



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SABRYNA COUTO ARAUJO**

**VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDÚSTRIAS ATRAVÉS DA  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
CELULOLÍTICAS POR *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ATCC 10110 E EM  
REAÇÕES DE SACARIFICAÇÃO**

**ILHÉUS-BAHIA  
2024**

**SABRYNA COUTO ARAUJO**

**VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDÚSTRIAS ATRAVÉS DA  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
CELULOLÍTICAS POR *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ATCC 10110 E EM  
REAÇÕES DE SACARIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC - como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

**Linha de Pesquisa:** Química dos produtos naturais.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julieta Rangel de Oliveira

**ILHÉUS-BAHIA  
2024**

A663      Araújo, Sabryna Couto.  
Reaproveitamento de resíduos agroindústrias  
através da fermentação em estado sólido para  
produção de enzimas celulolíticas por *Penicillium  
roqueforti* ATCC 10110 / Sabryna Couto Araújo. –  
Ilhéus, BA: UESC, 2024.  
65 f. : il.

Orientadora: Julieta Rangel de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual  
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em  
Química.  
Inclui referências.

1. Fungos. 2. Fungos filamentosos. 3. Fermentação  
em estado sólido. 4. Enzimas. I. Título.

CDD 579.5

SABRYNA COUTO ARAUJO

**VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS ATRAVÉS DA  
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE  
ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ATCC  
10110 E EM REAÇÕES DE SACARIFICAÇÃO**

Ilhéus-BA, 18 de julho de 2024.

**Comissão Examinadora:**



---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Julieta Rangel de Oliveira (UESC)**  
**Presidente/Orientadora**



Documento assinado digitalmente

MARCIO LUIS OLIVEIRA FERREIRA

Data: 01/08/2024 08:55:10-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

**Prof. Dr. Marcio Luís Oliveira Ferreira (UESC)**  
**Membro Interno/Avaliador**



Documento assinado digitalmente

IRLON MACIEL FERREIRA

Data: 18/07/2024 11:02:19-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

**Dr. Irlon Maciel Ferreira (UNIFAP)**  
**Membro Externo/Avaliador**

“Dedico esta dissertação ao meu eu mais profundo e aos meus amados pais, Meire e Marcos. Este trabalho é um marco da minha jornada de autodescoberta, crescimento e força que encontrei para perseguir meus sonhos. É a promessa que faço a mim mesma e a eles, hoje e sempre.”

## AGRADECIMENTOS

Segundo Blaise Pascal, ‘o crescimento do conhecimento se assemelha a uma esfera em expansão: quanto mais ampliamos nosso entendimento, maior é nosso contato com o desconhecido. Em outras palavras, quanto mais aprendemos, mais percebemos o quanto ainda temos para descobrir’. Um provérbio chinês ecoa esse sentimento, afirmando que ‘o aprendizado é um tesouro que acompanhará seu possuidor em todos os lugares’.

Na Bíblia, em Provérbios 3:13-14, encontramos: ‘Feliz é o homem que encontra sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; pois é mais proveitoso do que a prata e rende mais do que o ouro mais puro.’ Este trecho reforça que a sabedoria e o conhecimento superam qualquer riqueza material. Eles são a verdadeira medida de sucesso e realização na vida. Uma vez adquirido, o conhecimento nunca pode ser retirado de nós. Ele nos acompanha em todas as nossas jornadas e experiências de vida.

Com essas reflexões, expresso meu amor inabalável pelo conhecimento. Apesar dos desafios, minha paixão pelo aprendizado persiste, graças ao apoio constante das pessoas ao meu redor. Em função disso gostaria de expressar minha gratidão a todos eles.

Agradeço em especial aos meus pais, Marcos e Marimary, e à minha avó Maria, pelo amor incondicional e pelo carinho que me impulsionaram a chegar até aqui. Agradeço por nunca terem deixado de acreditar em mim.

Aos meus irmãos e a toda a minha família, agradeço o apoio que me deram de diversas maneiras.

Ao meu namorado Anderson, agradeço imensamente pelo apoio constante, pela paciência inabalável e pelo amor que me fortaleceu em todos os momentos.

À minha orientadora, Professora Julieta Rangel, sou grata pela oportunidade e confiança ao me aceitar como orientanda. Sua orientação foi de suma importância para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por acreditar em mim, até mais do que eu mesmo poderia fazê-lo.

Aos Professores Marcelo Franco e Erik Galvão Paranhos da Silva, agradeço pelas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Erik Galvão Paranhos da Silva e Igor Carvalho Fontes Sampaio, agradeço pelas contribuições e sugestões na banca de qualificação.

À minha grande amiga Laurieth, agradeço por todo apoio, lealdade, incentivo e pelos momentos de alegria e desabafos durante nossa jornada acadêmica.

Aos meus colegas e amigos do mestrado, Sandy Oliveira, Eliézer Luz, e aos meus queridos colegas de pesquisa do LaBioCat, em especial, Rafael Rocha, Márcia Gonçalves, Marla Rosa e demais, agradeço pelos momentos de alegria e discussões. Vocês foram incríveis!

Aos professores do PPGQUIM, agradeço o conhecimento transmitido, que contribuiu para a minha formação.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQUIM), agradeço a oportunidade e todo o apoio concedido durante a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço a concessão da bolsa de estudo de mestrado.

Aos membros da banca, Professores Doutores Irlon Maciel Ferreira e Márcio Luís Oliveira Ferreira, agradeço por aceitarem o convite.

A todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho, obrigada!

“Passo o tempo todo pensando – não raciocinando, não meditando, mas pensando, pensando sem parar. E aprendendo, não sei o quê, mas aprendendo. E com a alma mais sossegada (não estou totalmente certa). Sempre quis “jogar alto”, mas parece que estou aprendendo que o jogo alto está numa vida diária pequena, em que uma pessoa se arrisca muito mais profundamente, com ameaças maiores. Com tudo isso, parece que estou perdendo um sentimento de grandeza que não veio nunca de livros nem de influência de pessoas, uma coisa muito minha e que desde pequena deu a tudo, aos meus olhos, uma verdade que não vejo mais com tanta frequência. Disso tudo, restam nervos muito sensíveis e uma predisposição séria para ficar calada. Mas aceito tanto agora. Nem sempre pacificamente, mas a atitude é de aceitar”.

Clarice Lispector. Todas as cartas. Rio de Janeiro: Rocco, 2020.

Nota: Trecho de carta para Fernando Sabino, escrita em 5 de outubro de 1953.

# VALORIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ATCC 10110 E EM REAÇÕES DE SACARIFICAÇÃO

## RESUMO

O bioprocesso, Fermentação em Estado Sólido (FES), aproveita resíduos agroindustriais como nutrientes para crescimento microbiano, que ao crescerem excretam enzimas; e para otimizar a mistura de resíduos na FES faz-se uso da mistura com restrição. O uso da função desejabilidade, pode garantir que todas as enzimas necessárias estejam presentes em proporções ideais em um complexo de enzimas que atuam de forma sinérgica, como as celulasas endoglucanases (EGL), exoglucanases (EXG) e  $\beta$ -glicosidase (BGL). Neste estudo, a função desejabilidade é utilizada para otimizar a produção do complexo celulolítico pelo fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 via FES. O fungo foi cultivado em uma mistura de resíduos: casca de amêndoa de cacau (CAC) (1,0 g), casca da fruta de cacau (CFC) (7,5 g) e óleo de dendê (OD) (1,5 g), seguindo a matriz de mistura com restrição, resultando nas seguintes atividades para EGL (5,38 U/g), EXG (1,01U/g) e BGL (2358,75 U/g). As enzimas celulasas demonstraram estabilidade superior a 50% em pHs 4,5 e 6,0 ao longo de 5 horas de reação, bem como estabilidade térmica de 50% a 50 °C no mesmo período reacional. A adição de CoSO<sub>4</sub> e EDTA aumentou a atividade das enzimas EGL, EXG e BGL em mais de 100%. O efeito da adição de solvente foi analisado por meio de redes neurais artificiais com Mapa Auto-Organizável de Kohonen (KSOM) para encontrar correlações entre as respostas obtidas, a maioria dos solventes polares apróticos aumentaram a atividade enzimática em mais de 100%. As celulasas de *P. roqueforti* ATCC 10110 foram aplicadas na hidrólise enzimática dos resíduos: bagaço de cana (BC), casca de coco (CC) e palha de milho (PM) antes e após pré-tratamento hidrotérmico. O estudo demonstrou que a hidrólise dos resíduos após o pré-tratamento hidrotérmico foi mais eficiente na conversão aos açúcares redutores, apresentando os seguintes rendimentos de sacarificação PM (57 mg/g), CC (42,83 mg/g) e BC (48,24 mg/g) em 5 horas de reação. Este estudo destaca o potencial das celulasas de *P. roqueforti* ATCC 10110 na produção de açúcares fermentáveis a partir de resíduos agroindustriais, contribuindo para futuras pesquisas e aplicações em larga escala no campo da biotecnologia, demonstrando o valor dos resíduos agroindustriais e a otimização de processos biotecnológicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biotecnologia, Fungos, Celulasas, Hidrólise enzimática.

**VALUATION OF AGRO-INDUSTRIAL WASTE THROUGH SOLID STATE FERMENTATION FOR THE PRODUCTION OF CELLULOLYTIC ENZYMES BY *PENICILLIUM ROQUEFORTI* ATCC 10110 AND IN SACCHARIFICATION REACTIONS**

**ABSTRACT**

The bioprocess, Solid State Fermentation (SSF), utilizes agro-industrial waste as nutrients for microbial growth, which as they grow excrete enzymes; and to optimize the waste mixture in SSF, the mixture with restriction is used. The use of the desirability function can ensure that all necessary enzymes are present in ideal proportions in an enzyme complex that acts synergistically, such as endoglucanases (EGL), exoglucanases (EXG) and  $\beta$ -glucosidase (BGL). In this study, the desirability function is used to optimize the production of the cellulolytic complex by the fungus *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 via SSF. The fungus was grown in a waste mixture: cocoa almond husk (CAC) (1.0 g), cocoa fruit husk (CFC) (7.5 g), and palm oil (OD) (1.5 g), following the restricted mixture matrix, resulting in the following activities for EGL (5.38 U/g), EXG (1.01U/g) and BGL (2358.75 U/g). The cellulase enzymes demonstrated stability above 50% at pHs 4.5 and 6.0 over 5 hours of reaction, as well as thermal stability of 50% at 50 °C in the same reaction period. The addition of CoSO<sub>4</sub> and EDTA increased the activity of the EGL, EXG and BGL enzymes by more than 100%. The effect of solvent addition was analyzed through artificial neural networks with Kohonen Self-Organizing Map (KSOM) to find correlations between the obtained responses, most aprotic polar solvents increased enzymatic activity by more than 100%. The cellulases of *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 were applied in the enzymatic hydrolysis of the residues: sugarcane bagasse (BC), coconut husk (CC) and corn straw (PM) before and after hydrothermal pretreatment. The study demonstrated that the hydrolysis of the residues after hydrothermal pretreatment was more efficient in converting to reducing sugars, presenting the following saccharification yields PM (57 mg/g), CC (42.83 mg/g) and BC (48.24 mg/g) in 5 hours of reaction. This study highlights the potential of cellulases from *P. roqueforti* ATCC 10110 in the production of fermentable sugars from agro-industrial residues, contributing to future research and large-scale applications in the field of biotechnology, demonstrating the value of agro-industrial residues and the optimization of biotechnological processes.

**KEYWORDS:** Biotechnology, Fungi, Cellulases, Enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

|                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Vantagens e desvantagens da FES e FS .....                                                                                                                               | 27 |
| Tabela 2 - Variáveis de bioprocessos estudados para produção de celulasas (EGL, EXG e BGL) por fungos do gênero <i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> . .... | 30 |

### CAPÍTULO 2

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Matriz do planejamento de mistura com restrição .....        | 70 |
| Tabela 2 – Efeito dos solventes na ativação/inativação enzimática ..... | 89 |

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

|                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Gráfico Ternário da matriz de projeto de misturas restritas (a) Perfis para valores previstos e desejabilidade (b) Superfície de contorno da função desejabilidade (c).....       | 78 |
| Figura 2 –Temperaturas ótimas das EGL, EXG e BGL (a); Termoestabilidade: EGL (b), EXG (c) e BGL (d). ....                                                                                    | 81 |
| Figura 3 – pHs ótimos das EGL, EXG e BGL (a); Estabilidade: EGL (b), EXG (c) e BGL (d). ....                                                                                                 | 82 |
| Figura 4 – Efeito dos sais metálicos e compostos orgânicos em EGL, EXG, BGL.....                                                                                                             | 86 |
| Figura 5 – a) Mapa Auto-Organizado de Kohonen (KSOM) para as concentrações dos solventes (10, 20, 30, 40, 50%) b) Correlações solvente-enzima de acordo com as diferentes concentrações..... | 90 |

### CAPÍTULO 3

|                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 - Hidrólise dos resíduos: bagaço de cana (BC), casca de coco (CC) e palha de milho (PM) sem pré-tratamento pela EGL, EXG e BGL do <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110. .... | 108 |
| Figura 2 - Hidrólise dos resíduos: bagaço de cana (BC), casca de coco (CC) e palha de milho (PM) com pré-tratamento pela EGL, EXG e BGL do <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 ....  | 106 |
| Figura 3 - Atividade relativa da EGL, EXG e BGL durante a reação de sacarificação dos resíduos: bagaço de cana (BC), casca de coco (CC) e palha de milho (PM). ....              | 110 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

**AC** – Acetona

**ACN** – Acetonitrila

**RNA-AG** – Redes neurais artificiais com algoritmo genético

**BBD** – Desenho Box-Behnken

**BC** – Bagaço da cana-de-açúcar

**BGL** –  $\beta$ -Glicosidade

**BLAST** – Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local

**CAC** – Casca da amêndoa do cacau

**CC** – Casca de coco

**CCD** – Desenho Composto Central

**CCDR** – Desenho Composto Central Rotacional

**CFC** – Casca do fruto do cacau

**CMC** – Carboximetilcelulose

**CoSO<sub>4</sub>** – Sulfato de cobalto

**CuSO<sub>4</sub>** – Sulfato de cobre

**DMF** – *N,N*-dimetilformamida

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNS** – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

**EGL** – Endoglucanase

**EXG** – Exoglucanase

**Et** – Etanol

**FES** – Fermentação em estado sólido

**FeSO<sub>4</sub>** – Sulfato de ferro

**FS** – Fermentação Submersa

**HMF** – Hidroximetilfurfural

**KSOM** – Mapa Auto-organizado de Kohonen

**MgSO<sub>4</sub>** – Sulfato de magnésio anidro

**Met** – Metanol

**Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** – Sulfato de sódio anidro

**OD** – Oleo de dendê

**PM** – Palha de milho

**pH** – Potencial Hidrogeniônico

***p-NP***– *p*-nitrofenol

***p-NP β Glc***– *p*-nitrofenil β - D –glicopiranosídeo

**SC** – Simplex centroid

**UI** – Unidade Internacional de atividade enzimática

**Triton X-100** – T-octil-fenoxi-polietoxi-etanol

**Trolox** – 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico

**ZnSO<sub>4</sub>**– Sulfato de zinco anidro

## SUMÁRIO

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                   | <b>17</b> |
| <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                    | <b>19</b> |
| Geral .....                                                                                               | 19        |
| Específicos.....                                                                                          | 19        |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                  | <b>20</b> |
| <b>CAPÍTULO 1 – REVISÃO.....</b>                                                                          | <b>24</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                 | <b>25</b> |
| <b>2 PRODUÇÃO DE CELULASE PELOS GÊNEROS <i>TRICHODERMA</i>,<br/><i>ASPERGILLUS E PENICILLIUM</i>.....</b> | <b>28</b> |
| 2.1 Produção de Celulases por FES.....                                                                    | 39        |
| 2.2 Produção de celulases por FS .....                                                                    | 41        |
| <b>3 CONDIÇÕES FERMENTATIVAS.....</b>                                                                     | <b>42</b> |
| 3.1 Temperatura.....                                                                                      | 43        |
| 3.2 Umidade .....                                                                                         | 43        |
| 3.3 Tempo.....                                                                                            | 44        |
| 3.4 pH .....                                                                                              | 45        |
| 3.5 Otimização da produção de celulases.....                                                              | 46        |
| <b>4 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>                                                                       | <b>48</b> |
| <b>5 REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                | <b>49</b> |
| <b>CAPÍTULO 2.....</b>                                                                                    | <b>66</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                 | <b>67</b> |
| <b>2 METODOLOGIA.....</b>                                                                                 | <b>70</b> |
| 2.1 Preparo dos substratos .....                                                                          | 70        |
| 2.2 Cultivo do fungo e preparo da solução de esporos.....                                                 | 71        |
| 2.3 Processo de fermentação .....                                                                         | 71        |
| 2.3.1 Planejamento de mistura com restrições .....                                                        | 71        |
| 2.3.2 Fermentação em estado sólido.....                                                                   | 72        |
| 2.4 Extração multienzimática .....                                                                        | 72        |
| 2.4.1 Ensaio da atividade da endoglucanase (EGL) .....                                                    | 73        |
| 2.4.2 Ensaio da atividade da $\beta$ -glicosidases (BLG).....                                             | 73        |
| 2.4.3 Ensaio da atividade da exoglucanase (EXG).....                                                      | 74        |
| 2.5 Caracterização enzimática .....                                                                       | 74        |
| 2.5.1 Efeito da temperatura e estabilidade enzimática .....                                               | 74        |
| 2.5.2 Efeito do pH e estabilidade enzimática .....                                                        | 75        |

|                                                                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.5.3 Efeito dos sais metálicos e compostos orgânicos .....                                                                       | 75         |
| 2.5.4 Efeito dos solventes .....                                                                                                  | 76         |
| 3.1 Planejamento de mistura com restrição .....                                                                                   | 77         |
| 3.2 Caracterização Bioquímica.....                                                                                                | 80         |
| 3.2.1 Efeito da Temperatura .....                                                                                                 | 80         |
| 3.2.2 Efeito do pH .....                                                                                                          | 83         |
| 3.2.3 Efeito dos sais metálicos e compostos orgânicos .....                                                                       | 85         |
| 3.2.4 Efeito dos solventes .....                                                                                                  | 88         |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                           | <b>91</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                          | <b>92</b>  |
| <b>CAPÍTULO 3.....</b>                                                                                                            | <b>98</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                         | <b>99</b>  |
| <b>2 METODOLOGIA.....</b>                                                                                                         | <b>101</b> |
| 2.1 Fermentação em estado sólido.....                                                                                             | 101        |
| 2.1.1 Preparo do inóculo.....                                                                                                     | 101        |
| 2.1.2 Preparo dos resíduos.....                                                                                                   | 101        |
| 2.1.3 Processo fermentativo.....                                                                                                  | 102        |
| 2.2 Extração multienzimática .....                                                                                                | 102        |
| 2.2.1 Ensaio da atividade da endoglucanase (EGL) .....                                                                            | 103        |
| 2.2.2 Ensaio da atividade da exoglucanase (EXG).....                                                                              | 103        |
| 2.2.3 Ensaio da atividade da $\beta$ -glicosidases (BLG).....                                                                     | 104        |
| 2.3 Aplicação das celulasas em reações de sacarificação.....                                                                      | 104        |
| 2.3.1 Preparo dos substratos - Lavagem dos resíduos .....                                                                         | 105        |
| 2.3.2 Pré-tratamento hidrotérmico dos resíduos.....                                                                               | 105        |
| 2.3.3 Aplicação do extrato enzimático bruto na sacarificação de resíduos<br>lignocelulósicos. ....                                | 105        |
| <b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>                                                                                            | <b>106</b> |
| 3.1 Celulasas do <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110.....                                                                             | 106        |
| 3.2 Aplicação das celulasas (EGL, EXG e BGL) do <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110 na<br>hidrólise de resíduos agroindustriais ..... | 107        |
| 3.3 Identificação dos açúcares redutores por Cromatografia Líquida de Alta<br>Eficiência (CLAE).....                              | 111        |
| <b>4 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                           | <b>113</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                          | <b>114</b> |

## INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (Food and Agriculture Organization-FAO) estima que a produção mundial de resíduos agroindustriais atinja 1,3 bilhões de toneladas por ano, sendo que, 1/3 dos alimentos potencialmente destinados ao consumo humano são desperdiçados, seja como resíduos, oriundos do processamento, ou como perca na cadeia produtiva (IBARRURI; HERNÁNDEZ, 2021; KAUR; SINGH; SINGH, 2023). Uma grande variedade de resíduos agroindustriais pode ser utilizada como suporte na Fermentação em Estado Sólido (FES) sendo fonte de nutrientes para os microrganismos, e consequentemente, na produção de enzimas (BISWAL; MANDAVGANE, 2021; OLIVEIRA; MELO; BUZATO, 2019; RANA et al., 2021). A FES é um bioprocesso que envolve o crescimento microbiano em um substrato sólido, contendo uma umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, técnica versátil devido às vantagens econômicas e biotecnológicas além de contribuir para a valorização dos resíduos (ARAÚJO et al., 2022; DAS NEVES et al., 2022; DE MENEZES et al., 2023; LONDOÑO-HERNANDEZ et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019; RUDAKIYA, 2019).

Grande parte dos resíduos agroindustriais sólidos apresenta a lignocelulose como principal componente da biomassa, compreendendo cerca da metade da matéria vegetal produzida e representando o recurso orgânico renovável mais abundante no solo (YAFETTO, 2022; ZUCCARO; PIROZZI; YOUSUF, 2020). Além disso, a lignocelulose é composta por três tipos de biopolímeros: celulose, hemicelulose e lignina (ZUCCARO; PIROZZI; YOUSUF, 2020). Dentre os microrganismos, destacam-se os fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Apergillus* e *Penicillium*, os quais são capazes de degradar a lignocelulose e têm sido caracterizados como bons produtores de enzimas do tipo celulasas, essas muito empregadas no setor industrial (AHMED; BIBI, 2018; SAMPATHKUMAR et al., 2019)

As celulasas são formadas por um complexo de três enzimas denominadas endoglucanases (EGL), exoglucanases (EXG) e  $\beta$ -glicosidades (BGL), que atuam de forma sinérgica na degradação da cadeia polimérica da celulose (BHARDWAJ et al., 2021; INFANZÓN-RODRÍGUEZ et al., 2023; PATEL et al., 2019). A produção das enzimas EGL, EXG e BGL é amplamente relatada na literatura, pois pesquisas recentes

concentram-se na otimização eficiente da produção analisando fatores para melhorar o rendimento enzimático, destacando a produção a partir do fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; MARQUES *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2019)

As celulasas fúngicas podem ser aplicadas em reações de sacarificação de resíduos agroindustriais (FRASSATTO *et al.*, 2021; INFANZÓN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2023; SANTOS GOMES *et al.*, 2023). A celulose, presente nos resíduos agroindustriais, é um polissacarídeo complexo, que também é encontrado nas paredes celulares das plantas (ZHANG *et al.*, 2021). Em relação, ao aproveitamento desses resíduos, a degradação da celulose é fundamental. Isso ocorre por meio da ação do complexo de enzimas celulolíticas (EGL, EXG e BGL), que quebra as ligações da celulose em unidades menores de (AHMED; BIBI, 2018; EJAZ; SOHAIL; GHANEMI, 2021). Essa degradação é de extrema importância para a indústria biotecnológica (ACCOSSATO *et al.*, 2019; EJAZ; SOHAIL; GHANEMI, 2021; RANJAN *et al.*, 2023).

O processo de hidrólise enzimática da fração celulósica dos resíduos resulta na obtenção de glicose (RAVEN *et al.*, 2019; SANTOS GOMES *et al.*, 2023). A glicose é um açúcar essencial que pode ter diversas aplicabilidades (TRIPATHI *et al.*, 2023). Por exemplo, na indústria alimentícia, a glicose é um ingrediente importante em produtos como doces, geleias e xaropes (BHARDWAJ *et al.*, 2021; KUMAR; AGGARWAL, 2024). Além disso, a glicose também é usada na produção de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração (SINGHANIA *et al.*, 2021; YAVERINO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2024; ZUCCARO; PIROZZI; YOUSUF, 2020).

