assim confirmando a efetivação da imobilização de enzimas presentes no EEB para todos os suportes utilizados, no termino de 24 horas 90% das proteínas disponíveis no extrato bruto já estavam imobilizadas nos suportes. Já na figura 1b, ao observar a atividade da endoglucanase no sobrenadante confirma o que foi observado na figura 1a, determinando que nas horas iniciais obteve-se uma imobilização chegando a mais de 57% no termino de 24h.

Figura 1: Imobilização: (a) concentração proteica; (b) atividade da endoglucanase.



O sucesso da imobilização depende fortemente da seleção apropriada do suporte,

assim o resultado da imobilização em CA obtidos de biomassa lignocelulósicos foi promissor por possuir vantagens em suas propriedades como alta porosidade, baixo custo, grande área de superfície interna, tornando uma matriz adequada para imobilização enzimática com uma abordagem sustentável (QUESADA et al., 2020; WANG et al., 2022, BIJOY, et al., 2022). Devido a essas características os CAs estudados é interessante para aplicações biotecnológicas, pois o crescimento do mercado tem sido impulsionado pela crescente demanda por este material em uma série de setores industriais como farmacêutico, alimentos, bebidas e cosméticos (KAUR et al., 2021).

Tabela 1: Parâmetros de imobilização da endoglucanase em partículas de carvões ativos obtidos da casca do cacau.

Suportes	Teor de Proteína Total			Atividade Total da Endoglucanase		
	Carga Inicial (mg/mL)	Carga Final (mg/mL)	Eficiência de Imobilização (%)	Carga Inicial (U/mL)	Carga Final (U/mL)	Eficiência de Imobilização (%)
CAC	0.321	0.002	99.34 ± 2.4	1.436	0.398	72.26 ± 1.5
CAPr	0.321	0.016	94.83 ± 2.0	1.436	0.610	57.52 ± 1.8
CAAn	0.321	0.007	97.6 ± 1.5	1.436	0.448	68.78 ± 2.8

A eficiência de imobilização determina quão efetivo é o processo de imobilização (Tabela 1), os valores de teor de proteína demonstraram que os carvões ativos são aptos e eficientes para imobilizar todas as proteínas presente no EEB, sendo superior a 94.83 ± 2.0%. A eficiência de imobilização da atividade da endoglucanase obteve resultados para CAPr, CAAn e CAC os respectivos 57.52 ± 1.8, 68.78 ± 2.8, 72.26 ± 1.5%, a partir desses resultados podemos afirmar que tanto os carvões ativos tratados (CAPr e CAAn) com fermentação comparado ao carvão ativo sem o tratamento (CAC) possuem porosidade e superfície adequadas para a imobilização de celulasas. Os resultados da eficiência de imobilização foi superior a 57% semelhante ao encontrado por Lima et al (2021) que obteve 60% imobilizando endoglucanase em caulim via adsorção. Os resultados encontrados nesse estudo são superiores em comparação com 48% relatados para Lima et al. (2017) quando a endoglucanase foi imobilizada em nanopartículas magnéticas encapsuladas em poli(metacrilato de metila) nanoesferas. Sendo assim os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com os encontrados na literatura. Porém comparado aos suportes utilizados em diversas obras

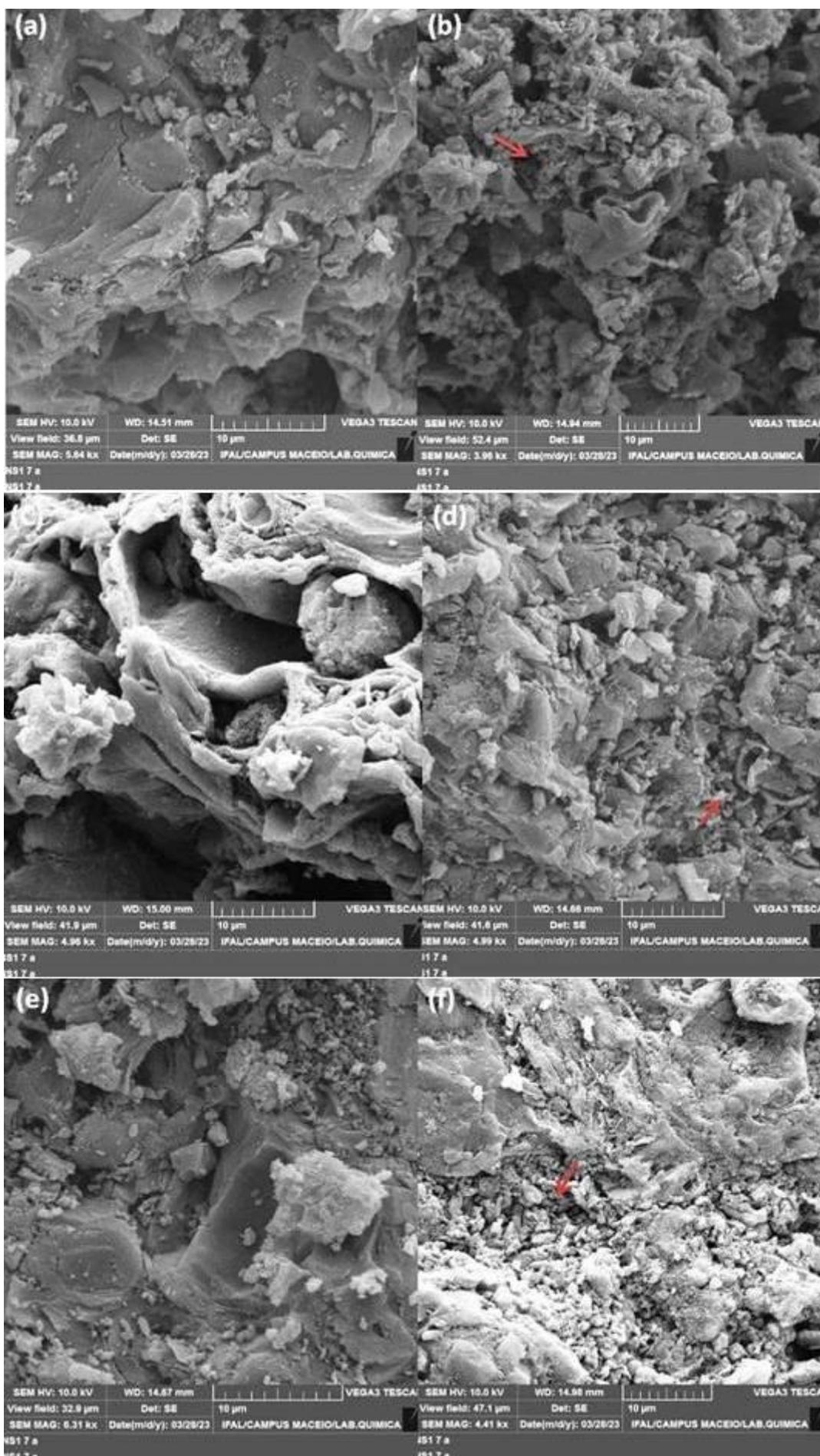
(sintéticos e caros) os carvões ativos CAPr, CAAn e CAC é mais atrativo e tem maior potencial para ser utilizado em escala industrial, pois são obtidos de biomassas presentes na natureza, facilmente disponíveis, baixo custo e não tóxico.

3.3.2 Caracterização dos carvões ativos (CAPr, CAAn e CAC)

A análise MEV é uma técnica muito útil, pois através de suas imagens é possível não só observar a eficácia de um determinado processo de imobilização enzimática, mas também delinear estratégias futuras (MOHAMAD et al., 2015; BILAL et al., 2016; DOS SANTOS et al 2021).

A técnica MEV foi realizada para comparar a morfologia da superfície de CAPr, CAAn e CAC mostradas na figura 2. Observando a figura 2 (a),(c) e (e) os CA sem imobilização (CAPr, CAAn e CAC) apresentam em sua estrutura túneis que podem aumentar a difusão e adsorção de enzimas, confirmando que estrutura porosa que é um requisito importante para biocatalisadores ativos e estáveis (DOS SANTOS et al 2021). Já os CA imobilizados (figuras 2 (b), (d) e (f),) revelaram uma estrutura microporosa e uniformidade na estrutura imobilizada, caracterizando a presença de enzimas em sua estrutura. MEV também foi usado por Santos e colaboradores (2020) para visualizar a lipase *Candida rugosa* em partículas de Diaion HP 20, confirmando que seu biocatalisador teve a imobilização efetiva.

Figura 2: Imagens MEV dos poros dos carvões ativos: CAC; (a) sem enzima imobilizada; (b) com endoglucanase imobilizada. CAAn; (c) sem enzima imobilizada; (d) com endoglucanase imobilizada. CAPr; (e) sem enzima imobilizada; (f) com endoglucanase imobilizada.

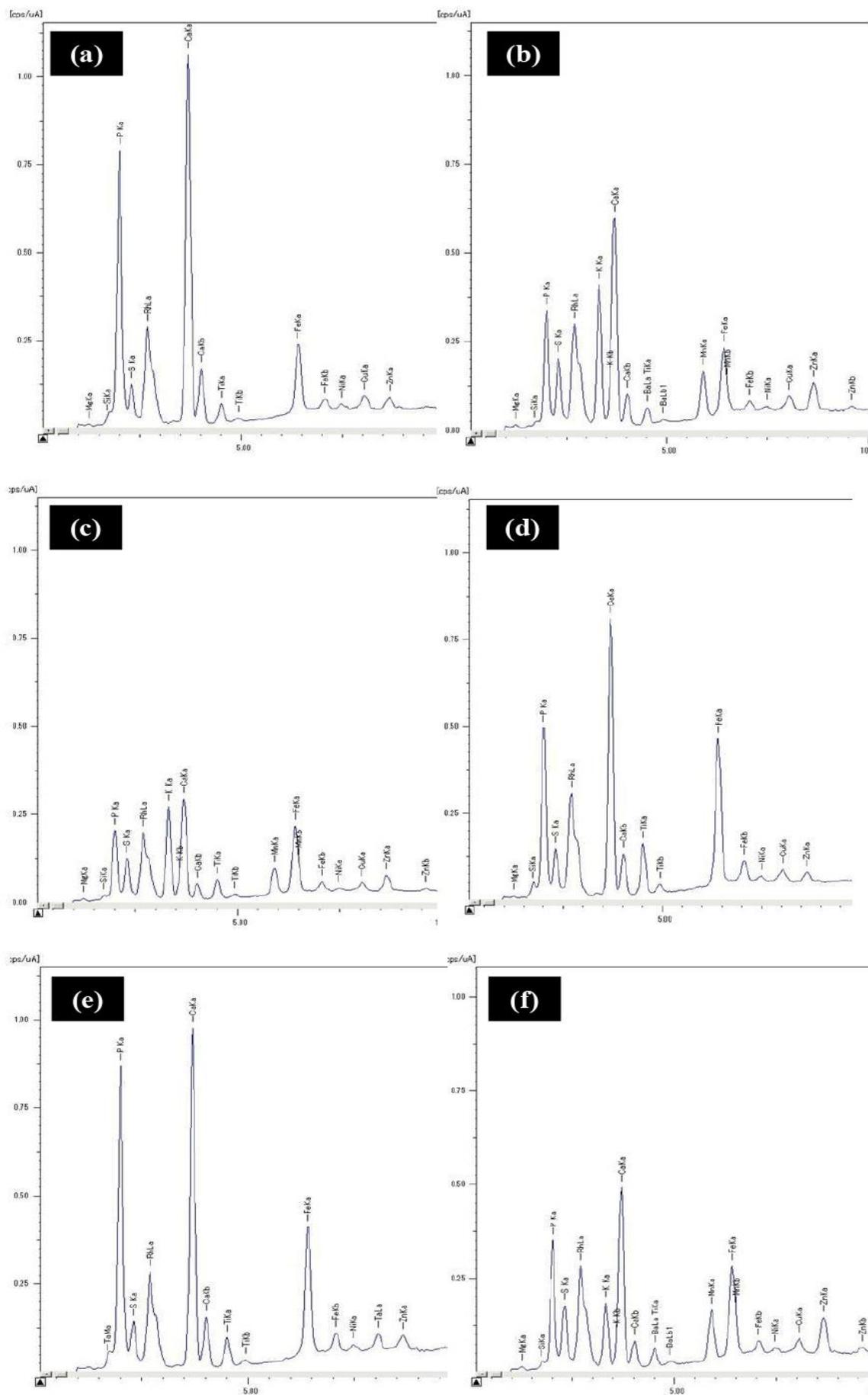


Através das análises qualitativas de EDX (figura 3) foi possível observar o sucesso da imobilização em ambos CA, devido a comparação das figuras 3 (a), (c) e (d) antes de imobilizar e após imobilização (figura 3. (b), (d) e (f)), o aumento nas proporções da composição presente nos carvões.

