

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –  
CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR:  
DETERMINAÇÃO DE FAIXAS DE pH E TEMPERATURA ÓTIMAS PARA  
ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS NÃO  
PURIFICADOS**

Aluno: João Pedro Lopes do Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy

Coorientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Rio Verde – GO

Fevereiro – 2017

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO –  
CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR:  
DETERMINAÇÃO DE FAIXAS DE pH E TEMPERATURA ÓTIMAS PARA  
ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS NÃO  
PURIFICADOS**

Aluno: João Pedro Lopes do Nascimento

Orientador: Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy

Coorientador: Dr. Carlos Frederico de Souza Castro

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Agroquímica Orgânica.

Rio Verde – GO

Fevereiro – 2017


INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA


**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR: DETERMINAÇÃO DE FAIXAS  
DE PH E TEMPERATURA ÓTIMAS PARA ATIVIDADE  
CELULOLÍTICA DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS NÃO  
PURIFICADOS**


Autor: João Pedro Lopes do Nascimento  
Orientador: Fábio Henrique Dyszy

*TITULAÇÃO:* Mestre em Agroquímica – Área de concentração  
Agroquímica.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2017.

  
Prof. Dr. Lucas Anjos de Souza  
*Avaliador externo*  
IF Goiano/RV

  
Prof. Dr. Bruno Eduardo Lobo  
Baêta  
*Avaliador externo*  
UFOP

  
Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

Lopes do Nascimento, João Pedro  
N244h Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar:  
Determinação de faixas de pH e temperatura ótimas para atividade  
celulolítica de extratos enzimáticos não purificados / João Pedro  
Lopes do Nascimento. Rio Verde. – 2017.  
48f.

Dissertação (Mestrado), Instituto Federal Goiano – Rio Verde,  
2017.

Orientador: Dr. Fábio Henrique Dyszy.

#### Bibliografia

1. *Paecilomyces parvisporus*. 2. *Aspergillus fumigatus*. 3.  
Etanol de segunda geração. 4. MSR. I. Título. 660

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, principalmente à minha mãe e ao meu pai, por cuidar de mim quando eu ainda não tinha como caminhar com meus próprios pés e à minha irmã, por ser minha melhor amiga.

Aos meus amigos, sem exceção, mas com destaque ao Suair Júnior, e às minhas companheiras nessa batalha, Danielle Maria (Dona Maria, ou Milhopam) e Daniela Macedo (Macedão, também conhecida como Missanguinha, da dupla Milhopam e Missanguinha), meus professores e toda equipe do PPGAq do IFGoiano – Rio Verde.

Ao professor Dr. Carlos Frederico de Souza Castro, por ter dado a oportunidade na iniciação científica durante minha graduação e ao meu orientador, Dr. Fábio Henrique Dyszy, por ter aceitado a minha orientação no mestrado e ter ajudado concluir este trabalho.

Aos meus companheiros dos laboratórios QuiTec (IFGoiano) e Enzimologia (UnB), por todo aprendizado que compartilhamos. E a Andreza, por fazer esse *link* e por mesmo estando tão distante se manter presente.

À Vida.

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

JOÃO PEDRO LOPES DO NASCIMENTO, filho de Jaina Lopes da Silva e Valdivino Candido do Nascimento, nasceu dia 21 de junho de 1993, na cidade de Santa Helena de Goiás, Goiás, GO.

No ano de 2011, ingressou no curso de Licenciatura de Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás – Campus Rio Verde, graduando em março de 2015, no mesmo mês iniciou no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, no mesmo Instituto, sob a orientação do Professor Dr. Fábio Henrique Dyszy.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>IV</b>
<b>BIOGRAFIA DO AUTOR.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
3. OBJETIVOS .....	8
2.1    Objetivo geral.....	8
2.2    Objetivos específicos.....	8
<b>DETERMINAÇÃO DE FAIXAS DE PH E TEMPERATURA ÓTIMAS PARA ATIVIDADE CELULOLÍTICA DE EXTRATOS ENZIMÁTICOS NÃO PURIFICADOS DE <i>P. PARVISPORUS</i> E <i>A. FUMIGATUS</i> E SUA APLICAÇÃO NA PSSF DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....</b>	<b>9</b>
ABSTRACT.....	9
RESUMO .....	10
1. <i>Introdução</i> .....	10
2. <i>Materiais e métodos</i> .....	13
2.1    Desenho e experimental e análise estatística .....	13
2.2    Microrganismos.....	15
2.3    Produção do Extrato Enzimático Bruto .....	15
2.4    Determinação das atividades celulolíticas .....	15
2.5    Hidrólise enzimática e fermentação.....	16
2.6    Quantificação de Glicose.....	16
2.7    Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar .....	16
2.8    Quantificação de etanol .....	17
3. <i>Resultados e discussão</i> .....	17
4. <i>Conclusões</i> .....	31
5. <i>Referências Bibliográficas</i> .....	32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pontos experimentais para o planejamento composto central (CALADO; MONTGOMERY, 2003).....	14
<b>Figura 2:</b> Gráfico de probabilidade normal dos resíduos ( <i>a,d</i> ); resíduos contra valores ajustados ( <i>b,e</i> ); resíduos contra ordem ( <i>c,f</i> ) para os EB de <i>P. parvisporus</i> ( <i>a, b e c</i> ) e <i>A. fumigatus</i> ( <i>d, eef</i> ). .....	22
<b>Figura 3:</b> RSM e gráfico de contorno de ART liberados pelo EB de <i>P. parvisporus</i> frente à variações de pH e temperatura. ....	23
<b>Figura 4:</b> RSM e gráfico de contorno de ART liberados pelo EB de <i>A. fumigatus</i> frente à variações de pH e temperatura. ....	23
<b>Figura 5.</b> Gráfico de otimização para condições ótimas de reação para <i>P. parvisporus</i> (acima) e <i>A. fumigatus</i> (abaixo). .....	24
<b>Figura 6:</b> Curva de pH ótimo para a atividade de uma enzima (preto) O pH que se obtem $V_{max}$ é o pH ótimo. A área verde mostra a faixa fisiológica. A linha vermelha mostra uma curva de estabilidade de pH mais ampla da enzima (BISSWANGER, 2014). .....	25
<b>Figura 7.</b> Curva-padrão de glicose obtida pelo método de detecção de açúcares redutores totais utilizando DNS. ....	26
<b>Figura 8:</b> Perfil da liberação e consumo de Glicose em 96 horas de PSSF utilizando EB de <i>P. parvisporus</i> . .....	27
<b>Figura 9.</b> Perfil da liberação e consumo de Glicose em 96 horas de PSSF utilizando EB de <i>A. fumigatus</i> . .....	27
<b>Figura 10:</b> Curva-padrão de etanol obtida através da reação com dicromato de potássio em meio ácido (BENNETT, 1971). .....	29



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Desenho experimental e respostas da RSM para as variáveis dependentes e independentes.....	18
<b>Tabela 2:</b> Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo EB de <i>P. parvisporus</i> frente à variações de pH e temperatura.....	19
<b>Tabela 3:</b> Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo EB de <i>A. fumigatus</i> frente à variações de pH e temperatura. ....	19
<b>Tabela 4:</b> Análise de variância estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de <i>P. parvisporus</i> frente à variações de pH e temperatura.....	20
<b>Tabela 5:</b> Análise de variância estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de <i>A. fumigatus</i> frente à variações de pH e temperatura. ....	20
<b>Tabela 6:</b> Configurações ótimas de pH e temperatura (°C) que maximizam a obtenção de ARTs a partir da hidrólise de material lignocelulósico pelos EB de <i>P. parvisporus</i> e <i>A. fumigatus</i> .....	24
<b>Tabela 7:</b> Atividade enzimática (U.mL <sup>-1</sup> ) obtida pelos EB de <i>P. parvisporuse</i> e <i>A. fumigatus</i> na degradação de papel Whatman nº 1. ....	26
<b>Tabela 8:</b> Concentração de etanol (g.L <sup>-1</sup> ) após a PSSF com uso dos EB de <i>P. Parvisporus</i> e <i>A. fumigatus</i> . ....	29
<b>Tabela 9:</b> Composição química (%) do bagaço de cana-de-açúcar. ....	30
<b>Tabela 10:</b> Eficiência na fermentação.....	30

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

$\mu\text{mol}$  – micromol

ANOVA – análise de variância

ART (s) – açúcar (es) redutor (es) total (is)

CCD – *central composite design* (delineamento central composto)

CMC - carboximetilcelulose

DNS – ácido dinitrosalicílico

EB – extrato bruto

EC – *enzyme commission numbers* (número de classificação para enzimas segunda a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)

FPase – *filter paper activity* (atividade de papel filtro)

PCC – planejamento central composto

pH – potencial hidrogeniônico

PSSF – *prehydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation* (pré-sacarificação seguida de sacarificação e fermentação simultâneas)

RSM – *response surface methodology* (metodologia de superfície de resposta)

spp. – espécies

Temp. – temperatura

## RESUMO

A produção de biocombustíveis a partir de lignocelulose requer mais etapas quando comparada à obtenção de biocombustíveis a partir do milho ou da cana-de-açúcar, devido a recalcitrância do material. Os processos são complexos, caros, pouco eficientes e apresentam diferentes obstáculos referentes à viabilidade econômica, principalmente no que diz respeito ao alto custo de produção de enzimas e a necessidade de dosagens elevadas na sacarificação da biomassa. Uma das possíveis maneiras de minimizar os custos é utilizar extratos enzimáticos não purificados, sejam eles combinados com coquetéis comerciais ou não. Neste trabalho utilizou-se o método de superfície de resposta (RSM) baseado em um Delineamento Composto Central (CCD) a fim de se identificar faixas ótimas de pH e temperatura para atividade de extratos enzimáticos de *Paecilomyces parvisporus* e *Aspergillus fumigatus* concomitantemente com a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. A maquinaria enzimática de *A. fumigatus* mostrou-se menos sensível a inibição por substrato, mas ambos os microorganismos mostraram-se capazes de degradar o material lignocelulósico, fornecendo monossacarídeos para a fermentação em etanol. A técnica de pré-sacarificação seguida de sacarificação simultânea à fermentação (PSSF) mostrou-se eficaz, muito embora seja necessário contornar a presença de lignina no material. A PSSF utilizando extratos enzimáticos não purificados é uma alternativa viável na produção de etanol de segunda geração, evitando a geração de resíduos e consumindo um material que seria rejeitado. As configurações ótimas para EB de *P. parvisporus* e *A. fumigatus* foram pH 5,46 e 62,1 °C e pH 4,89 e 56,4 °C. Fazendo uso das configurações ótimas foi realizada a PSSF, e, ao fim, obteve-se a eficiência fermentativa de 18 e 42 por cento para *P. parvisporus* e *A. fumigatus*, respectivamente.

NASCIMENTO, JOÃO PEDRO LOPES DO. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, fevereiro de 2017. **Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar: determinação de faixas de pH e temperatura ótimas para atividade celulolítica de extratos enzimáticos não purificados.** Orientador: Dr. Fábio Henrique Dyszy  
Coorientador: Dr. Carlos Frederico de Souza.