Assim, este trabalho foi dividido em três capítulos. O primeiro capítulo apresenta uma revisão abordando a produção de celulasas (EGL, EXG e BGL) pelos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*, com base na literatura científica nos últimos seis anos (2018-2024). Já, o segundo capítulo foca a aplicação de planejamentos quimiométricos para a produção e caracterização das enzimas celulasas (EGL, EXG e BGL) pelo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 via Fermentação em Estado Sólido (FES). Enquanto, o terceiro capítulo apresenta a aplicação dessas enzimas celulasas produzidas a partir do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 na hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais, analisando a eficiência do processo antes e após o pré-tratamento hidrotérmico.

## OBJETIVOS

### Geral

Produzir e caracterizar enzimas celulasas pelo fungo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 via fermentação em estado sólido e aplicação das enzimas celulasas na sacarificação de resíduos agroindustriais.

### Específicos

Paralelamente, ao desenvolvendo do projeto, realizou uma revisão visando à produção das celulasas endoglucanase (EGL), exoglucanase (EXG) e  $\beta$ -glicosidase (BGL) por fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* com base na literatura científica dos últimos seis anos (2018-2024). E para alcançar o objetivo geral, desenvolveram-se os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Produzir as enzimas celulolíticas (EGL, EXG e BGL) a partir do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 via FES utilizando ferramentas quimiométricas;
- ✓ Caracterizar bioquimicamente as enzimas celulolíticas do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, quanto ao pH, temperatura, e efeito da adição de sais e solventes.
- ✓ Aplicar as enzimas celulolíticas do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em reações de sacarificação de resíduos agroindustriais, antes e após pré-tratamento hidrotérmico.

## REFERÊNCIAS

- ACCOSSATO, S.; GRANATA, M.; FAÈ, M.; CELLA, R.; TOSI, S.; PICCO, A. M. Solid-state fermentation using a strain of *Trichoderma asperellum* improves the saccharification of rice straw. **Acta Microbiologica Bulgarica**, v. 35, n. 3, p. 133–140, 2019.
- AHMED, A.; BIBI, A. Fungal cellulase; production and applications: minireview. **LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences**, v. 4, n. 1, p. 19–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20319/ijhls.2018.41.1936>
- ARAÚJO, S. C.; RAMOS, M. R. M. F.; DO ESPÍRITO SANTO, E. L.; DE MENEZES, L. H. S.; DE CARVALHO, M. S.; TAVARES, I. M. de C.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Optimization of lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through solid-state fermentation using agro-industrial residue based on a univariate analysis. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 325–330, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1944203>
- BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, p. 95, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- BISWAL, D.; MANDAVGANE, S. A. Biomass waste: A potential feedstock for cellulase production. In: Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases. [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 347–359. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821882-2.00017-X>
- DA SILVA NUNES, N. et al. Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. **BioEnergy Research**, v. 13, n. 4, p. 1130–1143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>
- DAS NEVES, C. A.; DE MENEZES, L. H. S.; SOARES, G. A.; DOS SANTOS REIS, N.; TAVARES, I. M. C.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Production and biochemical characterization of halotolerant  $\beta$ -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown in forage palm under solid-state fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 8, p. 3133–3144, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00930-8>
- DE MENEZES, L. H. S.; OLIVEIRA, P. C.; DO ESPÍRITO SANTO, E. L.; GONÇALVES, M. S.; BILAL, M.; RUIZ, H. A.; DA SILVA, E. G. P.; SALAY, L. C.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Solid-State Fermentation as a Green Technology for Biomass Valorization: Optimization Techniques for Bioprocess—An Overview. **BioEnergy Research**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10670-y>
- EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. **Biomimetics**, v. 6, n. 3, p. 44, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>

FRASSATTO, P. A. C.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.  $\beta$ -Glucosidase production by *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* by solid state cultivation and application of enzymatic cocktail for saccharification of sugarcane bagasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 2, p. 503–513, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00608-1>

IBARRURI, J.; HERNÁNDEZ, I. Microbial Valorization: Strategies for Agro-Industry Waste Minimization and Value-Added Product Generation. In: SHACHI SHAH, V.; VENKATRAMANAN, R. P. (org.). Bio-valorization of Waste: Trends and Perspectives. 1. ed. Singapore: Springer, 2021. p. 73–110. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-9696-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-15-9696-4_4)

INFANZÓN-RODRÍGUEZ, M. I.; DEL MORAL, S.; CASTRO-MARTÍNEZ, C.; CANO-SARMIENTO, C.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Multi-Response Optimization Using the Desirability Function of Exoglucanases, Endoglucanases and  $\beta$ -Glucosidases Production by *Aspergillus niger* ITV-02 from Delignified Sugarcane Bagasse. **Sugar Tech**, v. 25, n. 1, p. 86–98, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01191-7>

KAUR, M.; SINGH, A. K.; SINGH, A. Bioconversion of food industry waste to value added products: Current technological trends and prospects. **Food Bioscience**, v. 55, p. 102935, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102935>

KUMAR, N.; AGGARWAL, N. K. Process development for fungal cellulase production and enzymatic saccharification of *Parthenium hysterophorus* for bioethanol production. **Waste Management Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2023.11.004>

LONDOÑO-HERNANDEZ, L.; RUIZ, H. A.; TORO, C. R.; ASCACIO-VALDES, A.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; AGUILERA-CARBO, A.; TUBIO, G.; PICO, G.; PRADO-BARRAGAN, A.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G.; AGUILAR, C. N. Advantages and Progress Innovations of Solid-State Fermentation to Produce Industrial Enzymes. In: [S. l.: s. n.]. p. 87–113. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_4)

MARQUES, G. L.; DOS SANTOS REIS, N.; SILVA, T. P.; FERREIRA, M. L. O.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Production and Characterisation of Xylanase and Endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through the Solid-State Fermentation of Rice Husk Residue. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 11, p. 2061–2069, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x>

OLIVEIRA, F. de; MELO, M. R. de; BUZATO, J. B. Effect of agro-industrial residues mixtures on the production of endoglucanase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 42, p. e41358, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v42i1.41358>

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.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v.

- 18, n. 3, p. 777–787, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira>
- PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 385–392, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.049>
- RANA, P.; INBARAJ, B. S.; GURUMAYUM, S.; SRIDHAR, K. Sustainable Production of Lignocellulolytic Enzymes in Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Waste: Application in Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Juice Clarification. **Agronomy**, v. 11, n. 12, p. 2379, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy11122379>
- RANJAN, R.; RAI, R.; BHATT, S. B.; DHAR, P. Technological Road map of Cellulase: A comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 198, p. 109020, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109020>
- RAVEN, S.; SRIVASTAVA, C.; KAUSHIK, H.; HESUH, V.; TIWARI, A. Fungal Cellulases: New Avenues in Biofuel Production. In: [S. l.: s. n.]. p. 1–18. E-book. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_1)
- RUDAKIYA, D. M. Strategies to Improve Solid-State Fermentation Technology. In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 155–180. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00010-2>
- SAMPATHKUMAR, K.; KUMAR, V.; SIVAMANI, S.; SIVAKUMAR, N. An Insight into Fungal Cellulases and Their Industrial Applications. In: [S. l.: s. n.]. p. 19–35. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_2)
- SANTOS GOMES, M. M. O. dos; NICODEMOS, I. S.; COSTA SILVA, M. da; SANTOS, D. M. R. C. dos; SANTOS COSTA, F.; FRANCO, M.; PEREIRA, H. J. V. Optimization of enzymatic saccharification of industrial wastes using a thermostable and halotolerant endoglucanase through Box-Behnken experimental design. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2201936>
- SINGHANIA, R. R.; RUIZ, H. A.; AWASTHI, M. K.; DONG, C.-D.; CHEN, C.-W.; PATEL, A. K. Challenges in cellulase bioprocess for biofuel applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 151, p. 111622, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111622>
- TRIPATHI, M.; LAL, B.; SYED, A.; MISHRA, P. K.; ELGORBAN, A. M.; VERMA, M.; SINGH, R.; MOHAMMAD, A.; SRIVASTAVA, N. Production of fermentable glucose from bioconversion of cellulose using efficient microbial cellulases produced from water hyacinth waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 252, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126376>
- YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. **Heliyon**, v. 8, n. 3, p. e09173, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>
- YAYERINO-GUTIÉRREZ, M. A.; WONG, A. Y. C.-H.; IBARRA-MUÑOZ, L. A.; CHÁVEZ, A. C. F.; SOSA-MARTÍNEZ, J. D.; TAGLE-PEDROZA, A. S.;

HERNÁNDEZ-BELTRAN, J. U.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, S.; SANTOS, J. C. dos; DA SILVA, S. S.; BALAGURUSAMY, N. Perspectives and Progress in Bioethanol Processing and Social Economic Impacts. **Sustainability**, v. 16, n. 2, p. 608, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su16020608>

ZHANG, B.; GAO, Y.; ZHANG, L.; ZHOU, Y. The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 251–272, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jipb.13055>

ZUCCARO, G.; PIROZZI, D.; YOUSUF, A. Lignocellulosic biomass to biodiesel. In: **Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels**. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 127–167. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00004-6>

## **CAPÍTULO 1 – Revisão**

### **Avanços na produção de celulases pelos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium***

#### **RESUMO**

A produção de celulases fúngicas tem sido alvo de intensa pesquisa devido seu potencial em aplicação industrial e impacto no desenvolvimento de processos sustentáveis. A compreensão dos mecanismos de produção dessas enzimas, bem como a otimização dos bioprocessos fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS), são aspectos cruciais para a eficiência e viabilidade econômica desses bioprocessos. Nesta revisão, realizou-se uma pesquisa com base em trabalhos publicados nos últimos 6 anos (2018-2024) sobre a produção das celulases endoglucanase (EGL), exoglucanase (EXG) e  $\beta$ -glicosidase (BGL) pelos fungos pertencentes aos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*, destacando suas características biológicas e estratégias de otimização dos bioprocessos; como também, as implicações industriais.

## **Avanços na produção de celulases pelos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium***

Sabryna Couto Araujo<sup>1</sup>, Eliézer Luz do Espírito Santo<sup>1</sup>, Iasnaia Maria de Carvalho Tavares<sup>2</sup>, Igor Carvalho Fontes Sampaio<sup>1</sup>, Muhammad Irfan<sup>3</sup>, Erik Galvão Paranhos<sup>1</sup>, Marcelo Franco<sup>1</sup>, Julieta Rangel de Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Pesquisa – Biotransformação e Biocatálise Orgânica, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 45654-370, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 45700-000, Bahia, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Ciências, Universidade de Sargodha, Sargodha, 40100, Paquistão

### **1 INTRODUÇÃO**

A produção de celulases por fungos filamentosos é um campo de pesquisa em constante evolução e de grande interesse para a indústria biotecnológica (CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020a). Os fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* são reconhecidos pela capacidade de secretar diversas enzimas de interesse comercial, incluindo as celulases, como endoglucanase (EGL), exoglucanase (EXG) e  $\beta$ -glicosidase (BGL) que desempenham um papel crucial na degradação da biomassa lignocelulósica (SAROJ; P; NARASIMHULU, 2022). Este complexo de enzimas é essencial para a conversão eficiente de matéria-prima vegetal em produtos de valor agregado, como biocombustíveis, produtos químicos e materiais renováveis (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022). A EGL atua na hidrólise da fração amorfa da cadeia de celulose reduzindo seu grau de polimerização (INFANZÓN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2023). A EXG é responsável por despolimerizar a extremidade redutora da celulose por hidrólise da ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica liberando celobiose (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020); e a BGL catalisa a hidrólise de ligações  $\beta$ -D-glicosídicas,

liberando açúcares simples como glicose (SAROJ; P; NARASIMHULU, 2022). A BGL pode atuar em diversos substratos, como a celobiose (DAS NEVES *et al.*, 2022).

Os bioprocessos de produção de celulasas incluem a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS), cada um com suas vantagens e desvantagens (Tabela 1) (CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020; DUTRA *et al.*, 2023) A FES apresenta benefícios como produtividade superior, simplicidade técnica, investimento de capital reduzido, demanda energética diminuída e consumo de água inferior (ABDULLAH *et al.*, 2021), enquanto a FS é vantajosa pela melhor transferência de massa, controle de temperatura e pH, e por ser escalonável a nível industrial (SUBHOSH CHANDRA *et al.*, 2021).

*Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* são utilizados em ambos bioprocessos, logo a escolha entre fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) para a produção das celulasas pode depender de vários fatores, incluindo a espécie do fungo, o substrato disponível e o objetivo do processo.

Logo, a escolha entre esses métodos de fermentação e a maximização de sua eficácia requer uma abordagem integrada que engloba múltiplas variáveis, tais como: seleção cuidadosa do microrganismo a ser utilizado, condições ideais para o meio de cultivo (temperatura, pH, tempo, substrato), a indução enzimática controlada e a avaliação econômica do bioprocessos (CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020; DASARI *et al.*, 2019; DUTRA *et al.*, 2023; SUBHOSH CHANDRA *et al.*, 2021). Assim, a utilização de ferramentas quimiométricas, têm sido amplamente utilizadas para estudar múltiplas variáveis em um bioprocessos, capaz de permitir a otimização das condições de fermentação e maximizar a produção de celulasas (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens da FES e FS.

|                     | <b>Fermentação em estado sólido</b>                                                                                                                                                                                      | <b>Fermentação submersa</b>                                                                                                                                         | <b>Referências</b>                                                                                                       |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Vantagens</b>    | Menor consumo de energia; menor de águas residuais;<br>Baixo requisito de água;<br>Menor suscetibilidade à contaminação;<br>Simplicidade técnica;<br>Baixo custo de investimento em equipamentos e sistemas de controle. | Escalonável a nível industrial;<br>Pouco trabalho manual;<br>Controle de temperatura e pH;<br>Boa homogeneização;<br>Inoculação fácil.                              | ABDULLAH <i>et al.</i> , 2021;<br>DAS NEVES <i>et al.</i> , 2022;<br>DINIL; JACOB, 2022;<br>INTASIT <i>et al.</i> , 2021 |
| <b>Desvantagens</b> | Menor transferência de massa;<br>Dificuldade de controle e monitoramento;<br>Dificuldade na escala industrial.                                                                                                           | Maior consumo de energia;<br>Necessidade de maior consumo de água;<br>Custo elevado de reagentes e equipamentos;<br>Produção de grandes volumes de águas residuais. | CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020;<br>CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022;<br>INTASIT <i>et al.</i> , 2021)                                 |

Esta revisão explora a produção das celulasas endoglucanase (EGL), exoglucanase (EXG) e  $\beta$ -glicosidase (BGL) por fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*, com base em literatura científica dos últimos 6 anos (2018-2024) (Tabela 2). Esta pesquisa foi realizada utilizando os bancos de dados da Scopus e Web of Science para consulta de periódicos. O foco da revisão é explorar o uso e

características biológicas dos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* e as variáveis de bioprocesso que influenciam a biossíntese de celulasas por meio da FES e FS. Bem como, as implicações dessas enzimas na indústria de bioprocessos e as possibilidades para o avanço de tecnologias sustentáveis que se beneficiam do uso de celulasas fúngicas.

## **2 PRODUÇÃO DE CELULASE PELOS GÊNEROS *TRICHODERMA*, *ASPERGILLUS* E *PENICILLIUM***

Os fungos filamentosos, que pertencem à categoria mais ampla de fungos, são considerados uma fonte potencialmente significativa devido à sua particular capacidade de secreção em comparação com outras fontes microbianas (MA *et al.*, 2024; METIN, 2023; SINGH *et al.*, 2021b, 2020)

Os fungos filamentosos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* são notáveis por sua capacidade de degradação de substratos complexos (ASIS *et al.*, 2021). Estes apresentam a capacidade de produzir enzimas celulolíticas valiosas, como as endoglucanases (EGL), exoglucanases (EXG) e  $\beta$ -glicosidases (BGL), tornando-os de grande interesse na biotecnologia e agricultura (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022; GRUJIĆ *et al.*, 2019; RAVEN *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2020), devido a atuação dessas enzimas na degradação de celulose, um dos principais componentes da biomassa vegetal, potencial considerável para diversas aplicações, incluindo a produção de biocombustíveis e o desenvolvimento na indústria de papel e celulose (ASTOLFI *et al.*, 2019; KUMAR; PRAKASH, 2023).

As espécies *Trichoderma longibrachiatum*, *T. harzianum* e *T. reesei* são encontradas em diversos tipos de solo, especialmente em climas temperados e tropicais, e são capazes de degradar amidos, pectinas e celulosas (MICHELIN *et al.*, 2019; TEO *et al.*, 2024). Já, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. heteromorphus*, *A. terreus* e *A. awamori* são altamente aeróbicos e estão presentes em quase todos os ambientes ricos em oxigênio, e são conhecidos por produzir uma variedade de enzimas que degradam polissacarídeos vegetais, como a celulose (BELLAOUCHI *et al.*, 2021; DOS SANTOS *et al.*, 2019; MOSTAFA *et al.*, 2024; RATUCHNE; KNOB, 2021; SHARMA *et al.*, 2020; SINGH *et al.*, 2021a). O *Penicillium*, capaz de colonizar diversos ambientes,

desde solos e materiais orgânicos até alimentos, é bem conhecido pela produção do antibiótico penicilina e na produção de queijos (A, 2022). Recentemente, também tem sido reconhecido como um bom produtor de celulase, produzindo EGL, EXG e BGL (A, 2022), e destaca-se por produzir boa quantidade de  $\beta$ -glicosidase (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2019), uma grande vantagem deste gênero em relação ao *Trichoderma* (A, 2022). As espécies mais relatadas para produção de celulasas são *P. funiculosum*, *P. crustosum*, *P. citrinum*, *P. rubens*, *P. oxalicum* e *P. roqueforti* (Tabela 2) (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022; ESPINOZA-ABUNDIS *et al.*, 2023; HE *et al.*, 2023; KUMAR *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SAINI; AGGARWAL, 2020).

Os bioprocessos FES e FS tem-se destacados na produção das celulasas pelos fungos pertencentes aos gêneros, *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* (SINGH *et al.*, 2021a; SINGHAL; BHAGYAWANT; SRIVASTAVA, 2021; SRIVASTAVA *et al.*, 2021). Alguns estudos relatam que a qualidade da fonte de carbono, pH, temperatura, percentual do inóculo e período de incubação são fatores que demonstram influência significativa na produção das enzimas EGL, EXG e BGL tanto pela FES quando FS (AREESHI, 2022; DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; SHAH; RANAWAT; MISHRA, 2019; SINGHAL; BHAGYAWANT; SRIVASTAVA, 2021). Na FES, a otimização da produção de celulase a partir desses gêneros foi alcançada em diversos estudos mediante a utilização de resíduos agroindustriais e planejamentos quimiométricos, resultando em aprimoramento da eficiência hidrolítica, como apresentado na tabela 2 (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022). Além disso, a utilização de resíduos de frutas (AREESHI, 2022) e outros resíduos agroindustriais (CASTRO-OCHOA *et al.*, 2023; COÊLHO *et al.*, 2021; DA SILVA NUNES *et al.*, 2020) servem como fontes de nutrientes para a produção de celulase microbiana e tem sido amplamente explorada, por apresentar potencial para biorrefinarias sustentáveis e produção de biocombustíveis (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; HENG; HAMZAH, 2022; PRAHALADBHAI; MURTY, 2020; SANTOS GOMES *et al.*, 2023; SHRUTHI *et al.*, 2019; VALLE-PÉREZ; FLORES-COSÍO; AMAYA-DELGADO, 2021).

Os estudos para produção, caracterização e purificação de celulasas proveniente de cultivos de espécies de *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* via FES tem sido mais explorada, pois as vantagens da produção de enzimas fúngicas nesse bioprocessos é maior em termos de facilidade e custo-benefício (Tabela 2) No entanto, a nível

industrial, a FS é mais utilizada devido à possibilidade de controle de temperatura e pH, facilidade de purificação do produto e por ser escalonável a nível industrial (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022; DASARI *et al.*, 2019; DE REZENDE *et al.*, 2020; NAHER *et al.*, 2021a; NÚÑEZ-SERRANO; GARCÍA-REYES; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2024).

Os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* tem mostrado extrema relevância na produção de enzimas celulolíticas e nas indústrias biotecnológicas. No entanto, é crucial observar que os métodos de produção e otimização dessas enzimas necessitam de um estudo mais aprofundado sobre suas vantagens e limitações, especialmente no contexto da escalabilidade industrial e dos custos associados. Além disso, é essencial, no contexto social, abordar as questões relacionadas à sustentabilidade e à eficiência dos processos de produção, considerando o uso de resíduos agroindustriais como fontes de nutrientes. É importante destacar não apenas os avanços e potenciais desses bioprocessos (FES e FS), mas também os desafios e áreas de melhoria, contribuindo para uma compreensão mais abrangente e informada do campo da biotecnologia de enzimas celulolíticas.