De acordo com as análises de EDX, essa amostra apresentou os elementos que compõem o carvões, sendo comum na composição química elementar dos carvões vegetais a presença de enxofre (NEVES et al., 2011), esse aumento caracteriza a eficácia da imobilização.

Esses resultados são coerentes, assim, os resultados de SEM e EDX sugerem que a endoglucanase foi imobilizada com sucesso na superfície dos CA.

Figura 3: Espectroscopia de raio X por dispersão em energia (EDX) dos carvões ativos: Sem imobilização (a) CAC, (c) CAAn e (e) CAPr. Após imobilização (b) CAC, (d) CAAn e (f) CAPr.



3.3.3 Caracterização da enzima endoglucanase livre e imobilizado

O processo de imobilização pode causar algumas alterações na estrutura da enzima, podendo alterar a atividade catalítica e a estabilidade diferente da livre (LIMA 2019). Essas alterações podem ocorrer devido à modificação na estrutura terciária da enzima ou pelo fato da interação entre a enzima e suporte (BRENA et al., 2013). Atualmente o método de adsorção física é um dos mais empregados para imobilização, devido a gerar poucos efeitos na estrutura conformacional da enzima, sendo a enzima espontaneamente imobilizada pela orientação que lhe é preferível e energeticamente favorável (CUI et al., 2018; BORGES et al 2023). Diversas enzimas já foram imobilizadas via adsorção física com êxito (BRITO et al., 2017; SANTOS et al., 2019; GONÇALVES et al., 2021; BORGES et al 2023) assim apresentando alto rendimento de imobilização, aumento de estabilidade frente ao tempo de armazenamento, pH e temperatura.

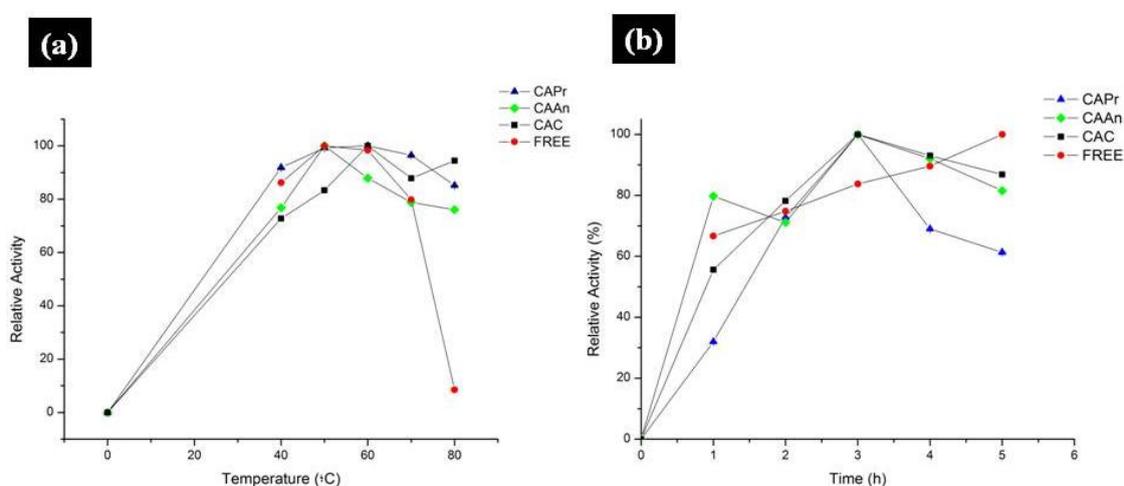
Como resultado, a enzima imobilizada deve ser avaliada porque essa pode adquirir novas propriedades cinéticas e apresentar comportamento diferente de acordo com determinadas condições de pH e temperatura, devido a sua conformação tridimensional. Dessa forma a cada protocolo de imobilização, a enzima imobilizada deve ser caracterizada e testada.

3.3.4 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

O efeito da temperatura na atividade das endoglucanase livre e imobilizadas por adsorção nas temperaturas de 40 a 80°C é mostrado na figura 4. A figura 4a representa o comportamento dos carvões imobilizados e a enzima livre em decorrência da temperatura, podendo ser observado que enzima livre mantém uma atividade constante até 60 °C, perdendo atividade bruscamente de 90% em 80 °C. A atividade ótima para todas as formas da enzima (livre ou imobilizado) foram de 50°C, de forma geral a endoglucanase costumam ter como temperatura ideal 50 °C (GOMES et al., 2023), sendo assim mesmo a enzima livre essa apresenta um bom comportamento. Já as enzimas imobilizadas em CA apresentaram um bom comportamento na temperatura de 80 °C a máxima estudada, assim configurando a estabilidade que a imobilização acrescenta a enzima. A partir desse resultado podemos sugerir que a endoglucanase imobilizada nos CA tem uma gama mais ampla de temperatura ideal do que a forma livre. Na literatura Lima e colaboradores (2019) encontraram resultados semelhantes entre outros (QI et al., 2015; LIMA et al 2017). A resistência da enzima em

temperaturas pode ocorrer devido a ligação estabelecida entre enzima-suporte estabilizando a mesma, com essa característica amplia as possíveis aplicações industriais para essa endoglucanase .

Figura 4: Atividade relativa dos carvões ativos com a enzima endoglucanase imobilizada (CAC, CAAn e CAPr) e livre. (a) em diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70 e 80 °C) 60 min; (b) perfil de termoestabilidade da endoglucanase endoglucanase imobilizada (CAC, CAAn e CAPr) e livre, na temperatura de 50 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.



A estabilidade térmica está relacionada com a capacidade da enzima manter sua conformação nativa em temperaturas relativamente altas. A estabilidade da enzima (livre e imobilizada) na figura 4b foi realizada na temperatura 50°C tida como ótima e apresentaram boa estabilidade térmica, mantendo a atividade por 5 horas. A característica de manter uma elevada estabilidade térmica é importante para que não ocorra redução de atividade catalítica devido à desnaturação. É possível observar que todas as formas que a enzima é representada ocorreu a estabilidade após as 5 h, demonstrando característica termoestável (GOMES et al, 2023). A enzima livre apresentou melhor resultado no tempo de 5 horas, o que pode ser atribuído ao aumento da mobilidade da enzima em solução, levando a um melhor desempenho da atividade (BORGES et al., 2023), essa característica pode ocorrer devido a se tratar de um extrato bruto de enzimas, em que as outras enzimas presentes no extrato são susceptíveis de exercer um comportamento protetor sobre a endoglucanase, assim protegendo contra o

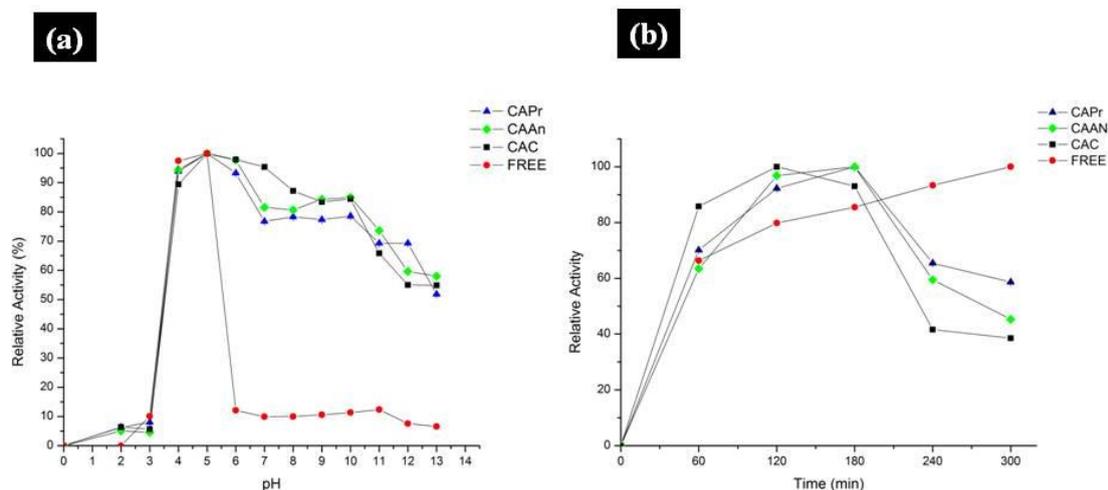
efeito do aumento da temperatura e do tempo (OLIVEIRA et al., 2019, GOMES et al., 2023).

3.3.5 Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

O efeito do pH na atividade da endoglucanase obtido de *P. roqueforti* ATCC 10110 foi verificado na faixa de 2.0 a 13.0 (figura 5). Na figura 4a podemos observar que a enzima livre demonstrou ter atividade apenas nos pH 4 e 5, no pH 2 não foi registrada nenhuma atividade e pH 8 atividade < 12%. Esse resultado demonstram características de uma endoglucanase acidófila, resultados semelhantes também foram encontrados por Oliveira et al., 2019 e Gomes et al 2023. Mohapatra (2018) e colaboradores, afirmaram que celulasas fúngicas são principalmente ativo em pH 3.7 a 7.0. Já a endoglucanase imobilizada manteve atividade em todos os pHs, tendo como pH ótimo do 4 ao 5 conforme dados também da enzima em sua forma livre, assim, pode-se concluir que o pH ideal da celulase livre e imobilizada foi entre pH 4 e 5. No pH 13 ainda foi registrado uma atividade < 50%, resultados semelhantes também foram encontrados por Lima e colaboradores (2019), que a endoglucanase imobilizada demonstrou manter atividade em pH 7 de 80%. Este resultado pode ser atribuído à rigidez estável e a confirmação da enzima devido à interação entre os grupos carregados da enzima e do transportador (RAHIMIZADEH et al., 2015). Dessa forma a estabilidade de enzimas imobilizadas em uma ampla faixa de pH aumenta seu potencial para aplicações industriais.

A estabilidade (figura 5b) foi realizada utilizando o pH que obteve melhor atividade (pH 5), assim observamos que a endoglucanase tanto em sua forma livre ou imobilizada foram estáveis em todos os tempos, com crescimento constate para enzima em sua forma livre no tempo de 300 min, este resultado também é comum devido a se tratar de um extrato bruto de enzimas, com demais enzimas que são susceptíveis de exercer um comportamento protetor sobre a endoglucanase (OLIVEIRA et al., 2019, GOMES et al., 2023). Dessa forma a estabilidade de enzimas livres ou imobilizadas em uma ampla faixa de pH também exibiu seu potencial para aplicações industriais.

Figura 5. Atividade relativa dos carvões ativos com a enzima endoglucanase imobilizada (CAC, CAAn e CAPr) e livre. (a) em diferentes pH (2 à 13) 60 min; (b) perfil de estabilidade ao pH de endoglucanase imobilizada (CAC, CAAn e CAPr) e livre, no pH 5. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras de erro indicam o desvio padrão de cada grupo de dados.