**Palavras-chave:** *Paecilomyces parvisporus*; *Aspergillus fumigatus*; etanol de segunda geração.

## ABSTRACT

The production of biofuels from lignocelluloses requires more steps when compared to that obtained from corn or sugarcane, due to the recalcitrance of the raw material. The processes involved are complex, expensive, inefficient and show different obstacles related to economic viability, especially with regard to the high cost of producing enzymes and the need for high concentrations of these enzymes in saccharification of lignocellulosic biomass. An alternative, in order to minimize costs, is to employ unpurified enzyme complexes, combined or not with commercial enzymes. In this work, response surface method (RSM) based on a Central Composite Design (CCD) was used in order to determine the optimum range for pH and temperature for FPase activity of enzymatic extracts from *Paecilomyces parvisporus* and *Aspergillus fumigatus* concomitantly with fermentation mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. The enzymatic machinery of *A. fumigatus* was shown to be less sensitive to substrate inhibition, but both microorganisms were able to degrade the lignocellulosic material, providing monosaccharides in order to obtain ethanol. The simultaneous saccharification and fermentation (SSF) technique proved to be efficient, although it is necessary to avoid the presence of lignin in the raw material. The SSF using unpurified enzymatic extracts is a viable alternative in obtaining second-generation biofuels, avoiding the production of residues and consuming a material that would be rejected. The optimal configurations for EB of *P. parvisporus* and *A. fumigatus* were pH 5.46 and 62.1 °C and pH 4.89 and 56.4 °C, respectively. Using the optimal configurations, the PSSF was carried out, where, at the end of the experiment, a fermentative efficiency of 18 and 42 percent were obtained for *P. parvisporus* and *A. fumigatus*, respectively.

NASCIMENTO, JOÃO PEDRO LOPES DO. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, February, 2017. **Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: determination of optimal pH and temperature ranges for cellulolytic activity of unpurified enzyme extracts.** Advisor: Fábio Henrique Dyszy, Ph.D. Co-advisor: Carlos Frederico de Souza, Ph.D.

**Key words:** *Paecilomyces parvisporus*; *Aspergillus fumigatus*; second-generation biofuels.

## 1. INTRODUÇÃO

A fim de melhorar a segurança energética e minimizar a emissão de gases do efeito estufa, muitos governos vêm sendo obrigados a buscar alternativas aos combustíveis derivados do petróleo (CHANG; HWANG; WU, 2017). Isso gerou interesse na produção de energia a partir de biomassa. Dentro desse contexto, combustíveis líquidos como o etanol tem se destacado como fonte energética interessante. O chamado etanol de primeira geração é obtido pela fermentação de açúcares extraídos principalmente de cana-de-açúcar, milho ou beterraba, entre outras fontes (OGEDA; LUCYI; PETRI, 2010). Entretanto, o etanol de primeira geração pode futuramente ocorrer numa conjuntura que configure competição entre produção de bioenergia ou alimentação (CHANG; HWANG; WU, 2017; GONÇALVES; SANJINEZ-ARGANDOÑA; GRACIANO FONSECA, 2011; VALDEZ-VAZQUEZ; DEL ROSARIO SÁNCHEZ GASTELUM; ESCALANTE, 2017). Uma possível opção consiste na produção de etanol celulósico a partir do aproveitamento de vegetais cultivados em locais inóspitos e resíduos agroindustriais e urbanos de origem vegetal, permitindo elevada abrangência geográfica, aumento significativo na oferta de energia limpa e aumento na produção de etanol sem a necessidade de expansão no uso de terras agricultáveis (CHANG; HWANG; WU, 2017; GONÇALVES; SANJINEZ-ARGANDOÑA; GRACIANO FONSECA, 2011).

O Brasil produziu aproximadamente 736 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra de 2016 (IBGE, 2016), com cerca de 9 milhões hectares de área cultivada (CONAB, 2016). O bagaço, assim, é um recurso a ser explorado também na produção de bioetanol, contribuindo na diversificação da matriz energética.

Apesar de amplamente estudada, a produção de biocombustíveis a partir de lignocelulose é mais difícil do que a partir de amido de milho ou do caldo da cana-de-açúcar, a conversão de lignocelulose em açúcares mais simples para posterior fermentação em bioetanol é recalcitrante, e os processos são complexos e dispendiosos (COUTURIER; BERRIN, 2013; LEE *et al.*, 2014). Os processos de conversão de lignocelulose em etanol consistem em três etapas principais: pré-tratamento de matérias-primas, hidrólise enzimática e fermentação (CHANG; HWANG; WU, 2017), sendo os dois primeiros os principais problemas associados à produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (MARGARITA *et al.*, 2015).

O complexo lignocelulósico é composto principalmente por uma matriz de carboidratos contendo celulose e polímeros de lignina ligados por cadeias de hemicelulose (CHANG; HWANG; WU, 2017; MARGARITA *et al.*, 2015), e tem como objetivo desestruturar a matriz para diminuir o grau de cristalinidade da celulose e aumentar o percentual de celulose amorfa, que é o mais adequado para o ataque enzimático subsequente (MARGARITA *et al.*, 2015).

O alto custo de produção de enzimas e a necessidade de dosagens elevadas na sacarificação da biomassa são os principais obstáculos para tornar a produção de etanol lignocelulósico viável economicamente (MENON; RAO, 2012). Com a melhoria na eficiência catalítica das enzimas, observa-se redução no custo da hidrólise, permitindo menores dosagens. Embora os métodos de hidrólise ácida tenham uma história industrial mais longa, a hidrólise enzimática é vista como um método economicamente mais promissor (KEEFE *et al.*, 2014).

A hidrólise completa dos substratos lignocelulósicos a açúcares monoméricos é dependente da disponibilidade de um consórcio de diferentes enzimas produzidas por micro-organismos em crescimento, que influencia diretamente na viabilidade industrial dos processos de bioconversão. Tal consórcio enzimático inclui enzimas ligninases, celulasas e hemicelulasas (SREEDHARAN *et al.*, 2016).

A produção de celulasas em escala industrial começou em meados da década de 1980, visando sua aplicação como aditivo para ração animal. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como insumo para a indústria de alimentos. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas indústrias têxtil, indústria de polpa e papel e lavanderias (COELHO; RIBEIRO; SALGADO, 2008; TOLAN; FOODY, 1999). Já na década de 1990, as celulasas, juntamente com as hemicelulasas, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

É difundido que para degradação de celulose em monômeros de glicose são necessários ao menos três tipos de celulasas: exo-1,4- $\beta$ -glucanases, EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176 (celobiohidrolase), endo-1,4- $\beta$ -glucanases, EC 3.2.1.4 e  $\beta$ -glucosidases, EC 3.2.1.21 (cellobiases). Celobiohidrolases e exoglucanases atacam as extremidades de cadeias de celulose e liberam celbiose dos terminais das cadeias de celulose. As endoglucanases agem aleatoriamente na região amorfa das fibrilas (interna) por clivagem

de ligações  $\beta$ -glucosídicas nas cadeias de celulose a fim reduzir o grau de polimerização, enquanto as  $\beta$ -glucosidases completam o processo de degradação hidrolisando a celobiose e outras celodextrinas (SREEDHARAN *et al.*, 2016; VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

As enzimas celulolíticas são produzidas por grande variedade de bactérias e fungos, aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos (ZOGLOWEK *et al.*, 2015). Num contexto de produção como único produto, fungos aeróbios são preferidos em relação às bactérias anaeróbias, as celulases disponibilizadas extracelularmente pelos fungos são, por natureza, adaptáveis e normalmente secretadas em grandes quantidades durante o crescimento (VAN DYK; PLETSCHE, 2012). Os estudos mais detalhados têm sido sobre os sistemas de enzimas celulolíticas de fungos aeróbios como *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Penicillium pinophilium*, *Sporotrichum pulverulentum* e *Fusarium solani* (MCKELVEY; MURPHY, 2011). Membros dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Mucor* também foram exploradas para a melhoria da produção de etanol a partir de biomassa (HASUNUMA *et al.*, 2013). Os fungos filamentosos são capazes de degradar celulose, hemicelulose e lignina através de um conjunto de enzimas hidrolíticas e oxidativas, como celulases, hemicelulases e ligninases (ZOGLOWEK *et al.*, 2015).

Fungos do gênero *Aspergillus spp.* São utilizados na produção de coquetéis de enzimas celulolíticas, ou como hospedeiros para a expressão heteróloga de enzimas nativas ou manipuladas (ZOGLOWEK *et al.*, 2015), enquanto exemplares de *Paecilomyces spp.* isolados de fontes lignocelulósicas apresentaram capacidade de produção de enzimas celulolíticas (BASSO; GALLO; BASSO, 2010). Até o momento há poucos relatos científicos sobre o *Paecilomyces parvisporus* (LOPES *et al.*, 2016).

Apesar das vantagens no uso de enzimas em processos industriais, algumas desvantagens são observadas, como a sensibilidade das enzimas a variações de pH e temperatura (MONTEIRO; SILVA, 2009). O efeito do pH na atividade das enzimas se dá pelo fato delas serem formadas por aminoácidos, que podem sofrer ionizações que resultam em protonações e desprotonações, promovendo alterações conformacionais na estrutura terciária da enzima. Já a temperatura influencia a atividade enzimática no sentido de aumentar a energia cinética das moléculas e conseqüentemente aumentar a probabilidade de encontro entre a enzima e o substrato. Porém, altas temperaturas levam a maioria das enzimas a sofrer mudanças conformacionais devido ao rompimento de

ligações de hidrogênio, em um processo denominado de desnaturação que, para a maioria das enzimas, é um processo irreversível. Cada enzima possui um valor ótimo de pH e temperatura, nos quais a atividade da enzima é máxima (MONTEIRO; SILVA, 2009). A partir destas preposições, nota-se a necessidade de otimização para a aplicação de enzimas isoladas ou compostos enzimáticos.

Tradicionalmente, a otimização em química analítica era realizada por monitoramento da influência de uma variável de cada vez sobre uma resposta experimental, isto é, quando um parâmetro era alterado, os demais eram mantidos constantes. Essa técnica de otimização é chamada de otimização de um fator (*one-variable-at-a-time*). Sua principal desvantagem é que ele não inclui os efeitos interativos entre as variáveis estudadas. Como consequência, esta técnica não descreve os efeitos completos dos parâmetros nas respostas. Outra desvantagem da otimização de um fator é o aumento do número de experiências necessárias para realizar a pesquisa, levando ao aumento do tempo e despesas, bem como o aumento no consumo de reagentes e materiais. De modo a ultrapassar este problema, a otimização dos processos de análise é executada usando técnicas estatísticas multivariadas. Entre as técnicas de análise multivariada utilizadas na otimização analítica, encontra-se a metodologia de superfície de resposta (RSM, *Response Surface Methodology*).

MSR é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas com base no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, que devem descrever o comportamento de um conjunto com o objetivo de fazer previsões estatísticas de dados. Pode ser também aplicada quando uma resposta ou um conjunto de respostas de interesse são influenciados por diversas variáveis. O objetivo é otimizar simultaneamente os níveis destas variáveis para alcançar o melhor desempenho do sistema (BEZERRA *et al.*, 2008).

Há estudos avaliando a combinação entre coquetéis enzimáticos comerciais e complexos enzimáticos não purificados a fim de se aumentar a eficiência na hidrólise enzimática (BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015; MAEDA *et al.*, 2011; PENGILLY *et al.*, 2015). Contudo, pouco se pesquisa sobre a otimização das condições de aplicação dos complexos enzimáticos não purificados. Ao compreender o complexo celulolítico de enzimas brutas aplicadas na hidrólise é possível obter impacto significativo no custo de produção, que aumenta substancialmente quando se faz uso da combinação diferentes enzimas parcialmente/completamente purificadas, como no caso de enzimas comerciais



(SRIVASTAVA *et al.*, 2015). Neste contexto, objetivou-se com este trabalho a determinação de faixas de pH e temperatura ótimos para atividade celulolítica de extratos enzimáticos não purificados a fim de utilizá-los na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Foram utilizados microrganismos das espécies *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces parvisporus* para a produção destes extratos enzimáticos.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO, L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1282–1289, nov. 2010.

BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. DA. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, 2015.

CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CHANG, W.-R.; HWANG, J.-J.; WU, W. Environmental impact and sustainability study on biofuels for transportation applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 67, p. 277–288, 2017.

COELHO, M. A. Z.; RIBEIRO, B. D.; SALGADO, A. M. **Tecnologia Enzimática**. 1. ed. Rio de Janeiro: EPUB editora, 2008.

CONAB, C. N. DE A. Acompanhamento da Safra de Cana-de-açúcar 2016. **Companhia Nacional de Abastecimento**, p. 66, 2016.

COUTURIER, M.; BERRIN, J.-G. The Saccharification Step: The Main Enzymatic Components. In: FARACO, V. (Ed.). *Lignocellulose Conversion*. [s.l: s.n.]. p. 93–110.

ERICKSON, B.; NELSON; WINTERS, P. Perspective on opportunities in industrial

biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology Journal**, v. 7, n. 2, p. 176–185, 2012.

GONÇALVES, F. A.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; GRACIANO FONSECA, G. Utilization of Agro-Industrial Residues and Municipal Waste of Plant Origin for Cellulosic Ethanol Production. **Journal of Environmental Protection**, v. 2, n. 10, p. 1303–1309, 2011.

HASUNUMA, T. *et al.* A review of enzymes and microbes for lignocellulosic biorefinery and the possibility of their application to consolidated bioprocessing technology. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 513–522, 2013.

IBGE - Produção - Brasil, 2016. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/imprimir/imprprevsaf.asp?t=1&u=1> Acessado dia 28 de Setembro de 2016.

KEEFE, R. *et al.* Woody biomass logistics In: KARLEN, D. L. **Cellulosic Energy Cropping Systems**. p. 251-279, 2014

LEE, D. S. *et al.* Rapid saccharification for production of cellulosic biofuels. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 239–247, 2014.

LOPES, A. *et al.* Primeiro relato da ocorrência dos fungos Paecilomyces: P. formosus, P. saturatus e P. parvisporus no Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n. 4, 2017.

MAEDA, R. N. *et al.* Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using Penicillium funiculosum and Trichoderma harzianum cellulases. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1196–1201, 2011.

MARGARITA, Z.-D. C. L. *et al.* Potencialidades del bagazo para la obtención de etanol frente a la generación de electricidad. **Ingeniería, Investigación y Tecnología**, v. 16, n. 3, p. 407–418, 2015.

MCKELVEY, S. M.; MURPHY, R. A. Biotechnological Use of Fungal Enzymes. In: KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and Applications**. 2. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. p. 179–203.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n.

4, p. 522–550, 2012.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. D. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, p. 9–23, 2009.

OGEDA, T.; LUCYI, D. F. S.; PETRI. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

PENGILLY, C. *et al.* Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated sweet sorghum bagasse by combinations of cellulase and endo-xylanase. **Fuel**, v. 154, p. 352–360, 2015.

SREEDHARAN, S. *et al.* An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016.

SRIVASTAVA, N. *et al.* Improved production of reducing sugars from rice straw using crude cellulase activated with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Alginate nanocomposite. **Bioresource Technology**, v. 183, p. 262–266, 2015.

TOLAN, J. S.; FOODY, B. Cellulase from Submerged Fermentation. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1999. p. 41–67.

VALDEZ-VAZQUEZ, I.; DEL ROSARIO SÁNCHEZ GASTELUM, C.; ESCALANTE, A. E. Proposal for a sustainability evaluation framework for bioenergy production systems using the MESMIS methodology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 68, n. August 2016, p. 360–369, 2017.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

ZOGLOWEK, M. *et al.* Heterologous expression of cellobiohydrolases in filamentous fungi - An update on the current challenges, achievements and perspectives. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 211–220, 2015.

### **3. OBJETIVOS**

#### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar a influência combinada de pH e temperatura na atividade celulolítica de extratos enzimáticos não purificados produzidos na fermentação submersa de bagaço de cana-de-açúcar e aplicar os resultados obtidos da hidrólise e fermentação simultânea do bagaço.

#### **2.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar o substrato a ser utilizado na produção de celulases e que será submetido à hidrólise enzimática;
- Produzir extratos enzimáticos a partir da fermentação submersa de bagaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar a atividade enzimática de FPase (do inglês *Filter Paper Activity*, atividade celulolítica na atuação sinérgica de exoglucanases e endoglucanases na degradação de papel filtro Whatman nº1) quanto a dependência do pH e da temperatura do meio reacional utilizando a metodologia de superfície de resposta;
- Otimizar o processo de hidrólise utilizando extratos enzimáticos não purificados.

## **Determinação de faixas de pH e temperatura ótimas para atividade celulolítica de extratos enzimáticos não purificados de *P. parvisporus* e *A. fumigatus* e sua aplicação na PSSF de bagaço de cana-de-açúcar.**

### **Abstract**

The production of biofuels from lignocelluloses requires more steps when compared to that obtained from corn or sugarcane, due to recalcitrance of the raw material. The processes involved are complex, expensive, inefficient and show different obstacles related to economic viability, especially with regard to the high cost of producing enzymes and the need for high concentrations of these enzymes in saccharification of lignocellulosic biomass. An alternative, in order to minimize costs, is to employ unpurified enzyme complexes, combined or not with commercial enzymes. In this work, response surface method (RSM) based on a Central Composite Design (CCD) was used in order to determine the optimum pH and temperature for FPase activity of enzymatic extracts from *Paecilomyces parvisporus* and *Aspergillus fumigatus* concomitantly with fermentation mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. The enzymatic machinery of *A. fumigatus* was shown to be less sensitive to substrate inhibition, but both microorganisms were able to degrade the lignocellulosic material, providing monosaccharides in order to obtain ethanol. The simultaneous saccharification and fermentation (SSF) technique proved to be efficient, although it is necessary to avoid the presence of lignin in the raw material. The SSF using unpurified enzymatic extracts is a viable alternative in obtaining second-generation biofuels, avoiding the production of residues and consuming a material that would be rejected. Using the optimum configurations, the PSSF was carried out, where, finally, a fermentation efficiency of 18 and 42 percent was obtained for *P. parvisporus* and *A. fumigatus*, respectively.

## Resumo

A produção de biocombustíveis a partir de lignocelulose requer mais etapas quando comparada à obtenção de biocombustíveis a partir do milho ou da cana-de-açúcar, devido a recalcitrância do material. Os processos são complexos, caros, pouco eficientes e apresentam diferentes obstáculos referentes à viabilidade econômica, principalmente no que diz respeito ao alto custo de produção de enzimas e a necessidade de dosagens elevadas na sacarificação da biomassa. Uma das possíveis maneiras de minimizar os custos é utilizar extratos enzimáticos não purificados, sejam eles combinados com coquetéis comerciais ou não. Neste trabalho utilizou-se o método de superfície de resposta (RSM) baseado em um Delineamento Composto Central (CCD) a fim de se identificar faixas ótimas de pH e temperatura para atividade FPásica de extratos enzimáticos de *Paecilomyces parvisporus* e *Aspergillus fumigatus* concomitantemente com a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. A maquinaria enzimática de *A. fumigatus* mostrou-se menos sensível a inibição por substrato, mas ambos os microrganismos mostraram-se capazes de degradar o material lignocelulósico, fornecendo monossacarídeos para a fermentação em etanol. A técnica de sacarificação simultânea à fermentação (SSF) mostrou-se eficaz, muito embora seja necessário contornar a presença de lignina no material. A SSF utilizando extratos enzimáticos não purificados é uma alternativa viável na produção de etanol de segunda geração, evitando a geração de resíduos e consumindo material que seria rejeitado. As configurações ótimas para EB de *P. parvisporus* e *A. fumigatus* foram pH 5,46 e 62,1 °C e pH 4,89 e 56,4 °C. Fazendo uso das configurações ótimas foi realizada a PSSF, e, ao fim obteve-se a eficiência fermentativa de 18 e 42 por cento para *P. parvisporus* e *A. fumigatus*, respectivamente.

## 1. Introdução

A biomassa lignocelulósica representa o maior recurso orgânico renovável da Terra e sua utilização não compete diretamente com o fornecimento de alimentos. Constituída basicamente de celulose, hemicelulose e lignina, é considerada de grande potencial para matéria-prima na produção de energia, novos materiais, produtos químicos, compostos específicos para a área biotecnológica e biocombustíveis (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; SANTOS *et al.*, 2010; WATANABE, 2013; LEE *et al.*, 2014; MENEZES; BARRETO, 2015;), fatos estes que a tornam um recurso decisivo para

a resolução dos problemas causados pelo rápido consumo de recursos fósseis (WATANABE, 2013). Motivados pela disponibilidade de bagaço de cana-de-açúcar, diversas instituições têm realizado pesquisas e estudos para seu aproveitamento na produção de etanol. Essas investigações envolvem estudos sobre as tecnologias de pré-tratamento, hidrólise de materiais lignocelulósicos, enzimas celulolíticas e o processo de fermentação de açúcares (BUSSAMRA, 2014).

Em geral, a utilização dos produtos renováveis de biomassa lignocelulósica requer três ou quatro passos. Em primeiro lugar, o pré-tratamento para remoção de lignina e outros materiais cerosos para expor a celulose; em seguida, a hidrólise da celulose a açúcares simples por celulases; e, finalmente, a fermentação do açúcar simples (GUNNY *et al.*, 2014). Pode-se ainda incluir nestas etapas a produção de celulases antes da hidrólise (CHEN, 2014).

A hidrólise utilizando enzimas celulolíticas requer condições brandas, com temperaturas em torno de 45 a 50 °C e pH 4,8, sem gerar subprodutos em virtude da alta especificidade das enzimas, tornando sua aplicação interessante do ponto de vista ecológico (*eco-friendly*) (CHEN, 2015; JUTURU; WU, 2014). Contudo, o alto custo de produção das enzimas e a necessidade de altas concentrações destas enzimas na sacarificação da biomassa são obstáculos para a viabilidade econômica da produção de etanol lignocelulósico (MENON; RAO, 2012).

De acordo com o grau de integração dos processos de produção de celulases, hidrólise enzimática e fermentação, eles podem ser divididos em quatro diferentes processos biológicos: fermentação separada da hidrólise (*separate hydrolysis and fermentation – SHF*), sacarificação e fermentação simultâneas (*simultaneous saccharification and fermentation – SSF*) e sacarificação e cofermentação (*simultaneous saccharification and cofermentation – SSCF*) e conversão microbiana direta (*direct microbial conversion – DMC*) (CHEN, 2014).

O método de SSF foi desenvolvido em 1970 a fim de se reduzir o custo do bioetanol. A hidrólise da celulose e a fermentação ocorrem no mesmo reator. A glicose gerada pela hidrólise da celulose é fermentada rapidamente pelos microrganismos, fato que diminui a inibição pelo produto observada no método SHF (CHEN, 2014). No entanto, uma grande desvantagem da SSF é o distanciamento entre a temperatura ideal das enzimas e a dos microrganismos fermentadores. A configuração de pré-sacarificação seguida de

sacarificação e fermentação simultâneas (*prehydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation* -PSSF) pode ser conduzida numa tentativa de resolver parcialmente esta desvantagem. Trata-se de uma breve hidrólise enzimática realizada à temperatura ótima seguida por um processo SSF conduzido a temperatura mais baixa para facilitar a conversão do açúcar em etanol (LÓPEZ-LINARES *et al.*, 2014).