Tabela 2 – Variáveis de bioprocessos estudados para produção de celulasas (EGL, EXG e BGL) por fungos do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium*.

| Planejamentos | Variáveis                                                                                              | Fungos                                   | Fermentação | Substrato                                                                                                                                                                                                        | Enzimas                                              | Referências                        |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------|
| CCRD          | Temperatura (°C)<br>Umidade (%)                                                                        | <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 | FES         | Palmeira forrageira                                                                                                                                                                                              | β-glicosidase                                        | (DAS NEVES <i>et al.</i> , 2022)   |
| CCD           | peptona protease<br>Lactose<br>MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | <i>Trichoderma harzianum</i> HZN11       | FES         | Talos de sorgo Farelo de trigo<br>Bagaço de cana-de-açúcar<br>Casca de amendoim<br>Espigas de milho Farelo de arroz<br>Casca de arroz<br>Bolos de Serragem Óleo de amendoim óleo de coco<br>Bolo de Serapilheira | Endoglucanas e<br>Exoglucanase<br>FPaseβ-glucosidase | (BAGEWADI ; MULLA; NINNEKAR, 2018) |
| CCD           | pH<br>Extrato de levedura (p/m%)<br>Tamanho do inóculo (esporos g <sup>-1</sup> )<br>Umidade (%)       | <i>Aspergillus niger</i> CKB             | FES         | Resíduos têxteis                                                                                                                                                                                                 | Celulase                                             | (HU <i>et al.</i> , 2018)          |

|                 |                                                                                                                                                                                                |                                          |     |                                                 |                                     |                                             |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----|-------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------|
| Plackett-Burman | Farelo de trigo (%)<br>Avicel (%)<br>Lactose (%)<br>CSL (%)<br>Ureia (%)<br>CaCl <sub>2</sub> (%)                                                                                              | <i>Penicillium funiculosum</i> NCIM 1228 | FS  | Sintético                                       | Fpase*<br>CMCase**<br>β-glicosidase | (CHAVAN;<br>SHETE;<br>DHARNE,<br>2024a)     |
| BBD             | Ureia<br>CaCl <sub>2</sub><br>MgSO <sub>4</sub><br>Peptona<br>Avicel<br>Farelo de Trigo<br>CSL<br>Lactose<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>Temperatura<br>pH<br>inóculo<br>agitação (RPM) |                                          |     |                                                 |                                     |                                             |
| BBD-RNA-GA      | Temperatura (°C)<br>Tempo<br>pH                                                                                                                                                                | <i>Penicillium oxalicum</i> R4           | FS  | Sintético                                       | Fpase<br>CMCase<br>β-glicosidase    | (LI <i>et al.</i> ,<br>2021)                |
| SC-RNA-GA       | Resíduos de mistura                                                                                                                                                                            | <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110 | FES | Bagaço de cana-de-açúcar<br>Casca de coco verde | Exoglucanase                        | (DA SILVA<br>NUNES <i>et al.</i> ,<br>2020) |

|                       |                                                                           |                                          |     |                                                                     |                                         |                                           |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
| Planejamento fatorial | Concentração de inóculo<br>Temperatura<br>Concentração de farelo de trigo | <i>Penicillium sp.</i> FSDE15            | FS  | Farelo de trigo Bagaço de cana-de-açúcar<br>Palha de cana-de-açúcar | CMCase<br>$\beta$ -glicosidase          | (COÊLHO <i>et al.</i> , 2021)             |
| CCD                   | Peptona (%)<br>Lactose (%)<br>pH                                          | <i>Penicillium citrinum</i>              | FES | Parthenium hysterophorus                                            | Fpase                                   | (KUMAR; AGGARWAL, 2024)                   |
| BBD                   | Temperatura<br>pH<br>Inóculo<br>agitação                                  | <i>Penicillium funiculosum</i> NCIM 1228 | FS  | Sintético                                                           | Fpase<br>CMCase<br>$\beta$ -glicosidase | (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022)             |
| Planejamento fatorial | Umidade (%)<br>Substrato (g)                                              | <i>Aspergillus japonicus</i> URM5620     | FES | Casca de laranja<br>Casca de maracujá                               | Fpase<br>CMCase                         | (DA SILVA <i>et al.</i> , 2023)           |
| BBD                   | Uréia (g/L)<br>Sulfato de amônio (g/L)<br>Extrato de levedura (g/L)       | <i>Aspergillus niger</i> ITV 02          | FS  | Sintético                                                           | CMCase                                  | (INFANZÓN-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2020) |
| CCRD                  | pH<br>Temperatura (°C)<br>Tempo (d)                                       | <i>Aspergillus fumigatus</i>             | FES | Serragem de pinho                                                   | Celulases<br>$\beta$ -glicosidase       | (JOSHI <i>et al.</i> , 2024)              |
| SC                    | Resíduos de mistura                                                       | <i>Aspergillus niger</i> B60             | FES | Bagaço branco<br>Farelo de trigo<br>Bagaço de uva vermelha          | Carboximetil<br>celulase                | (PAPADAKI <i>et al.</i> , 2020)           |

|                 |                                                                                                                                       |                                      |     |                                                                                                                                                                                                                                                      |                        |                                      |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| CCRD            | pH<br>Cultivo do tempo<br>Concentração de substrato                                                                                   | <i>Aspergillus fumigatus</i>         | FS  | Farinha de canola                                                                                                                                                                                                                                    | β-glicosidase          | (RATUCHNE ; KNOB, 2021)              |
| BBD             | Temperatura (°C)<br>Tempo (h)<br>Atividade na água                                                                                    | <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 10124 | FES | Casca de cacau                                                                                                                                                                                                                                       | CMCase                 | (REIS <i>et al.</i> , 2020)          |
| CCD             | Umidade inicial<br>pH<br>Temperatura (°C)<br>inóculo (%)<br>Tempo (h)                                                                 | <i>Aspergillus terreus</i> RWY       | FES | Bagaço de sorgo                                                                                                                                                                                                                                      | Fpase<br>β-glicosidase | (SHARMA <i>et al.</i> , 2020)        |
| BBD             | Teor de azoto (%)<br>inóculo fúngico<br>Tempo (h)                                                                                     | <i>Aspergillus flavus</i>            | FES | Palha de trigo                                                                                                                                                                                                                                       | CMCase                 | (SINGHAL <i>et al.</i> , 2022)       |
| CCD             | Umidade (%)<br>Relação BSG/AP (%)<br>pH                                                                                               | <i>Aspergillus sp.</i>               | FES | Bagaço de maçã<br>Grão gasto de cervejaria<br>Sabugo de milho Caroço<br>de algodão Resíduos de<br>cenoura<br>Casca de toranja Bagaço<br>de uva<br>Casca de laranja<br>Casca de amendoim<br>Resíduo de massa<br>alimentícia<br>Resíduo de soja Farelo | Celulase               | (SOSA-MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 2023) |
| Plackett-Burman | Temperatura<br>pH do meio mineral<br>Umidade<br>Quantidade de inóculo<br>Idade do inóculo<br>Tempo de fermentação<br>Razão AFR BSG/AP |                                      |     |                                                                                                                                                                                                                                                      |                        |                                      |

|                          |                                                          |                                                              |     |                                  |                                 |                                        |
|--------------------------|----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|
|                          |                                                          |                                                              |     | de trigo                         |                                 |                                        |
| BBD                      | Dosagem de inóculo<br>Temperatura<br>pH                  | <i>Trichoderma reesei</i>                                    | FES | Farelo de trigo                  | Fpase                           | (VERMA;<br>KUMAR,<br>2020)             |
| BBD                      | Tamanho do inóculo<br>umidade inicial<br>pH              | <i>Trichoderma harzianum</i><br><i>Aspergillus fumigatus</i> | FES | Folhas de dendê                  | Fpase<br>EGase<br>β-glicosidase | (TEO <i>et al.</i> ,<br>2024)          |
| Planejamento<br>fatorial | pH<br>umidade<br>Maltose<br>Farinha de aveia<br>Magnésio | <i>Trichoderma hamatum</i> NGL1                              | FES | Esterco de vaca                  | CMCase                          | (MARRAIKI<br><i>et al.</i> , 2020)     |
| CCD                      | Razão de substrato<br>Razão de conídios                  | <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>           | FES | Farelo de trigo<br>Casca de soja | CMCase                          | (MORILLA;<br>STEGMANN;<br>TUBIO, 2023) |
| CCD                      | Talos de Molokhia (g/L)<br>Tempo (d)                     | <i>Aspergillus awamori</i> MK788209                          | FES | Hastes de Molokhia               | CMCase                          | (MOSTAFA<br><i>et al.</i> , 2024)      |
| RNA-GA                   | Tempo<br>Concentração da fonte<br>de nitrogênio          | <i>Trichoderma stromaticum</i> AM7                           | FES | Resíduo de pupunha               | CMCase                          | (BEZERRA <i>et al.</i> , 2021)         |

|       |                                                                                  |                                                                                                |     |                                                                                             |                                                |                                 |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------|
|       | Temperatura                                                                      |                                                                                                |     |                                                                                             |                                                |                                 |
| CCD   | Umidade<br>pH                                                                    | <i>Aspergillus niger</i>                                                                       | FS  | Resíduos<br>lignocelulósicos urbanos                                                        | Fpase<br>CMCase                                | (SANTOS <i>et al.</i> , 2022)   |
| BLAST | Temperatura (°C)<br>pH<br>Tempo                                                  | <i>Penicillium oxalicum</i> P-07                                                               | FS  | CMC-Na<br>Farelo de trigo                                                                   | CMCase<br>FPase<br>CBHase****<br>β-glicosidase | (XIE <i>et al.</i> , 2023)      |
| BBD   | Hora (dia)<br>Proporção de material<br>líquido inicial<br>pH<br>Temperatura (°C) | <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (MK 878447)<br><i>Trichoderma afroharzianum</i> (MT 734073) | FES | Palha de milho                                                                              | Fpase                                          | (LI; ZHAO; HE, 2022)            |
| CCD   | Temperatura (°C)<br>Tamanho do inóculo<br>(esporos/g)                            | <i>Trichoderma reesei</i> CCT-2768                                                             | FES | <i>Opuntia ficus-indica</i>                                                                 | Fpase<br>β-glicosidase<br>CMCase               | (SOUZA FILHO; DOS SANTOS, 2023) |
| CCRD  | Temperatura (°C)<br>pH                                                           | <i>Trichoderma reesei</i> NRRL 3652                                                            | FES | Casca de arroz Casca de soja<br>Bagaço de cana-de-açúcar<br>Palito de dente em pó erva-mate | Fpase<br>CMCase                                | (ASTOLFI <i>et al.</i> , 2019)  |
| CCD   | Bolo de amendoim em pó<br>Umidade Inicial<br>Farelo de trigo                     | <i>Penicillium oxalicum</i> 16<br><i>Trichoderma reesei</i> RUT-C30                            | FES | Farelo de trigo<br>Palha de arroz                                                           | Endoglucanas<br>e<br>FPase<br>Exoglucanase     | (ZHAO; YI; LI, 2019)            |

|                 |                                                                                                                                                                                                       |                              |           |                                                                                                                |                      |                           |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Plackett-burman | Bolo de amendoim em pó<br>Umidade Inicial<br>Temperatura<br>pH inicial<br>Palha de arroz<br>Farelo de trigo<br>Dummy 1                                                                                |                              |           |                                                                                                                | $\beta$ -glicosidase |                           |
| Plackett-Burman | Peptona<br>Farelo de trigo<br>$K_2HPO_4$<br>KCl<br>$MgSO_4 \cdot 7H_2O$<br>$FeSO_4$<br>pH<br>Temperatura (°C)<br>Volume do meio (ml)<br>Tamanho do inóculo (ml/50 ml)<br>Velocidade de agitação (rpm) | <i>Aspergillus ochraceus</i> | FES<br>FS | Farelo de arroz<br>Farelo de trigo<br>Casca de limão<br>Casca de laranja<br>Farelo de aveia<br>Milho de pipoca | Fpase<br>CMCase      | (ALNUSAIR E; FARAG, 2022) |

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                    |     |                      |                 |                               |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----|----------------------|-----------------|-------------------------------|
| Plackett-Burman | FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O<br>Tween 80<br>Amido solúvel<br>Peptona<br>CaCl <sub>2</sub><br>extrato de levedura<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>MgSO <sub>4</sub> .7. H <sub>2</sub> O<br>(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>MnSO <sub>4</sub> . ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O<br>Ureia<br>Acetato de sódio desidrogenato<br>Carbonato de sódio anidro<br>Tempo de incubação | <i>Aspergillus niger</i> 3ASZ      | FS  | Sintético            | Celulase        | (SOROUR <i>et al.</i> , 2023) |
| BBD             | Amido solúvel<br>MnSO <sub>4</sub><br>CaCl <sub>2</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                    |     |                      |                 |                               |
| CCRD            | Atividade de água<br>Massa de fibra (g)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <i>Trichoderma reesei</i> CCT-2768 | FES | Fibras de coco verde | Fpase<br>CMCase | (CAMPOS <i>et al.</i> , 2024) |

\*Fpase – Celulase total \*\*CMCase- Endoglucanase \*\*\*CBHase

## 2.1 Produção de Celulases por FES

Os resíduos agroindustriais frequentemente são descartados indiscriminadamente no meio ambiente, resultando em problemas ambientais, tais como: saneamento, poluição e riscos à saúde de animais e seres humanos. Uma alternativa bastante positiva é fermentação em estado sólido (FES), técnica de bioprocessamento, que ocorre em uma matriz sólida (suporte/substrato), geralmente resíduos agroindustriais, na ausência ou quase ausência de água livre levando a produtos de alto valor agregado. No entanto, o substrato requer umidade para sustentar o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos (BEHERA; KERKETTA; RAY, 2023; CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020; RUDAKIYA, 2019; YAFETTO; ODAMTTEN; WIAFE-KWAGYAN, 2023).

A primeira etapa crítica durante a FES envolve a seleção cuidadosa do resíduo agroindustrial e dos fungos adequados, que serão empregados no processo de fermentação. Devido à composição lignocelulósica e ao grande tamanho dos substratos, geralmente é necessário tratar o resíduo, picando, triturando ou quebrando para reduzir o tamanho das partículas. Isso aumenta a área superficial e torna os substratos mais acessíveis para a colonização microbiana durante a fermentação (SUBHOSH CHANDRA *et al.*, 2021; YAFETTO, 2022; YAFETTO; ODAMTTEN; WIAFE-KWAGYAN, 2023).

Apesar disso, estudos relatam que alguns resíduos agroindustriais não contêm todos os nutrientes essenciais necessários para o crescimento fúngico (BISWAL; MANDAVGANE, 2021; YAFETTO; ODAMTTEN; WIAFE-KWAGYAN, 2023). Portanto, a adição de suplementos nutricionais aos resíduos agroindustriais serve para melhorar a necessidade de nutrientes durante o crescimento microbiano e a formação de produtos durante a fermentação. Os nutrientes comumente usados para complementar substratos na FES incluem fontes de nitrogênio, como sulfato de amônia ( $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_2$ ), nitrato de amônia ( $\text{NH}_3\text{NO}_3$ ), nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ), peptona, uréia, extrato de levedura (YAFETTO; ODAMTTEN; WIAFE-KWAGYAN, 2023).

Os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* são frequentemente empregados na FES, devido sua capacidade de rápida proliferação em substratos sólidos com reduzido teor de água (ACCOSSATO *et al.*, 2019; LODHA; PAWAR; RATHOD, 2020; SHRUTHI; ACHUR; NAYAKA BORAMUTHI, 2020; SHRUTHI *et al.*, 2019).

As pesquisas têm se concentrado na otimização da produção de celulases, utilizando resíduos agroindustriais como substratos por meio de FES (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; ESPINOZA-ABUNDIS *et al.*, 2023; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

*T. harzianum* e *T. reesei* são frequentemente relatados para a produção de celulase (Tabela 2), destacando *T. reesei* que é um dos fungos filamentosos extensivamente estudado, porque produz EGL, EXG e BGL suficiente para degradar completamente a celulose (FRASSATTO *et al.*, 2021; HENG; HAMZAH, 2022). A maior parte das celulases comerciais disponíveis é produzida a partir de *T. reesei* (KSHIRSAGAR *et al.*, 2020). Contudo, foi bem documentado que o *T. reesei* produz BLG em quantidade menor comparado a EGL e EXG, que estão em proporção suficiente, para a hidrólise eficiente da biomassa lignocelulósica (KAUR; SINGH; SINGH, 2023; LONG *et al.*, 2022). Assim, a BGL de *Aspergillus niger* é geralmente adicionada à celulase de *T. reesei* para gerar uma mistura de coquetel para hidrólise eficiente de biomassa, levando a uma conversão de biomassa economicamente viável (LEGODI; LA GRANGE; VAN RENSBURG, 2023).

No contexto da FES, *Aspergillus*, especificamente, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger* foram relatadas como produtores de quantidades elevadas de celulases (EGL, EXG, BGL) quando cultivado em substratos lignocelulósicos individuais (Tabela 2) ((MOSTAFA *et al.*, 2024; SALDAÑA-MENDOZA *et al.*, 2023; SINGH *et al.*, 2021a; SINGHAL *et al.*, 2022; THAKUR *et al.*, 2024; VALLE-PÉREZ; FLORES-COSÍO; AMAYA-DELGADO, 2021). Como também, o gênero *Penicillium* mostrou potencial na produção de celulases frente à FES, destacando o *P. funiculosum*, *P. roqueforti* ATCC 10110 e *P. crustosum* quando cultivado em substratos lignocelulósicos individuais ou em misturas (Tabela 2) (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022; DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; NÚÑEZ-SERRANO; GARCÍA-REYES; GARCÍA-GONZÁLEZ, 2024; OGUNYEWU *et al.*, 2020).

Embora a FES tenha emergido como uma técnica promissora na produção de celulases a partir de resíduos agroindustriais existe limitações e desafios associados a esse método; e os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* sejam frequentemente explorados devido à sua capacidade de crescimento em substratos sólidos com baixo teor de água, a dependência de uma umidade adequada para o crescimento desses fungos levanta preocupações sobre a eficiência da FES, devido à falta de controle de

parâmetros, como temperatura e pH durante o bioprocesso. Além disso, é essencial reconhecer que, embora *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* tenham demonstrado potencial na produção de celulasas, a eficácia desses gêneros em diferentes substratos e condições de cultivo ainda não foi completamente explorada a nível industrial. Portanto, uma visão da pesquisa atual em FES sugere a necessidade de uma abordagem mais abrangente, que leve em consideração não apenas a produção de celulasas, mas também a espécie de fungo utilizada, os parâmetros estudados e a adaptação do fungo aos substratos, para obter uma mistura de celulasas com boas concentrações de EGL, EXG e BGL e com grande potencial de aplicação biotecnológica que seja eficiente e economicamente viável.

## 2.2 Produção de celulasas por FS

FS é considerada vantajosa industrialmente, pois requer menor tempo de manuseio, é escalonável a nível industrial e a purificação do produto final é mais fácil (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022). Dessa forma, é uma técnica preeminente na produção de celulase, destacando o fungo aeróbico *Trichoderma reesei* como uma das cepas mais utilizadas, conforme amplamente documentado na literatura (Tabela 2) (ACCOSSATO *et al.*, 2019; CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020; GRUJIĆ *et al.*, 2019; HENG; HAMZAH, 2022; LEGODI; LA GRANGE; VAN RENSBURG, 2023; NOVY *et al.*, 2021). Contudo, na FS, o custo de produção dessas enzimas é relativamente elevado. Isso representa um obstáculo significativo para sua aplicação em escala mais abrangente, conforme discutido na literatura (DE REZENDE *et al.*, 2020; NAHER *et al.*, 2021a, 2021b; YANG *et al.*, 2024).

Em comparação com a FES, a produção de enzimas por meio da FS apresenta vantagens em termos de melhor transferência de massa, boa homogeneização e disponibilidade de equipamentos industriais (Tabela 1). Ambas, FES e FS têm sido empregadas na produção de enzimas celulolíticas fúngicas (CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020; INTASIT *et al.*, 2021; LEGODI; LA GRANGE; VAN RENSBURG, 2023). No entanto, ao analisar a tabela 2, observa-se uma tendência entre os pesquisadores pela FES. Essa preferência pela FES pode ser atribuída a diversas razões, como a capacidade

dos fungos filamentosos a adaptar-se em ambientes com menor teor de água. Além disso, a FES é reconhecida por proporcionar condições mais simples para o crescimento dos fungos e pela produção de enzimas em maior quantidade em comparação com a FS (DASARI *et al.*, 2019). Os trabalhos apresentados na tabela 2 sugerem que a FES tem sido mais eficaz na obtenção de altos rendimentos de produção de enzimas celulasas.

Apesar, a FS ser uma técnica amplamente utilizada na indústria biotecnológica, essa enfrenta alguns desafios. Sua dependência de condições de cultivo controladas, como temperatura e pH, pode aumentar os custos de produção e reduzir a viabilidade econômica e ambiental, em função do uso de matérias-primas de alto valor e reagentes que podem levar a formação de subprodutos indesejados (NANDA *et al.*, 2023). Reconhecer e abordar esses desafios são cruciais para melhorar a eficiência, sustentabilidade e a viabilidade econômica da FS, podendo aprimorar o meio de cultivo através da exploração de fontes alternativas de matéria-prima de baixo custo.

### **3 CONDIÇÕES FERMENTATIVAS**

A escolha do fungo para a produção de celulasas depende do bioprocessamento (FES e FS) escolhido, das demandas de produção e das propriedades desejadas das enzimas (SHARMA *et al.*, 2020).

Durante a FES ou FS diversas variáveis podem influenciar a eficiência de crescimento fúngico e produção de celulasas, como temperatura, pH do meio, umidade inicial, tempo de incubação, adição de nutrientes e quantidade de substrato (RAVEN *et al.*, 2019; SAMPATHKUMAR *et al.*, 2019). A temperatura e o pH são as variáveis mais estudadas, pois pode variar muito de acordo com o fungo utilizado, já que ambas as variáveis podem causar estresse para o fungo em valores muito elevados ou reduzidos (LI *et al.*, 2022). Estudos detalhados sobre a resposta de diferentes fungos a variações de temperatura e pH são fundamentais para entender as necessidades específicas de cada sistema. De modo geral, as celulasas têm sido produzidas em pH's levemente ácidos (4,0 – 6,0) e temperaturas entre 27 a 35 °C (PATEL *et al.*, 2019). A umidade e o tempo de fermentação também são variáveis bastante estudadas, alguns trabalhos analisam o tempo de crescimento do fungo, chamado de perfil fermentativo para avaliar como o fungo cresce de acordo com as variações de umidade, temperatura e principalmente

tempo (DAS NEVES *et al.*, 2022; LEGODI; LA GRANGE; VAN RENSBURG, 2023). Estudos detalhados sobre a resposta dos fungos a essas variáveis são essenciais para entender as necessidades específicas de cada sistema e otimizar o processo de produção de celulases. Logo, é necessário explorar cada uma dessas variáveis em detalhes.

### 3.1 Temperatura

Em sistemas de fermentação fúngicos, a temperatura demonstrou ter efeito sobre a secreção de certas enzimas (PATEL *et al.*, 2019). Os fungos do gênero *Trichoderma* são relatados na literatura com faixa de temperatura de 25 a 30°C (LEGODI; LA GRANGE; VAN RENSBURG, 2023; MICHELIN *et al.*, 2019; PELÁEZ *et al.*, 2022). Já fungos do gênero *Aspergillus* podem crescer em uma ampla faixa de temperatura. Por exemplo, o *Aspergillus niger* pode crescer em temperaturas que variam de 20°C a 45°C, sendo relatada temperatura de 30 °C como a ideal para o seu crescimento (BELLAOUCHI *et al.*, 2021; DOS SANTOS *et al.*, 2019). Os fungos do gênero *Penicillium* podem crescer em uma faixa de temperatura ainda mais ampla do que a do *Aspergillus* e *Trichoderma*. Por exemplo, o *Penicillium* pode crescer em temperaturas baixas (5 °C) e a temperaturas relativamente altas (35 °C) (COTON *et al.*, 2020). Estudos revelam que as temperaturas ideais para o seu desenvolvimento estão entre 20 e 25 °C. No entanto, temperaturas acima de 35 °C, seu desenvolvimento é muito ruim ou eles não crescem diretamente ((COTON *et al.*, 2020; ESPINOZA-ABUNDIS *et al.*, 2023; HE *et al.*, 2023; KUMAR *et al.*, 2022; SHRUTHI; ACHUR; NAYAKA BORAMUTHI, 2020; VALLE-PÉREZ; FLORES-COSÍO; AMAYA-DELGADO, 2021).

Assim, a taxa de crescimento pode diminuir fora do intervalo ideal e essas faixas de temperatura podem variar dependendo da espécie dos fungos e do meio de cultivo escolhido.

### 3.2 Umidade

Ao comparar os bioprocessos, FES e FS, a umidade é uma variável, exclusivamente, avaliada na FES e determinada pelo tipo de resíduo utilizado como substrato e desempenha um papel crucial no processo fermentativo, pois a umidade influencia diretamente na disponibilidade de nutrientes, na solubilidade de compostos e a manutenção das condições ideais para a atividade microbiana (DAS NEVES *et al.*, 2022; LEGODI; LA GRANGE; VAN RENSBURG, 2023; SOSA-MARTÍNEZ *et al.*, 2023).

A quantidade adequada de umidade é essencial para garantir a eficiência do bioprocessos, fornecendo um ambiente propício para o crescimento microbiano (BEHERA; KERKETTA; RAY, 2023; COTON *et al.*, 2020; DASARI *et al.*, 2019; MAURICE, 2019; RUDAKIYA, 2019). Na literatura, a umidade tem sido expressa em porcentagem (%) (SOSA-MARTÍNEZ *et al.*, 2023) ou como atividade de água ( $A_w$ ) (REIS *et al.*, 2020). A umidade em porcentagem indica a quantidade real de água presente em um material, expressa como uma proporção do peso total.  $A_w$  é uma medida adimensional que reflete a disponibilidade da água para reações químicas e atividade microbiana (REIS *et al.*, 2020; SOSA-MARTÍNEZ *et al.*, 2023; TEO *et al.*, 2024).

Na FES, onde o substrato é sólido com pouca água disponível, manter a umidade constante é desafiador devido à evaporação, heterogeneidade do substrato e dificuldades de monitoramento (CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020; DASARI *et al.*, 2019). A perda de umidade ao longo da fermentação pode afetar a disponibilidade de água para os fungos e influenciar a eficiência do bioprocessos (DASARI *et al.*, 2019; MITCHELL; RUIZ; KRIEGER, 2023). Diante disso, o tempo é um fator que influencia diretamente na umidade.

### **3.3 Tempo**

O tempo de fermentação é um fator crucial que influencia a taxa de crescimento microbiano, a produção de metabólitos desejados e a eficiência global do processo de crescimento. Durante a fermentação, os fungos alimentam-se dos nutrientes presentes no substrato, crescem, multiplicam-se e produzem enzimas que continuam a degradar o

substrato para obter mais nutrientes (DASARI *et al.*, 2019; RAVEN *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2020) esse processo requer um tempo, que é indeterminado a depender da enzima desejada. A produção de celulasas (EGL, EXG, BGL) tem sido relatada em fermentações que duram de 3 a 7 dias (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DASARI *et al.*, 2019; RAVEN *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2020).