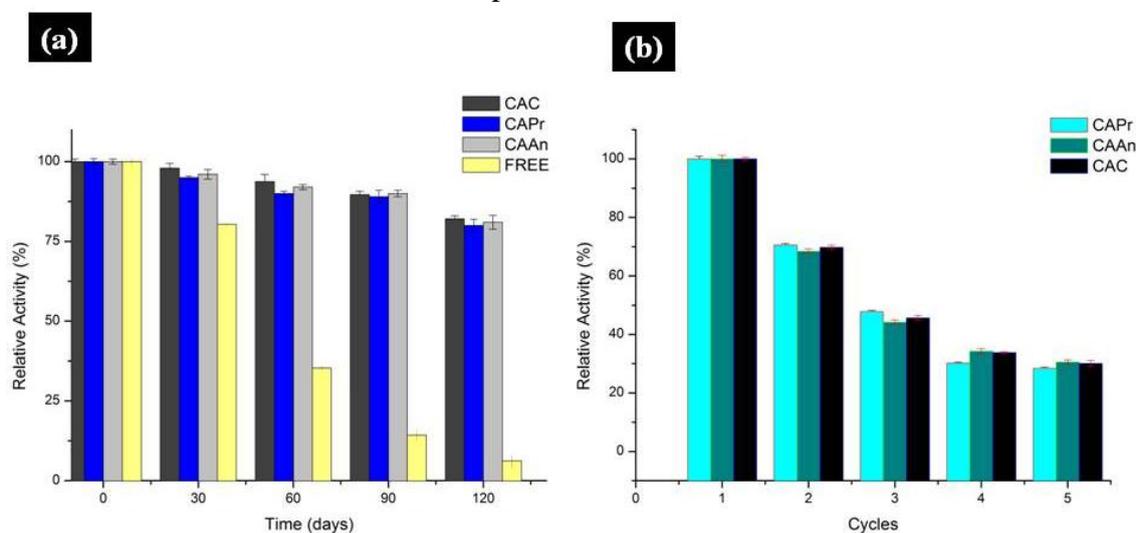
3.3.6 Estabilidade tempo armazenamento

O armazenamento de uma enzima é um fator importante que pode limitar sua aplicação, assim a preservação de sua estabilidade estrutural é uma grande preocupação. Refere-se à capacidade de uma enzima manter sua atividade no período entre a produção e reutilizar (LIMA 2019).

As enzimas livres e imobilizadas foram analisadas quanto à sua estabilidade de armazenamento a 4 °C por 30, 60, 90 e 120 dias (figura 6a), a atividade do dia 0 foi considerada como atividade inicial. No término dos 120 dias a atividade da enzima livre foi de 9%, já nos carvões CAC, CAPr e CAAn imobilizados foram de 82.1, 80.3, 81.4% respectivamente, os resultados indicaram que a imobilização aumentou a vida útil da enzima (ABBASZADEH et al., 2019; WENG et al., 2022). A desativação lenta da enzima durante esse período pode afetar a reprodutibilidade dos processos. Esses resultados evidenciam que a imobilização possibilitou um ambiente favorável para que a enzima para que não sofresse danos ocasionados pelo microambiente, dessa forma preservando sua atividade e possibilitando sua utilização após o armazenamento. A estabilidade de armazenamento é uma vantagem importante para a enzima imobilizada comparada a enzima livre, pois a enzima nativa pode perder sua atividade em um curto período de tempo. Portanto, este parâmetro é um indicativo de custo-benefício para o

uso da enzima para muitas aplicações biotecnológicas (ZHANG et al., 2021; BORGES et al 2023)

Figura 6: Perfil da caracterização da endoglucanase imobilizada (a); Efeito da refrigeração 4 dos carvões imobilizados e livre; (b) Estudo do reaproveitamento dos carvões ativos CAC, CAAn e CAPr após ciclos sucessivos.



3.3.7 Reutilização da endoglucanase imobilizada

A reutilização é a vantagem mais importante da imobilização enzimática, sendo um fator decisivo que rege significativamente a viabilidade técnico-econômica de qualquer processo baseado em enzimas (WENG et al., 2022) e sua aplicação em escala industrial (MACHADO et al., 2023). Dentro das ótimas condições aplicadas na enzima imobilizada, essas foram repetidas (cinco vezes) para determinar a mudança na atividade relativa após múltiplos usos. Os resultados (figura 6b) demonstram a diminuição gradativa da atividade relativa do imobilizado com o tempo de reutilização. Os carvões CAPr, CAAn e CAC a atividade foi retida respectivamente 30, 33 e 32% da atividade relativa após 5 ciclos. A perda de atividade relativa pode ser atribuída à ligação inadequada entre a enzima e o suporte (SAHA et al., 2019; WENG et al., 2022), como também a alterações conformacionais e a obstrução dos poros do suporte, seja pelo acúmulo de substrato ou produtos, são apontadas como as causas da redução da atividade enzimática nos ciclos subsequentes (KUMAR et al., 2014; BORGES et al 2023). Em estudos anteriores de imobilização em esferas de alginato retiveram apenas 18% de atividade após cinco ciclos de reutilização (SAHA et al., 2019; WENG et al., 2022). YU et al. (2013) imobilizaram a celulase em Eudragit S-100 e Eudragit L-100 e obteve retenção de atividade após a imobilização, menor que 40% da atividade inicial

após cinco ciclos de uso. Portanto, pode-se afirmar que a imobilização de enzimas em CAPr, CAAn e CAC é economicamente benéfico para o processo, pois o biocatalisador podem ser reutilizadas múltiplas vezes e reter atividade enzimática suficiente.

3.4 Conclusão

O presente estudo é o primeiro a relatar a imobilização da endoglucanase contido em EBB em CAs obtidos a partir da biomassa da casca do cacau. Este estudo demonstrou que a adsorção da endoglucanase em CAs levou a imobilização efetiva para todos os carvões estudados. A alta afinidade da endoglucanase pelo superfície de suporte também foi confirmada por análises de MEV. A imobilização melhorou a atividade em determinadas temperatura (40 à 80 C) o que favorece e possibilita maiores aplicações industriais. Já a atividade nos pH de 2 à 13 da enzima imobilizadas foi superior a enzima livre. A estabilidade de ambos foram semelhantes a enzima livre e imobilizada. Através da imobilização foi possível observar a reutilização enzimática, fator que determina a sustentabilidade econômica do processo, no termino do quinto ciclo foi observado que para CAPr, CAAn e CAC reteve respectivamente 30, 33 e 32% da atividade relativa. A imobilização da endoglucanase em CAs pode ser considerado uma alternativa promissora de imobilização de enzimas, sendo o ciclo desde a produção dos carvões até a imobilização totalmente natural.

3.5 Referências

- Bijoy, G.; Rajeev, R.; Benny, L.; Jose, S.; Varghese, A. Enzyme immobilization on biomass-derived carbon materials as a sustainable approach towards environmental applications. *Chemosphere*. 2022, 307, 135759. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.135759.
- Bilal, M.; Asgher, M.; Shahid, M.; Bhatti, H.N. Characteristic features and dye degrading capability of agar-agar gel immobilized manganese peroxidase. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, 86, 728-740. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.014.
- Borges, J.F.; Nascimento, P.A.; Alves, A.N.; Santos, M.P.F.; Brito, M.J.P.; Bonomo, R.C.F.; Santos, L.S.; Veloso, C.M. Laccase Immobilization on Activated Carbon from Hydrothermal Carbonization of Corn Cob. *Waste and Biomass Valorization*. 2023, 15, 501-520. Doi: 10.1007/s12649-023-02160-1.
- Brena, B.; González-Pombo, P.; Batista-Viera, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. In: *Immobilization of enzymes and cells*. Springer. 2013, 15-31. Doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_2.
- Brito, M.J.P.; Veloso, C.M.; Bonomo, R.C.F.; Fontan, R.C.I.; Santos, L.S.; Monteiro, K.A. Activated carbons preparation from yellow mombin fruit stones for lipase immobilization. *Fuel. Processing. Technology*. 2017. 156, 421–428. Doi: 10.1016/j.fuproc.2016.10.003.
- Chilakamarry, C.R.; 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. *Bioresour. Technol.* 2022, 343, 126065. Doi: 10.1016/j.biortech.2021.126065.
- Cui, J.; Ren, S.; Sun, B.; Jia, S. Optimization protocols and improved strategies for metal-organic frameworks for immobilizing enzymes: Current development and future challenges. *Coord. Chem. Rev.* 2018. 370, 22-41. Doi: 10.1016/j.ccr.2018.05.004.
- Cunha, T.M.; Mendes, A.A.; Hirata, D.B.; Angelotti, J.A.F. Optimized Conditions for Preparing a Heterogeneous Biocatalyst via Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs) of β -Glucosidase from *Aspergillus niger*. *Catalysts*. 2023, 13, 62. Doi: 10.3390/catal13010062.
- Dadwal, A.; Sharma, S.; Satyanarayana, T. Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: characteristics, recent advances and biotechnological applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 188, 226-244. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.08.024.
- Dey, T.; Bhattacharjee, T.; Nag, P.; Ghati, A.; Kuila, A. Valorization of agrowaste into value added products for sustainable development. *Bioresour. Technol. Rep.* 2021, 16, 100834. Doi: 10.1016/j.biteb.2021.100834.
- Dos Santos, M.M.O.; Gama, R.S.; Carvalho, I. M.T.; Santos, P.H.; Gonçalves, M.S.; De Carvalho, M.S.; Franco, M. Application of lipase immobilized on a hydrophobic support for the synthesis of aromatic esters. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2021, 68, 538-

546. Doi: 10.1002/bab.1959.

Gomes, M.M.O.D.S.; Nicodemos, I.S.; Costa, M.D.S.; Santos, D.M.R.C.D.; Costa, F.S.; Franco, M.; Pereira, H.J.V. Optimization of enzymatic saccharification of industrial wastes using a thermostable and halotolerant endoglucanase through Box-Behnken experimental design. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2023, 54, 1-11. Doi: 10.1080/10826068.2023.2201936.

Gonçalves, G. R. F.; Gandolfi, O.R.R.; Brito, M.J.P.; Bonomo, C.F.; Fontan, R.C.I.; Veloso, C.M. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. *Process Biochemistry.* 2021, 111, 114-123. Doi: 10.1016/j.procbio.2021.10.027.

Gonçalves, M.S.; Oliveira, P.C.; Araujo, S.C.; Espirito Santo, E.L.; Neta, J.L.V.; Anjos, P.N.M.; Franco, M. Innovating in the production of activated carbon through the reuse of fermented biomass. *Chem. Pap.* 2023, 1-5. Doi: 10.1007/s11696-023-03227-y.

Houfani, A.A.; Anders, N.; Spiess, A.C.; Baldrian, P.; Benallaoua, S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars – a review. *Biomass and Bioenergy.* 2020, 134, 105481. Doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105481.

Huang, W.; Pan, S.; Li, Y.; Yu, L.; Liu, R. Immobilization and characterization of cellulase on hydroxy and aldehyde functionalized magnetic Fe₂O₃/Fe₃O₄ nanocomposites prepared via a novel rapid combustion process. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 162, 845-852. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.209.

Ji, C.; Cheng, K.; Nayak, D.; Pan, G. Environmental and economic assessment of crop residue competitive utilization for biochar, briquette fuel and combined heat and power generation. *J. Clean. Prod.* 2018, 192, 916-923. Doi: 10.1016/j.jclepro.2018.05.026.

Kaur, N.; Bhardwaj, P.; Singh, G.; Arya, S. K. Applicative insights on nascent role of biochar production, tailoring and immobilization in enzyme industry- A review. *Biochem.* 2021, 107, 153-163. Doi: 10.1016/J.PROCBIO.2021.05.017.