As maiores expectativas para a viabilização do etanol celulósico no longo prazo estão depositadas na possibilidade de se utilizar a maquinaria bioquímica de fungos e bactérias para degradar a parede celular. Para chegar à celulose, que é o principal composto da parede celular, os fungos precisam hidrolisar as outras hemiceluloses que recobrem as microfibrilas e, para isto, são necessários verdadeiros arsenais enzimáticos, como celulases e outras hidrolases, sendo pertinente o estudo do poderio enzimático dos fungos, bem como das estruturas finas de enzimas hidrolíticas, para utilizá-las a nosso favor (OLIVEIRA *et al* 2014).

Os fungos filamentosos são capazes de degradar a celulose, hemicelulose e a lignina através de um conjunto de enzimas hidrolíticas e oxidativas como celulases, hemicelulases e ligninases (SOCCOL *et al.*, 2010). Os microrganismos *Paecilomyces parvisporus* e *Aspergillus fumigatus*, que foram utilizados neste estudo, pertencem ao filo Ascomycota, este é o maior filo no reino dos fungos e suas espécies são muito diversificadas quanto à morfologia e ecologia. São fungos degradadores de materiais orgânicos persistentes e desempenham papel importante no ciclo dos nutrientes (BEIMFORDE *et al.*, 2014), Houbraken e colaboradores (2011) apontaram a possibilidade do *Paecilomyces parvisporus* atuar como degradador de material lignocelulósico e Hargreaves (2008) afirma que dentre os principais fungos produtores de enzimas estão os dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*.

O efeito do pH na atividade das enzimas se dá pelo fato dessas serem cadeias polipeptídicas, que podem sofrer ionizações, alterando o estado de protonação e desprotonação das cadeias laterais dos aminoácidos, promovendo alterações conformacionais na estrutura terciária da enzima. Já a temperatura influencia a atividade enzimática no sentido de aumentar a energia cinética das moléculas e consequentemente aumentar a probabilidade de encontro entre a enzima e o substrato. Porém, a altas temperaturas a maioria das enzimas sofre mudanças conformacionais por causa do rompimento de ligações de hidrogênio, em um processo denominado de desnaturação que, para a maioria das enzimas, é um processo irreversível. Cada enzima possui um valor



ótimo de pH e temperatura, no qual a atividade da enzima é máxima (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Em termos de ciência aplicada, é bastante relevante obter enzimas otimizadas para aplicações em processos industriais (TURNER, 2003; WEE; TRAU, 2014), com o intuito tanto de baratear processos quanto de oferecer novas possibilidades à sociedade. Para determinar quais as configurações ótimas para a atividade enzimática técnicas estatísticas podem ser aplicadas.

A metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology* - RSM) é uma técnica estatística eficiente para a otimização de múltiplas variáveis experimentais, a fim de prever as melhores condições de desempenho com número mínimo de experiências de síntese. Esse número mínimo de experimentos é utilizado para a análise de regressão múltipla utilizando dados quantitativos (LIU *et al.*, 2014a).

Objetivou-se com este trabalho a aplicação de uma MSR na determinação de faixas de pH e temperatura ótimos para atividade celulolítica de extratos enzimáticos não purificados de *P. parvisporus* e *A. fumigatus* e utilizá-los na PSSF de bagaço de cana-de-açúcar na produção de etanol de segunda geração.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Desenho e experimental e análise estatística**

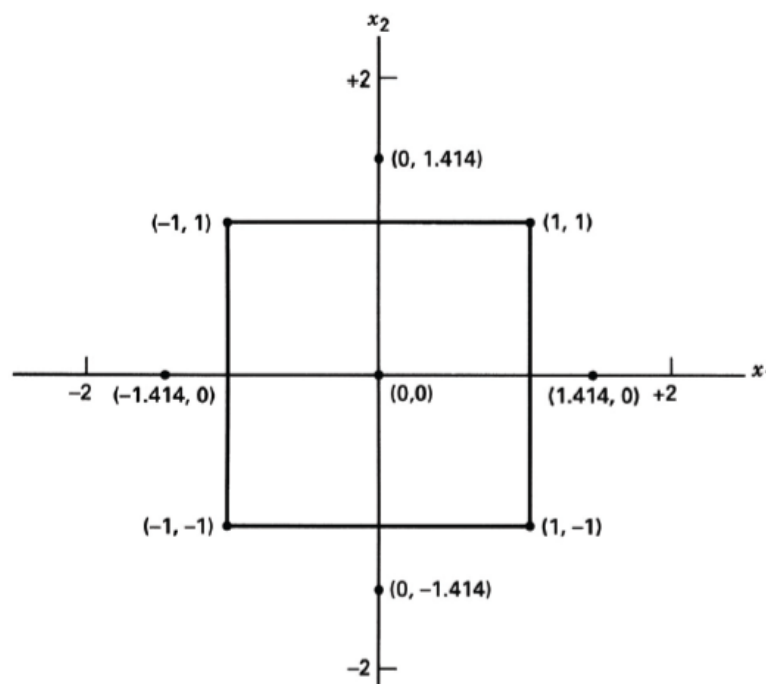
Foi utilizado o método de superfície de resposta (MSR) baseado em um Delineamento Composto Central (DCC) constituído de cinco níveis e duas variáveis, quatro pontos fatoriais, quatro pontos axiais e um ponto central. Os efeitos de cada variável e suas interações foram investigados usando o programa Minitab17. Os termos significativos no modelo foram encontrados por análise de variância (ANOVA) para cada resposta. Os efeitos interativos dos fatores foram observados utilizando gráficos de superfície de resposta.

A RSM foi aplicada para modelar a taxa de conversão de papel filtro Whatman nº1 em açúcares redutores totais (ART) por extratos enzimáticos brutos (EB), analisando dois parâmetros de reação: pH e temperatura do meio. Foi utilizado um Delineamento Composto Central (CCD) (ou Planejamento Composto Central).

O CCD consiste nas seguintes etapas: (1) um fatorial completo ou fatorial fracionário; (2) um design adicional, com a concepção de que os pontos experimentais estão a uma distância do seu centro e (3) um ponto central.

Os planejamentos centrais rotativos completamente uniformes possuem as seguintes características: (1) requerem um número de experiência de acordo com  $N = k^2 + 2k + c_p$ , em que  $k$  é o número de fatores e  $c_p$  é o número de repetições do ponto central; (2) o fator  $\alpha$  depende do número de variáveis e pode ser calculado por  $\alpha = 2^{(k-c_p)/4}$ . Para duas, três e quatro variáveis, são, respectivamente, 1,41, 1,68 e 2,00; (3) todos os fatores são estudados em cinco níveis  $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$  (BEZERRA *et al.*, 2008). Cada um desses valores é um código para um valor de variável original. A codificação dos níveis variáveis é uma transformação linear simples da escala de medição original de modo que o valor mais alto da variável original se torne +1 e o valor mais baixo se torna -1. Amédia destes dois valores é atribuído o valor 0, enquanto os valores de  $-\alpha$  e  $+\alpha$  são aplicados para encontrar os valores máximo e mínimo (IZADIYAN; HEMMATEENEJAD, 2016)

A figura 1 apresenta os pontos do planejamento composto para o caso de dois fatores.



**Figura 1.** Pontos experimentais para o planejamento composto central (CALADO; MONTGOMERY, 2003)

Após a realização dos experimentos um modelo quadrático foi ajustado aos dados de resposta usando o software Minitab. Um modelo quadrático para  $k$  variáveis é dado pela equação (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_i x_i + \beta_j x_j + \beta_{ii} x_i^2 + \beta_{jj} x_j^2 + \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Em que  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_j$ ,  $\beta_{ii}$ ,  $\beta_{jj}$  são os parâmetros do modelo, que foram estimados, e que definem a regressão polinomial de segunda ordem.

A magnitude numérica dos coeficientes padronizados do modelo revela sua importância no modelo obtido e a resposta modelada (em relação aos coeficientes padronizados, os valores maiores são mais efetivos). Além disso, os coeficientes negativos representam o efeito inverso do fator correspondente na resposta modelada. Além de um modelo quadrático, o modelo também pode ser exibido em gráficos de três dimensões. (IZADIYAN; HEMMATEENEJAD, 2016).

## 2.2 Microrganismos

Para esta pesquisa foram utilizados os isolados *Aspergillus fumigatus* e *Paecilomyces parvisporus*, provenientes de bagaço de cana-de-açúcar cultivada na região sudoeste do estado de Goiás (LOPES *et al.*, 2017). Os fungos utilizados estavam armazenados em meio BDA (meio de crescimento composto de batata, dextrose e ágar) a 5 °C no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

## 2.3 Produção do Extrato Enzimático Bruto

Foi utilizado 1 g de bagaço em erlenmeyers de 125 mL contendo meio basal de Mandels & Weber (1969) autoclavados a 1 atm 121 °C por 20 minutos. Um disco de micélio dos isolados foram inoculados em frascos, em triplicata. Foi então, realizada a incubação pelo período de 7 dias a 28 °C sob agitação a 150 rpm em incubadora orbital. O micélio usado foi obtido de placas BDA com 7 dias de cultivo a 28 °C. Após 7 dias, amostras de 15mL do extrato enzimático foram retiradas de cada frasco e centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades enzimáticas.

## 2.4 Determinação das atividades celulolíticas

Para determinar a atividade celulolítica total foi utilizada a adaptação do protocolo de Ghose (1987), utilizando papel Whatman nº 1 como substrato. Os ensaios de atividade

celulolítica foram realizados em tubos de ensaio de 25mL, na presença de 1mL de tampão Borato-Citrato-Fosfato 50mM (tampão PBC), no pH desejado. Foram adicionados 0,5 mL do extrato enzimático, e também 0,025g de papel Whatman nº 1 picotado. Os controles negativos foram realizados da mesma forma, na ausência do substrato e na presença de 0,25 mL adicionais de tampão. Os tubos foram levados a banho-maria nas temperaturas estipuladas para o planejamento fatorial por 60 minutos. Após o período de incubação foi realizada a quantificação de açúcares redutores (Miller, 1959), e acrescentando 1,5 mL do reativo DNS (ácido 3,5- dinitrosalicílico) aos tubos, e, então são levados a banho-maria (95 °C) durante 5 minutos, para que ocorra a reação colorimétrica, e posteriormente colocados em banho frio e então adicionados 10 mL de água. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro em  $\lambda = 540$  nm.

## **2.5 Hidrólise enzimática e fermentação**

Foi escolhida uma variação da SSF, a PSSF (LÓPEZ-LINARES *et al.*, 2014) com a adição de *S. cerevisiae* YPO4 2:100 (m/v) e suplementação com extrato de levedura ( $1,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e peptona ( $2,0 \text{ g L}^{-1}$ ) após 24h de pré-sacarificação, que foi realizada nas configurações ótimas de cada extrato bruto (EB). Inicialmente, o meio reacional constituiu-se de bagaço de cana-de-açúcar 1:100 (m/v) em EB tamponado. A hidrólise processou-se por 96 horas.

## **2.6 Quantificação de Glicose**

Os sacarídeos foram analisados em sistema Dionex ICS 3000 DC *Ion Chromatography* com utilização de pré-coluna CarboPac Guard e coluna CarboPac PA-100 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) a 20 °C. Foram injetados 10  $\mu\text{L}$  de amostra com o auto sampler AS40 . As amostras foram eluídas em solução de hidróxido de sódio 100 mM, com fluxo de 15 mL/h por 60 min. Os sacarídeos foram identificados e quantificados em detector eletroquímico ED40, sendo os dados analisados pelo programa Chromeleon 6.8 SR8. Foi utilizado padrão externo de qualidade analítica para levantamento da curva analítica de D (+) – Glicose.

## **2.7 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar**

O substrato foi lavado em água abundante, seco, moído e peneirado com granulação máxima de 0,5 mm. Em seguida, o material foi seco em estufa a 60 °C até que

a massa não se alterasse mais, e então armazenado hermeticamente. A quantificação de extraíveis, hemicelulose, lignina e celulose foram realizadas segundo Lin *et al.*, (2010).