No entanto, é razoável supor que um período de fermentação adequado seja necessário para permitir o crescimento dos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* para obter maiores quantidades de celulasas (Tabela 2). Em geral, o tempo de fermentação é um fator que deve ser otimizado para cada espécie fúngica, individualmente, bem como as condições de fermentação para garantir o crescimento ideal do fungo e a produção de enzimas celulolíticas (DASARI *et al.*, 2019).

### 3.4 pH

O pH é uma variável crítica tanto para FES quanto FS, afetando diretamente o crescimento microbiano e a produção de enzimas, incluindo as celulasas (AREESHI, 2022; RAVEN *et al.*, 2019).

Na FES, o pH é frequentemente considerado durante o processo de extração das enzimas celulasas (JOSHI *et al.*, 2024). Isso ocorre porque o pH pode influenciar a estabilidade e a atividade dessas enzimas, afetando, assim, sua eficiência na degradação do substrato sólido. Estudos mostraram que diferentes faixas de pH podem ser ideais para EGL, EXG e BGL produzidas por fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; INFANZÓN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2023; MARRAIKI *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Portanto, ajustar o pH durante o processo de extração pode ser crucial para garantir alto rendimento enzimático (AREESHI, 2022; RAVEN *et al.*, 2019).

Por outro lado, na FS, o pH é um parâmetro chave para controlar o crescimento microbiano e induzir a produção de celulasas (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022; SINGH *et al.*, 2021a). Fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* têm diferentes faixas de pH ótimo para o crescimento e produção de celulasas. Manter o pH dentro da faixa ideal pode maximizar a atividade enzimática e, consequentemente,

aumentar a eficiência do processo de fermentação (AREESHI, 2022; RAVEN *et al.*, 2019). Alguns estudos relatam atividades ótimas das enzimas EGL, EXG e BGL em pH ácido tanto na extração pela FES (GOMES *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2023), quanto na produção pela FS e FES (CATALÁN; SÁNCHEZ, 2020; TEO *et al.*, 2024; XIE *et al.*, 2023) conforme os trabalhos citados na tabela 2.

Logo, o pH desempenha um papel significativo na regulação da atividade enzimática durante a fermentação, seja na FES ou na FS. É necessário um estudo e controle cuidadoso do pH para melhorar a produção de celulasas e, consequentemente, maximizar a eficiência dos bioprocessos (FES e FS).

### 3.5 Otimização da produção de celulasas

A otimização da produção enzimática é uma abordagem que visa maximizar a eficiência do crescimento microbiano e consequentemente, a produção de enzimas. A integração de diferentes abordagens possibilita melhorias significativas na eficiência, robustez e sustentabilidade dos bioprocessos (FES e FS). Em função disso, há um aumento crescente nos estudos com uso de ferramentas quimiométricas para avaliar variáveis nos processos de fermentação, visando aprimorar a produção de enzimas, como as celulasas (DE MENEZES *et al.*, 2023a, 2023b).

As ferramentas quimiométricas referem-se a métodos estatísticos e matemáticos aplicados a dados químicos para extrair informações relevantes e compreender padrões complexos, elas permitem considerar, simultaneamente, as interações entre as variáveis, economizando tempo e reagente (NOVAES *et al.*, 2017). A tabela 2 expõe os trabalhos que utilizaram planejamentos estatísticos para otimização de celulasas (EGL, EXG e BGL) utilizando fungos do gênero *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* nos últimos 6 anos tanto pela FES quanto FS (DE MENEZES *et al.*, 2023a). Dentre os planejamentos estatísticos mais relatados nesta revisão, em relação aos bioprocessos FES e FS, destacam-se o Delineamento Composto Central (DCC) e o Delineamento Box-Behnken (DBB) (Tabela 2).

Delineamento Composto Central (DCC) foi desenvolvido por Box e Wilson em 1951 (DE MENEZES *et al.*, 2023b). Ele envolve a combinação de múltiplos fatores-chave em diferentes níveis, permitindo a análise de como esses fatores influenciam o

resultado desejado. O DCC combina um design fatorial fracionário de dois níveis com pontos axiais adicionais e um ponto central, abrangendo uma ampla gama de condições experimentais (DE MENEZES *et al.*, 2023b; MOSTAFA *et al.*, 2024). Essa abordagem sistemática permite explorar de forma eficiente o espaço de resposta e identificar a combinação ótima de fatores para maximizar ou minimizar uma variável de interesse. A aplicação DCC na produção de enzimas celulasas têm sido eficaz tanto em fermentação em estado sólido quanto em fermentação submersa (MOSTAFA *et al.*, 2024; THAKUR *et al.*, 2024). A otimização da produção de BGL e EGL (MOSTAFA *et al.*, 2024; SANTOS *et al.*, 2022; THAKUR *et al.*, 2024) tem sido alcançada com sucesso através do uso do DCC, proporcionando melhorias significativas nos processos de produção (DE MENEZES *et al.*, 2023b).

Já o Delineamento Box-Behnken (DBB) é uma alternativa eficaz aos experimentos de composto central, especialmente, na otimização da produção de enzimas celulasas (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022, 2024b; DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; INFANZÓN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2023). Baseados em desenhos fatoriais de três níveis incompletos, os DBB são designs de rotação de segunda ordem ou quase rotativos (DE MENEZES *et al.*, 2023a, 2023b). Uma das vantagens dos DBB é sua eficiência matemática e econômica na modelagem estatística (DE MENEZES *et al.*, 2023a). Embora apresente uma pequena vantagem sobre o DCC em alguns casos, o DBB tem sido amplamente utilizado nos últimos anos para otimizar a produção de EGL e BGL (Tabela 2) (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2022, 2024b; INFANZÓN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2023; REIS *et al.*, 2020; TEO *et al.*, 2024).

Tanto o DCC quanto o DBB têm sido fundamentais na otimização da produção de celulasas. Enquanto, o DCC oferece uma variedade de possibilidades de desenhos experimentais, incluindo o Delineamento composto central rotacional (DCCR) (Tabela 2), o DBB destaca-se pela sua eficiência matemática e econômica, pois requer menor número de experimentos. Ambos os métodos têm sido eficazes na melhoria dos processos de produção de celulasas, contribuindo para avanços significativos na área de bioprocessos e biotecnologia. A escolha entre esses dois delineamentos experimentais depende das características específicas do processo de produção e das necessidades de otimização de cada aplicação.

## 4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A produção de celulasas (EGL, EXG e BGL) pelos fungos dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* através dos bioprocessos (FES ou FS) é uma área de pesquisa crucial para a biotecnologia. Os estudos têm buscado otimizar a produção dessas enzimas, explorando a seleção de fungos eficientes, o desenvolvimento de meios de cultivo de baixo custo e produção enzimática controlada, objetivando obter apenas a enzima de interesse ou uma mistura enzimática. Embora a FS ofereça vantagens industriais, como escalabilidade e menor intervenção manual, a FES tem sido preferida devido à sua capacidade de proporcionar condições controladas para o desenvolvimento dos fungos, resultando em maior produção enzimática. A preferência pela FES também é evidenciada pela capacidade dos gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Penicillium* desenvolverem-se em ambientes com menor teor de água, além de proporcionar uma maior transferência de massa e homogeneização. No entanto, ambas as abordagens possuem suas vantagens e desvantagens, destacando a importância de avaliar, cuidadosamente, as condições do processo e as espécies de fungos envolvidos ao selecionar a melhor estratégia de fermentação para aplicações específicas. A compreensão das variáveis críticas, como temperatura, umidade, pH e tempo de fermentação, é essencial para maximizar a eficiência na conversão de biomassa lignocelulósica. A utilização de ferramentas quimiométricas para avaliação e otimização do processo tem se mostrado promissora, oferecendo uma abordagem sistemática para entender e melhorar a produção de celulasas. Logo, esses avanços contribuem significativamente para a sustentabilidade ambiental e o desenvolvimento biotecnológico mais eficiente na produção de celulasas que possibilitem aplicações industriais mais viáveis.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar sua gratidão à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil), ao Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela assistência administrativa e técnica.

## REFERÊNCIAS

A, L. F. “Agricultural Applications of *Penicillium Genera*”. **Environmental Analysis & Ecology Studies**, v. 9, n. 5, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.31031/eaes.2022.09.000724>

ABDULLAH, R.; AKHTAR, A.; NISAR, K.; KALEEM, A.; IQTEDAR, M.; IFTIKHAR, T.; SALEEM, F.; ASLAM, F. Process optimization for enhanced production of cellulases from locally isolated fungal strain by submerged fermentation. **Bioscience Journal**, v. 37, p. e37021, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.14393/BJ-v37n0a2021-53815>

ACCOSSATO, S.; GRANATA, M.; FAÈ, M.; CELLA, R.; TOSI, S.; PICCO, A. M. Solid-state fermentation using a strain of *Trichoderma asperellum* improves the saccharification of rice straw. **Acta Microbiologica Bulgarica**, v. 35, n. 3, p. 133–140, 2019.

AHMED, A.; BIBI, A. Fungal cellulase; production and applications: minireview. **LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences**, v. 4, n. 1, p. 19–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20319/ijhls.2018.41.1936>

ALABDALALL, A. H.; ALMUTARI, A. A.; ALDAKEEL, S. A.; ALBARRAG, A. M.; ALDAKHEEL, L. A.; ALSOUFI, M. H.; ALFURAIH, L. Y.; ELKOMY, H. M. Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass Using *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* Hydrolysis Enzymes through Immobilized *S. cerevisiae*. **Energies**, v. 16, n. 2, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en16020823>

ALNUSAIRE, T. S.; FARAG, A. M. Lignocellulosic substrate as a low-cost effective inducer for production of hydrolytic cellulases by marine halophilic *Aspergillus ochraceus*. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 26, n. 5, p. 463–481, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.21608/ejabf.2022.262654>

AMADI, O. C.; EGONG, E. J.; NWAGU, T. N.; OKPALA, G.; ONWOSI, C. O.; CHUKWU, G. C.; OKOLO, B. N.; AGU, R. C.; MONEKE, A. N. Process optimization for simultaneous production of cellulase, xylanase and ligninase by *Saccharomyces cerevisiae* SCPW 17 under solid state fermentation using Box-Behnken experimental design. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04566, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04566>

ANU; KUMAR, V.; SINGH, D.; SINGH, B. A greener, mild, and efficient bioprocess for the pretreatment and saccharification of rice straw. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 5, p. 4121–4133, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01450-9>

ARAUJO, S. C.; RAMOS, M. R. M. F.; DO ESPÍRITO SANTO, E. L.; DE MENEZES, L. H. S.; DE CARVALHO, M. S.; TAVARES, I. M. de C.; FRANCO, M.; DE

- OLIVEIRA, J. R. Optimization of lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through solid-state fermentation using agro-industrial residue based on a univariate analysis. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 325–330, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1944203>
- AREESHI, M. Y. Microbial cellulase production using fruit wastes and its applications in biofuels production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 378, p. 109814, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109814>
- ARJU HOSSAIN, Md.; AKASH AHAMMED, Md.; ISLAM SOBUJ, S.; KUBRA SHIFAT, S.; DIPTA SOMADDER, P. Cellulase Producing Bacteria Isolation, Screening and Media Optimization from Local Soil Sample. **American Journal of Microbiological Research**, v. 9, n. 3, p. 62–74, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.12691/ajmr-9-3-1>
- ASTOLFI, V.; ASTOLFI, A. L.; MAZUTTI, M. A.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; CAMARGO, A. F.; DALASTRA, C.; KUBENECK, S.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Cellulolytic enzyme production from agricultural residues for biofuel purpose on circular economy approach. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 677–685, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02072-2>
- BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Optimization of endoglucanase production from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 by central composite design under response surface methodology. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 2, p. 305–316, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0285-3>
- BEHERA, S. S.; KERKETTA, A.; RAY, R. C. Solid-state fermentation for the production of microbial cellulases. In: BRAHMACHARI, G. (org.). **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 2. ed. [S. l.]: Academic Press, 2023. p. 59–88. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19059-9.00012-8>
- BELLAOUCHI, R.; ABOULOIFA, H.; ROKNI, Y.; HASNAOUI, A.; GHABBOUR, N.; HAKKOU, A.; BECHCHARI, A.; ASEHRAOU, A. Characterization and optimization of extracellular enzymes production by *Aspergillus niger* strains isolated from date by-products. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00145-y>
- BEZERRA, C. O.; CARNEIRO, L. L.; CARVALHO, E. A.; DAS CHAGAS, T. P.; DE CARVALHO, L. R.; UETANABARO, A. P. T.; DA SILVA, G. P.; DA SILVA, E. G. P.; DA COSTA, A. M. Artificial Intelligence as a Combinatorial Optimization Strategy for Cellulase Production by *Trichoderma stromaticum* AM7 Using Peach-Palm Waste Under Solid-State Fermentation. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 4, p. 1161–1170, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10234-4>
- BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; DOS SANTOS, A. M. P.; VALASQUES, G. S.; DA MATA CERQUEIRA, U. M. F.; DOS SANTOS ALVES, J. P. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941–959, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.088>
- BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. **Bioresources and**

**Bioprocessing**, v. 8, n. 1, p. 95, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>

BISWAL, D.; MANDAVGANE, S. A. Biomass waste: A potential feedstock for cellulase production. In: SHAH, S.; VENKATRAMANAN, R. P. (org.). **Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases**. [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 347–359. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821882-2.00017-X>

BIVER, S.; STROOBANTS, A.; PORTETELLE, D.; VANDENBOL, M. Two promising alkaline  $\beta$ -glucosidases isolated by functional metagenomics from agricultural soil, including one showing high tolerance towards harsh detergents, oxidants and glucose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 479–488, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1400-0>

CAMPOS, A. O.; ASEVEDO, E. A.; SOUZA FILHO, P. F.; SANTOS, E. S. dos. Extraction of cellulases produced through solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* CCT-2768 using green coconut fibers pretreated by steam explosion combined with alkali. **Biomass**, v. 4, n. 1, p. 92–106, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomass4010005>

CAO, G.; XIMENES, E.; NICHOLS, N. N.; FRAZER, S. E.; KIM, D.; COTTA, M. A.; LADISCH, M. Bioabatement with hemicellulase supplementation to reduce enzymatic hydrolysis inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 412–415, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.064>

CASTRO-OCHOA, L. D.; HERNÁNDEZ-LEYVA, S. R.; MEDINA-GODOY, S.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILAR-USCANGA, M. G.; CASTRO-MARTÍNEZ, C. Integration of agricultural residues as biomass source to saccharification bioprocess and for the production of cellulases from filamentous fungi. **3 Biotech**, v. 13, n. 2, p. 43, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03444-4>

CATALÁN, E.; SÁNCHEZ, A. Solid-state fermentation (SSF) versus submerged fermentation (SmF) for the recovery of cellulases from coffee husks: A life cycle assessment (LCA) based comparison. **Energies**, v. 13, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/EN13112685>

CHANDA, K.; MOZUMDER, A. B.; CHOREI, R.; GOGOI, R. K.; PRASAD, H. K. A lignocellulolytic *Colletotrichum* sp. OH with broad-spectrum tolerance to lignocellulosic pretreatment compounds and derivatives and the efficiency to produce hydrogen peroxide and 5-hydroxymethylfurfural tolerant cellulases. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 785, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7100785>

CHAVAN, S. B.; SHETE, A. M.; DHARNE, M. Optimization for improved cellulase production of *Penicillium funiculosum* NCIM 1228 in submerged fermentation. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1721851/v1>

CHAVAN, S. B.; SHETE, A. M.; DHARNE, M. S. Bioprocess optimization of *Penicillium funiculosum* NCIM 1228 for improved production and hydrolytic efficiency of cellulases on sugarcane bagasse. **Sugar Tech**, v. 26, n. 1, p. 215–233, 2024 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-023-01324-6>

CHAVAN, S.; SHETE, A.; DHARNE, M. S. Strain improvement for cellulolytic enzymes for effective saccharification of lignocellulosic biomass by mutant of

*Penicillium funiculosum* NCIM 1228. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 4, n. 2, p. 716–730, 2024 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43393-024-00247-x>

COÊLHO, M. de C.; ROCHA, J. da C.; SANTOS, F. A.; CARLOS RAMOS GONÇALVES, J.; DE VASCONCELOS, S. M.; GRISI, T. C. S. de L.; SANTOS, S. F. de M.; DE ARAÚJO, D. A. M.; DE CARVALHO-GONÇALVES, L. C. T. Use of agroindustrial wastes for the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 6, p. 101553, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101553>

COTON, E.; COTON, M.; HYMER, N.; MOUNIER, J.; JANY, J.-L. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 59–73, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>

DA SILVA, A. F. V.; SANTOS, L. A. dos; DE MELO, A. H. F.; JUCÁ, J. F. T.; SANTOS, A. F. de M. S.; PORTO, T. S. Use of cellulase obtained from solid-state fermentation of orange and passion fruit peels as an enzymatic pre-treatment step for anaerobic digestion. **BioEnergy Research**, v. 17, n. 2, p. 1288–1301, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10691-7>

DA SILVA, F. L.; MAGALHÃES, E. R. B.; DE SÁ LEITÃO, A. L. O.; DOS SANTOS, E. S. Production of lignocellulolytic enzymatic complex using pretreated carnauba straw as carbon source and application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 7, p. 2611–2622, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00815-w>

DA SILVA NUNES, N. et al. Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. **BioEnergy Research**, v. 13, n. 4, p. 1130–1143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>

DAS NEVES, C. A.; DE MENEZES, L. H. S.; SOARES, G. A.; DOS SANTOS REIS, N.; TAVARES, I. M. C.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Production and biochemical characterization of halotolerant  $\beta$ -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown in forage palm under solid-state fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 8, p. 3133–3144, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00930-8>

DAS, S.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Integrated strategies for enzyme assisted extraction of bioactive molecules: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 899–917, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.060>

DASARI, P. R.; RAMTEKE, P. W.; KESRI, S.; KONGALA, P. R. Comparative Study of Cellulase Production Using Submerged and Solid-State Fermentation. In: [S. l.: s. n.]. p. 37–52. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_3)

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and  $\alpha$ -amylase under solid state fermentation using

a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813–821, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.002>

DE MENEZES, L. H. S. et al. The application of chemometric methods in the production of enzymes through solid state fermentation uses the artificial neural network—a review. **BioEnergy Research**, v. 16, n. 1, p. 279–288, 2023a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-022-10462-w>

DE MENEZES, L. H. S.; OLIVEIRA, P. C.; DO ESPÍRITO SANTO, E. L.; GONÇALVES, M. S.; BILAL, M.; RUIZ, H. A.; DA SILVA, E. G. P.; SALAY, L. C.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Solid-State Fermentation as a Green Technology for Biomass Valorization: Optimization Techniques for Bioprocess—An Overview. **BioEnergy Research**, 2023b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10670-y>

DE MENEZES, L. H. S.; RAMOS, M. R. M. F.; ARAUJO, S. C.; SANTO, E. L. do E.; OLIVEIRA, P. C.; TAVARES, I. M. de C.; SANTOS, P. H.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Application of a constrained mixture design for lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 under solid-state fermentation and using agro-industrial wastes as substrate. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 52, n. 8, p. 885–893, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.2004547>

DE REZENDE, L. C.; DE ANDRADE, C. A. L.; COSTA, L. B.; DE ALMEIDA, H.-V. B.; SILVA, L. G.; PINTO, Z. V.; MORANDI, M. A. B.; DE MEDEIROS, F. H. V.; MASCARIN, G. M.; BETTIOL, W. Optimizing mass production of *Trichoderma asperelloides* by submerged liquid fermentation and its antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02882-7>

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>

DINIL, A.; JACOB, A. Valorization of Agro-industrial Discards in Fermentation for the Production of Cellulase Enzyme. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 347–354, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.22207/JPAM.16.1.25>

DOS SANTOS, B. V.; RODRIGUES, P. O.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Use of an (Hemi) Cellulolytic Enzymatic Extract Produced by Aspergilli Species Consortium in the Saccharification of Biomass Sorghum. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 1, p. 37–48, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-019-02991-6>

DUTRA, T. R.; GUIMARÃES, V. M.; VARELA, E. M.; DE ALBUQUERQUE, M. F. G.; DÍEZ, J. D. R.; ALFENAS, A. C.; DE REZENDE, S. T. A new approach for *Chrysosporthe cubensis* cellulolytic cocktail production using solid and submerged-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 40, n. 2, p. 359–366, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43153-023-00309-y>

EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. **Biomimetics**, v. 6, n. 3, p. 44, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>

- ESPINOZA-ABUNDIS, C.; SOLTERO-SÁNCHEZ, C.; ROMERO-BORBÓN, E.; CÓRDOVA, J. Cellulase and Xylanase Production by a Newly Isolated *Penicillium crustosum* Strain under Solid-State Fermentation, Using Water Hyacinth Biomass as Support, Substrate, and Inducer. **Fermentation**, v. 9, n. 7, p. 660, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9070660>
- FERDE, M.; COSTA, V. C.; MANTOVANELI, R.; WYATT, N. L. P.; ROCHA, P. de A.; BRANDÃO, G. P.; DE SOUZA, J. R.; GIMENES, A. C. W.; COSTA, F. S.; DA SILVA, E. G. P.; CARNEIRO, M. T. W. D. Chemical characterization of the soils from black pepper (*Piper nigrum* L.) cultivation using principal component analysis (PCA) and Kohonen self-organizing map (KSOM). **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, n. 9, p. 3098–3106, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11368-021-02966-3>
- FRASSATTO, P. A. C.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.  $\beta$ -Glucosidase production by *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* by solid state cultivation and application of enzymatic cocktail for saccharification of sugarcane bagasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 2, p. 503–513, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00608-1>
- GOMES, M. M. O. dos S.; SANTOS, D. M. R. C. dos; SILVA, M. da C.; SOUZA, C. B. de; FERREIRA, A. N.; FRANCO, M.; PEREIRA, H. J. V. Aplicações biotecnológicas da enzima endoglucanase microbiana. In: A pesquisa em ciências biológicas: Desafios atuais e perspectivas futuras. [S. l.]: Atena Editora, 2021. p. 1–12. Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.3002104101>
- GRUJIĆ, M.; DOJNOV, B.; POTOČNIK, I.; ATANASOVA, L.; DUDUK, B.; SREBOTNIK, E.; DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P.; VUJČIĆ, Z. Superior cellulolytic activity of *Trichoderma guizhouense* on raw wheat straw. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2774-y>
- HE, X.-J.; JIAO, J.; GAI, Q.-Y.; FU, J.-X.; FU, Y.-J.; ZHANG, Z.-Y.; GAO, J. Bioprocessing of pigeon pea roots by a novel endophytic fungus *Penicillium rubens* for the improvement of genistein yield using semi-solid-state fermentation with water. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 90, p. 103519, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103519>
- HENG, J. L. S.; HAMZAH, H. Effects of different parameters on cellulase production by *Trichoderma harzianum* TF2 using solid-state fermentation (SSF). **Indonesian Journal of Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 80–86, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.66549>
- HU, Y.; DU, C.; PENSUPA, N.; LIN, C. S. K. Optimisation of fungal cellulase production from textile waste using experimental design. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 118, p. 133–142, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.06.009>
- INFANZÓN-RODRÍGUEZ, M. I.; DEL MORAL, S.; CASTRO-MARTÍNEZ, C.; CANO-SARMIENTO, C.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Multi-Response Optimization Using the Desirability Function of Exoglucanases, Endoglucanases and  $\beta$ -Glucosidases Production by *Aspergillus niger* ITV-02 from

Delignified Sugarcane Bagasse. **Sugar Tech**, v. 25, n. 1, p. 86–98, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01191-7>

INFANZÓN-RODRÍGUEZ, M. I.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A.; DEL MORAL, S.; CALDERÓN-SANTOYO, M.; GUTIÉRREZ-RIVERA, B.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Optimization of Cellulase Production by *Aspergillus niger* ITV 02 from Sweet Sorghum Bagasse in Submerged Culture Using a Box–Behnken Design. **Sugar Tech**, v. 22, n. 2, p. 266–273, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00765-2>