Kumar, V.V.; Sivanesan, S.; Cabana, H. Magnetic cross-linked laccase aggregates—bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. *Sci. Total Environ.* 2014, 487, 830–839. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.04.009.

Lewoyehu, M. Comprehensive review on synthesis and application of activated carbon from agriculture residues for their mediation of venomous pollutants in wastewater. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 2021, 159, 105279. Doi: 10.1016/j.jaap.2021.105279.

Lima, J.S.; Araújo, P.H.H.; Sayer, C.; Souza, A.A.U.; Viegas, A.C.; Oliveira, D. Cellulase immobilization on magnetic nanoparticles encapsulated in polymer nanospheres. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2017, 40, 511–518. Doi: 10.1007/s00449-016-1716-4.

Lima, J.S.; Boemo, A.P.S.I.; Araújo, P.H.H.; Oliveira, D. Immobilization of endoglucanase on kaolin by adsorption and covalent bonding. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2021, 44, 1627–1637. Doi: 10.1007/s00449-021-02545-3.

Lima, J.S.; Costa, F.N.; Bastistella, M.A.; Araújo, P.H.H.; Oliveira, D. Functionalized kaolin as support for endoglucanase immobilization. *BIOPROC BIOSYST ENG.* 2019, 42, 1165-1173. Doi: 10.1007/s00449-019-02113-w.

Liu, S.; Bilal, M.; Rizwan, K.; Gul, I.; Rasheed, T.; Iqbal, H.M.N. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 190, 396-408. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.09.006.

Machado, N.B.; Sabi, G.J.; Hirata, D.;B.; Mendes, A.A. Enzymatic production of wax esters by esterification using lipase immobilized via physical adsorption on functionalized rice husk silica as biocatalyst. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2023, 70, 1291-1301. Doi: 10.1002/bab.2439.

Mohamad, N.R.; Marzuki, N.H.C.; Buang, N.A.; Huyop, F.; Wahab, R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Equip.* 2015, 29, 205–220. Doi: 10.1080/13102818.2015.1008192.

Mohapatra, S.; Padhy, S.; Mohapatra, P.K.D.; Thatoi, H.N. Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass, *Pennisetum* species through cellulose from a newly isolated *Aspergillus fumigatus*. *Bioresour. Technol.* 2018, 253, 262-272. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.01.023.

Neves, T.A.; Protásio, T.P.; Couto, A.M.; Trugilho, P.F.; Silva, V.O.; Vieira, C.M.M. Evaluation of eucalyptus clones in different locations involved in charcoal production. *Pesquisa Florestal Brasileira.* 2011, 31, 319-330. Doi: 10.4336/2011.pfb.31.68.319.

Oliveira, P.C.; De Brito, A.R.; Pimentel, A.B.; Soares, G.A.; Pacheco, C.S.V.; Santana, N.B.; Da Silva, E.G.P.; Fernandes, A.G.A.; Ferreira, M.L.O.; Oliveira, J.R.; Franco, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 2019, 18, 777-787. Doi: 10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira.

Patel, A.; Shah, A. Purification and characterization of novel, thermostable and non-processive GH5 family endoglucanase from *Fomitopsis meliae* CFA 2. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 182, 1161–1169. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.04.110.

Postigo, L. O. C.; Velazquez, D. A. J.; Flores, D. G.; Amezcuita, L. E.G.; Cayuela, T. G. Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by products: Recent advances and its industrial feasibility. *Food Biosci.* 2021, 41, 100926. Doi: 10.1016/j.fbio.2021.100926.

Qamar, S.A.; Qamar, M.; Bilal, M.; Bharagava, R.N.; Ferreira, L.F.R.; Sher, F.; Iqbal, H. M. Cellulose-deconstruction potential of nano-biocatalytic systems: a strategic drive from designing to sustainable applications of immobilized cellulases.

Int. J. Biol. Macromol. 2021, 185, 1-19, Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.079.

Qi, H.; Duan, H.; Wang, X.; Meng, X.; Yin, X.; Ma, L. Preparation of magnetic porous terpolymer and its application in cellulase immobilization. *Polym Eng Sci.* 2015, 55, 1039–1045. Doi: 10.1002/pen.23973.

Quesada, H.B.; De Araújo, T.P.; Vareschini, D.T.; De Barros, M.A.S.D.; Gomes, R.G.; Bergamasco, R. Chitosan, alginate and other macromolecules as activated carbon immobilizing agents: A review on composite adsorbents for the removal of water contaminants. *Int. J. Biol. Macromol.* 2020, 164, 2535-2549. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.118.

Rahimizadeh, P.; Najavand, S.; Pazhang, M. A comparative study of activity and stability of the free and the immobilized endoglucanase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *J. Biol. Macromol.* 2015, 1, 167-176.

Raina, D.; Kumar, V.; Saran, S. A critical review on exploitation of agro-industrial biomass as substrates for the therapeutic microbial enzymes production and implemented protein purification techniques, *Chemosphere.* 2022, 294, 133712. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.133712.

Rajnish, K.N.; Samuel, M.S.; Datta, S.; Chandrasekar, N.; Balaji, R.; Jose, S.; Selvarajan, E. Immobilization of cellulase enzymes on nano and micromaterials for breakdown of cellulose for biofuel production-a narrative review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 182, 1793-1802. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.176.

Ramos, M.D.; Sandri, J.P.; Claes, A.; Carvalho, B. T.; Thevelein, J. M.; Zangirolami, T. C.; Milessi, T. S. Effective application of immobilized second generation industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain on consolidated bioprocessing. *New Biotechnology.* 2023, 78, 153-161. Doi: 10.1016/j.nbt.2023.10.011.

Reshmy, R.; Narisetty, V.; Tarafdar, A.; Bachan, N.; Madhavan, A.; Tiwari, A.; Sindhu, R. An overview of cellulase immobilization strategies for biofuel production. *Bioenergy Res.* 2023, 16, 4–15. Doi: 10.1007/s12155-022-10431-3.

Ribeiro, E.S.; Farias, B.S.; Junior, T.R.S.C.; Pinto, L.A.A.; Diaz, P.S. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 183, 1959-1970. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.214.

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. *Arch. Microbiol.* 2020, 202, 935–951. Doi: 10.1007/s00203-019-01796-9.

Saha, K.; Verma, P.; Sikder, J.; Chakraborty, S.; Curcio, S. Synthesis of chitosan-cellulase nanohybrid and immobilization on alginate beads for hydrolysis of ionic liquid pretreated sugarcane bagasse. *Renew. Energy.* 2019, 133, 66–76. Doi: 10.1016/j.renene.2018.10.014.

Santos, D.M.R.C.; Albuquerque, F.; Silva, T.P.; Ferreira, A.N.; Machado, S.S.; Da Luze, J.M.R.; Pereira, H.J.V. Production, Purification, Characterization, and Application of Halotolerant and Thermostable Endoglucanase Isolated from *Pycnoporus sanguineus*. *Waste Biomass Valori*. 2023, 14, 1-12. Doi: 10.1007/s12649-023-02175-8.

Santos, M.P.F.; Brito, M.J.P.; Junior, E.C.S.; Bonomo, R.C.F.; Veloso, C.M. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2019, 94, 1982-1990. Doi: 10.1002/jctb.5981.

Shinde, R.; Shahi, D.K.; Mahapatra, P.; Singh, C.S.; Naik, S.K.; Nandkishore Thombare, N.; Singh, A.K. Management of crop residues with special reference to the on-farm utilization methods: A review. *Ind. Crops Prod.* 2022, 181, 114772. Doi: 10.1016/j.indcrop.2022.114772.

Silva, T.P.; De Albuquerque, F.S.; Dos Santos, C.W.V.; Franco, M.; Caetano, L.C.; Pereira, H.J.V.; Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. *Bioresour Technol.* 2018, 270, 263–269. Doi: 10.1016/j.biortech.2018.09.022.

Silva, T.P.; Ferreira, A.N.; De Albuquerque, F.S.; Barros, A.C.A.; Da Luz, J.M.R.; Gomes, F.R.; Pereira, H.J.V. Box–Behnken experimental design for the optimization of enzymatic saccharification of wheat bran. *Biomass Conv. Bioref.* 2022, 12, 5597–5604. Doi: 10.1007/s13399-021-01378-0.

Srivastava, N.; Srivastava, M.; Mishra, P.K.; Gupta, V.K.; Molina, G.; Rodriguez-Couto, S.; Ramteke, P.W. Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations. *Renew Sustain Energy Rev.* 2018, 82, 2379-2386. Doi: 10.1016/j.rser.2017.08.074.

Tripathi, N.; Hills, C.D.; Singh, R.S.; Atkinson, C.J. Biomass waste utilization in low-carbon products: harnessing a major potential resource. *NPJ Clim. Atmos. Sci.* 2019, 2, 35. Doi: 10.1038/s41612-019-0093-5.

Wang, X.; Cheng, H.; Ye, G.; Fan, J.; Yao, F.; Wang, Y.; Jiao, Y.; Zhu, W.; Huang, H.; Ye, D. Key factors and primary modification of activated carbon and their application in adsorption of carbon-based gases: A review. *Chemosphere.* 2022, 287, 131995. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131995.

Weng, Z.H.; Nargotra, P.; Kuo, C.H.; Liu, Y.C. (2022). Immobilization of recombinant endoglucanase (CelA) from *Clostridium thermocellum* on modified regenerated cellulose membrane. *Catalysts.* 2022, 12, 1356. Doi: 10.3390/catal12111356.

Xie, J.; Zhang, Y.I.; Simpson, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. *Curr. Opin. Food Sci.* 2022, 43, 27-35. Doi: 10.1016/j.cofs.2021.09.004.

Yu, Y.; Yuan, J.; Wang, Q.; Fan, X.; Ni X.; Wang, P.; Cui, L. Cellulase immobilization onto the reversibly soluble methacrylate copolymer for denim washing. *Carbohydr Polym.* 2013, 95, 675–680. Doi: 10.1016/j.carbpol.2013.03.043.

Zhang, Z.; Yang, J.; Quian, J.; Zhao, Y.; Wang, T.; Zhai, Y. Biowaste hydrothermal carbonization for hydrochar valorization: Skeleton structure, conversion path ways and clean biofuel applications. *Bioresour. Technol.* 2021, 324, 124686. Doi: 10.1016/j.biortech.2021.124686.

Seção 4

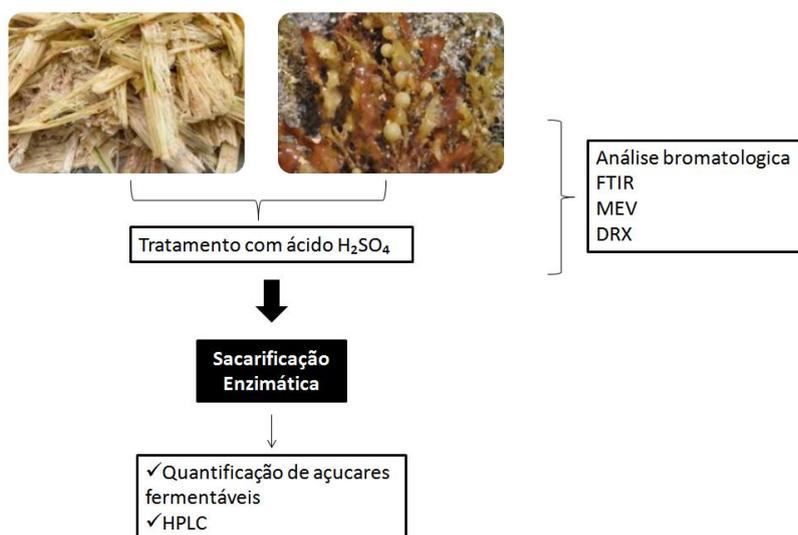
Artigo 3

4 ARTIGO 3: Avaliação do pré-tratamento do bagaço da cana e a macroalga *Sargassum vulgare* com ácido diluído na sacarificação utilizando a endoglucanase do *P. roqueforti* ATCC 10110

Resumo: A biomassa lignocelulósica é uma alternativa promissora para a produção de biocombustíveis, apesar de sua natureza recalcitrante. As macroalgas marinhas (algas marinhas) e bagaço de cana-de-açúcar podem acumular grandes quantidades de celulose nos seus tecidos, portanto, oferecendo uma fonte potencial atraente de matéria-prima para a produção de bioetanol. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência do pré-tratamento dos resíduos Bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e *Sargassum vulgare* (SVU) em meio a ácido diluído utilizando o extrato enzimático contendo endoglucanase obtida pelo fungo *Penicillium roqueforti*. A composição dos resíduos demonstraram que o BCA possui alto teor de hemicelulose enquanto o SVU possui menos de 3% de lignina, assim favorecendo o uso desse resíduo sem necessidade de tratamento. Análises como FTIR e XRD foram utilizados para caracterizar o efeitos do processo de pré-tratamento. Já o HPLC confirmou a presença dos açúcares glicose e fruto produzidos na sacarificação com resíduos *in natura* e tratados com ácido.