## **2.8 Quantificação de etanol**

O método utilizado para a determinação de teores alcoólicos foi baseado na oxidação do etanol a ácido acético, através da reação com dicromato de potássio em meio ácido (BENNETT, 1971).

O fermentado foi destilado previamente a fim de se evitar subprodutos interferentes. Tipicamente, 25 mL das amostras após PSSF e 50 mL de água foram destilados. Foram coletados 50 mL do destilado e diluídos 1:2 (v/v). Em tubos de ensaio adicionaram-se 5 mL da amostra destilada, acrescentados 2 mL de água destilada em cada tubo, juntamente com 2 mL de dicromato em meio ácido ( $325 \text{ mL.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado e  $33,678 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Os tubos foram levados a banho-maria a  $60^\circ\text{C}$  por 30 minutos, resfriados a temperatura ambiente e então lidos em espectrofotômetro ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) (UV-VIS Bioespectro – SP-220).

## **3. Resultados e discussão**

As variáveis independentes, seus níveis e códigos e a variável dependente (ART liberados após exposição do substrato – papel Whatman – aos extratos brutos obtidos) são apresentados na Tabela 1. O delineamento central composto foi constituído de um planejamento  $2^2$ , 4 corridas axiais e 5 observações no ponto central (0,0), com duas corridas experimentais.

**Tabela 1:** Desenho experimental e respostas da RSM para as variáveis dependentes e independentes.

Experimentos	Variáveis em unidades codificadas		Variáveis em unidades originais		ARTs liberados (g L <sup>-1</sup> )	
	pH	°C	pH	°C	<i>P.parvisporus</i>	<i>A.fumigatus</i>
1	-1	-1	3,0	40,0	1,21	1,41
2	+1	-1	8,0	40,0	0,79	0,35
3	-1	+1	3,0	90,0	0,45	0,23
4	+1	+1	8,0	90,0	0,37	0,10
5	+ $\alpha$	0	8,7	65,0	0,70	0,06
6	- $\alpha$	0	2,3	65,0	0,53	0,79
7	0	+ $\alpha$	5,5	96,7	0,41	0,37
8	0	- $\alpha$	5,5	33,3	1,35	1,10
Central	0	0	5,5	65,0	3,28	1,76

$\alpha=1,414$

A significância dos termos do modelo de regressão quadrática foi estimada utilizando a técnica de análise de variância (ANOVA).

Um *p-value* menor do que 0,05 implica na significância estatística do modelo proposto para os experimentos. Assim, pode-se observar na Tabela 2, que para os extratos brutos (EB) de *P. parvisporus*, os *p-value* observados menores do que 0,05 foram aqueles relacionados às variáveis Temp, pH x pH e Temp x Temp, e implica em dizer que estas variáveis são significantes para o modelo proposto, o mesmo foi notado para todas as variáveis observadas para o EB de *A. fumigatus*. O coeficiente de correlação indica que 94,39% (tabela 2, *P. parvisporus*) e 97,19% (tabela 3, *A. fumigatus*) da variabilidade poderiam ser explicadas adequadamente pelos modelos estabelecidos.

Todos os coeficientes para o EB de *A. fumigatus* são estatisticamente significativos apresentando *p-value* = 0,000.

**Tabela 2:** Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo EB de *P. parvisporus* frente à variações de pH e temperatura.

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	3,2800	0,1110	29,54	0,000
pH	-0,0410	0,0930	-0,43	0,668
Temp	-0,3280	0,0930	-3,51	0,002
pH x pH	-1,4850	0,1100	-13,46	0,000
Temp x Temp	-1,3180	0,1100	-11,94	0,000
pH x Temp	0,0820	0,1250	0,66	0,519

R<sup>2</sup>= 94,39%, R<sup>2</sup>(pred)= 90,64%, R<sup>2</sup>(adj)= 92,99%

**Tabela 3:** Coeficientes de regressão estimados para liberação de ART pelo EB de *A. fumigatus* frente à variações de pH e temperatura.

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value
Constant	1,7220	0,0410	41,84	0,000
pH	-0,2930	0,0350	-8,48	0,000
Temp	-0,3260	0,0350	-9,41	0,000
pH x pH	-0,7400	0,0410	-18,10	0,000
Temp xTemp	-0,5480	0,0410	-13,38	0,000
pH x Temp	0,2330	0,0460	5,02	0,000

R<sup>2</sup>= 97,19%, R<sup>2</sup>(pred)= 94,14%, R<sup>2</sup>(adj)= 96,49%

Por outro lado, Sopajarne Sangwichien (2015), mostraram que a degradação de material lignocelulósico de folhas de taboa (*Typhaangustifolia*) por um coquetel enzimático proveniente de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 é dependente da temperatura do meio reacional, além das concentrações de substrato e de enzimas. Para fins de aplicação agroindustrial, essas informações são bastante relevantes, uma vez que enzimas que não sofram desnaturação a temperaturas maiores podem oferecer maior conversão de substrato em produto. Por outro lado, aumentar a concentração enzimática impacta diretamente no custo de produção, uma vez que enzimas são insumos relativamente dispendiosos (Liu *et al.*, 2014b).

Os modelos matemáticos obtidos com o software Minitab17 que descrevem a liberação de ART (g L<sup>-1</sup>) foram dados pelas equações 2 (EB de *P. parvisporus*) e 3 (EB de *A. fumigatus*), mostradas a seguir:

$$-11,40 + 2,513 \times pH + 0,2537 \times Temp - 0,2377 \times pH^2 - 0,002108 \times Temp^2 + 0,00132 \times pH \times Temp \quad (2)$$

$$-2,737 + 0,9432 \times pH + 0,08033 \times Temp - 0,11846 \times pH^2 - 0,000876 \times Temp^2 + 0,003731 \times pH \times Temp \quad (3)$$

Os modelos mostrados pelas equações 2 e 3 e propostos neste trabalho são estatisticamente significativos, apresentando  $p\text{-value} = 0,000$  (tabelas 4 e 5).

**Tabela 4:** Análise de variância estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de *P. parvisporus* frente à variações de pH e temperatura.

Source	DF	Adj. SS	Adj. MS	F-values	p-value
Model	5	42,2773	8,4555	67,30	0,000
Linear	2	1,5716	0,7858	6,25	0,008
Square	2	40,6515	20,3258	161,78	0,000
2-Way Interaction	1	0,0543	0,0543	0,43	0,519
Error	20	2,5127	0,1256		
Lack-of-Fit	3	1,2270	0,4090	5,41	0,008
Pure Error	17	1,2857	0,0756		
Total	25	44,7901			

**Tabela 5:** Análise de variância estimados para liberação de ART pelo extrato bruto de *A. fumigatus* frente à variações de pH e temperatura.

Source	DF	Adj. SS	Adj. MS	F-value	p-value
Model	5	11,9460	2,3892	138,45	0,000
Linear	2	2,7700	1,3850	80,26	0,000
Square	2	8,7410	4,3705	253,27	0,000
2-Way Interaction	1	0,4349	0,4349	25,20	0,000
Error	20	0,3451	0,0173		
Lack-of-Fit	3	0,1750	0,0583	5,83	0,006
Pure Error	17	0,1702	0,0100		
Total	25	12,2911			

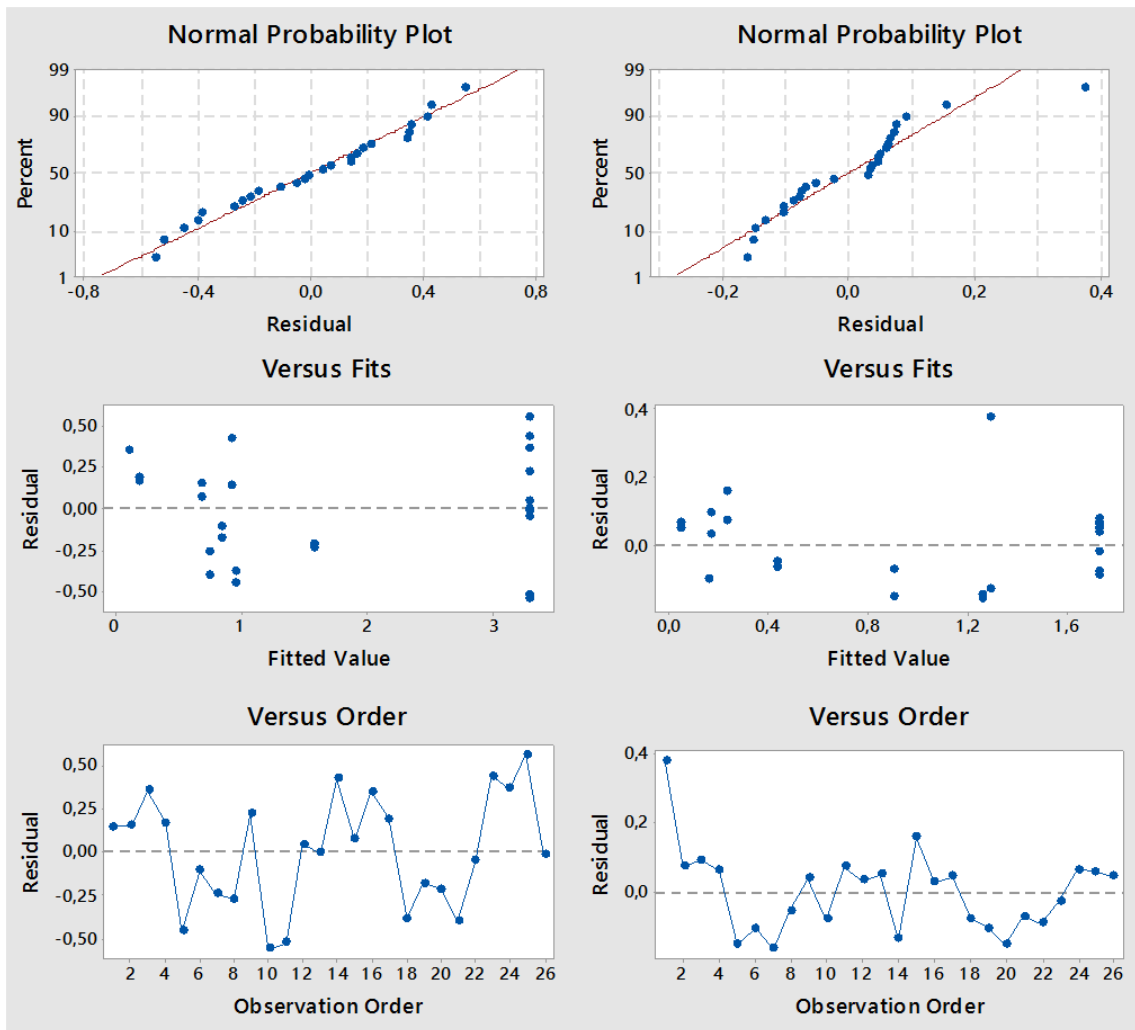
Para verificar a adequação do modelo é primordial observar se as suposições dos erros existentes no modelo matemático são aleatórios, distribuídos normalmente independentemente, com média zero e variância constante (CALADO; MONTGOMERY, 2003).