INTASIT, R.; CHEIRSILP, B.; SUYOTHA, W.; BOONSAWANG, P. Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. **Biochemical Engineering Journal**, v. 173, p. 108086, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108086>

JOSHI, N.; GREWAL, J.; DREWNIK, L.; PRANAW, K. Bioprospecting CAZymes repertoire of *Aspergillus fumigatus* for eco-friendly value-added transformations of agro-forest biomass. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 17, n. 1, p. 3, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-023-02453-6>

KAUR, M.; SINGH, A. K.; SINGH, A. Bioconversion of food industry waste to value added products: Current technological trends and prospects. **Food Bioscience**, v. 55, p. 102935, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102935>

KORSA, G.; KONWARH, R.; MASI, C.; AYELE, A.; HAILE, S. Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. **Annals of Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 13, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01715-w>

KSHIRSAGAR, S.; WAGHMARE, P.; SARATALE, G.; SARATALE, R.; KURADE, M.; JEON, B. H.; GOVINDWAR, S. Composition of Synthesized Cellulolytic Enzymes Varied with the Usage of Agricultural Substrates and Microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, n. 4, p. 1695–1710, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03297-8>

KUMAR, N.; AGGARWAL, N. K. Process development for fungal cellulase production and enzymatic saccharification of *Parthenium hysterophorus* for bioethanol production. **Waste Management Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2023.11.004>

KUMAR, N.; SHARMA, R.; AGGARWAL, N. K.; YADAV, A. *Parthenium hysterophorus* Weed as a Novel Substrate for  $\beta$ -Glucosidase Production by *Penicillium citrinum* NAF5: Application of the Crude Extract to Biomass Saccharification. **Letters in Applied NanoBioScience**, v. 12, n. 1, p. 13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.33263/LIANBS121.013>

KUMAR, R.; PRAKASH, O. Experimental investigation on effect of season on the production of bioethanol from wheat-stalk (WS) using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) method. **Fuel**, v. 351, p. 128958, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.128958>

KUMARI, U.; SINGH, R.; RAY, T.; RANA, S.; SAHA, P.; MALHOTRA, K.; DANIELL, H. Validation of leaf enzymes in the detergent and textile industries:

launching of a new platform technology. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 6, p. 1167–1182, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pbi.13122>

KUTHIALA, T.; THAKUR, K.; SHARMA, D.; SINGH, G.; KHATRI, M.; ARYA, S. K. The eco-friendly approach of cocktail enzyme in agricultural waste treatment: A comprehensive review. [S. l.]: Elsevier B.V., 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.173>

LEE, C.-R.; SUNG, B. H.; LIM, K.-M.; KIM, M.-J.; SOHN, M. J.; BAE, J.-H.; SOHN, J.-H. Co-fermentation using Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains Hyper-secreting Different Cellulases for the Production of Cellulosic Bioethanol. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4428, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04815-1>

LEGODI, L. M.; LA GRANGE, D. C.; VAN RENSBURG, E. L. J. Production of the Cellulase Enzyme System by Locally Isolated *Trichoderma* and *Aspergillus* Species Cultivated on Banana Pseudostem during Solid-State Fermentation. **Fermentation**, v. 9, n. 5, p. 412, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9050412>

LI, H.; DOU, M.; WANG, X.; GUO, N.; KOU, P.; JIAO, J.; FU, Y. Optimization of Cellulase Production by a Novel Endophytic Fungus *Penicillium oxalicum* R4 Isolated from *Taxus cuspidata*. **Sustainability**, v. 13, n. 11, p. 6006, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su13116006>

LI, W.; ZHAO, L.; HE, X. Degradation potential of different lignocellulosic residues by *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma afroharzianum* under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 112, p. 6–17, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.11.011>

LI, X.; SHI, Y.; KONG, W.; WEI, J.; SONG, W.; WANG, S. Improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by bio-coordinated physicochemical pretreatment—A review. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2021.12.015>

LIU, J.; YANG, J.; WANG, R.; LIU, L.; ZHANG, Y.; BAO, H.; JANG, J. M.; WANG, E.; YUAN, H. Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 288–294, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.256>

LODHA, A.; PAWAR, S.; RATHOD, V. Optimised cellulase production from fungal co-culture of *Trichoderma reesei* NCIM 1186 and *Penicillium citrinum* NCIM 768 under solid state fermentation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 8, n. 5, p. 103958, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103958>

LONG, T.; ZHANG, P.; YU, J.; GAO, Y.; RAN, X.; LI, Y. Regulation of  $\beta$ -Disaccharide Accumulation by  $\beta$ -Glucosidase Inhibitors to Enhance Cellulase Production in *Trichoderma reesei*. **Fermentation**, v. 8, n. 5, p. 232, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation8050232>

LOPINA, O. D. Enzyme Inhibitors and Activators. In: Enzyme Inhibitors and Activators. [S. l.]: InTech, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/67248>

- LV, Y.; LIU, X.; ZHOU, S.; YU, Q.; XU, Y. Microbial saccharification – Biorefinery platform for lignocellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 189, p. 115761, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115761>
- MA, X.; LI, S.; TONG, X.; LIU, K. An overview on the current status and future prospects in *Aspergillus* cellulase production. **Environmental Research**, v. 244, p. 117866, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117866>
- MARQUES, G. L.; DOS SANTOS REIS, N.; SILVA, T. P.; FERREIRA, M. L. O.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Production and Characterisation of Xylanase and Endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through the Solid-State Fermentation of Rice Husk Residue. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 11, p. 2061–2069, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x>
- MARRAIKI, N.; VIJAYARAGHAVAN, P.; ELGORBAN, A. M.; DEEPA 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. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 2, p. 1718–1724, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.01.008>
- MAURICE, N. Role of Solid-State Fermentation to Enhance Cellulase Production. In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 127–153. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00009-6>
- MEIRA, L. A.; DE SOUZA DIAS, F. Application of constrained mixture design and Doehlert matrix in the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction assisted by ultrasound for preconcentration and determination of cadmium in sediment and water samples by FAAS. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 56–63, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.07.013>
- MENEGAZZO, F.; GHEDINI, E.; SIGNORETTO, M. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) Production from Real Biomasses. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2201, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23092201>
- METIN, B. *Penicillium roqueforti* Secondary Metabolites: Biosynthetic Pathways, Gene Clusters, and Bioactivities. **Fermentation**, v. 9, n. 9, p. 836, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9090836>
- MICHELIN, M.; MOTA, A. M. O.; SILVA, D. P.; RUZENE, D. S.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Production of Biomass-Degrading Enzymes by *Trichoderma reesei* Using Liquid Hot Water-Pretreated Corn cob in Different Conditions of Oxygen Transfer. **Bioenergy Research**, v. 12, n. 3, p. 583–592, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-019-09991-8>
- MITCHELL, D. A.; RUIZ, H. A.; KRIEGER, N. A Critical Evaluation of Recent Studies on Packed-Bed Bioreactors for Solid-State Fermentation. **Processes**, v. 11, n. 3, p. 872, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr11030872>
- MONDAL, S.; NEOGI, S.; CHAKRABORTY, S. Optimization of reactor parameters for amplifying synergy in enzymatic co-hydrolysis and microbial co-fermentation of

lignocellulosic agro-residues. **Renewable Energy**, v. 225, p. 120281, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.120281>

MONDAL, S.; SOREN, J. P.; MONDAL, J.; RAKSHIT, S.; KUMAR HALDER, S.; MONDAL, K. C. Contemporaneous synthesis of multiple carbohydrate debranching enzymes from newly isolated *Aspergillus fumigatus* SKF-2 under solid state fermentation: A unique enzyme mixture for proficient saccharification of plant bioresources. **Industrial Crops and Products**, v. 150, p. 112409, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112409>

MORILLA, E. A.; STEGMANN, P. M.; TUBIO, G. Enzymatic cocktail production by a co-cultivation Solid-State Fermentation for detergent formulation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 140, p. 110–121, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.05.001>

MOSTAFA, F. A.; WEHAIDY, H. R.; SHARAF, S.; EL-HENNAWI, H. M.; MAHMOUD, S. A.; SALEH, S. A. A. *Aspergillus awamori* MK788209 cellulase: production, statistical optimization, pea peels saccharification and textile applications. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02286-w>

NAHER, L.; FATIN, S. N.; SHEIKH, M. A. H.; AZEEZ, L. A.; SIDDIQUEE, S.; ZAIN, N. M.; KARIM, S. M. R. Cellulase enzyme production from filamentous fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in submerged fermentation with rice straw. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/JOF7100868>

NAHER, L.; FATIN, S. N.; SHEIKH, M. A. H.; AZEEZ, L. A.; SIDDIQUEE, S.; ZAIN, N. M.; KARIM, S. M. R. Cellulase enzyme production from filamentous fungi *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori* in submerged fermentation with rice straw. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7100868>

NANDA, S.; PATTNAIK, F.; PATRA, B. R.; KANG, K.; DALAI, A. K. A Review of Liquid and Gaseous Biofuels from Advanced Microbial Fermentation Processes. **Fermentation**, v. 9, n. 9, p. 813, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9090813>

NIYONZIMA, F. N. Detergent-compatible fungal cellulases. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 1, p. 25–40, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00838-w>

NOGUEIRA, L. S.; SANTOS, M. M. O. dos; MONTEIRO, G. P.; OLIVEIRA, P. C.; GONÇALVES, M. S.; MENEZES, L. H. S.; CARVALHO, M. S. de; SANTO, E. L. do E.; TAVARES, I. M. de C.; OLIVEIRA, J. R. de; FRANCO, M. Utilização do fungo do gênero *Penicillium* em fermentação em estado sólido: Uma revisão. In: **Ciências Agrárias: Conhecimentos Científicos e Técnicos e Difusão de Tecnologias**. [S. l.]: Atena Editora, 2020. p. 179–187. Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.93020170718>

NOVAES, C. G.; YAMAKI, T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, S.; BEZERRA, M. A. Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part I: Process Variables. **Revista**

**Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170070>

NOVY, V.; NIELSEN, F.; CULLEN, D.; SABAT, G.; HOUTMAN, C. J.; HUNT, C. G. The characteristics of insoluble softwood substrates affect fungal morphology, secretome composition, and hydrolytic efficiency of enzymes produced by *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01955-5>

NÚÑEZ-SERRANO, A.; GARCÍA-REYES, R. B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, A. Optimization of hydrolases production by *Penicillium crustosum* in submerged fermentation using agro-waste residues as cosubstrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 57, p. 103116, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2024.103116>

NYANHONGO, G.; HERRERO ACERO, E.; MATUCHAKI, M. D. D. J.; RAU, M.; GUEBITZ, G.; ANDREAUS, J. 2. Microbial applications for fabric and textile industries. In: **Microbial Applications**. [S. l.]: De Gruyter, 2016. p. 33–78. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/9783110412789-004>

OGUNYEW, O. A.; RANDHAWA, A.; JOSHI, M.; JAIN, K. K.; WADEKAR, P.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M.; YAZDANI, S. S. Engineered *Penicillium funiculosum* produces potent lignocellulolytic enzymes for saccharification of various pretreated biomasses. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 49–60, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.029>

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.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. **Revista Mexicana de Ingeniera Química**, v. 18, n. 3, p. 777–787, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira>

PAPADAKI, E.; KONTOGIANNOPOULOS, K. N.; ASSIMOPOULOU, A. N.; MANTZOURIDOU, F. Th. Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using *Aspergillus niger* in an integrated citric acid-enzymes production process. **Bioresource Technology**, v. 309, p. 123317, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317>

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 385–392, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.049>

PELÁEZ, R. D. R.; WISCHRAL, D.; CUNHA, J. R. B.; MENDES, T. D.; PACHECO, T. F.; SIQUEIRA, F. G. de; ALMEIDA, J. R. M. de. Production of enzymatic extract with high cellulolytic and oxidative activities by co-culture of *Trichoderma reesei* and *Panus lecomtei*. **Fermentation**, v. 8, n. 10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation8100522>

- PENDSE, D. S.; DESHMUKH, M.; PANDE, A. Different pre-treatments and kinetic models for bioethanol production from lignocellulosic biomass: A review. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16604>
- PEREIRA, J. de C.; GIESE, E. C.; MORETTI, M. M. de S.; GOMES, A. C. dos S.; PERRONE, O. M.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Effect of metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities. In: ENZYME INHIBITORS AND ACTIVATORS. [S. l.]: InTech, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/65934>
- POTPROMMANEE, L.; WANG, X. Q.; HAN, Y. J.; NYOBE, D.; PENG, Y. P.; HUANG, Q.; LIU, J. Y.; LIAO, Y. L.; CHANG, K. L. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175004>
- PRAHALADBHAI, P. S.; MURTY, D. S. Improved cellulase production through RSM by using *Aspergillus tubingensis* MN239975 in solid state fermentation. **Research Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 1–10, 2020.
- RAJESH, R.; GUMMADI, S. N. Production of multienzymes, bioethanol, and acetic acid by novel *Bacillus* sp. PM06 from various lignocellulosic biomass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 15, p. 13949–13961, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02418-z>
- RANA, P.; INBARAJ, B. S.; GURUMAYUM, S.; SRIDHAR, K. Sustainable production of lignocellulolytic enzymes in solid-state fermentation of agro-industrial waste: Application in pumpkin (*Cucurbita maxima*) juice clarification. **Agronomy**, v. 11, n. 12, p. 2379, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy11122379>
- RANJAN, R.; RAI, R.; BHATT, S. B.; DHAR, P. Technological road map of cellulase: A comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 198, p. 109020, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109020>
- RATUCHNE, A.; KNOB, A. A new and unusual  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*: Catalytic activity at high temperatures and glucose tolerance. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 102064, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102064>
- RAVEN, S.; SRIVASTAVA, C.; KAUSHIK, H.; HESUH, V.; TIWARI, A. Fungal cellulases: New avenues in biofuel production. In: [S. l.: s. n.]. p. 1–18. E-book. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_1)
- REIS, N. dos S.; LESSA, O. A.; PACHECO, C. S. V.; PEREIRA, N. E.; SOARES, G. A.; SILVA, E. G. P.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell as a substrate for obtaining endoglucanase and xylanase from *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 42, p. e48211, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v42i1.48211>
- RIGOLDI, F.; DONINI, S.; REDAELLI, A.; PARISINI, E.; GAUTIERI, A. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering**, v. 2, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.4997367>

- RODRIGUES, H. C. S. R.; CARVALHO, A. L.; SOUZA, C. O.; UMSZA-GUEZ, M. A. Evolution of world and Brazilian markets for enzymes produced by solid-state fermentation: A patent analysis. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 112–120, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1872208313666191017143845>
- RUDAKIYA, D. M. Strategies to improve solid-state fermentation technology. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 155–180. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00010-2>
- SAINI, A.; AGGARWAL, N. K. Valorization of *Parthenium hysterophorus* biomass by its utilization in endoglucanase production by *Penicillium citrinum* NAF5. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 6, p. 2591–2601, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00602-3>
- SALDAÑA-MENDOZA, S. A.; PALACIOS-PONCE, A. S.; RUIZ, H. A.; ASCACIO-VALDÉS, J. A.; AGUILAR, C. N. Revalorization of green tea waste through the production of cellulases by solid-state fermentation using a *Aspergillus niger* 28A. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-023-03919-1>
- SALOMÃO, G. S. B.; AGNEZI, J. C.; PAULINO, L. B.; HENCKER, L. B.; DE LIRA, T. S.; TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1–6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.019>
- SAMPATHKUMAR, K.; KUMAR, V.; SIVAMANI, S.; SIVAKUMAR, N. An Insight into Fungal Cellulases and Their Industrial Applications. In: [S. l.: s. n.]. p. 19–35. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_2)
- SANTOS, G. B.; DE SOUSA FRANCISCO FILHO, Á.; RÊGO DA SILVA RODRIGUES, J.; RODRIGUES DE SOUZA, R. Cellulase production by *Aspergillus niger* using urban lignocellulosic waste as substrate: Evaluation of different cultivation strategies. **Journal of Environmental Management**, v. 305, p. 114431, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.114431>
- SANTOS GOMES, M. M. O. dos; NICODEMOS, I. S.; COSTA SILVA, M. da; SANTOS, D. M. R. C. dos; SANTOS COSTA, F.; FRANCO, M.; PEREIRA, H. J. V. Optimization of enzymatic saccharification of industrial wastes using a thermostable and halotolerant endoglucanase through Box-Behnken experimental design. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2201936>
- SAROJ, P.; P, M.; NARASIMHULU, K. Biochemical Characterization of Thermostable Carboxymethyl Cellulase and  $\beta$ -Glucosidase from *Aspergillus fumigatus* JCM 10253. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 6, p. 2503–2527, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03839-2>
- SHAH, F.; RANAWAT, B.; MISHRA, S. An Approach Toward Cellulase Production, Bioconversion, and Utilization. In: **Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels**,

Biobased Chemicals, and Bioproducts. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 207–223. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817941-3.00011-5>

SHARMA, R.; KOCHER, G. S.; RAO, S. S.; OBEROI, H. S. Improved Production of Multi-component Cellulolytic Enzymes Using Sweet Sorghum Bagasse and Thermophilic *Aspergillus terreus* RWY Through Statistical Process Optimization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 7, p. 3355–3369, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00670-5>

SHRUTHI, B. R.; ACHUR, R. N. H.; NAYAKA BORAMUTHI, T. Optimized Solid-State Fermentation Medium Enhances the Multienzymes Production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2192–2206, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02036-w>

SHRUTHI, K.; YADAV, P. S.; PRASAD, B. V. S.; CHANDRA, M. S. Cellulase production by *Aspergillus unguis* in solid state fermentation. **Journal of Forestry Research**, v. 30, n. 1, p. 205–212, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0619-4>

SIMON HAYKIN. Neural Networks and Learning Machines. Pearson Education India, n. 3, 2009.

SINGH, A.; BAJAR, S.; DEVI, A.; BISHNOI, N. R. Evaluation of cellulase production from *Aspergillus niger* and *Aspergillus heteromorphus* under submerged and solid-state fermentation. **Environmental Sustainability**, v. 4, n. 2, p. 437–442, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00173-x>

SINGH, A.; BAJAR, S.; DEVI, A.; PANT, D. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, p. 100652, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>

SINGH, R.; TOMER, A.; PRASAD, D.; VISWANATH, H. S. Biodiversity of *Trichoderma* Species in Different Agro-Ecological Habitats. In: [S. l.: s. n.]. p. 21–40. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5_2)

SINGHAL, A.; KUMARI, N.; GHOSH, P.; SINGH, Y.; GARG, S.; SHAH, M. P.; JHA, P. K.; CHAUHAN, D. K. Optimizing cellulase production from *Aspergillus flavus* using response surface methodology and machine learning models. **Environmental Technology & Innovation**, v. 27, p. 102805, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102805>

SINGHAL, G.; BHAGYAWANT, S. S.; SRIVASTAVA, N. Cellulases through thermophilic microorganisms: Production, characterization, and applications. In: Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases. [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 39–57. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821882-2.00005-3>

SINGHVI, M. S.; ZINJARDE, S. S. Production of pharmaceutically important genistein and daidzein from soybean flour extract by using  $\beta$ -glucosidase derived from *Penicillium janthinellum* NCIM 1171. **Process Biochemistry**, v. 97, p. 183–190, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.014>

- SIQUEIRA, J. G. W.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>
- SOROUR, A. A.; OLAMA, Z. A.; EL-NAGGAR, M. Y.; ALI, S. M. Bioprocess development for extraction and purification of cellulases from *Aspergillus niger* 3ASZ using statistical experimental design techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, p. 124759, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124759>
- SOSA-MARTÍNEZ, J. D.; MONTAÑEZ, J.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; BALAGURUSAMY, N.; GADI, S. K.; MORALES-OYERVIDES, L. Agroindustrial and food processing residues valorization for solid-state fermentation processes: A case for optimizing the co-production of hydrolytic enzymes. **Journal of Environmental Management**, v. 347, p. 119067, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119067>
- SOUZA FILHO, P. F.; DOS SANTOS, E. S. Solid-State Fermentation of Steam-Exploded *Opuntia ficus-indica* Cladodes Using *Trichoderma reesei* CCT-2768 for the Production of Cellulolytic Enzymes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, n. 3, p. 1675–1698, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04222-x>
- SRIVASTAVA, N.; ELGORBAN, A. M.; MISHRA, P. K.; MARRAIKI, N.; ALHARBI, A. M.; AHMAD, I.; GUPTA, V. K. Enhance production of fungal cellulase cocktail using cellulosic waste. **Environmental Technology and Innovation**, v. 19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100949>
- SRIVASTAVA, N.; MOHAMMAD, A.; SINGH, R.; SRIVASTAVA, M.; SYED, A.; BAHADUR PAL, D.; ELGORBAN, A. M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K. Evaluation of enhanced production of cellulose deconstructing enzyme using natural and alkali pretreated sugar cane bagasse under the influence of graphene oxide. **Bioresource Technology**, v. 342, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126015>
- SUBHOSH CHANDRA, M.; SURESH YADAV, P.; BRAMHACHARI, P. V.; GOLLA, N. Influence of Significant Parameters on Cellulase Production by Solid-State Fermentation. In: [S. l.: s. n.]. p. 73–91. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-33-4611-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-33-4611-6_3)
- TEO, H. L.; WAHAB, R. A.; ZAINAL-ABIDIN, M. H.; MARK-LEE, W. F.; HUYOP, F.; SUSANTI, E.; MAHAT, N. A.; AZMAN, A. R. Statistically assisted optimisation for the simultaneous production of *Trichoderma harzianum* and *Aspergillus fumigatus* cellulolytic enzymes. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-023-05222-5>
- THAKUR, G.; SUTAONEY, P.; JOSHI, V.; GHOSH, P. Response surface optimization of cellulase production by *Aspergillus stellatus* NFCCI 5299 in shake flask submerged fermentation using wheat bran. **3 Biotech**, v. 14, n. 1, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03860-0>

- VALLE-PÉREZ, A. U.; FLORES-COSÍO, G.; AMAYA-DELGADO, L. Bioconversion of Agave Bagasse to Produce Cellulases and Xylanases by *Penicillium citrinum* and *Aspergillus fumigatus* in Solid-State Fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 11, p. 5885–5897, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01397-y>
- VALLE-PÉREZ, A. U.; GÓMEZ-ANGULO, J. H.; FLORES-COSÍO, G.; AMAYA-DELGADO, L. Interaction of Fungal Strains, Biomass, and pH to Produce Lignocellulosic Enzymes in Solid-State Fermentation for Sustainable Biotransformation of Sugarcane and Agave Bagasse. **Bioenergy Research**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10695-3>
- VATANEN, T.; OSMALA, M.; RAIKO, T.; LAGUS, K.; SYSI-AHO, M.; OREŠIČ, M.; HONKELA, T.; LÄHDESMÄKI, H. Self-organization and missing values in SOM and GTM. **Neurocomputing**, v. 147, p. 60–70, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2014.02.061>
- VERMA, N.; KUMAR, V. Impact of process parameters and plant polysaccharide hydrolysates in cellulase production by *Trichoderma reesei* and *Neurospora crassa* under wheat bran based solid state fermentation. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00416, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00416>
- WANG, Z.-W.; ZHU, M.-Q.; LI, M.-F.; WEI, Q.; SUN, R.-C. Effects of hydrothermal treatment on enhancing enzymatic hydrolysis of rapeseed straw. **Renewable Energy**, v. 134, p. 446–452, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.11.019>
- XIE, H.; WU, B.; LIU, G.; LI, X. Optimization of in situ cellulase production from *Penicillium oxalicum* P-07 under submerged fermentation conditions with different cellulose types. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 3, p. 110290, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110290>
- YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. **Heliyon**, v. 8, n. 3, p. e09173, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>
- YAFETTO, L.; ODAMTTEN, G. T.; WIAFE-KWAGYAN, M. Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case. **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. e14814, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14814>
- YANG, W.; SU, Y.; WANG, R.; ZHANG, H.; JING, H.; MENG, J.; ZHANG, G.; HUANG, L.; GUO, L.; WANG, J.; GAO, W. Microbial production and applications of  $\beta$ -glucosidase—A review. [S. l.]: Elsevier B.V., 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127915>
- YAYERINO-GUTIÉRREZ, M. A.; WONG, A. Y. C.-H.; IBARRA-MUÑOZ, L. A.; CHÁVEZ, A. C. F.; SOSA-MARTÍNEZ, J. D.; TAGLE-PEDROZA, A. S.; HERNÁNDEZ-BELTRAN, J. U.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, S.; SANTOS, J. C. dos; DA SILVA, S. S.; BALAGURUSAMY, N. Perspectives and Progress in Bioethanol Processing and Social Economic Impacts. **Sustainability**, v. 16, n. 2, p. 608, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su16020608>

ZHANG, B.; LI, J.; LIU, X.; BAO, J. Continuous simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) for cellulosic L-lactic acid production. **Industrial Crops and Products**, v. 187, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115527>

ZHANG, F.; BUNTERNGSOOK, B.; LI, J. X.; ZHAO, X. Q.; CHAMPREDA, V.; LIU, C. G.; BAI, F. W. Regulation and production of lignocellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* for biofuels production. In: **Advances in Bioenergy**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. v. 4, p. 79–119. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2019.03.001>

ZHAO, X.; YI, S.; LI, H. The optimized co-cultivation system of *Penicillium oxalicum* 16 and *Trichoderma reesei* RUT-C30 achieved a high yield of hydrolase applied in second-generation bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 136, p. 1028–1035, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.01.066>

ZUCCARO, G.; PIROZZI, D.; YOUSUF, A. Lignocellulosic biomass to biodiesel. In: **Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 127–167. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00004-6>

## CAPÍTULO 2

### **Aplicação de ferramentas quimiométricas na produção simultânea das enzimas celulolíticas por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido**

#### **RESUMO**

Neste estudo, o planejamento de mistura restrito foi aplicado para explorar o potencial de subprodutos como casca do fruto do cacau (CFC), casca da amêndoa do cacau (CAC) e borra do óleo de dendê (OD). A função desejabilidade foi utilizada para otimizar a produção simultânea das enzimas endoglucanase (EGL), exoglucanase (EXG) e  $\beta$ -glicosidase (BGL) pelo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por meio da fermentação em estado sólido (FES). A função desejabilidade foi 0,84, indicando que a meta foi totalmente alcançada. As proporções otimizadas de CFC (7,5 g), CAC (1,0 g) e OD (1,5 g) resultaram nas respectivas atividades de EGL (5,38 UI/g), EXG (1,01 UI/g) e BGL (2358,75 UI/g). EGL, EXG e BGL demonstraram excelente estabilidade a 50 °C e nos pHs 4,5 e 6,0. CoSO<sub>4</sub> e EDTA aumentaram a atividade das enzimas EGL, EXG e BGL em mais de 100%. O efeito da adição de solventes foi analisado por meio das redes neurais artificiais com Mapa Auto-organizado de Kohonen (KSOM) com o objetivo de encontrar correlação entre as respostas obtidas. A aplicação da desejabilidade na produção enzimática, otimizada por meio do planejamento de mistura restrito, revelou-se crucial para aprimorar a produção de enzimas celulasas por *P. roqueforti* ATCC 10110. Essas enzimas revelaram, por meio da caracterização, potencial significativo para aplicações industriais.