Palavras-chave: Algas marinhas, bioetanol, etanol.

Graphical Abstract



Keywords: Seaweed, bioethanol, ethanol.

4.1 Introdução

A busca por energia alternativa, sustentável e fontes limpa tem se tornando uma preocupação mundial devido a eminente escassez de combustíveis fósseis, aquecimento global, aumento do efeito estufa, emissão de gases e poluição do ar (Li et al., 2013; Tavares et al., 2024; Narayanan et al., 2024; Qarri e Israel, 2020). A população mundial atingirá cerca de 9 mil milhões até 2030 e o mercado global de fontes de combustíveis fósseis também deverá aumentar as emissões de dióxido de carbono até 26 % até 2030, com recursos não renováveis esgotando-se em breve (Tripathi et al., 2019; Narayanan et al., 2024). O desenvolvimento de fontes alternativas como a conversão de recursos de biomassa em bioprodutos e energia é a primeira etapa para que ocorra a transição de uma economia biológica (Magalhães et al., 2019; karp et al., 2021).

Dessa forma o bioetanol é uma fonte de energia favorável ao meio ambiente (Qarri e Israel, 2020), por possuir vantagens de baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, podendo ser obtido por diversos suprimentos de amido e celulose provenientes de agricultura matéria-prima, ao qual é chamado de etanol de primeira geração, porém o problema encontrado nessa produção é devido a competição com a segurança alimentar humana e os mercados alimentares globais (Qarri 2020. Sudhakar 2017). Uma segunda maneira de obtenção do bioetanol é o aproveitamento da lignocelulose presente em biomassas, que depara com diversas adversidade como a dificuldades em quebrar as ligações de lignina para mono-açúcar (Nigam, 2011; Qarri e Israel, 2020). Dentre as biomassas se destaca o bagaço da cana-de-açúcar obtido a partir do processamento da cana-de-açúcar no Brasil, se destaca por ser o maior produtor mundial, sendo composto principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (Maheswari et al., 2020; Lu et al., 2021), esse resíduo é utilizado como fonte de energia térmica e energia elétrica e também como fonte para obtenção de etanol de segunda geração, porém para ser utilizado é necessário o pré-tratamento do resíduo (Lu et al., 2021).

Já uma terceira geração de biocombustíveis envolve o uso de macroalgas marinhas, sendo uma alternativa tecnicamente viável, superando as vantagens da obteção do bioetanol na primeira e na segunda gerações. A utilização de algas marinhas compõem diversas vantagens sendo eles pelo seu alto teor de carboidratos e baixas quantidades de lignina (Qarri e Israel, 2020; Dinç et al., 2024), geralmente contém três componentes, ou seja, ácido algínico, celulose e outros polissacarídeos (Mišurcová et

al., 2011; Ardalan et al., 2018), essas também tem altas taxas fotossintéticas e rápidas crescimento levando a altas produtividades, onde macroalgas consome grandes quantidades de CO₂ em seu crescimento (Qarri e Israel, 2020; Borines et al., 2013). Essas macroalgas tem despertado interesse entre os pesquisadores devido a suas diversas aplicações como indústria farmacêutica, cosmética, alimentação animal e indústrias de fertilizantes (Adeniyi et al., 2018; Qarri e Israel, 2020; Sabzi et al., 2023). São conhecidos os três tipos de algas marinhas, nomeadamente verdes (Chlorophyta), vermelhas (Rhodophyta) e marrom (Ochrophyta) (Qarri e Israel, 2020).

Entre as magroalgas marrom as espécies de *Sargassum*, *S. vulgare* (C. Agardh, 1820) (Sargassaceae) da família Phaeophyceae é uma alga marinha comum e abundante em mares tropicais e subtropicais (Mahmoud et al., 2019; Dinç et al., 2024), essa macroalga ganhou interesse emergente no área biomédica (Ammar et al., 2017) por possuir inúmeras atividades biológicas (Sabzi et al., 2023). Devido a sua composição o *S. vulgare* se torna interessante fonte para obtenção de bioetanol.

Entretanto para melhor obtenção do bioetanol a utilizando dos pré-tratamento dessas biomassas ocorrer utilizadas tecnologias como pré-tratamento mecânico, físico e químico (Javed et al., 2019). A utilização dessas técnicas são essenciais para melhorar a hidrólise enzimática da lignocelulose (Houfani e outros, 2020; Lu et al., 2021). O pré-tratamento com ácido é um dos processos químicos que tem por objetivo despolimerizar a hemicelulose e reduzir a recalcitrante de lignocelulose vem sendo muito utilizado para melhorar sacarificação de lignocelulose (Chen et al., 2017; Lu et al., 2021). Entretanto a utilização de pré-tratamento utilizando ácidos pode deparar com algumas desvantagens como a recuperação de produtos a jusante do chorume tratado e a reciclagem de ácidos que não reagiram (de Vries e Jackson, 2012; Lu et al., 2021). Assim é preciso obter uma solução que encaixe na química verde, sendo mais seguro e sustentável (Lu et al., 2021).

Dessa forma o objetivo deste estudo foi avaliar a sacarificação obtida de resíduos lignocelulose como o bagaço de cana-de-açúcar e a macroalga *Sargassum vulgare*. Este trabalho focou no pré-tratamento com ácido diluído e os resultados da sacarificação enzimática.

4.2 Materias e Métodos

4.2.1 Coleta, preparação da matéria prima e microrganismo

Os resíduos utilizados nesse trabalho foram bagaço de cana-de-açúcar (BCA),

farelo de trigo (FT) fornecido por indústria localizada na cidade de Maceió, Alagoas, Brasil e *Sargassum vulgare* (SVU) uma macroalga nativa em mares tropicais e subtropicais, foi colhida nas águas costeiras da praia de Ponta Verde na cidade de Maceió, Alagoas, Brasil (coordenadas: Latitude: 09°41'00" S e Longitude: 35°43'00" O). O resíduo BCA e FT foram seco em estufa (SX 1.0 DTMC, Sterilifer, Diadema, SP, Brasil) a 50 °C por 24 h em seguida triturados em moinho de facas da marca Wiley (ACB, Labor, São Paulo, Brasil) até se obter partícula de tamanho 2 mm e armazenados em recipiente até serem utilizados. Já a SVU colhida foi lavada com água da torneira para remover sais e areias e depois secas à temperatura ambiente.

O fungo filamentoso *Penicillium roqueforti* foi fornecido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro, RJ, Brasil sob o número de registro 40075 e número de lote 079840075.

4.2.2 Preparo do inoculo e fermentação em estado sólido (FES)

O microrganismo foi cultivada em meio de agar-dextrose-batata (PDA), em Erlenmeyer de 250 mL em estufa bacteriológica (SL 222, Solab, Piracicaba, Brasil) a 27°C por sete dias em seguida armazenado em ambiente refrigerado a 4 °C. A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de resíduos seco FT como substrato, em seguida adicionado aos recipientes água estéril para atingir a umidade de 65%. Os frascos foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C 1 atm por 20 minutos e depois resfriado à temperatura ambiente e inoculado com quatro discos de micélio (5 mm) da cepa fúngica (Patel e Shah 2021). O conteúdo dos frascos foram bem misturados e incubados em câmara de germinação (SX 1.0 DTMC, Sterilifer, Diadema, SP, Brasil) em temperatura controlada de 27 °C por 240 horas.

4.2.3 Obtenção do extrato enzimático

Após a FES nos elernmeyer foram adicionados 5 mL de água estéril para cada 1 g de resíduo levados a agitação em incubadora (TECNAL) por 20 minutos a 170 rpm e 25°C. O extrato obtido foi submetido à filtração seguida de uma centrifugação de 5 minutos (15.000 g), assim o sobrenadante chamamos de extrato enzimático bruto, este foi separado e utilizado posteriormente.

4.2.4 Pré-tratamento ácido diluído

O pré-tratamento ácido foram conduzidos conforme relatado por (Silva et al., 2023) nas devidas concentrações (0.5%, 1%, 1.5% (v/v) do ácido H₂SO₄). Os resíduos SVU e BCA foram pesados (5g) e adicionados em erlenmeyer de 250 mL na proporção de 1:10 (resíduo (g)/volume solução ácido diluído (mL)). Os erlenmeyers após serem fechados foram levados à autoclave por 20 min a 120°C. Em seguida os frascos foram resfriados a temperatura ambiente, os sólidos foram separados da fase líquida por filtração e lavagem com água destilada para remoção de componentes solúveis. O sobrenadante foi utilizada para realizar as análises posteriores de AR (açúcar redutor) pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) Miller (1959) como também a identificação de possíveis inibidores da enzima celulase por análise no HPLC. Já as frações sólidas retidas foram acondicionadas em estufa (SX 1.0 DTMC, Sterilifer, Diadema, SP, Brasil) a 50°C por 24 h para secagem e posteriormente utilizados nas caracterizações e sacarificação.

4.2.5 Análise de composição

A composição físico-química foi realizada para os resíduos BCA e SVU (*in natura* e pré-tratado com ácido diluído). Determinou-se a proteína bruta (PB), lignina (LIG), celulose (CEL), hemicelulose (HC) de acordo com a metodologia da Associação de Químicos Analíticos Oficiais AOAC (1995); os valores obtidos foram expressos em %, g/100 g de matéria seca.

4.4.6 Determinação de atividade da celulose

Para determinar a atividade da endoglucanase (CMCase, endo-1,4-β-D-glucanase; EC 3.2.1.4) foi realizado em um meio de reação com total 1 mL conduzidos pela adição de 10 μL de extrato enzimático bruto, 100 μL de solução de carboximetilcelulose 2% (CMC) (p/v) e 190 μL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5). As amostras foram incubadas a 50 ° C por 60 min que foi interrompida pela adição de 200 μL de ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS (Sigma-Aldrich). Depois disso, os tubos foram aquecidos em água fervente por 5 min adicionando 500 μL de água destilada. A liberação de açúcares redutores foi determinada usando o método de Miller (1959) em absorbância de 540 nm usando espectrofotômetro Fex Station 3 (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

4.2.7 Análise FTIR

A análise de FTIR tem por objetivo a determinação semi-quantitativa de componentes da amostra. Os espectros na região do infravermelho médio foram obtidos num espectrofotômetro de infravermelho modelo Nicole-IR, utilizando o brometo de potássio (KBr) como agente dispersante. Inicialmente as amostras e o KBr foram pesados, para a confecção das pastilhas. Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: faixa espectral de 400-4000 cm^{-1} , 60 scans em modo transmitância, com resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.8 Análise de Raio-X e Cristalinidade

A análise de difração de Raio-X foi realizada utilizando o equipamento modelo XRD-6000 da Shimadzu com uma fonte de radiação de $\text{CuK } \alpha$ com voltagem de 30 KV e corrente de 30 mA, com filtro de Ni. O método de pó foi utilizado para realização desse procedimento. Os dados foram selecionados na faixa de 2θ de 10° a 40° com velocidade de goniômetro de 2 $^\circ/\text{min}$ com um passo de 0,02 $^\circ$. O índice de cristalinidade (CrI) das amostras de BCA e SVU foram calculados pelo método (Segal et al., 1959). O índice de cristalinidade (IC) é determinado usando a equação 1.