O gráfico de probabilidade normal é um instrumento útil que indica a distribuição normal dos resíduos. O gráfico de valores de resposta residual contra a resposta predita pode ser empregado para investigar a suposição de variância constante, confirmada pela existência de uma dispersão aleatória de pontos acima e abaixo do eixo x. (YAQUBZADEH *et al.*, 2016)

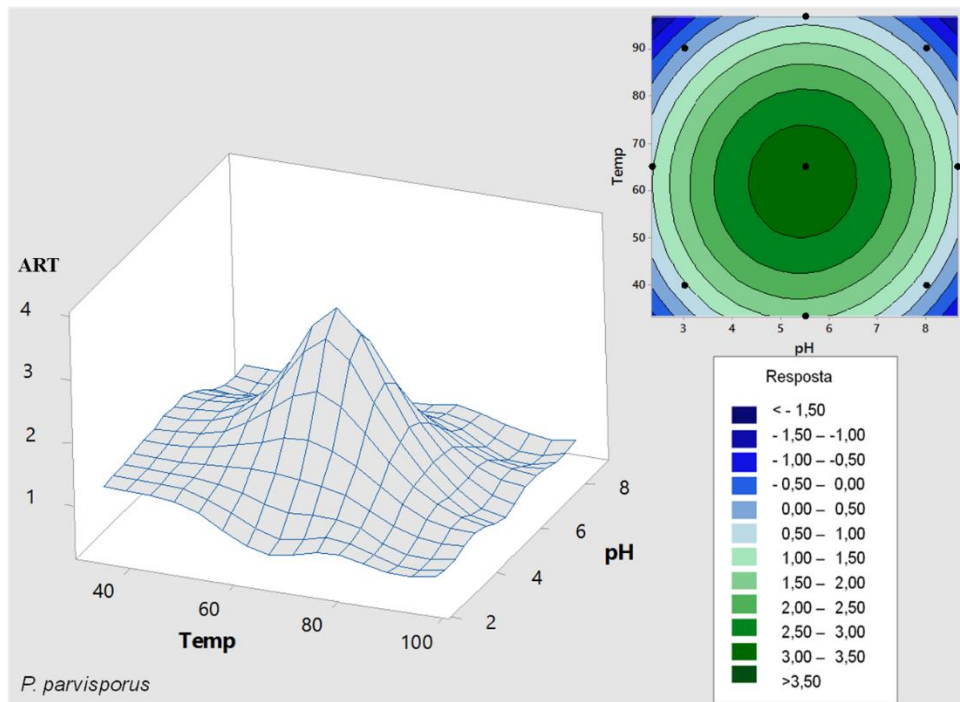
Para o EB de *P. parvisporus* (Figuras 2a, 2b e 2c), é possível supor que a normalidade dos erros (a) não viola a suposição que os erros são constantes (b) e que os erros são independentes uns dos outros (c).

Já nas figuras 2d, 2e e 2f, pode-se observar que, para o EB de *A. fumigatus*, no gráfico de resíduos contra a ordem (figura 2f) pode-se notar que não há padrões que violem a suposição de que os erros sejam independentes uns dos outros, sendo então plausível a suposição de normalidade dos resíduos mesmo com a presença de um ponto afastado da reta (*outlier*), que deve ser investigado com mais profundidade (Figura 2d). Os valores dos resíduos contra os valores ajustados confirmam a presença de um *outlier*, contudo, não se pode afirmar que há a violação da suposição de que os erros sejam constantes (Figura 2e).

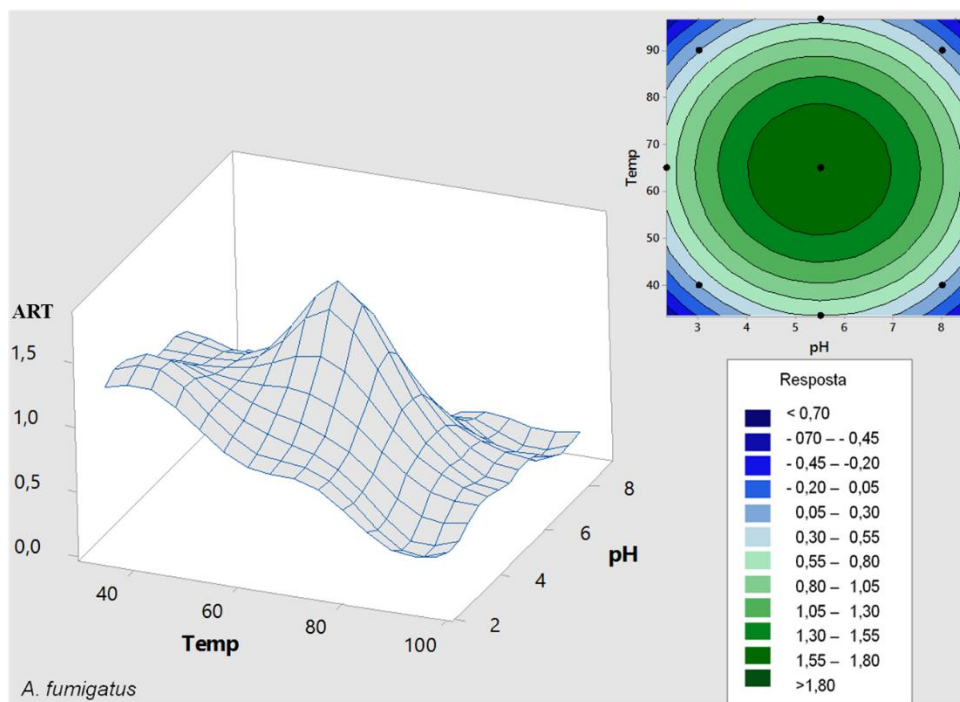


**Figura 2:** Gráfico de probabilidade normal dos resíduos (a,d); resíduos contra valores ajustados (b,e); resíduos contra ordem (c,f) para os EB de *P. parvisporus* (a, b e c) e *A. fumigatus* (d, eef).

Os efeitos interativos dos fatores foram observados utilizando gráficos de superfície de resposta, derivados do modelo gerado. A representação tridimensional (figuras 3 e 4) viabiliza a observação de máximos e mínimos das respostas e significância dos coeficientes da equação e o gráfico de contorno permite melhor visualização da influência das variáveis e sua interação na resposta (TALAT; SINGH; SRIVASTAVA, 2011)

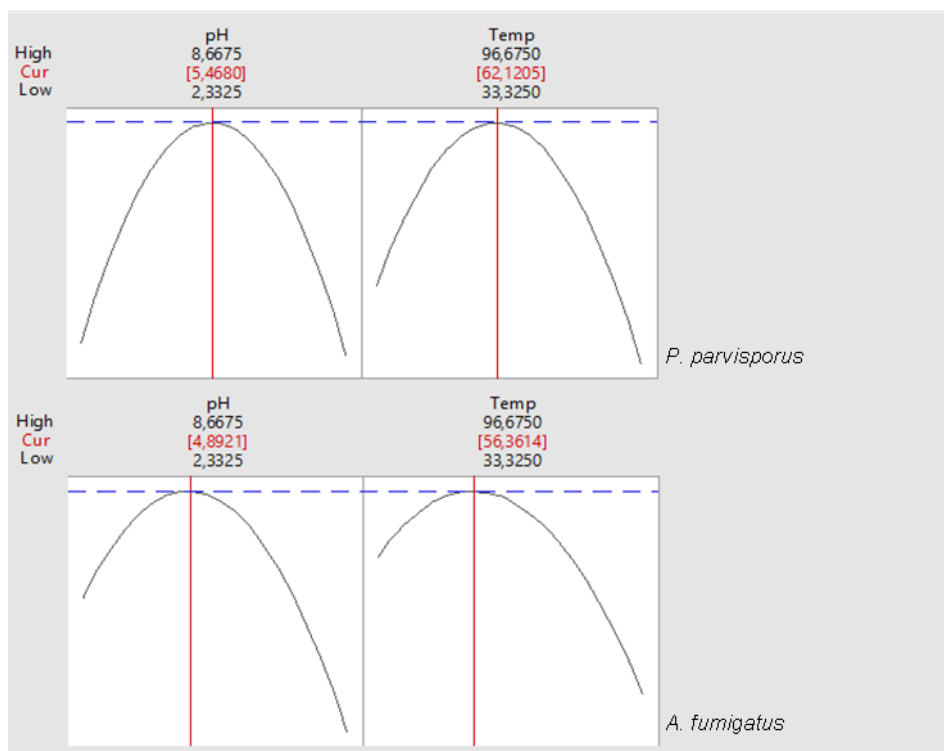


**Figura 3:** RSM e gráfico de contorno de ART liberados pelo EB de *P. parvisporus* frente à variações de pH e temperatura.



**Figura 4:** RSM e gráfico de contorno de ART liberados pelo EB de *A. fumigatus* frente à variações de pH e temperatura.

Finalmente, o nível ótimo de parâmetros de processos que simultaneamente maximizam o rendimento de ART foram deduzidos utilizando o módulo de otimização de resposta do software Minitab17 (figura 5).



**Figura 5.** Gráfico de otimização para condições ótimas de reação para *P. parvisporus* (acima) e *A. fumigatus* (abaixo).

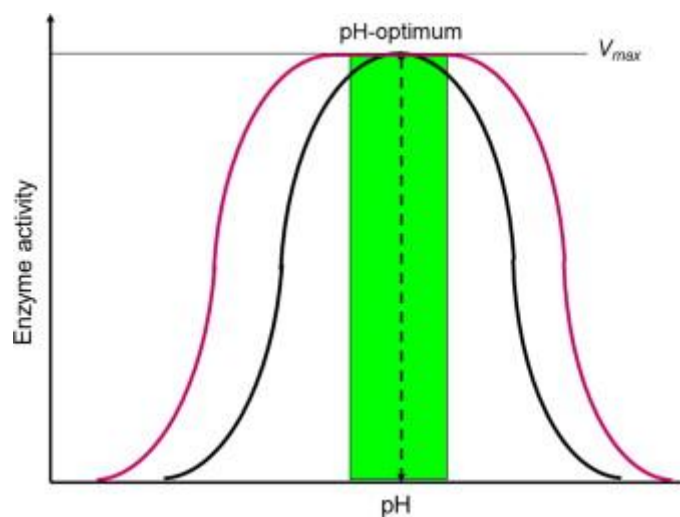
A partir dos dados analisados, e resumidamente mostrados na figura 5, pode-se concluir que a melhor combinação de fatores para uma resposta ótima foram os valores apresentados na tabela 4.

**Tabela 6:** Configurações ótimas de pH e temperatura (°C) que maximizam a obtenção de ARTs a partir da hidrólise de material lignocelulósico pelos EB de *P. parvisporus* e *A. fumigatus*.