Palavras-chave: Celulasas, Análise multi-resposta, fermentação em estado sólido, fungo filamentoso, rede neural artificial.

# **Aplicação de ferramentas quimiométricas na produção simultânea das enzimas celulolíticas por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação em estado sólido**

Sabryna Couto Araujo<sup>1</sup>, Eliézer Luz do Espírito Santo<sup>1</sup>, Márcia Soares Gonçalves<sup>2</sup>, Márcio da Silva Souza<sup>1</sup>, Iasnaia Maria de Carvalho Tavares<sup>2</sup>, Igor Carvalho Fontes Sampaio<sup>1</sup>, Muhammad Irfan<sup>3</sup>, Nuno Avelar Nascimento<sup>1</sup>, Erik Galvão Paranhos da Silva<sup>1</sup>, Marcelo Franco<sup>1</sup>, Julieta Rangel de Oliveira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Pesquisa - Biotransformação e Biocatálise Orgânica, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 45654-370, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 45700-000, Bahia, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Ciências, Universidade de Sargodha, Sargodha, 40100, Paquistão

## **1 INTRODUÇÃO**

As celulasas são as enzimas mais utilizadas comercialmente e desempenham um papel crucial na hidrólise da celulose que é o polímero vegetal mais abundante disponível na biomassa lignocelulósica de alguns resíduos, tornando-as inestimáveis em diversas indústrias (alimentícias, têxtil, farmacêuticas e de cosméticos) (LIU *et al.*, 2020; LV *et al.*, 2022; PATEL *et al.*, 2019; RANJAN *et al.*, 2023).

As celulasas constituem um grupo de três enzimas individuais endoglucanase (EGL) (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase (EXG) (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (BGL) (1,4- $\beta$ -D-glicosidase (EC 3.2.1.21) (Ahmed & Bibi, 2018). Essas enzimas atuam em sinergia na quebra das ligações  $\beta$ -1,4-

glicosídicas presentes na estrutura da celulose para a liberação de açúcares, destacando a glicose que desperta maior interesse industrial. EGL atua clivando as ligações internas ( $\beta$ -1,4) das cadeias amorfas de celulose, produzindo glicose e oligossacarídeos de vários comprimentos (RANJAN *et al.*, 2023). Já a EXG exerce a função de despolimerizar as extremidades formadas na etapa anterior gerando estruturas de celobiose e a BGL hidrolisam a celobiose liberando moléculas de D-glicose (MA *et al.*, 2024).

As celulasas podem ser excretadas por bactérias (ARJU HOSSAIN *et al.*, 2021), leveduras (EJAZ; SOHAIL; GHANEMI, 2021) e fungos filamentosos (DAS NEVES *et al.*, 2022; REIS *et al.*, 2020). Destacando os fungos filamentosos devido à grande capacidade de secretar um pool de enzimas, contendo endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase motivando o seu intensivo uso na produção de enzimas industriais (SRIVASTAVA *et al.*, 2020). O *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 têm sido amplamente estudados para produção de celulasas por meio da fermentação em estado sólido (FES) utilizando resíduo agroindustriais, como a casca da amêndoa do cacau (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; NOGUEIRA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

FES é um método de cultivo que vem destacando-se nos últimos anos (ARAUJO *et al.*, 2022; DE MENEZES *et al.*, 2023b) devido às suas vantagens, como alta produtividade volumétrica, maior concentração dos produtos, necessidade de equipamento de fermentação simples e menor geração de efluentes (LONDOÑO-HERNANDEZ *et al.*, 2020). Bem como, ecologicamente correta e economicamente relevante, pois permite o aproveitamento de resíduos agroindustriais, resultando em menor consumo e produção de água residual, produtos de alta estabilidade, baixo custo de produção e diminuição na geração de poluentes (SALOMÃO *et al.*, 2019). Assim, a FES simula um habitat ideal para o crescimento do fungo e consequentemente a excreção enzimática, e, o resíduo é o componente que serve para simular uma condição de crescimento mais favorável para o fungo que irá excretar a enzima de interesse (DE MENEZES *et al.*, 2023b). Com o objetivo de melhorar o processo fermentativo e maximizar a obtenção das enzimas desejadas, ferramentas quimiométricas que auxiliam no controle do processo são utilizadas.

Dentre as ferramentas quimiométricas, o planejamento de misturas com restrição tem como principal objetivo auxiliar na identificação das condições experimentais ideais, visando otimizar o processo de produção enzimática (MEIRA; DE SOUZA DIAS, 2017). O planejamento de mistura com restrição é aplicado limitando as

proporções dos componentes da mistura em limites máximos e mínimos. O planejamento de mistura restrito é aplicado em duas situações distintas: quando todos os componentes devem estar presentes para alcançar a resposta desejada e quando a proporção dos componentes na mistura precisa ser controlada (MEIRA; DE SOUZA DIAS, 2017). Por exemplo, quando um substrato líquido é usado na FES, a quantidade desse substrato no meio de crescimento deve ser limitada, porque na FES, o meio água/líquido é necessário apenas para manter o teor de umidade necessário, um requisito básico para o crescimento microbiano (RODRIGUES *et al.*, 2020; SINGHVI; ZINJARDE, 2020).

O extrato multienzimático produzido pelo fungo na FES contém uma variedade de enzimas, como lipases, celulasas, hemicelulasas, lacases, entre outras (RAJESH; GUMMADI, 2023; SHRUTHI; ACHUR; NAYAKA BORAMUTHI, 2020). Quando há o interesse em maximizar a produção de mais de uma enzima de forma simultânea, como é o caso das celulasas que atuam em conjunto, pode-se aplicar a função desejabilidade. Essa surge como um método analítico capaz de contornar a limitação de otimizar uma enzima por vez permitindo a otimização de multi-respostas simultaneamente, garantindo uma abordagem mais abrangente e eficiente (INFANZÓN-RODRÍGUEZ *et al.*, 2023).

A função desejabilidade é aplicada quando se deseja encontrar uma condição favorável onde todas as respostas estejam dentro de uma região aceita como desejável (BEZERRA *et al.*, 2019; DERRINGER; SUICH, 1980; NOVAES *et al.*, 2017). Assim, as respostas originais são codificadas entre 0 (condição indesejável) e 1 (condição desejável) (BEZERRA *et al.*, 2019). Quanto mais próximo de 1 for o valor da desejabilidade, melhor para a otimização simultânea. Esse valor indica que os ótimos individuais correspondentes a cada resposta estão próximos entre si e que pode haver uma condição experimental que os satisfaça simultaneamente (BEZERRA *et al.*, 2019; NOVAES *et al.*, 2017). Portanto, a função desejabilidade serve como uma ferramenta valiosa para aprimoramento de processos em diversas áreas.

Outra ferramenta multivariada bastante utilizada na quimiometria é o mapa auto-organizado de Kohonen (KSOM), utilizado para reconhecimento de padrões baseado em algoritmos de redes neurais artificiais com alto poder de aprendizagem. Este algoritmo tem sido amplamente aplicado, pois é considerado uma maneira simples de organizar dados dimensionalmente complexos de acordo com suas semelhanças,

proporcionando reconhecimento de padrões como estratégia de análise exploratória. Nessa aplicação de rede neural artificial, os neurônios são colocados em nós das redes e sintonizados seletivamente aos padrões de entrada durante um processo de aprendizagem competitiva (FERDE *et al.*, 2021).

Diante desse contexto, este estudo buscou aprimorar a produção simultânea de endoglucanases (EGL), exoglucanases (EXG) e  $\beta$ -glicosidases (BGL) pelo *P. roqueforti* ATCC 10110 através da FES com o auxílio de planejamentos quimiométricos. Como também, a caracterização e atividade enzimática foram avaliadas frente à estabilidade em diferentes temperaturas e pHs, assim como em diversos sais, compostos e solventes orgânicos.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Preparo dos substratos

Os resíduos de casca da amêndoa do cacau e casca do fruto do cacau (*Theobroma cacao*) e a borra do óleo de dendê (*Elaeis guineenses*) foram adquiridos junto a agroindústrias situadas na região sul da Bahia. A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC (Ilhéus, Bahia, Brasil) gentilmente cedeu os resíduos de cacau, enquanto a borra do óleo de dendê líquido foi obtida da indústria de dendê MIL SELECT (Ituberá, Bahia, Brasil).

Os resíduos de cacau foram triturados em um moinho de facas tipo Willey (ACB LABOR) e dimensionados através de uma peneira granulométrica de 20 mesh e depois submetidos a esterilização em autoclave (121 °C/1 atm /15 min) (PRISMATEC-CS 50) seguido do processo de secagem em uma estufa de ventilação forçada de ar (SOLAB SL 102) a 50 °C por 24 horas. O material resultante foi armazenado em um recipiente fechado de plástico em local seco.

O resíduo da borra do óleo de dendê líquido também foi submetido a um processo de esterilização em autoclave (121 °C/1 atm /15 min) (PRISMATEC-CS 50). Posteriormente, o material esterilizado foi armazenado em um recipiente fechado, garantindo condições adequadas para sua preservação até o uso futuro.

## 2.2 Cultivo do fungo e preparo da solução de esporos

O fungo utilizado para os ensaios de fermentação foi o *Penicilium roqueforti* ATCC 10110, fornecido da coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil) sob o registro de número 40074 e lote 041140074. Este fungo foi preservado em meio de sílica e glicerol a -80°C em ultra freezer. O repique das cepas foi realizado em meio de cultura de Batata Dextrose Agar (BDA) (KASVI®, Paraná, PR, Brasil) em placas de Petri, previamente esterilizados em autoclave vertical (121 °C/1 atm /15 min) (PRISMATEC CS-50). As placas inoculadas foram incubadas em câmara de incubação microbiológica (SL 222, SOLAB), com temperatura controlada de  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  por 7 dias ou até esporulação abundante.

Após o período de incubação, a cultura esporulada foi submetida a uma raspagem com auxílio de pérolas de vidro e 50 mL de água destilada estéril, previamente esterilizadas em autoclave vertical (121 °C/1 atm /15 min) (PRISMATEC CS-50). A suspensão foi coletada em frasco âmbar. Uma alíquota de 0,1 mL da solução foi tomada e diluída em tubo de eppendorf para a contagem do número de esporos utilizando câmara de Neubauer em microscópio binocular (BIOVAL® L1000).

## 2.3 Processo de fermentação

### 2.3.1 Planejamento de mistura com restrições

O planejamento de mistura com restrição foi utilizado para obter a composição da mistura ótima dos resíduos agroindustriais: casca do fruto do cacau (CFC), casca da amêndoa do cacau (CAC) e borra do óleo de dendê (OD) para máxima produção das enzimas celulolíticas EGL, EXG e BGL e para avaliar os efeitos da interação em uma mistura de componentes (Tabela 1). De acordo com a definição teórica, as proporções entre os substratos foram expressas como frações, e sua soma deve ser igual a 100%. No presente estudo as variáveis envolvidas na metodologia do planejamento da matriz de fermentação foram analisadas e otimizadas utilizando um desenho de delineamento de três componentes com restrições máximas e mínimas, sendo realizado sistematicamente

um total de onze ensaios definidos a partir do software STATISTICA® Software v. 10.0 (Statsoft, USA).

Tabela 1– Matriz do planejamento de mistura com restrição

| <b>Exp</b> | <b>CFC<br/>(g)</b> | <b>CAC<br/>(g)</b> | <b>OD<br/>(mL)</b> | <b>EGL<br/>UI/g</b> | <b>EXG<br/>UI/g</b> | <b>BGL<br/>UI/g</b> |
|------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>1</b>   | 8                  | 1                  | 1                  | 1,87±0,02           | 0,15±0,021          | 432,36±0,2          |
| <b>2</b>   | 5                  | 4,5                | 0,5                | 5,36±0,35           | 0,33±0,015          | 1982,36±0,043       |
| <b>3</b>   | 8                  | 1,5                | 0,5                | 1±0,18              | 0,24±0,023          | 317,91±0,021        |
| <b>4</b>   | 7,5                | 1                  | 1,5                | 5,38±0,054          | 1,01±0,010          | 2358,75±0,015       |
| <b>5</b>   | 5                  | 3,5                | 1,5                | 5,49±0,065          | 0,44±0,18           | 1751,8±0,065        |
| <b>6</b>   | 5                  | 4                  | 1                  | 7,33±0,015          | 0,21±0,10           | 1994,86±0,18        |
| <b>7</b>   | 8                  | 1,25               | 0,75               | 1,89±0,042          | 0,25±0,015          | 503,19±0,042        |
| <b>8</b>   | 7,75               | 1                  | 1,25               | 6,29±0,015          | 1,0±0,18            | 3093,47±0,015       |
| <b>9</b>   | 6,5                | 3                  | 0,5                | 3,81±0,016          | 0,84±0,054          | 2468,47±0,054       |
| <b>10</b>  | 6,25               | 2,25               | 1,5                | 3,82±0,01           | 0,89±0,042          | 1854,58±0,015       |
| <b>11</b>  | 6,7                | 2,3                | 1                  | 4,79±0,013          | 1,08±0,015          | 2212,91±0,033       |

### 2.3.2 Fermentação em estado sólido

As misturas de resíduos (10 g) (Tabela 1) foram autoclavadas (121 °C/1 atm /15 min) em Erlenmeyers (250 mL). Após o resfriamento, o substrato estéril foi inoculado com solução  $10^7$  esporos/g e água destilada estéril até 70% de umidade. As fermentações foram mantidas em câmara de incubação microbiológica (SL 222, SOLAB) a 28 °C por 72 horas. As condições experimentais ótimas (temperatura e tempo de incubação) estabelecidas para os testes foram obtidas através de trabalhos previamente realizados de acordo com a experiência do grupo de pesquisa. Todos os pontos experimentais presentes na matriz foram realizados em triplicata.

### 2.4 Extração multienzimática

Após a etapa de fermentação, 10 mL de água destilada estéril foram adicionados aos meios fermentados para cada 1.0 g de resíduo. A mistura foi mantida em incubadora com agitação orbital (Q315IA, QUIMIS) a 200 rpm e 28 °C por 30 minutos. O conteúdo inteiro de cada Erlenmeyer foi prensado (prensa manual) através de gaze para separar o sólido do extrato enzimático. O filtrado foi coletado e centrifugado (CT-6000R;

CIENTEC) a 3000 rpm por 10 minutos. Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando-se a parte sobrenadante (extrato enzimático bruto).

#### 2.4.1 Ensaio da atividade da endoglucanase (EGL)

Seguindo a metodologia de Oliveira et al. (2019), a atividade de endoglucanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da incubação de diferentes ensaios, controle e branco. As análises foram realizadas em triplicata. No tubo de ensaio com a reação foi adicionado 0,5 mL de carboximetilcelulose (CMC) na concentração de 2% (m/v) preparado em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), com 0,5 mL do extrato enzimático bruto e 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). Para o ensaio de controle foram incubados 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) com 0,5 mL do extrato enzimático bruto. O ensaio branco continha 1,0 mL da mesma solução tampão e 0,5 mL de CMC. Os tubos foram incubados em banho-Maria a 50°C por 10 min. Após o período de incubação, os açúcares redutores foram dosados com adição de 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) aos meios reacionais, seguindo de incubação em água fervente por 5 minutos e posterior resfriamento em banho de gelo. Posteriormente, foi realizada uma diluição com 6,0 mL de água destilada, agitação em vortex (PHOENIX Ap 56) seguido da leitura das amostras em espectrofotômetro (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics) no comprimento de onda a 540 nm. A quantidade de açúcar redutor liberada foi quantificada usando curva padrão de glicose. Uma unidade internacional de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0  $\mu$ mol de açúcares redutores por minuto a 50 °C. Os resultados dessas análises foram expressos em unidades internacionais por grama de substrato (UI/g) (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

#### 2.4.2 Ensaio da atividade da $\beta$ -glicosidases (BLG)

Seguindo a metodologia de Das Neves et al. (2022), a atividade enzimática foi determinada pelo extrato enzimático bruto utilizando *p*-NP  $\beta$  Glc (*p*-nitrofenil  $\beta$  - *D* – glicopiranosídeo) (Sigma-Aldrich) como substrato e a curva de calibração padrão foi preparada com *p*-nitrofenol (*p*-NP) (Sigma-Aldrich). O ensaio reacional foi realizado com 0,25 mL de extrato enzimático bruto e 1,0 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M,

pH 5,0), o meio reacional foi incubado em banho-Maria a 42 °C por 5 min seguido da adição de 0,25 mL do substrato com concentração 10 mM preparada em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0). Posteriormente, a reação foi incubada por 10 min a 42 °C e interrompida com a adição de 1,0 mL de uma solução de carbonato de sódio 1,0 M. O ensaio branco foi realizado sem a adição do extrato bruto enzimático ao meio e o ensaio de controle foi realizado com 1,25 mL da mesma solução tampão e 0,25 mL de extrato bruto enzimático. A concentração de glicose produzida é determinada indiretamente pela medida da concentração de *p*-nitrofenol no meio reacional, lida através de um espectrofotômetro (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics) a 410 nm. Uma unidade internacional de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0 μmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação (DAS NEVES *et al.*, 2022).

#### 2.4.3 Ensaio da atividade da exoglucanase (EXG)

Seguindo a metodologia adaptada de Da Silva Nunes *et al.* (2020), a atividade de exoglucanase no extrato enzimático bruto foi avaliada em triplicata por degradação de 1,60 mL de Avicel® (Sigma-Aldrich) (1,25% w.v<sup>-1</sup>) suspenso em água destilada estéril e 0,40 mL de extrato bruto enzimático. O ensaio branco foi realizado de forma análoga ao tubo de reação, substituindo o extrato enzimático por água destilada estéril e o ensaio da reação controle foi realizado substituindo a solução de avicel por água destilada estéril. Os ensaios foram incubados a 50 °C por 120 minutos. Após a incubação, 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico foi adicionado, seguido de aquecimento por 5 minutos a 100 °C. Ao término do aquecimento, a mistura foi diluída em 6,0 mL de água, e a liberação de açúcares redutores foi determinada a 540 nm em um espectrofotômetro (SF200DM-UV-Vis; BEL PHOTONICS), utilizando o método de Miller. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcares redutores por minuto (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020).

## 2.5 Caracterização enzimática

### 2.5.1 Efeito da temperatura e estabilidade enzimática

O impacto da temperatura na atividade enzimática foi investigado ao variar a temperatura de reação entre 40, 50, 60, 70 e 80 °C, seguindo a metodologia padrão de quantificação das enzimas EGL, EXG e BGL previamente estabelecidas. As respostas foram quantificadas e expressas como atividade relativa (%), sendo que o resultado mais elevado foi considerado como 100%.

Para avaliar a termoestabilidade, ensaios com o extrato bruto enzimático foram realizados em frascos schott de 10 mL e incubando em banho-Maria em diferentes faixas de temperatura (50 a 80 °C). Amostras de 0,5 mL foram retiradas para EGL e EXG, e 0,2 mL para BGL, em intervalos de 1 hora, seguindo as metodologias de atividade das enzimas EGL (item 2.4.1), EXG (item 2.4.3) e BGL (item 2.4.2). Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), considerando a atividade enzimática inicial como 100%.

#### 2.5.2 Efeito do pH e estabilidade enzimática

Para determinar o pH ótimo, diferentes tampões foram utilizados, variando o pH de 3 a 8 (citrato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> para pHs 3,0, 4,5 e 6,0 e fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> para pHs 7,5 e 9,0). Para cada tampão utilizado, o extrato bruto enzimático foi diluído na proporção 1:1. A atividade das enzimas foi determinada a uma temperatura de 40 °C (BGL) e 50 °C (EXG e EGL) por tempo determinado seguindo as metodologias de atividade das enzimas EGL (item 2.4.1), EXG (item 2.4.3) e BGL (item 2.4.2). Os resultados foram expressos como atividade relativa, sendo o resultado mais alto considerado como 100%.

A estabilidade do pH foi determinada incubando o extrato bruto enzimático em banho-Maria a 50 °C, utilizando tampões com pHs 3,0, 4,5, 6,0 7,5 e 9,0 na diluição (1:1) do extrato a ser incubado. Durante o período de incubação (5 horas), alíquotas (0,5 mL) foram retiradas em intervalos de 1 hora para quantificar as atividades enzimáticas seguindo as metodologias de atividade das enzimas EGL (item 2.4.1), EXG (item 2.4.3) e BGL (item 2.4.2). As respostas foram expressas como atividade relativa (%), considerando a atividade enzimática determinada antes da incubação como 100%.