(1)

$$CI (\%) = \left(1 - \frac{h_{am}}{h_{cr}}\right) \times 100$$

Onde h_{crs} é a altura do sinal mais intenso, e h_{am} a intensidade da difração atribuída à celulose amorfa. A altura de intensidade do material amorfo é tomada perto de 18° para celulose e em torno de 16° para celulose II. Os valores de CI são calculados a partir dos dados originais sem subtrair o fundo (Segal et al., 1959).

4.2.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise MEV, as amostras dos resíduos BCA SVU “in natura” e pós tratamento foram fixadas a um suporte “Stub” e em seguida foram metalizadas com uma fina camada de ouro, cerca de 20 a 30 nm de espessura por um sistema de evaporação “sputtering” utilizando equipamento SSX-550 Superscan, da Shimadzu (Quioto, Quioto, Japão), conforme procedimento padrão.

4.2.10 Sacarificação dos resíduos

Pra o estudo de sacarificação dos resíduos BCA e SVU após as melhores condições de tratamento ácido diluído, foi utilizado o extrato bruto multienzimático contendo a endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 (440 U/mL). O meio reacional consistiu em 1% de substrato e 1 mL do extrato bruto enzimático e 9 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5). Já o controle foram utilizados 1% do resíduo sem adição do extrato enzimático bruto. A sacarificação foi realizada em banho à 50°C em diferentes tempos (1, 4, 8, 12 e 24 horas). Após a sacarificação, os tubos foram centrifugados (HITACHI Rx II series) a 5.000g a 24°C por 3 min, a parte sobrenadante foi utilizada para dosagem dos açúcares redutores pelo método DNS Miller (1959) e identificação dos açúcares fermentáveis produzidos ao final do processo com maior produção de açúcares redutores por HPLC, com detecção por índice de refração (RI). O cromatógrafo em questão estava equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian), injetor manual modelo 80765 (HAMILTON) com loop de 20 µl, detector de índice de refração modelo 356 LC. A coluna cromatográfica empregada para determinação dos produtos foi a 87H (300 mm x 7,8 mm d.i.; MetaCarb), operando nas seguintes condições: temperatura da coluna: 55 °C; a fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo de 0,70 mL.min⁻¹.

4.2.11 Identificação dos inibidores formados após os pré-tratamentos

Após os pré-tratamentos com ácido diluído, foram coletados amostras dos erlenmeyer e em seguida foram centrifugados (HITACHI Rx II series) a 5.000g a 24°C por 3 min, a parte sobrenadante foi utilizada a identificação dos inibidores produzidos ao final do processo por HPLC, com detecção por índice de refração (RI). O cromatógrafo em questão estava equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian), injetor manual modelo 80765 (HAMILTON) com loop de 20 µl, detector de índice de refração modelo 356 LC. A coluna cromatográfica empregada para determinação dos produtos foi a 87H (300 mm x 7,8 mm d.i.; MetaCarb), operando nas seguintes condições: temperatura da coluna: 55 °C; a fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico (0,005 mol.L⁻¹) com fluxo de 0,70 mL.min⁻¹.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Análise composicional da biomassa antes e após pré-tratamento

A análise da composição química das biomassas estudadas é significativamente importante, pois colabora na detecção da sua viabilidade para o estudo, assim revelando a composição presente nos resíduos e seu potencial para utilização na sacarificação. A composição dos resíduos BCA e SVU sem tratamento e pós tratamento foram analisadas para avaliar o teor de celulose (CEL), hemicelulose (HC), lignina (LIG). Esses valores, que estão descritos na Tabela 1 mostram a quantidade de cada composto. De acordo com os resultados apresentados, verifica-se que os componentes do bagaço de cana-de-açúcar são semelhantes àqueles descritos na literatura (Pandey et al., 2000; karp et al., 2021; Silva et al., 2023) e pode ser tomado como base para o presente trabalho. Através do pré-tratamento, componentes da hemicelulose podem ser solubilizados em açúcares monoméricos, como xilose, arabinose e galactose, tornando a celulose mais acessível à degradação enzimática (Borines et al., 2013).

Dessa forma o pré-tratamento para o resíduos BCA é necessário devido ao grande percentual de hemicelulose presente no resíduo *in natura*. Dessa forma a redução do teor de hemicelulose pode aumentar o acesso enzimático à celulose e reduzir a ligação não produtiva da celulase com açúcares hemicelulósicos (Silva et al., 2023).

O pré-tratamento também foi eficaz para a macroalga SVU, porém na sua composição *in natura* é observado que a macroalga possui baixo teor de hemicelulose e lignina conforme já descrito na literatura em que a quantidade de lignina em macroalgas são estimada em menos de 4%, o que está de acordo com o observado na parede celular da macroalga SVU, conforme Borines e colaboradores (2013), onde relatam que a parede celular das algas não contém ou contém pouca lignina. O baixo teor de lignina na composição da biomassa 3,12% indica de alguma forma que materiais se tratar de um material menos complexos (Borines et al., 2013). Com esse resultado do resíduo SVU *in natura*, podemos afirmar que não se faz necessário o uso de tratamento para obtenção de açúcares redutores, assim reduzindo o custo na produção do etanol de terceira geração.

Tabela 1: Análise composicional dos resíduos, BCA (bagaço de cana-de-açúcar) e SVU (*Sargassum vulgare*) “in natura” e após os pré-tratamento com ácido.

Componentes da biomassa	Não tratado		Tratamento com ácido	
	<i>Sargassum vulgare</i>	Bagaço de cana	<i>Sargassum vulgare</i> (1.5%)	Bagaço de cana (1,5%)
Celulose	41.84 ± 1.5	30.05 ± 1.2	48.91 ± 0.33	50.27 ± 0.85
Lignina	3.12 ± 1.8	31.43 ± 0.46	1.45 ± 1.0	15.73 ± 0.75
Hemicelulose	15.22 ± 0.8	24.97 ± 0.35	1.9 ± 0.82	17.14 ± 1.1

Fonte: elaborado pela autora, 2024.

4.3.2 Pré-tratamento ácido diluído

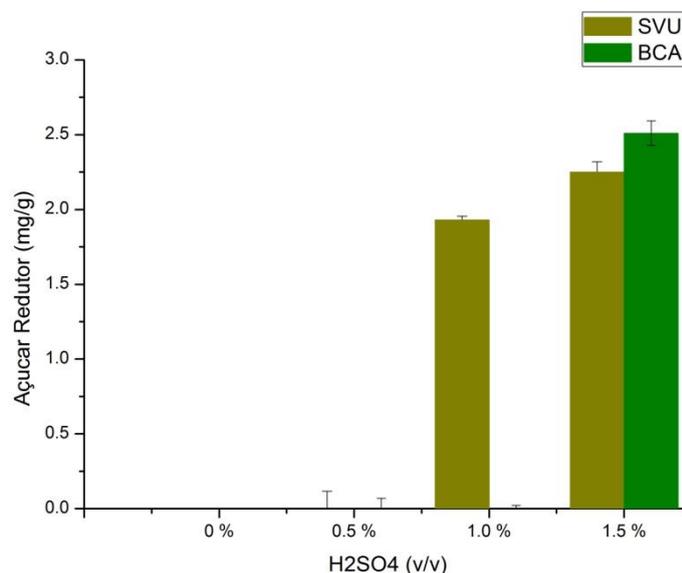
O pré-tratamento é um passo importante para aumentar a disponibilidade da biomassa para reações enzimáticas com o objetivo de liberar monossacarídeos fermentáveis (Singh et al., 2022; Narayanan et al. 2024). O pré-tratamento à base de ácido é comumente usado para converter os polímeros encontrados nas paredes celulares em formas fermentáveis simples com menos energia e alta eficiência (Narayanan et al. 2024).

A faixa dos valores de concentração de açúcar representados na figura 1 indicam que o pré-tratamento com ácido realizados nas devidas concentrações (0.5%, 1%, 1.5% (v/v)) a liberação de açúcares redutores foram proporcionadas pelo pré-tratamento com ácido ser eficiente com maiores valores de açúcares redutores na concentração 1.5% para os resíduos BCA (2.25 mg/g) e SVU (2.50 mg/g). O efeito positivo de pré-tratamento com ácido já era esperado e confirmado, pois o bom desempenho do ácido em pré-tratamento é eficaz para a solubilização da hemicelulose e menos seletivo à lignina (Karp et al., 2021), uma vez que o principal objetivo do pré-tratamento na biomassa é romper o complexo de lignocelulose por degradação parcial de hemicelulose e lignina, também a eficiência do pré-tratamento com solução do ácido sulfúrico diluída permite a hidrólise da hemicelulose em xilose, arabinose, galactose e manose, (Dionisio et al., 2021) o que é fator determinante para a validação do pré-tratamento (Silva et al., 2023).

O sobrenadante após o tratamento com ácido foram analisados para BCA e SVU quanto a formação de inibidores e observou-se que não houve formação dos mesmo. Pesquisadores afirmam que pré-tratamento de biomassa de macroalgas marrons não

produzem quaisquer subprodutos inibitórios (Veza et al., 2022; Narayanan et al., 2024).

Figura 1: Perfil do pré-tratamento com ácido H_2SO_4 diluído (0.5%, 1%, 1.5% (v/v) com a quantidade de açúcar redutor liberado.



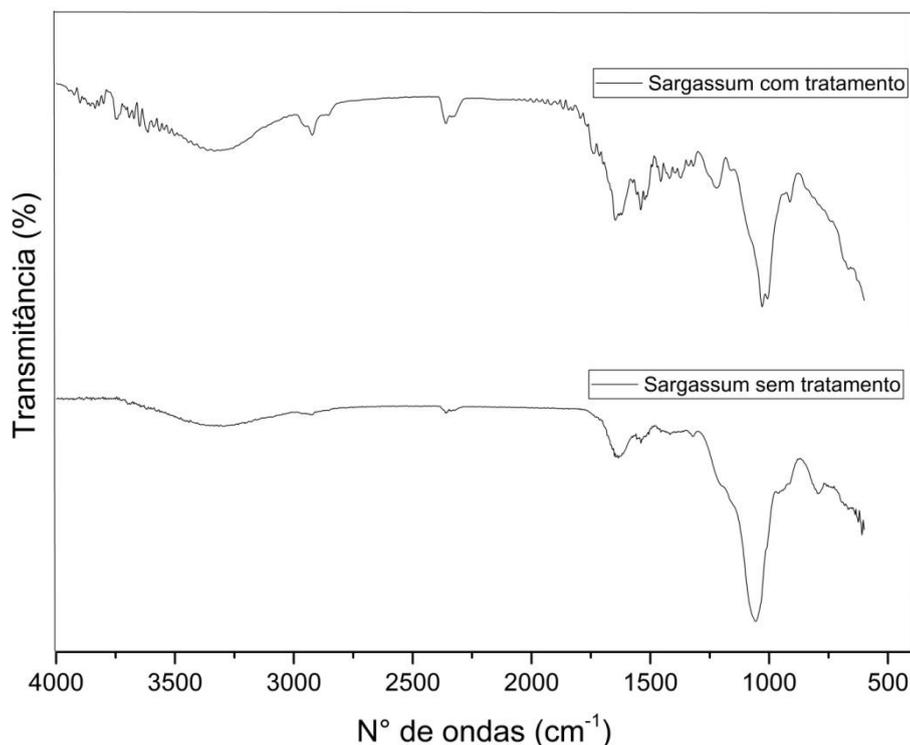
Fonte: elaborado pela autora, 2024.