Microrganismo	pH	Temperatura (°C)
<i>P. parvisporus</i>	5,46	62,1
<i>A. fumigatus</i>	4,89	56,4

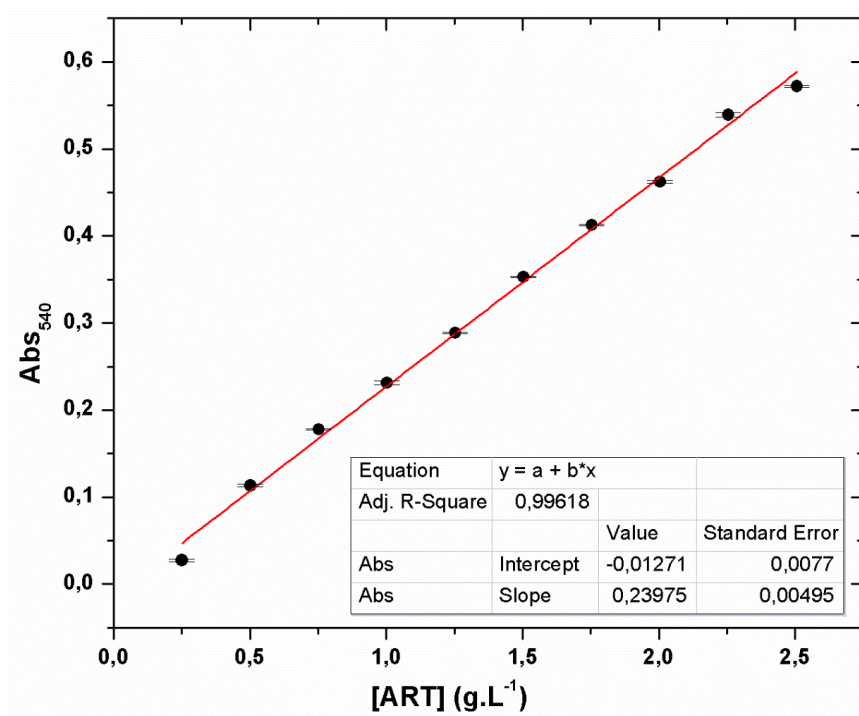
Em todos os casos, a curva do efeito do pH na atividade enzimática sobre o papel Whatman nº 1, assim como para a maioria das enzimas, segue uma curva em forma de sino, como observado na figura 6. A atividade enzimática depende fortemente do pH no meio em que se está conduzindo o ensaio. As atividades da maioria das enzimas seguem

uma curva em forma de sino, aumentando de zero na região de ácido forte até o valor máximo, e diminuindo para zero para a região alcalina forte. Dois efeitos diferentes são responsáveis por este comportamento: (i) o estado de protonação de grupos funcionais de aminoácidos e cofatores envolvidos na reação catalítica e (ii) a estrutura proteica tridimensional nativa da enzima (BISSWANGER, 2014). Foi observado aumento de atividade a partir da região muito acidificada até ao valor máximo, diminuindo a zero conforme se aumenta a alcalinidade do meio. O efeito do pH na atividade enzimática é um fenômeno amplamente descrito (BARROCA *et al.*, 2017; BARRON *et al.*, 2017; CAO *et al.*, 2016; ROSSETO *et al.*, 2016). Assim, a obtenção do pH ótimo de atividade mostra-se como um dado relevante para aplicações tecnológicas.



**Figura 6:** Curva de pH ótimo para a atividade de uma enzima (preto) O pH que se obtém  $V_{max}$  é o pH ótimo. A área verde mostra a faixa fisiológica. A linha vermelha mostra uma curva de estabilidade de pH mais ampla da enzima (BISSWANGER, 2014).

Além das condições ótimas de ensaio, é necessária a quantificação da atividade celulolítica dos EBs, sendo que as condições utilizadas nestes ensaios foram aquelas obtidas pelas simulações de RSM (tabela 6). Para este fim, foi construída uma curva-padrão de glicose, fazendo uso da metodologia descrita no item 2.4 da seção 2 (materiais e métodos), utilizando o método de detecção de açúcares redutores totais com o reagente colorimétrico DNS. A curva-padrão obtida pode ser visualizada na figura 7.



**Figura 7.** Curva-padrão de glicose obtida pelo método de detecção de açúcares redutores totais utilizando DNS.

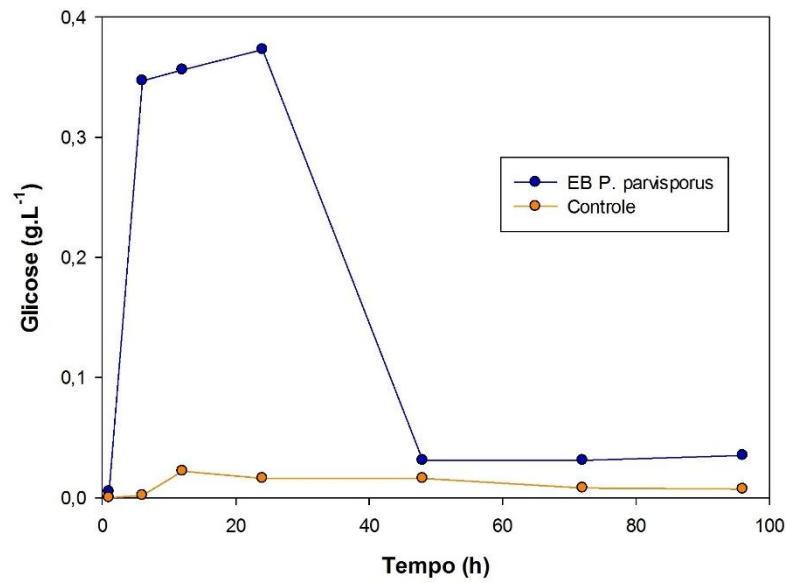
As análises da atividade enzimática foram realizadas como descrito no item 2.4 da seção 2 (materiais e métodos), ou seja, tendo papel Whatman nº 1 como substrato. Admitindo-se que U representa unidades enzimáticas correspondentes a quantidade de substrato ( $\mu\text{mol}$ ) convertido por minuto (HANSEN *et al.*, 2015), as atividades foram quantificadas e seus valores estão mostrados na tabela 7.

**Tabela 7:** Atividade enzimática ( $\text{U.mL}^{-1}$ ) obtida pelos EB de *P. parvisporuse* e *A. fumigatus* na degradação de papel Whatman nº 1.

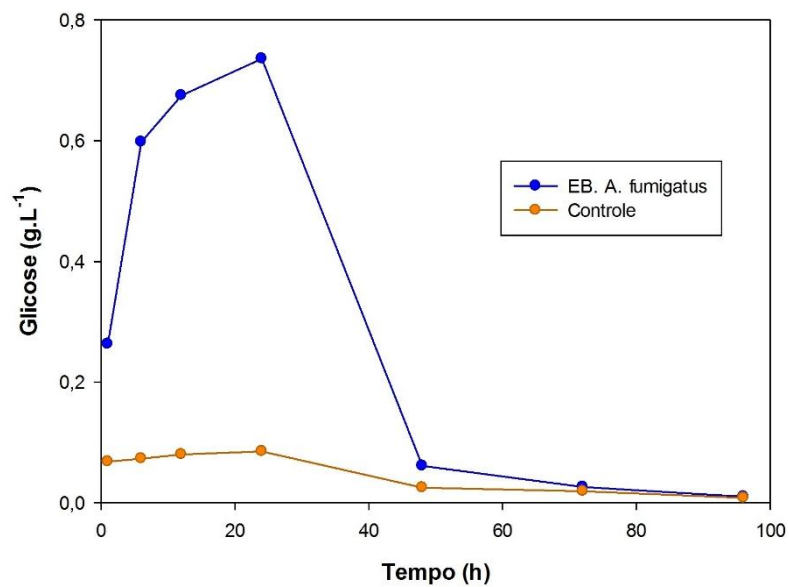
<b>Microrganismo</b>	<b>Atividade (<math>\text{U mL}^{-1}</math>)</b>
<i>P. parvisporus</i>	$0,13 \pm 0,01$
<i>A. fumigatus</i>	$0,34 \pm 0,01$

A partir destes valores, foi estabelecido que seria adicionado ao meio reacional de PSSF o equivalente a 10U de enzimas. Nas figuras 8 e 9, estão mostrados os resultados

da PSSF, fazendo uso do EB de *P. parvisporus* (figura 8) e do EB de *A. fumigatus* (figura 9).



**Figura 8:** Perfil da liberação e consumo de Glicose em 96 horas de PSSF utilizando EB de *P. parvisporus*.



**Figura 9.** Perfil da liberação e consumo de Glicose em 96 horas de PSSF utilizando EB de *A. fumigatus*.

É possível observar nas figuras 8 e 9 que ambos os microrganismos foram capazes de liberar glicose em até 24 horas de hidrólise do material lignocelulósico em valores bem acima do obtido pelo controle, realizado na presença de EB desnaturado a 95°C por 10 min.

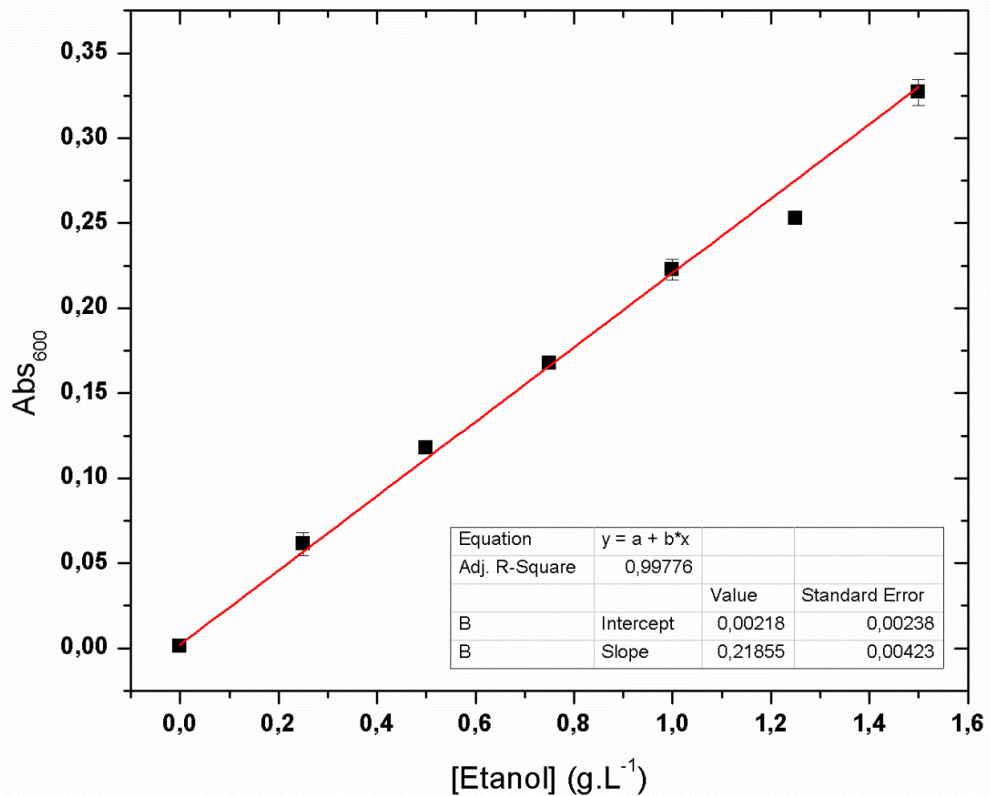
No entanto, observa-se que, para *P. parvisporus*, entre 6 e 24 horas não houve aumento muito pronunciado de glicose. Koppram *et al* (2014), Liu (2014)b, Modenback *et al* (2013), Ferreira (2010) e Ohgren *et al* (2007) trabalham com degradação de material lignocelulósico por coquetéis enzimáticos provenientes de diferentes microrganismos observam esse fenômeno, que é comumente atribuído ao efeito de inibição pelo produto, ou seja, as enzimas responsáveis por digerir o polímero de celulose liberam resíduos de glicose, que acabam por inibir estas mesmas enzimas. Este fenômeno é também observado na SSF com diferentes finalidades, como por exemplo, na utilização de amido na produção de ácido láctico (ANURADHA; SURESH; VENKATESH, 1999) e celulose, na produção de ácido acético (BORDEN; LEE; YOON, 2000).

Além disso, Kádár, Szengyel e Réczey, (2004) observaram que, na degradação de resíduos industriais por *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* ocorre inibição da liberação de ARTs pelas altas temperaturas empregadas no estudo. No entanto, em nosso trabalho, as temperaturas foram mantidas dentro dos padrões otimizados pela RSM durante a etapa de pré-sacarificação, e por essa razão pode-se atribuir a menor liberação de glicose por *P. parvisporus* (figura 8) à inibição das enzimas celulolíticas pelo produto (glicose) obtido, essa inibição, no entanto, não é observada em *A. fumigatus* (figura 9), mostrando possível mecanismo de adaptação das enzimas deste microrganismo às condições do meio.