#### 2.5.3 Efeito dos sais metálicos e compostos orgânicos

A influência dos sais metálicos  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  e dos compostos orgânicos ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA), T-octil-fenoxi-polietoxi-etanol (Triton X-100) e 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-ácido carboxílico (Trolox) na atividade enzimática foi investigada em concentração de  $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$  no meio reacional. A seleção desses sais de sulfato e compostos orgânicos foi previamente realizada por nosso grupo de pesquisa, os quais demonstraram que esses sais promoveram atividades superiores a 100% em celulasas de *P. roqueforti* ATCC 10110 (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANTOS GOMES *et al.*, 2023). Os ensaios envolveram a incubação do extrato enzimático em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 5,0), contendo os aditivos, por 15 minutos, seguido da avaliação da atividade das enzimas seguindo as metodologias de atividade das enzimas EGL (item 2.4.1), EXG (item 2.4.3) e BGL (item 2.4.2). Os resultados foram expressos como atividade relativa (%). Essas considerações refletem a complexidade das interações entre os ânions sulfatos presentes nos sais e o efeito na atividade enzimática, destacando a importância de estudos específicos para compreender os efeitos desses compostos em diferentes contextos enzimáticos.

#### 2.5.4 Efeito dos solventes

Os solventes orgânicos acetona, etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), *N,N*-dimetilformamida (DMF) e acetonitrila (ACN) foram avaliados quanto à atividade enzimática. Os ensaios consistiram na incubação de diferentes porcentagens de solvente (10, 20, 30, 40, 50%) em extrato enzimático por 15 minutos seguido da determinação da atividade da EGL (item 2.4.1), EXG (item 2.4.3) e BGL (item 2.4.2). Os resultados foram expressos como atividade relativa (%).

As redes neurais artificiais com o Mapa Auto-Organizado de Kohonen (KSOM) foram empregadas para avaliar as interações entre as diferentes proporções e tipos de solventes utilizados durante a reação com as enzimas EGL, EXG e BGL, bem como para investigar como esses solventes influenciam na ativação e inibição enzimática. Para o KSOM, foi utilizado um pacote de ferramentas que foi desenvolvido pelo Laboratório de Informática e Informação Ciência (Universidade de Tecnologia de Helsínquia, Finlândia) (VATANEN *et al.*, 2015). O software MatLab foi usado para

implementação dos códigos (Versão R2018b, MathWorks, EUA), elaborados a partir de algoritmos sugeridos na literatura (SIMON HAYKIN, 2009). O conjunto de dados foi organizado em uma matriz 15 x 18 e o total de neurônios utilizados no mapa foi definido pela fórmula  $5\sqrt{n}$ , onde  $n$  é o número total de amostras. O KSOM foi treinado com o conjunto de grupos de dados de entrada utilizando um algoritmo de treinamento em lote, no qual todo o conjunto é apresentado ao mapa antes de qualquer ajuste. A função que limitou a vizinhança utilizada no treinamento da plataforma e na estrutura da rede foi do tipo hexagonal. Mesmo com esta configuração, foram realizados inúmeros treinos até que fosse alcançado o melhor com os menores erros e os melhores índices. A arquitetura da rede foi avaliada com base em índices qualitativos como erro de quantização (QE) e erro topológico (TE).

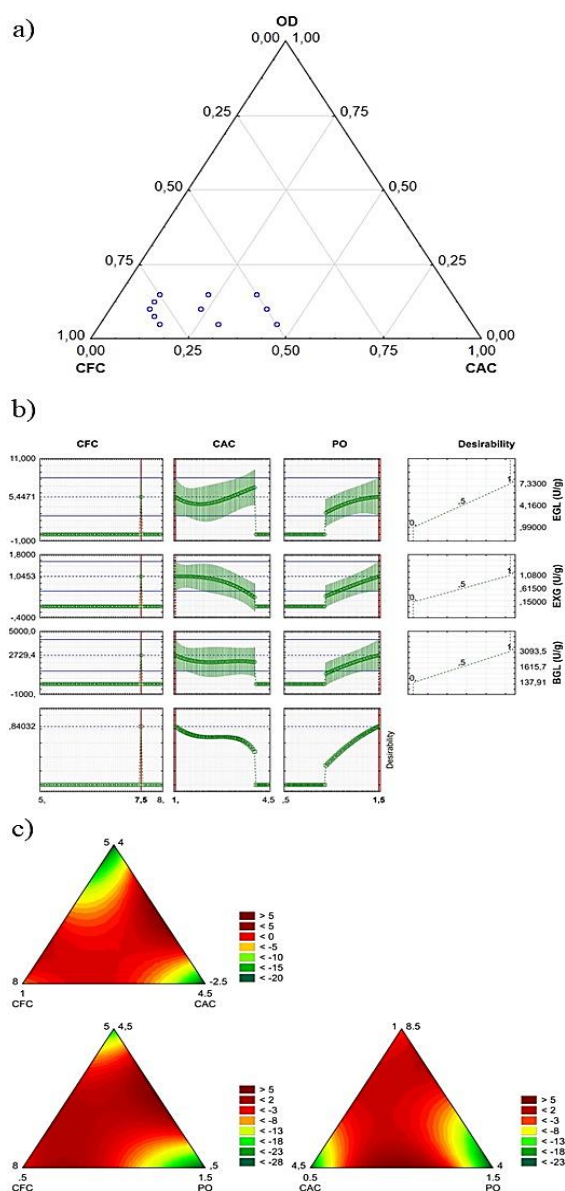
### **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### **3.1 Planejamento de mistura com restrição**

Um planejamento de mistura é um delineamento experimental usado para otimizar a composição das misturas, ou seja, a resposta gerada é uma função das proporções de cada componente da mistura. Em um planejamento de mistura convencional, cada componente de mistura é avaliada em todas as suas proporções, incluindo mínimo (0%) e máximo (100%) (DE MENEZES *et al.*, 2022). No presente estudo, um dos componentes (óleo de dendê) da mistura está no estado líquido e, portanto, sua proporção máxima não atende ao princípio da FES cujo crescimento microbiano deve ocorrer na ausência total ou parcial de água livre. A CFC e CAC apresentaram os seguintes valores de umidade 12,26% e 8,27%, respectivamente, que foram definidos, experimentalmente, em laboratório utilizando a balança de umidade. Já o óleo de dendê tem valor percentual de umidade desconhecido. Logo, esta incompatibilidade é resolvida adicionando restrições que podem estabelecer limites inferiores e superiores para cada um dos componentes da mistura, retirando os experimentos contendo apenas um componente puro (100%) e, desta forma, alterando as configurações experimentais do planejamento de mistura convencional (DE MENEZES *et al.*, 2022). Em função disso, obteve-se uma matriz de planejamento de

mistura com restrições máximas e mínimas para cada componente da mistura. O gráfico ternário (Figura 1a) ilustra a restrição.

Figura 1– Gráfico Ternário da matriz de projeto de misturas restritas (a) Perfis para valores previstos e desejabilidade (b) Superfície de contorno da função desejabilidade (c).



As múltiplas respostas obtidas para as variáveis dependentes (EGL, EXG e BGL) foram analisadas em conjunto utilizando a função desejabilidade (Figura 1b). Para fazer esse tipo de análise foi necessário realizar a normalização das respostas entre 0 e 1. Onde 0 representa uma meta não alcançada, e 1 representa uma meta totalmente

alcançada (BEZERRA *et al.*, 2019). Ela é definida como uma combinação ponderada de funções de desempenho para cada objetivo, como por exemplo, a obtenção do ponto ótimo das enzimas (EGL, EXG e BGL) neste trabalho; cujas ponderações refletem a importância relativa de cada objetivo (DE MENEZES *et al.*, 2022). Neste trabalho, a desejabilidade obtida foi de 0,84 e o modelo que melhor se ajustou foi o quadrático. Esse valor é considerado aceitável, significa que a meta foi obtida. Porém, é necessário realizar experimentos para validar experimentalmente e avaliar se os valores ótimos atendem aos objetivos. A precisão da análise foi avaliada ao realizar triplicatas do ponto ótimo, utilizando 7,5 g de CFC, 1,0 g de CAC e 1,5 g de OD. Durante as análises houve concordância entre os resultados observados e preditos.

A utilização da função desejabilidade na obtenção de enzimas celulolíticas é fundamental, pois as enzimas endoglucanase (EGL), exoglucanase (EXG) e  $\beta$ -glicosidade (BGL) operam sinergicamente na quebra das ligações  $\beta$ -1,4. A otimização conjunta da produção dessas três enzimas confere uma vantagem significativa no contexto industrial, uma vez que sua aplicação combinada pode ser empregada em processos industriais para maximizar a obtenção de produtos específicos. Em processos biotecnológicos, por exemplo, em reações de sacarificação, atuação coordenada dessas três enzimas é crucial para a conversão eficiente de açúcares. As enzimas EGL, EXG e BGL, quando atuam em conjunto, degradam resíduos de lignocelulose, possibilitando a produção de açúcares e subsequente bioetanol a partir desses açúcares (BEHERA; KERKETTA; RAY, 2023).

De acordo com alguns estudos citados na literatura, planejamentos experimentais para obter multi-respostas já foram aplicados. No entanto, alguns autores decidiram otimizar as respostas individualmente, como o estudo de Marques *et al.* (2018), que utilizaram resíduo de casca de arroz com cultivo do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 para gerar um extrato multienzimático com potencial aplicação biotecnológica. Os autores aplicaram um delineamento experimental do tipo Doehlert e a otimização das condições de fermentação para a produção de atividades de xilanase (U/g) e endoglucanase (U/g) foi realizada de forma individualizada. Embora a atividade ideal da xilanase tenha sido 1,04 U/g a 32 °C/82 h, representando um desvio de apenas 3% em relação ao valor teoricamente otimizado, a atividade da endoglucanase não pôde ser ajustada a um modelo quadrático, mas alcançou  $2,37 \pm 0,01$  U/g a 32 °C por 72 h

(MARQUES *et al.*, 2018). Logo, os pesquisadores não conseguiram encontrar uma condição ótima que favorece a produção das duas enzimas simultaneamente.

Já De Castro e Sato (2013) exploraram o planejamento simplex centroide para otimizar o processo de fermentação em estado sólido e utilizaram resíduos de farelo de trigo, farelo de soja e farelo de algodão como substratos, isoladamente ou em combinação. Eles buscaram a produção simultânea de protease e  $\alpha$ -amilase por *Aspergillus oryzae*. No entanto, eles analisaram as respostas das enzimas individualmente. Os resultados indicaram que apenas as misturas binárias tiveram uma influência positiva na produção simultânea das enzimas, com o farelo de trigo promovendo as maiores atividades, mas não obtiveram um ponto em comum para a obtenção das duas enzimas. Possivelmente, a aplicação da função desejabilidade, poderia ter sido benéfica para encontrar o ponto ótimo de produção simultânea dessas enzimas nesses correspondentes estudos (DE CASTRO; SATO, 2013).

Os gráficos de contorno dispostos na (Figura 1c) permitem ilustração dos efeitos das variáveis e suas interações. No estudo do planejamento de mistura da fermentação o resíduo de OD teve influência mínima na mistura em comparação aos resíduos de cacau. O *P. roqueforti* ATCC 10110, assim como qualquer outro microrganismo necessita de nutrientes para seu crescimento microbiano. Provavelmente, o OD não contém nutrientes necessários para o crescimento desse fungo nessas condições de mistura. Os resíduos de cacau já foram apontados em outros trabalhos como potencial produtor de enzimas celulolíticas (OLIVEIRA *et al.*, 2019; REIS *et al.*, 2020).

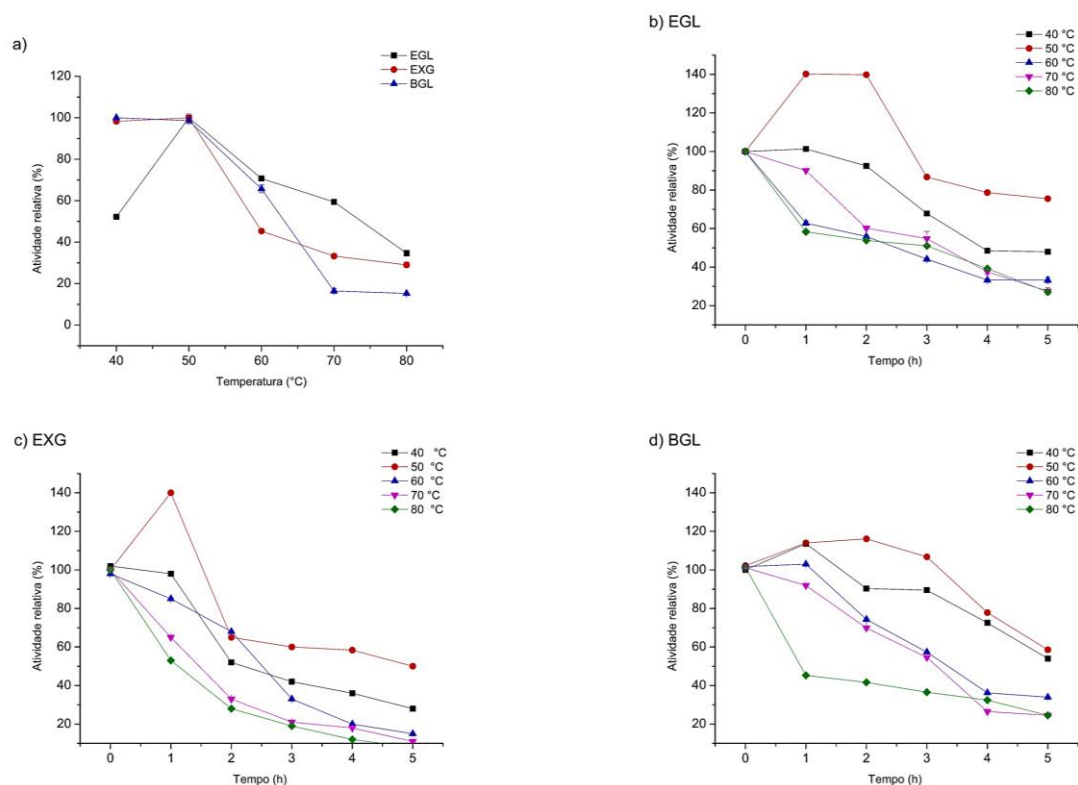
## 3.2 Caracterização Bioquímica

### 3.2.1 Efeito da Temperatura

A temperatura é um fator que influencia diretamente na atividade enzimática através da velocidade da reação que aumenta com o aumento da temperatura até atingir um ponto ótimo (alta energia de ativação enzimática). A temperatura ótima para as enzimas celulolíticas varia de 50 a 60 °C (PATEL *et al.*, 2019) que propicia uma melhor atividade, seja na ligação ao substrato ou tempo de ação no metabolismo. Quando há uma variação gradual ou muito brusca na temperatura, elas sofrem desnaturação e perdem a sua capacidade funcional (PATEL *et al.*, 2019).

A Figura 2a demonstra as faixas de temperatura ótima para as enzimas EGL, EXG e BGL. A EGL obteve máximo de atividade em 50 °C, enquanto as enzimas EXG e BGL obtiveram máximo de atividade relativa em 40 °C. A atividade relativa foi calculada considerando a atividade das enzimas em condições padrão de quantificação como 100%. Alguns autores relataram em seus trabalhos faixas de temperatura ótimas de 50 °C para a EGL e EXG (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANTOS GOMES *et al.*, 2023), e 52 °C para BGL (DAS NEVES *et al.*, 2022) obtidas a partir do *P. roqueforti* ATCC 10110. Essas pesquisas corroboram com os resultados encontrados neste trabalho, pois as enzimas EGL, EXG e BGL obtiveram atividade ótima à 50 °C.

Figura 2– Temperaturas ótimas das EGL, EXG e BGL (a); Termoestabilidade: EGL (b), EXG (c) e BGL (d).



Além da temperatura de atividade das enzimas, o estudo da estabilidade enzimática é de grande importância para aplicações industriais. A literatura indica, consistentemente, que as celulasas microbianas tendem a apresentar maior estabilidade

térmica quando comparadas as enzimas oriundas de outras fontes, como as de origem animal, especialmente em temperaturas relativamente elevadas (EJAZ; SOHAIL; GHANEMI, 2021; POTPROMMANEE *et al.*, 2017; RIGOLDI *et al.*, 2018). Tanto fungos termofílicos, quanto mesofílicos são fontes de celulasas, cujas temperaturas ideais, após o processo de purificação, mostram-se similares. Os fungos termofílicos destacam-se, especialmente, devido à sua capacidade de secretar grandes quantidades de celulasas, tornando-os objeto de estudo frequente (PATEL *et al.*, 2019). As celulasas fúngicas termofílicas, por exemplo, demonstram alta estabilidade com atividades máxima a 50–80 °C (PATEL *et al.*, 2019). Além disso, as enzimas celulasas de fungos termofílicos exibem notável estabilidade térmica, permanecendo estáveis a 60°C, com meias-vidas mais longas a 70, 80 e 90°C em comparação com fungos mesofílicos, como o *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; PATEL *et al.*, 2019; SANTOS GOMES *et al.*, 2023).

No entanto, *P. roqueforti* ATCC 10110, classificado como mesofílico, tem sido objeto de estudo para a produção de enzimas celulasas termoestáveis (COTON *et al.*, 2020; NOGUEIRA *et al.*, 2020). Em um estudo realizado por Oliveira (2019) e colaboradores, a produção de um extrato multienzimático, contendo uma endoglucanase termoestável mantendo-se 100% estável a 50°C por 3 horas. Além disso, a enzima reteve mais de 40% de sua atividade relativa em 40 e 50°C ao longo de 5 horas de reação, com a atividade diminuindo após esse período. A EGL do *P. roqueforti* ATCC 10110 obtida neste trabalho se mostrou termoestável, pois reteve mais de 70% de atividade a 50 °C por 5 horas. E reteve apenas 30% de sua atividade em 70 e 80 °C, caracterizando que a enzima sofreu desnaturação ao longo das 5 horas de reação em temperatura elevada.

A enzima EXG apresentou estabilidade térmica reduzida em comparação à EGL (Figs. 2b e 2c). A EXG em 50°C manteve 60% de sua atividade relativa após 5 horas de reação, enquanto a 40 e 60 °C em 3 horas de reação manteve 50% de sua atividade relativa. Em 5 horas de reação a 50 °C, a atividade foi reduzida em mais 50% em 40, 60, 70 e 80 °C. A enzima EXG foi mais sensível a exposição prolongada nas diferentes temperaturas e sofreu desnaturação com mais facilidade. A enzima BGL (Fig 2d) demonstrou ser a mais termoestável, mantendo mais de 50% de sua atividade relativa em 5 horas de reação nas temperaturas 40 e 50 °C.

Neste estudo, as enzimas EGL, EXG e BGL demonstraram um desempenho promissor dentro das faixas de temperatura, destacando seu potencial para aplicações em processos biotecnológicos que operam em temperaturas entre 40 e 50°C, como por exemplo, a sacarificação enzimática e co-fermentação simultânea para produção de bioetanol (LEE *et al.*, 2017; MONDAL; NEOGI; CHAKRABORTY, 2024; SIQUEIRA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2022).

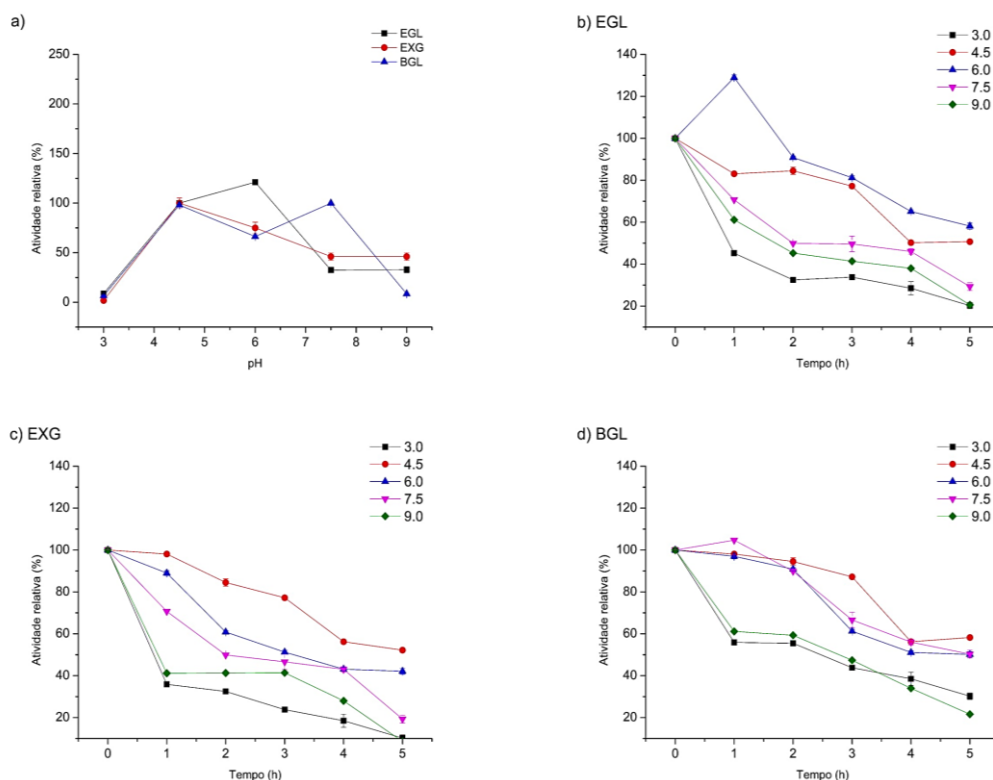
### 3.2.2 Efeito do pH

O pH também afeta a atividade enzimática, pois as enzimas têm uma faixa de pH ótima para sua atividade que irá contribuir para efetividade da ação enzimática, e cada enzima opera em uma variação de pH específico. pH ótimo é o pH em que a atividade enzimática é máxima. pHs distantes do pH ótimo alteram as ligações interespecíficas da molécula, comprometendo desde sua estrutura e função à inativação enzimática completa (NIYONZIMA, 2021). Quando o pH está fora da faixa ótima, a atividade enzimática diminui. Para enzimas celulolíticas, o pH ótimo geralmente varia de 4,0 a 5,5 (NIYONZIMA, 2021).

A atividade ótima das celulasas EGL, EXG e BGL foi determinada em diferentes pHs. A Figura 3a demonstra o pH ótimo. As enzimas obtiveram máxima atividade relativa nos respectivos pHs 6,0 (EGL), 4,5 (EXG) e 4,5 e 7,5 (BGL).

Alguns trabalhos relatam a obtenção de  $\beta$ -glicosidase alcalinas com pHs que variam de 8,0-9,0 (BIVER *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2015). No entanto, outros estudos demonstram que as enzimas celulolíticas endoglucanase e exoglucanase obtidas do *P. roqueforti* ATCC 10110 elevam suas atividades catalítica em pHs ácidos (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Neste trabalho, a BLG demonstrou ter dois pHs ótimos em 4,5 (ácido) e 7,5 (alcalino). Diante deste resultado é possível que no extrato multienzimático contenha mais de um tipo de enzima BGL, sendo uma ativa em pH ácido e outra em pH alcalino, enquanto as enzimas EGL e EXG demonstraram maior atividade em pHs ácidos.

Figura 3 – pHs ótimos das EGL, EXG e BGL (a); Estabilidade: EGL (b), EXG (c) e BGL (d).