4.3.3 FTIR

Análise de espectroscopia infravermelha médio foi realizada para obter informações sobre os grupos funcionais presentes nos resíduos industriais de SVU antes e depois do pré-tratamento (Figura 2). O sinal em 906 cm^{-1} corresponde à ligação β (1 \rightarrow 4) glicosídica da celulose. As vibrações entre 1200 e 1000 cm^{-1} são atribuídas à presença de hemicelulose e celulose, observadas na Figura 2. O sinal em 1144 cm^{-1} corresponde ao alongamento assimétrico de C – O – C, sendo observado com melhor resolução no espectro sem tratamento. As emissões entre 1450 e 1300 cm^{-1} correspondem a acoplamentos moleculares, aumentando a complexidade espectral devido aos vários modos vibracionais de lignina e hidratos de carbono. O sinal em aproximadamente 1458 cm^{-1} representa deformações nas ligações CH_2 e CH_3 da lignina. Os sinais em aproximadamente 1644 cm^{-1} podem ser atribuídos ao alongamento das ligações C = C e C = O no anel aromático da lignina, enquanto a região em torno de 1742 cm^{-1} é característica das ligações C = O quando a hemicelulose é esticada. Os sinais em 2853 e 2918 cm^{-1} correspondem às ligações simétricas e assimétricas CH e CH_2 da celulose, respectivamente. Sinais entre 3800 e 3000 cm^{-1} estão relacionados às

vibrações das ligações de hidrogênio e do grupo hidroxila da celulose.

Figura 2. Espectros de infravermelho médio do *Sargassum vulgare* antes e depois do tratamento.

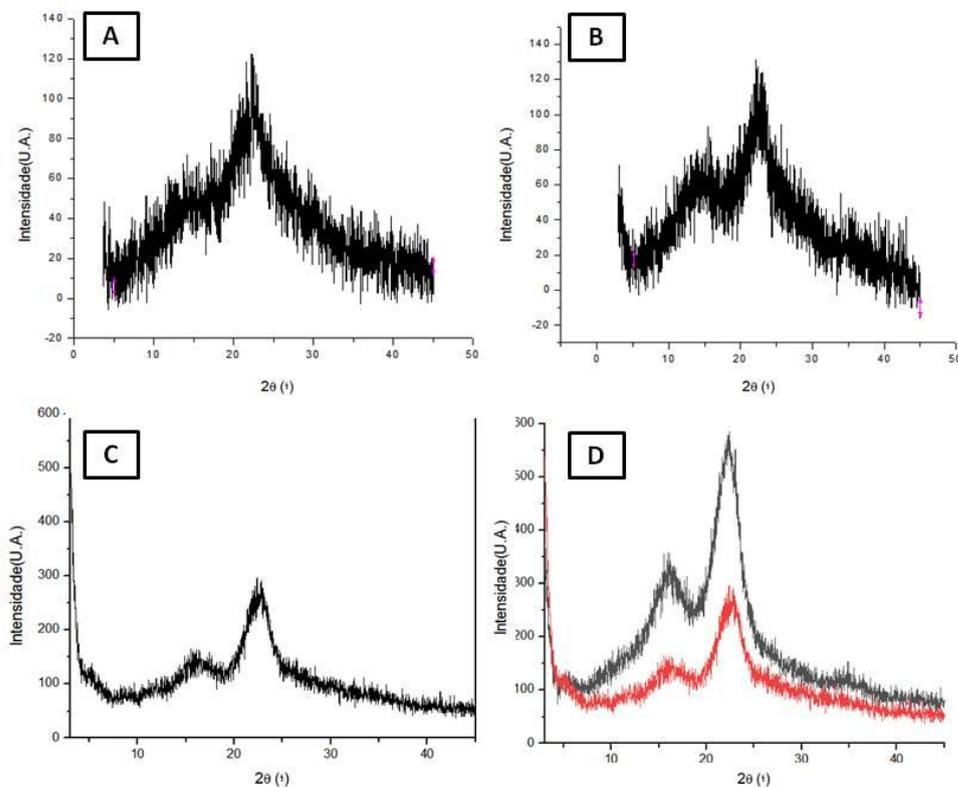


Fonte: elaborado pela autora, 2024.

4.3.4 Difração de Raio- X

A celulose e hemicelulose presente nos materiais tratados apresentam regiões cristalinas (altamente ordenadas) e o tratamento aplicado resulta em propriedades diferentes para cada biomassa (figura 3). Onde podemos observar que o SVU in natura e tratado não houve grandes mudanças confirmando o que a composição desse resíduo informou. Já o BCA teve mudanças nas suas regiões, isso em decorrência do resultado obtido do resíduo tratado. Os índices de cristalinidade para os sólidos não tratados chamamos de 100% e para os sólidos tratados obtivemos 218,88, 102,7 % para BCA e SVU respectivamente. Em ambos os resíduos foram observados o aumento da cristalinidade após o pré-tratamento, este efeito pode ser explicado pela remoção de lignina amorfa e hemicelulose que provoca aumento da exposição da celulose, enquanto o inchaço da celulose em tratamento ácido suavizou a estrutura lignocelulósica provocando a diminuição da cristalinidade (Wei e Cheng, 1985; Silva et al., 2023)

Figura 3: Espectros de DRX (A) SVU in natura, (B) SVU pré-tratamento com ácido, (C) BCA in natura, (D) BCA pré-tratamento com ácido.



Fonte: elaborado pela autora, 2024.

4.3.5 Sacarificação dos resíduos

A sacarificação enzimática dos resíduos BCA e SVA foram realizados para fins de comparação com as amostras não pré-tratadas. Os materiais lignocelulósicos in natura e pré-tratados foram submetidos a um processo de sacarificação enzimática realizadas em diferentes tempos 1, 4, 8, 12 e 24 h de reação enzimática (figura 4). Os tempos com a maior produção de açúcares redutores foram submetidos a identificação por HPLC dos açúcares formados.

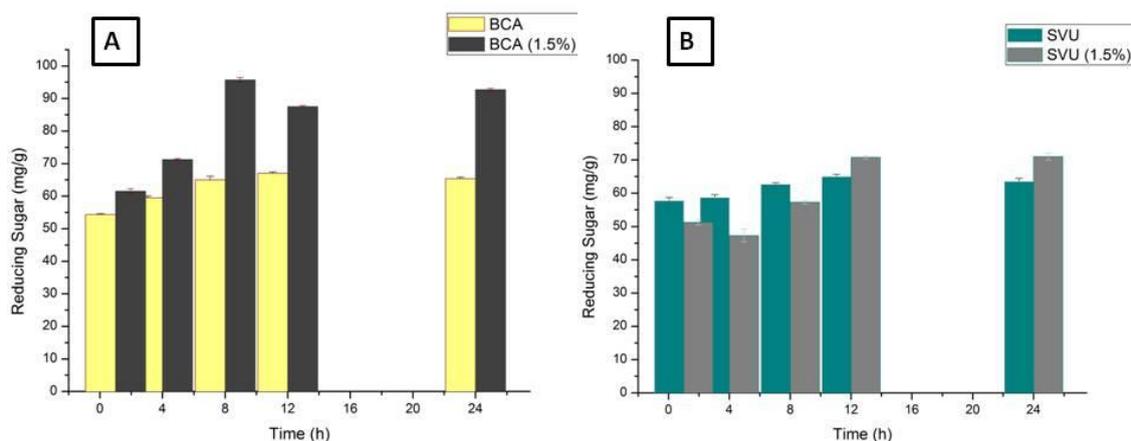
Foi observado que o resíduo BCA tratado expressou uma concentração maior de açúcares redutores obtendo o topo em 8 h, já o BCA sem tratamento obteve seu maior resultado em 12 h. O SVU sem tratamento obteve bons resultados crescentes nos tempos de 1 a 8 horas, com o melhor resultado em 12 h, já o resíduo tratado obteve melhores resultados nos intervalos de 12 a 24 h.

A partir da Tabela 2 pode-se observar que todos os materiais produziram glicose e frutose. Os resíduos BCA in natura apresentou valores menores que o tratado como já era de se esperar conforme literatura (Silva et al., 2023), provavelmente pelo alto teor de lignina e a dificuldade de acesso das enzimas em comparação com os pré-tratamentos. O pré-tratamento modificou a estrutura da lignina de modo a torná-la mais suscetível à degradação, assim o baixo teor de lignina presente na biomassa representa maior conversão (Toquero e Bolado, 2014), pois facilita o ataque enzimático.

O SVU apresentou resultados semelhantes tratados e sem tratamentos, isso devido a seu baixo teor de lignina, comprovando que essa macroalga é eficiente para sacarificação mesmo sem o processo de pré-tratamento (Ardalan et al., 2018). Borines et.al 2013, usou *Sargassum spp.* utilizando celulasas suplementadas com β -glucosidase (celobiase) para biomassa tratado com H_2SO_4 a 1% e 5% a 115 °C por 1,5 h, com rendimento de 3,4 a 4,6% de açúcar redutor.

A sacarificação enzimática, está relacionado a biomassa e sua composição como também a carga enzimática disponível utilizada. Utilizamos a carga do extrato enzimático de 440 U/mL da endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110. Assim o extrato enzimático utilizado também facilitou a sacarificação devido a multiplicidade de enzimas contido nas preparações não purificadas resulta em sacarificação eficiente independentemente dos efeitos pré-tratamento (karp et al.,2021).

Figura 4: (A) Sacarificação do BCA, (B) Sacarificação da SVU. Resíduos pré-tratados com ácido utilizando a endoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110.



Fonte: elaborado pela autora, 2024.

Os resultados da análise por HPLC (Tabela 2) permitiram observar a eficiência da liberação de açúcares individuais. Isso pode ser útil se houver interesse em um monossacarídeo específico para posterior conversão. Para produção de etanol, a glicose é preferida.

Os resultados da concentração de glicose obtidos por HPLC estavam de acordo com a literatura (Silva et al., 2023), aumento na produção da glicose para os resíduos tratados foram de 64,6 e 7,09 % para BCA e SVU, enquanto para frutose foram -42,2 e -11,79 % para BCA e VRU, podemos observar a diminuição da frutose apenas em resíduos tratadas, essa diminuição pode ter ocorrido devido à alta solubilidade em meio aquoso durante o tratamento promoveu a remoção da frutose (karp et al., 2021).

Tabela 2: Identificação e concentração dos açúcares redutores formados a partir dasacarificação dos resíduos BCA e VRU in natura e após o pré-tratamento ácido.

Resíduos	Glicose (mg/L)	Frutose (mg/L)	Açúcar total (mg/L)
BCA in natura (12 h)	31,00	56,81	85,02
BCA tratado (8 h)	51,03	33,99	87,35
SVU in natura (12 h)	31,74	10,6	42,34
SVU tratado (12 h)	33,99	9,35	43,34

Fonte: elaborado pela autora, 2024.

4.4 Conclusão

A caracterização química dos resíduos lignocelulósicos demonstrou que os pré-tratamento para o BCA foi significativamente capazes de aumentar os percentuais de celulose presentes na biomassa, análise como infravermelho com transformada de Fourier, e os resultados de XRD de amostras antes e depois do pré-tratamento confirmaram que o BCA é necessário o pré-tratamento. Já a biomassa SVU apresentou resultados na sua composição vantagens para produção de etanol, onde não é necessário o tratamento, pois apresenta em sua forma in natura baixo teor de lignina, dessa forma a análise composicional de revelou sua vantagem como matéria-prima para produção de açúcar redutor.