Após as 24 horas iniciais, as concentrações de glicose, aproximadamente 0,35 e 0,7 g.L<sup>-1</sup> de *P. parvisporus* e *A. fumigatus*, respectivamente, caem progressivamente com o decorrer da PSSF (figuras 8 e 9). Com a inoculação do microrganismo fermentador, a fermentação ocorre simultaneamente à hidrólise, com isso a glicose vai sendo gradualmente consumida, levando então a maior liberação de glicose ao longo do tempo. Observa-se a conversão de aproximadamente 65% de ART após 72h após o início da SSF para *P. parvisporus* e *A. fumigatus*.



A fim de quantificar a produção de etanol, foi construída uma curva-padrão de etanol (figura 10) fazendo uso da metodologia descrita no item 2.8 da seção 2 (materiais e métodos), através da reação com dicromato de potássio em meio ácido (BENNETT, 1971).



**Figura 10:** Curva-padrão de etanol obtida através da reação com dicromato de potássio em meio ácido (BENNETT, 1971).

Ao fim da PSSF, o fermentado foi destilado previamente a fim de se evitar subprodutos interferentes. De posse dos dados da curva-padrão de etanol, a concentração do álcool ao fim da fermentação pôde ser calculada e os dados estão mostrados na tabela 8.

**Tabela 8:** Concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>) após a PSSF com uso dos EB de *P. Parvisporus* e *A. fumigatus*.

Microrganismo	[Etanol] (g.L <sup>-1</sup> )
<i>P. parvisporus</i>	0,26 ± 0,03
<i>A. fumigatus</i>	0,62 ± 0,02

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar não tratado foi caracterizada segundo os métodos descritos no item 2.6, seção 2 (materiais e métodos). Os resultados estão mostrados na tabela 9, e pode-se observar que os dados obtidos em nossas quantificações são comparáveis àquelas obtidas por Rezende *et al.*, 2011, que realizou as mesmas quantificações em bagaço de cana-de-açúcar não tratado.

**Tabela 9:** Composição química (%) do bagaço de cana-de-açúcar.

Fração	Este trabalho	Rezende <i>et al.</i> , 2011
Extraíveis	12,31 ± 3,13	n.d.
Cinzas	8,10 ± 1,12	20,9 ± 4,3
Hemicelulose	24,93 ± 1,50	24,5 ± 0,6
Lignina	24,24 ± 2,35	22,2 ± 0,1
Celulose	32,43 ± 2,64	35,02 ± 0,9
<b>Total</b>	102,1	102,8 ± 2,6

n.d.: não disponível

Considerando o conteúdo de celulose disponível na biomassa hidrolisada, foi realizada o cálculo teórico da eficiência na fermentação dos ARTs liberados.

**Tabela 10:** Eficiência na fermentação.

Conteúdo de celulose (%)	Concentração Teórica Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração teórica máxima de etanol (g.L <sup>-1</sup> )	EF%	
			<i>P.parvisporus</i>	<i>A. fumigatus</i>
32	2,88	1,47	18	42

Ferreira *et al* (2010) obtiveram EF% próximos utilizando como fonte de celulose CMC e Avicel®, aproximadamente 25 e 59%, respectivamente. Quando o material utilizado foi celulignina de bagaço de cana pré-tratado, o rendimento alcançado foi de aproximadamente 70%, quando comparado com o bagaço utilizado neste trabalho percebe-se que o resultado é compreensível, visto que a hidrólise enzimática de biomassa

lignocelulósica nativa produz menos de 20% de glicose a partir da fração de celulose (VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

O rendimento global, em litros, de etanol por tonelada de substrato foi calculado utilizando a equação 4:

$$EtOH(L.ton^{-1}) = \frac{\left(\frac{EtOH}{789}\right)}{S} \quad (4)$$

Em que o valor de EtOH é dado em g.L<sup>-1</sup>, S é a massa de substrato convertida em tonelada, e 789 é a densidade do EtOH em g.L<sup>-1</sup>. Os rendimentos foram de 33 e 78 L.ton<sup>-1</sup> para PSSF utilizando EB de *P. parvisporus* e PSSF utilizando EB de *A. fumigatus*, respectivamente.

Apesar destes números encontrarem-se abaixo de dados obtidos na literatura (Ferreira *et al.*, 2010; Kádár *et al.* 2004), pode-se destacar que o material lignocelulósico não passou por nenhuma espécie de pré-tratamento, dificultando o acesso das enzimas celulolíticas ao polissacarídeo. Como já mostrado (BARRERA-MARTÍNEZ *et al.*, 2016), a lignina apresenta como um obstáculo a ser superado para aumentar a eficiência do processo de liberação dos ARTs. Por outro lado, a ausência de pré-tratamento diminui a produção de efluentes, diminuindo tanto custos quanto possíveis impactos ao meio ambiente, estudos futuros devem ser conduzidos de forma a minimizar esse efeito, sem que seja necessário o pré-tratamento do resíduo.

#### 4. Conclusões

- A metodologia de RSM permitiu que os experimentos fossem otimizados, ao sugerir a condução dos experimentos em condições ótimas de pH e temperatura.
- As configurações ótimas para a atividade celulolítica observadas neste trabalho são comparáveis ao descrito na literatura, cerca de pH4,8 e 50°C, com exceção da temperatura ótima para o EB de *P. parvisporus*, que mostrou maior atividade em temperatura acima de 60°C.
- A PSSF aplicando-se EB de *A. fumigatus* em bagaço foi capaz de produzir cerca 2,4 vezes mais etanol que na aplicação de EB de *P. parvisporus*.

- A maquinaria enzimática de *A. fumigatus* parece sofrer menor inibição pelo produto quando comparada à maquinaria de *P. parvisporus*, e alguma vantagem na etapa fermentativa do processo de PSSF.

## 5. Referências Bibliográficas

ANURADHA, R.; SURESH, A. K.; VENKATESH, K. V. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3–4, p. 367–375, nov. 1999.

BARRERA-MARTÍNEZ, I. *et al.* Ozonolysis of alkaline lignin and sugarcane bagasse: Structural changes and their effect on saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 94, p. 167–172, 2016.

BARROCA, M. *et al.* Deciphering the factors defining the pH-dependence of a commercial glycoside hydrolase family 8 enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 96, p. 163–169, 2017.

BARRON, C. C. *et al.* Optimization of oligomeric enzyme activity in ionic liquids using *Rhodotorula glutinis* yeast phenylalanine ammonia lyase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 96, p. 151–156, 2017.

BENNETT, C. Spectrophotometric acid dichromate method for the determination of ethyl alcohol. **The American journal of medical technology**, v. 37, n. 6, p. 217–20, jun. 1971.

BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, p. 41–55, 2014.

BORDEN, J. R.; LEE, Y. Y.; YOON, H.-H. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulosic Biomass to Acetic Acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, n. 1–9, p. 963–970, 2000.

BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. DA. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173–181, 2015.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o**

**Statistica**, 2003.

CAO, Y. *et al.* The pH-dependent protection of  $\alpha$ -galactosidase activity by proteins against degradative enzymes during soymilk in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 244–250, 2016.

CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CHANG, R. Enzyme Kinetics. In: **Physical Chemistry for the Biosciences**. p. 363–400, 2005.

CHEN, H. **Biotechnology of Lignocellulose: Theory and Practice**, 2014.

CHEN, H. Lignocellulose biorefinery feedstock engineering. In: **Lignocellulose Biorefinery Engineering**. p. 37–86, 2015.

FERREIRA, V. *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation process of different cellulosic substrates using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring the  $\beta$ -glucosidase gene. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 0–0, 15 mar. 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GUNNY, A. A. N. *et al.* Potential halophilic cellulases for in situ enzymatic saccharification of ionic liquids pretreated lignocelluloses. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 177–181, 2014.

HANSEN, G. H. *et al.* Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.

HARGREAVES, P.I. **Bioprospecção de novas celulases de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana**. p. 75 Dissertação (Mestrado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Brasil, 2008.

HOUBRAKEN, J. *et al.* *Penicillium araracuarensis* sp. nov., *Penicillium elleniae* sp. nov., *Penicillium penarojense* sp. nov., *Penicillium vanderhammenii* sp. nov. and *Penicillium*

wotroi sp. nov., isolated from leaf litter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 1462–1475, 1 jun. 2011.

IZADIYAN, P.; HEMMATEENEJAD, B. Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design. **Food Chemistry**, v. 190, p. 864–870, 2016.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188–203, 2014.

KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 1, p. 103–110, 2004.

KOPPRAM, R.; OLSSON, L. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, 2014.

LEE, D. S. *et al.* Rapid saccharification for production of cellulosic biofuels. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 239–247, 2014.

LIN, L. *et al.* In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8217–8223, 2010

LIU, W. *et al.* Design of an effective bifunctional catalyst organotriphosphonic acid-functionalized ferric alginate (ATMP-FA) and optimization by Box-Behnken model for biodiesel esterification synthesis of oleic acid over ATMP-FA. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 266–271, 2014b.

LIU, Z.-H. *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 167, 4 dez. 2014a.

LOPES, A. *et al.* Primeiro relato da ocorrência dos fungos Paecilomyces: P. formosus, P. saturatus e P. parvisporus no Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n. 4, 2016.

LÓPEZ-LINARES, J. C. *et al.* Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. **Fuel**, v. 122, p. 112–118, 2011.

MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.

MENEZES, C. R. DE; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos : Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, p. 1365–1391, 2015.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. III, p. 426–428, 1959.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526–544, set. 2013

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. D. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, p. 9–23, 2009.

OHGREN, K. *et al.* Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2503–2510, set. 2007.

OLIVEIRA, J. H. S. ; COSTA, M. T. ; ABUD, A. K. S. Uso do planejamento experimental para avaliar a produção de enzimas celulolíticas por cultivo em estado sólido. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2015, Florianópolis. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. São Paulo: Editora Edgard Blücher. p. 959.

PANDIYAN, K. *et al.* Optimization of Enzymatic Saccharification of Alkali Pretreated Parthenium sp. Using Response Surface Methodology. **Enzyme research**, v. 2014, p. 764898, 2014.

REZENDE, C. A. *et al.* Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 54, 28 nov. 2011.

ROSSETO, F. R. *et al.* Biophysical and biochemical studies of a major endoglucanase secreted by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 91, p. 1–7, 2016.

SANTOS, J. R. A. DOS *et al.* Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904–908, 2010.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.; MEDEIROS, A.B.; KARP, S.G.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTASCHALK, L.M.; FERRARA, M.A.; BON DA SILVA, E.P.; MORAES, L. M.; ARAUJO J DE A.; TORRES, F.A. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

SOPAJARN, A.; SANGWICHEN, C. Optimization of Enzymatic Saccharification of Alkali Pretreated *Typha angustifolia* for Glucose Production. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 6, n. 4, p. 232–236, 2015.

TALAT, M.; SINGH, A. K.; SRIVASTAVA, O. N. Optimization of process variables by central composite design for the immobilization of urease enzyme on functionalized gold nanoparticles for various applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 6, p. 647–657, 2011.

TURNER, N. J. Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 474–478, nov. 2003.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHKE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

WATANABE, T. Introduction: Potential of Cellulosic Ethanol. In: FARACO, V. **Lignocellulose Conversion**. p. 1–21, 2013.



WEE, E. J. H.; TRAU, M. Enzyme catalysis: Evolution made easy. **Nature Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 756–757, 21 ago. 2014.

YAQUBZADEH, A. R. *et al.* Low-cost preparation of silica aerogel for optimized adsorptive removal of naphthalene from aqueous solution with central composite design (CCD). **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 447, p. 307–314, 2016.