Dessa forma podemos afirmar que a macroalga *Sargassum vulgare* apresentou potencial significativo como matéria-prima renovável para a produção de bioetanol sem necessidade de pré-tratamento.

4.5 Referências

Adeniyi, O. M., Azimov, U., & Burluka, A. (2018). Algae biofuel: current status and future applications. *Renewable and sustainable energy reviews*, *90*, 316-335.

Ardalan, Y., Jazini, M., & Karimi, K. (2018). Sargassum angustifolium brown macroalga como um substrato de alto potencial para produção de alginato e etanol com exigência mínima de nutrientes. *Algal research*, *36*, 29-36.

Ammar, N., Jabnoun-Khiareddine, H., Mejdoub-Trabelsi, B., Nefzi, A., Mahjoub, MA, & Daami-Remadi, M. (2017). Controle de vazamento de Pythium em batata usando extratos aquosos e orgânicos da alga marrom Sargassum vulgare (C. Agardh, 1820). *Biologia e Tecnologia Pós-Colheita*, *130*, 81-93

Borines, M. G., de Leon, R. L., & Cuello, J. L. (2013). Bioethanol production from the macroalgae Sargassum spp. *Bioresource technology*, *138*, 22-29.

Chen, H., Liu, J., Chang, X., Chen, D., Xue, Y., Liu, P., Lin, H., Han, S., 2017. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. *Fuel Process. Technol.* *160*, 196–206.

De Vries, J.G., Jackson, S.D., 2012. Homogeneous and heterogeneous catalysis in industry. *Catal. Sci. Technol.* *2* (10), 2009.

Dionisio SR, Santoro DCJ, Bonan C, Soares LB, Biazi LE, Rabelo SC, et al. Second-generation ethanol process for integral use of hemicellulosic and cellulosic hydrolysates from diluted sulfuric acid pretreatment of sugarcane bagasse. *Fuel.* 2021;304:121290.

Houfani, A.A., Anders, N., Spiess, A.C., Baldrian, P., Benallaoua, S., 2020. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars-a review. *Biomass. Bioenerg.* *134*, 105481.

Javed, U., Ansari, A., Aman, A., & Qader, SAU (2019). Fermentação e sacarificação de resíduos agroindustriais: Uma abordagem custo-efetiva para uso duplo de resíduos de biomassa vegetal para produção de xilose. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *21*, 101341

Karp, S. G., Rozhkova, A. M., Semenova, M. V., Osipov, D. O., de Pauli, S. T., Sinitsyna, O. A., ... & Sinitsyn, A. P. (2021). Designing enzyme cocktails from *Penicillium* and *Aspergillus* species for the enhanced saccharification of agro-industrial wastes. *Bioresource Technology*, *330*, 124888.

Liu, D., Li, J., Zhao, S., Zhang, R., Wang, M., Miao, Y., ... & Shen, Q. (2013). Diversidade do secretoma e análise quantitativa de *Aspergillus fumigatus* Z5 celulolítico na presença de diferentes fontes de carbono. *Biotecnologia para biocombustíveis*, *6*, 1-16.

Lu, S., Wang, Q., Liang, Z., Wang, W., Liang, C., Wang, Z., ... & Qi, W. (2021).

Saccharification of sugarcane bagasse by magnetic carbon-based solid acid pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 160, 113159.

Magalhães, A.I., Carvalho, J.C., Melo Pereira, G.V., Karp, S.G., Câmara, M.C., Medina, J. D.C., Soccol, C.R., 2019. Lignocellulosic biomass from agro-industrial residues in South America: current developments and perspectives. *Biofuels Bioproducts Bioref.* 13, 1505–1519.

Mišurcová, L. (2011). Chemical composition of seaweeds. *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology*, 171-192.

Mahmoud, S. H., Salama, D. M., El-Tanahy, A. M., Abd El-Samad, E. H. (2019). Utilization of seaweed (*Sargassum vulgare*) extract to enhance growth, yield and nutritional quality of red radish plants. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(2), 167-175.

Narayanan, M. (2024). Promising biorefinery products from marine macro and microalgal biomass: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 190, 114081.

Nigam, P. S., & Singh, A. (2011). Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in energy and combustion science*, 37(1), 52-68.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. ‘Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse.’ *Bioresource Technology*, 74: 69-80, 2000.

Sabzi, E., Mohammadiazarm, H., & Salati, A. P. (2023). Synergistic effects of *Sargassum vulgare* extract and lipid levels on growth performance, blood biochemical indices, immunological competence, and antioxidant capacity in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Reports*, 33, 101829.

Silva, T. P., de Albuquerque, F. S., Nascimento Ferreira, A., Santos, D. M. R. C. D., Santos, T. V. D., Meneghetti, S. M. P., ... & Pereira, H. J. V. (2023). Dilute acid pretreatment for enhancing the enzymatic saccharification of agroresidues using a *Botrytis ricini* endoglucanase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70(1), 184-192.

Singh A, Singhanian RR, Soam S, Chen C-W, Haldar D, Varjani S, et al. Production of bioethanol from food waste: status and perspectives. *Bioresour Technol* 2022: 127651.

Tavares, MP, Morgan, T., Gomes, RF, Mendes, JPR, Castro-Borges, W., Maitan-Alfenas, GP, & Guimarães, VM (2024). Análise comparativa de exoproteomas de *Chrysosporthe cubensis* e sua especificidade para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. *Enzyme and Microbial Technology*, 173, 110365.

Tripathi AD, Mishra R, Maurya KK, Singh RB, Wilson DW. Estimates for world population and global food availability for global health. The role of functional food security in global health. Elsevier; 2019. p. 3–24.

TOQUERO, C., BOLADO, S., Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource Technology*, v.157, p.68–76, 2014.

Qarri, A., & Israel, A. (2020). Seasonal biomass production, fermentable saccharification and potential ethanol yields in the marine macroalga *Ulva* sp.(Chlorophyta). *Renewable Energy*, 145, 2101-2107.

Uma Maheswari, R., Mavukkandy, M.O., Adhikari, U., Naddeo, V., Sikder, J., Arafat, H. A., 2020. Synergistic effect of humic acid on alkali pretreatment of sugarcane bagasse for the recovery of lignin with phenomenal properties. *Biomass. Bioenerg.* 134, 105486

Veza I, Hoang AT, Abbas MM, Tamaldin N, Idris M, Djamari DW, et al. Microalgae and macroalgae for third-generation bioethanol production. *Liquid biofuels. Bioethanol: Springer*; 2022. p. 301–31.

Wei, CJ, & Cheng, CY (1985). Efeito do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio nas características estruturais e na hidrólise enzimática da palha de arroz. *Biotecnologia e bioengenharia* , 27 (10), 1418-1426.

Seção 5
Conclusão
Perspectivas futuras
Anexos

5.1 Conclusão geral

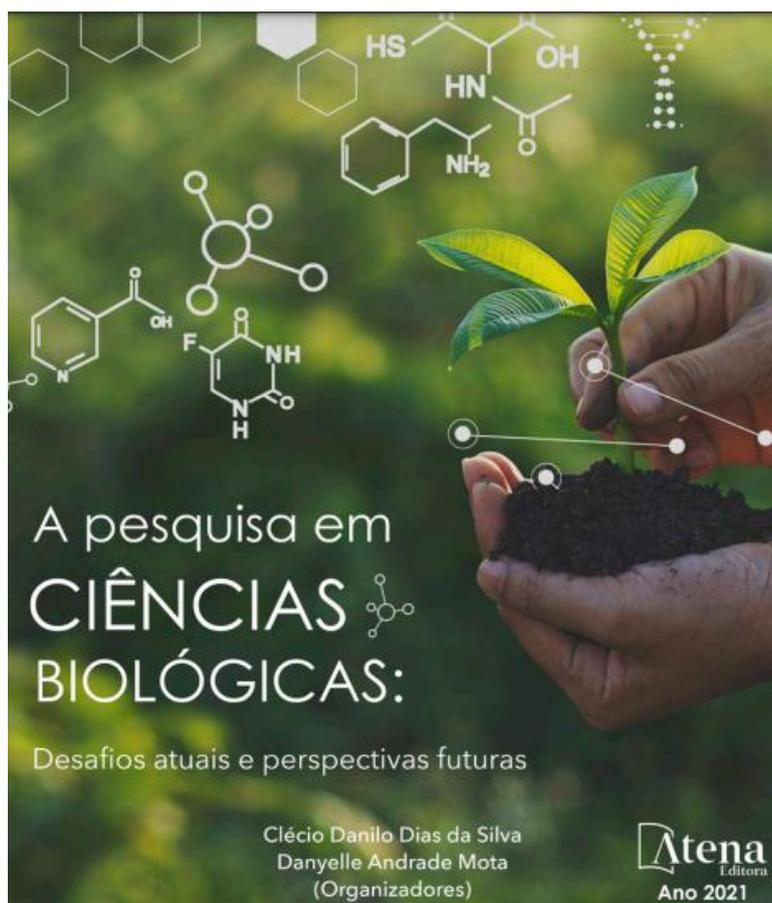
- ✓ O fungo filamentoso *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 foi capaz de produzir a enzima endoglucanase em diferentes resíduos;
- ✓ A FES foi efetiva na produção do extrato enzimático contendo endoglucanase;
- ✓ O farelo de trigo foi o resíduo mais promissor para produção da enzima endoglucase;
- ✓ O farelo de trigo foi o resíduo que mais produziu açúcares redutor utilizando o extrato enzimático;
- ✓ O extrato enzimático apresentou características bioquímicas importantes para o uso do extrato enzimático contendo endoglucanases como halotolerante, termoestável e estável em diferentes pHs;
- ✓ A imobilização do extrato enzimático em carvoes orgânicos foi efetiva.
- ✓ O extrato enzimático contendo endoglucanase foi capaz de sacarificar diferentes resíduos industriais in natura e após pré- tratamentos ácido produzindo açúcares fermentáveis

5.2 Perspectivas

- ✓ Utilizar os açúcares fermentáveis produzidos para a obtenção de etanol 2G.

5.3 Anexos

5.3.1 Capítulo de livro publicado



CAPÍTULO 1

APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA ENZIMA ENDOGLUCANASE MICROBIANA

Data de aceite: 21/09/2021

Marta Maria Oliveira dos Santos Gomes
Universidade Federal de Alagoas, Programa de
Pós Graduação em Química e
Biotecnologia, Maceió - Alagoas
<http://lattes.cnpq.br/5925280745485828>

Dávida Maria Ribeiro Cardoso dos Santos
Universidade Federal de Alagoas, Programa
de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia
Molecular, Maceió - Alagoas
<http://lattes.cnpq.br/8548200518407877>

Monizy da Costa Silva
Universidade Federal de Alagoas, Programa de
Pós Graduação em Química e
Biotecnologia, Maceió - Alagoas
<http://lattes.cnpq.br/0669155596988540>

Hugo Juarez Vieira Perelra

Universidade Federal de Alagoas, Programa de
Pós Graduação em Química e
Biotecnologia, Maceió - Alagoas
<http://lattes.cnpq.br/3682743268696668>

RESUMO: As endoglucanases pertencem ao grupo das celulasas, enzimas pertencentes a classe das hidrolases. Essas enzimas estão diretamente envolvidas na degradação da parede celular vegetal, e possuem uma vasta aplicação em diversos segmentos industriais. Neste contexto, o presente trabalho objetivou relatar os possíveis meios de obtenção microbianos, características e as principais aplicações nos segmentos industriais. A FES tem demonstrado ser o meio de obtenção mais promissor devido ao reduzido custo e o aproveitamento de