Conforme mostrado na Figura 3b, mais de 55% da atividade máxima da EGL foi retida em valores de pHs 4.5 e 6.0 após 5 horas de incubação, com uma estabilidade superior a 20% para valores de pHs 7.5 e 9.0. No entanto, em pHs 3.0 e 9.0, a atividade catalítica da EGL foi inferior a 20% após 5 horas de reação. Esse comportamento pode ser explicado pela desnaturação da enzima em condições muito ácidas (pH 3.0) e alcalinas (pH 9.0), levando à perda de sua atividade catalítica (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A enzima EXG (Figura 3c) demonstrou estabilidade superior a 40% em valores de pHs de 4.5, 6.0 e 7.5 após 5 horas de reação, o que é interessante do ponto de vista industrial, pois sugere que a enzima mantém sua atividade efetiva em uma ampla faixa de pH relevante para várias aplicações. No entanto, em pHs 3.0 e 9.0, a atividade

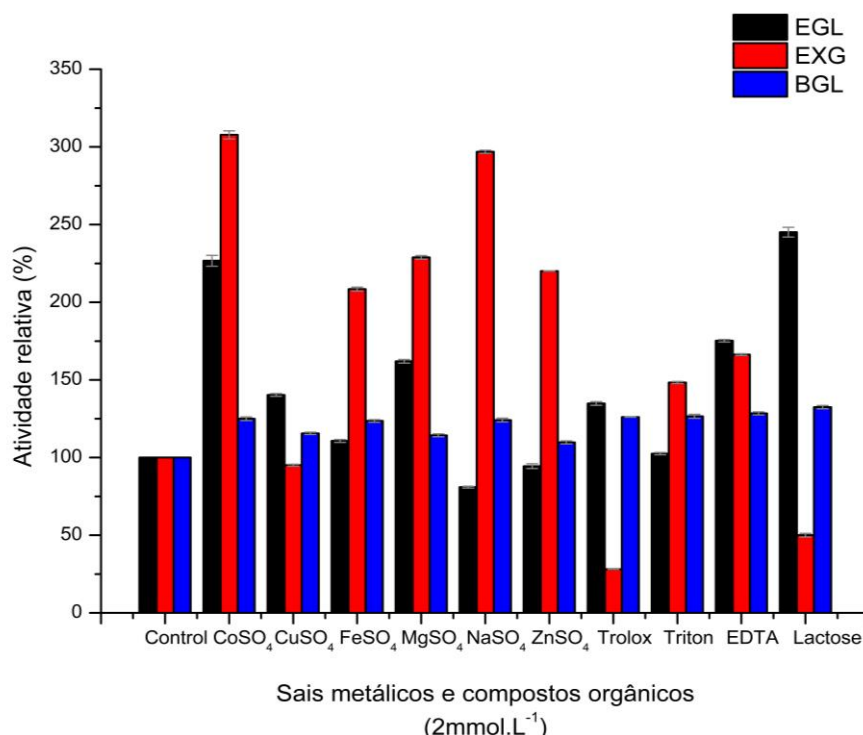
catalítica foi inferior a 20% após 5 horas de reação, o que pode ser explicado pela desativação da enzima nessas condições extremas de pH.

A BGL proveniente de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 apresentou um comportamento catalítico comparável ao EGL. Ambas demonstraram um bom desempenho catalítico em pH na faixa de 4,5 a 7,5. Além disso, elas mostraram baixa atividade catalítica em pH muito ácido (3,0) e pH muito alcalino (9,0), que é consistente com a desativação enzimática observada em condições extremas de pH. Constantemente é relatado na literatura aplicações industriais de enzimas celulasas em pH 4,5 a 5,0 no processo de hidrólise enzimática e durante o processo de fermentação de açúcares para produção de bioetanol a partir da hidrólise da celulose (AHMED; BIBI, 2018). Além disso, é relatado a aplicação de enzimas celulasas neutras e ácidas na indústria têxtil (BHARDWAJ *et al.*, 2021) e celulasas alcalinas na indústria de detergentes (NIYONZIMA, 2021). Isso ressalta a importância de escolher o pH apropriado para as aplicações industriais dessas enzimas, garantindo que elas mantenham sua atividade e estabilidade (SHAH; RANAWAT; MISHRA, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; ZUCCARO; PIROZZI; YOUSUF, 2019).

### 3.2.3 Efeito dos sais metálicos e compostos orgânicos

Os sais metálicos  $\text{CoSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{ZnSO}_4$  podem influenciar a atividade de enzimas celulasas fúngicas de diversas formas, dependendo da concentração do sal, do tipo de metal envolvido e das características específicas das enzimas celulasas (LOPINA, 2017). Diversos mecanismos são observados nos efeitos dos sais metálicos sobre as celulasas, destacando-se a atuação como cofatores. Certos íons metálicos, como manganês ( $\text{Mn}^{2+}$ ) e cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ), desempenham o papel de cofatores, facilitando a atividade enzimática de algumas celulasas fúngicas. No âmbito deste estudo, destaca-se a EGL de *P. roqueforti* ATCC 10110, a qual foi ativada pela presença de  $\text{Co}^{2+}$  que é relatado como um bom cofator para enzimas celulasas (Figura 4) (OLIVEIRA *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2017).

Figura 4— Efeito dos sais metálicos e compostos orgânicos em EGL, EXG, BGL



Outro fator importante é a variação nos efeitos de íons divalentes. Íons metálicos mono-, di- e trivalentes são frequentemente estudados nos ensaios de caracterização de celulases. Além da carga iônica, o tamanho do raio iônico, influencia significativamente a atividade e estabilidade da enzima. Estudos indicam que raios maiores têm menos impacto nos aminoácidos catalíticos, enquanto raios menores podem alterar a conformação geral da enzima, prejudicando o sítio catalítico (LOPINA, 2017; PEREIRA *et al.*, 2017).

O íon  $Mg^{2+}$  teve efeito ativador em todas as enzimas do presente estudo, bem como  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  e  $Na^+$ . Logo, alguns metais, como ferro II e cobre, são relatados como tendo efeitos inibitórios específicos nas atividades das celulases (LOPINA, 2017; PEREIRA *et al.*, 2017). Esse efeito foi notado na A EXG do *P. roqueforti* ATCC 10110, que mostrou melhor desempenho com  $Co^{2+}$  e  $Na^+$ , mas foi inibida pelo  $Cu^{2+}$ . Outros estudos (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020) corroboram com os resultados obtidos nesse estudo, indicando que a influência desses íons divalentes pode variar entre diferentes enzimas mesmo quando secretadas pelo mesmo microrganismo.

O efeito ativador com a adição de diferentes sais metálicos foi notado também na  $\beta$ -glicosidase do *P. roqueforti* ATCC 10110. Um estudo adicional com  $\beta$ -glicosidase

do *P. roqueforti* ATCC 10110 indicou uma ativação específica com íons de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ . No entanto, outros íons, como  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , tiveram efeito inibidor (DAS NEVES *et al.*, 2022). A complexidade dessas interações destaca a importância de considerar as condições específicas de obtenção da enzima.

Certos íons metálicos, como cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), podem inibir a atividade enzimática, frequentemente ligando-se aos grupos sulfidrilas de resíduos de cisteína nas enzimas resultando em inativação (PEREIRA *et al.*, 2017). Torna-se evidente que a influência dos sais metálicos nas celulasas é complexa, sendo essencial considerar as características específicas de cada enzima, as condições de obtenção e a presença de diferentes íons para compreender completamente os efeitos observados.

Os compostos orgânicos EDTA, Triton-X, Trolox e lactose tiveram um impacto significativo na atividade das enzimas endoglucanase (EGL), exoglucanase (EXG) e  $\beta$ -glicosidase (BGL). O EDTA (ácido etilenodiaminotetra-acético) é um agente quelante que pode ativar algumas atividades enzimáticas, especialmente de celulasas, ao sequestrar íons metálicos inibidores do sistema aquoso. Quando os agentes quelantes se complexam com metais no meio de reação, o sítio ativo da enzima fica disponível para reagir com o substrato, o que representa o efeito positivo desses compostos nas atividades das celulasas (PEREIRA *et al.*, 2017). Isso resultou no aumento da atividade relativa acima de 100% para EGL, EXG e BGL (Figura 4).

O triton-X é um surfactante tensoativo não iônico que facilita sua interação com as enzimas, aumentando a estabilidade e a atividade enzimática (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022). Esse composto exerceu um efeito positivo nas enzimas EXG e BGL, aumentando a atividade em mais de 100%. No entanto, exibiu um efeito inibidor na EGL reduzindo a atividade em cerca de 10% (Figura 4).

Já o trolox é um composto que possui atividade antioxidante, baseado nos resultados observados, as enzimas EGL e BGL de *P. roqueforti* ATCC 10110 tiveram suas atividades aumentadas em mais de 10%, isso leva a sugerir que o trolox exerceu um efeito protetor, provavelmente, evitando a oxidação de grupos das enzimas e permitindo a manutenção de sua forma ativa (OLIVEIRA *et al.*, 2019). O mesmo efeito não ocorreu para enzima EXG, indicando que provavelmente não houve efeito protetor para esta enzima, ocorrendo uma possível desnaturação.

A lactose aumentou a atividade das enzimas EGL e BGL de *P. roqueforti* ATCC 10110 (Figura 4). A lactose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e

outra de galactose(PEREIRA *et al.*, 2017). A presença desses açúcares pode estar causando a ativação da enzima, pois representa um substrato com afinidade potencial com o sítio ativo (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020; DAS NEVES *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

#### 3.2.4 Efeito dos solventes

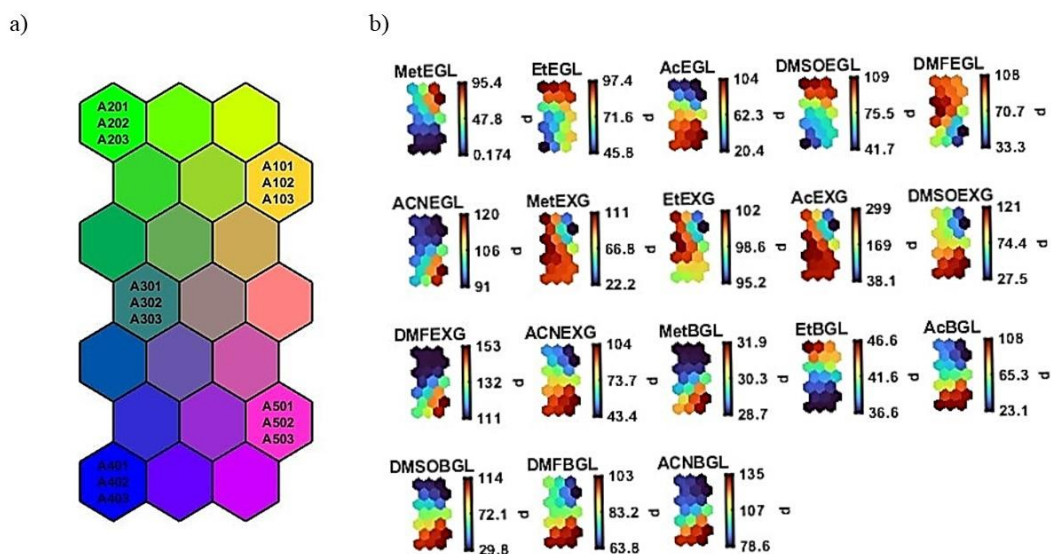
A análise foi realizada utilizando redes neurais artificiais com o Mapa Auto-organizado de Kohonen (KSOM), usada tipicamente para dados não lineares, mas também para dados lineares. Os solventes etanol (Et), metanol (Met), acetona (Ac), dimetilsulfóxido (DMSO), N,N-Dimetilformamida (DMF) e acetonitrila (ACN) em diferentes concentrações (10%, 20%, 30%, 40% e 50%) foram utilizados para avaliar seus efeitos ativadores e inibidores às enzimas EGL, EXG e BGL. Por meio dos dados coletados, realizou-se uma análise utilizando o KSOM, com o objetivo de organizar os dados complexos de acordo com suas semelhanças, permitindo o reconhecimento de padrões (Figura 5a, Tabela 2).

Tabela 2– Efeito dos solventes na ativação/inativação enzimática

| %  | Interação solvente-enzima |           |         |         |         |         |        |        |         |           |         |           |        |        |        |         |         |        |
|----|---------------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|---------|-----------|---------|-----------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|
|    | ACN-BGL                   | DMS O-BGL | ACN-EGL | DMF-EXG | Met-BGL | DMF-BGL | Ac-EGL | Ac-BGL | ACN-EXG | DMS O-EXG | Met-EGL | DMS O-EGL | Et-BGL | ET-EGL | Et-EXG | DMF-EGL | Met-EXG | Ac-EXG |
| 10 | 76,50                     | 26,60     | 90,77   | 111,25  | 28,74   | 80,97   | 18,84  | 32,53  | 41,72   | 23,80     | 100,32  | 102,55    | 28,98  | 90,91  | 94,73  | 86,94   | 16,44   | 22,53  |
| 20 | 82,53                     | 31,34     | 92,84   | 111,61  | 28,74   | 82,29   | 22,44  | 37,15  | 55,78   | 84,87     | 24,17   | 111,00    | 46,98  | 98,99  | 101,72 | 94,43   | 114,15  | 263,38 |
| 30 | 85,13                     | 66,79     | 93,41   | 111,61  | 28,94   | 79,55   | 82,29  | 52,91  | 81,26   | 85,58     | 11,12   | 59,03     | 37,98  | 52,55  | 102,43 | 112,59  | 113,66  | 308,45 |
| 40 | 128,85                    | 105,53    | 98,18   | 128,16  | 30,99   | 101,01  | 92,28  | 109,30 | 96,02   | 113,73    | 0       | 40,40     | 36,56  | 44,49  | 98,24  | 71,50   | 97,41   | 278,83 |
| 50 | 136,67                    | 116,40    | 122,02  | 154,92  | 32,06   | 103,48  | 105,32 | 106,50 | 104,99  | 122,88    | 0       | 65,61     | 36,56  | 80,93  | 99,26  | 29,62   | 94,29   | 278,52 |

Ac- Acetona; ACN-Acetonitrila, DMF- *N,N*-dimetilformamida, DMSO-Dimetilsulfóxido, Et-Etanol, Met-Metanol

Figura 5 – a) Mapa Auto-Organizado de Kohonen (KSOM) para as concentrações dos solventes (10, 20, 30, 40, 50%); b) Correlações solvente-enzima de acordo com as diferentes concentrações.



Correlações comuns para diferentes solventes foram identificadas. Por exemplo, para a interação solvente-enzima, os solventes ACN-EGL, DMF-EXG, ACN-BGL e DMSO-BGL demonstraram correlação entre si por serem solventes polares apróticos, influenciando na ativação enzimática em concentrações de 40% a 50% (Figura 5b, Tabela 2). No entanto, o metanol, sendo um solvente polar prótico, apresentou um comportamento inibitório, resultando na diminuição da atividade da BGL. A Figura 5b ilustra a semelhança entre DMF-EXG e Met-BGL, sendo inversamente proporcional, pois o aumento da concentração de DMF aumenta a atividade da EXG, levando à ativação enzimática, enquanto o aumento da concentração de metanol resulta na inibição da BGL.

Para as interações DMF-BGL, Ac-EGL, Ac-BGL, ACN-EXG e DMSO-EXG, o aumento da concentração até 50% do solvente influenciou positivamente na ativação enzimática. Por outro lado, para Met-EGL e DMSO-EGL, concentrações menores do solvente (10-20%) não inibiram as enzimas, mas o aumento da concentração (30 a 40%) levou à inibição dessas enzimas (Tabela 2). Nas interações Et-BGL, Et-EGL, Et-EXG, DMF-EGL, Met-EXG, Ac-EXG, concentrações entre 20% e 30% influenciaram na

ativação de algumas enzimas e na inativação de outras, de forma inversamente proporcional (Tabela 2).

#### 4 CONCLUSÃO

A otimização da produção das EGL, EXG e BGL por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 através da FES com auxílio de um planejamento de mistura com restrição e a partir da função desejabilidade para análise de multi-respostas, simultaneamente, indicou uma desejabilidade aceitável de 0,84. Os experimentos de validação confirmaram a precisão dos resultados preditos, destacando a eficácia do método proposto.

EGL, EXG e BGL apresentaram ótima estabilidade a 50°C e nos pHs 4,5 e 6,0. A estabilidade em diferentes pHs destaca a importância de escolher o pH apropriado para aplicações industriais tornando-as particularmente adequadas para aplicações biotecnológicas.  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  e  $Na^{+}$  apresentaram efeito ativador nas enzimas, enquanto  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  exibiram efeito inibitório para EXG e EGL, respectivamente. A complexidade dessas interações ressalta a necessidade de considerar as condições específicas de obtenção das enzimas ao aplicar metais. Quanto ao efeito de solventes, a análise utilizando o Mapa Auto-organizado de Kohonen (KSOM) revela a influência complexa dos solventes na atividade das enzimas EGL, EXG e BGL. Os solventes polares apróticos demonstraram influência positiva, enquanto solventes próticos, como o metanol, mostraram tendência à inibição. O KSOM proporcionou uma compreensão detalhada dessas interações, destacando a importância das propriedades químicas dos solventes na sua escolha adequada em futuras aplicações industriais.

Os resultados deste estudo contribuem para a compreensão das condições ideais para a produção e aplicação de enzimas celulolíticas, abrindo caminho para avanços biotecnológicos e industriais nesse campo.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar sua gratidão ao Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LABIOCAT) à Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela assistência administrativa e técnica.

## REFERÊNCIAS

AHMED, A.; BIBI, A. Fungal cellulase; production and applications: minireview. **LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences**, v. 4, n. 1, p. 19–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20319/ijhls.2018.41.1936>

ARAUJO, S. C.; RAMOS, M. R. M. F.; DO ESPÍRITO SANTO, E. L.; DE MENEZES, L. H. S.; DE CARVALHO, M. S.; TAVARES, I. M. de C.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Optimization of lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through solid-state fermentation using agro-industrial residue based on a univariate analysis. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 325–330, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1944203>

ARJU HOSSAIN, Md.; AKASH AHAMMED, Md.; ISLAM SOBUJ, S.; KUBRA SHIFAT, S.; DIPTA SOMADDER, P. Cellulase Producing Bacteria Isolation, Screening and Media Optimization from Local Soil Sample. **American Journal of Microbiological Research**, v. 9, n. 3, p. 62–74, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.12691/ajmr-9-3-1>

BEHERA, S. S.; KERKETTA, A.; RAY, R. C. Solid-state fermentation for the production of microbial cellulases. In: BRAHMACHARI, G. (org.). **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 2. ed. [S. l.]: Academic Press, 2023. p. 59–88. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19059-9.00012-8>

BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; DOS SANTOS, A. M. P.; VALASQUES, G. S.; DA MATA CERQUEIRA, U. M. F.; DOS SANTOS ALVES, J. P. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941–959, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.088>

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, p. 95, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>

BIVER, S.; STROOBANTS, A.; PORTETELLE, D.; VANDENBOL, M. Two promising alkaline  $\beta$ -glucosidases isolated by functional metagenomics from agricultural soil, including one showing high tolerance towards harsh detergents, oxidants and glucose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 479–488, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1400-0>

CAO, G.; XIMENES, E.; NICHOLS, N. N.; FRAZER, S. E.; KIM, D.; COTTA, M. A.; LADISCH, M. Bioabatement with hemicellulase supplementation to reduce enzymatic

hydrolysis inhibitors. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 412–415, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.064>

COTON, E.; COTON, M.; HYMERY, N.; MOUNIER, J.; JANY, J.-L. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 59–73, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>

DA SILVA NUNES, N. et al. Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. **BioEnergy Research**, v. 13, n. 4, p. 1130–1143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>

DAS NEVES, C. A.; DE MENEZES, L. H. S.; SOARES, G. A.; DOS SANTOS REIS, N.; TAVARES, I. M. C.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Production and biochemical characterization of halotolerant  $\beta$ -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown in forage palm under solid-state fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 8, p. 3133–3144, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00930-8>

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and  $\alpha$ -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813–821, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.002>

DE MENEZES, L. H. S.; OLIVEIRA, P. C.; DO ESPÍRITO SANTO, E. L.; GONÇALVES, M. S.; BILAL, M.; RUIZ, H. A.; DA SILVA, E. G. P.; SALAY, L. C.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Solid-State Fermentation as a Green Technology for Biomass Valorization: Optimization Techniques for Bioprocess—An Overview. **BioEnergy Research**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10670-y>

DE MENEZES, L. H. S.; RAMOS, M. R. M. F.; ARAUJO, S. C.; SANTO, E. L. do E.; OLIVEIRA, P. C.; TAVARES, I. M. de C.; SANTOS, P. H.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Application of a constrained mixture design for lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 under solid-state fermentation and using agro-industrial wastes as substrate. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 52, n. 8, p. 885–893, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.2004547>

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>

EJAZ, U.; SOHAIL, M.; GHANEMI, A. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. **Biomimetics**, v. 6, n. 3, p. 44, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>

FERDE, M.; COSTA, V. C.; MANTOVANELI, R.; WYATT, N. L. P.; ROCHA, P. de A.; BRANDÃO, G. P.; DE SOUZA, J. R.; GIMENES, A. C. W.; COSTA, F. S.; DA SILVA, E. G. P.; CARNEIRO, M. T. W. D. Chemical characterization of the soils from black pepper (*Piper nigrum* L.) cultivation using principal component analysis (PCA) and

- Kohonen self-organizing map (KSOM). **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, n. 9, p. 3098–3106, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11368-021-02966-3>
- INFANZÓN-RODRÍGUEZ, M. I.; DEL MORAL, S.; CASTRO-MARTÍNEZ, C.; CANO-SARMIENTO, C.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; AGUILAR-USCANGA, M. G. Multi-Response Optimization Using the Desirability Function of Exoglucanases, Endoglucanases and  $\beta$ -Glucosidases Production by *Aspergillus niger* ITV-02 from Delignified Sugarcane Bagasse. **Sugar Tech**, v. 25, n. 1, p. 86–98, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01191-7>
- LEE, C.-R.; SUNG, B. H.; LIM, K.-M.; KIM, M.-J.; SOHN, M. J.; BAE, J.-H.; SOHN, J.-H. Co-fermentation using Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains Hyper-secreting Different Cellulases for the Production of Cellulosic Bioethanol. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4428, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04815-1>
- LIU, J.; YANG, J.; WANG, R.; LIU, L.; ZHANG, Y.; BAO, H.; JANG, J. M.; WANG, E.; YUAN, H. Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 288–294, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.256>
- LONDOÑO-HERNANDEZ, L.; RUIZ, H. A.; TORO, C. R.; ASCACIO-VALDES, A.; RODRIGUEZ-HERRERA, R.; AGUILERA-CARBO, A.; TUBIO, G.; PICO, G.; PRADO-BARRAGAN, A.; GUTIERREZ-SANCHEZ, G.; AGUILAR, C. N. Advantages and Progress Innovations of Solid-State Fermentation to Produce Industrial Enzymes. In: [S. l.: s. n.]. p. 87–113. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_4)
- LOPINA, O. D. Enzyme Inhibitors and Activators. In: **Enzyme Inhibitors and Activators**. [S. l.]: InTech, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/67248>
- LV, Y.; LIU, X.; ZHOU, S.; YU, Q.; XU, Y. Microbial saccharification – Biorefinery platform for lignocellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 189, p. 115761, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115761>
- MA, X.; LI, S.; TONG, X.; LIU, K. An overview on the current status and future prospects in *Aspergillus* cellulase production. **Environmental Research**, v. 244, p. 117866, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117866>
- MARQUES, G. L.; DOS SANTOS REIS, N.; SILVA, T. P.; FERREIRA, M. L. O.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Production and Characterisation of Xylanase and Endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through the Solid-State Fermentation of Rice Husk Residue. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 11, p. 2061–2069, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x>
- MEIRA, L. A.; DE SOUZA DIAS, F. Application of constrained mixture design and Doehlert matrix in the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction assisted by ultrasound for preconcentration and determination of cadmium in sediment and water samples by FAAS. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 56–63, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.07.013>

MONDAL, S.; NEOGI, S.; CHAKRABORTY, S. Optimization of reactor parameters for amplifying synergy in enzymatic co-hydrolysis and microbial co-fermentation of lignocellulosic agro-residues. **Renewable Energy**, v. 225, p. 120281, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.120281>

NIYONZIMA, F. N. Detergent-compatible fungal cellulases. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 1, p. 25–40, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00838-w/Published>

NOGUEIRA, L. S.; SANTOS, M. M. O. dos; MONTEIRO, G. P.; OLIVEIRA, P. C.; GONÇALVES, M. S.; MENEZES, L. H. S.; CARVALHO, M. S. de; SANTO, E. L. do E.; TAVARES, I. M. de C.; OLIVEIRA, J. R. de; FRANCO, M. Utilização do fungo do gênero *penicillium* em fermentação em estado sólido: Uma revisão. In: **Ciências Agrárias: Conhecimentos Científicos e Técnicos e Difusão de Tecnologias**. [S. l.]: Atena Editora, 2020. p. 179–187. Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.93020170718>

NOVAES, C. G.; YAMAKI, T.; DE PAULA, F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B.; BARRETO, J.; VALASQUES, S.; BEZERRA, A. Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology - Part I: Process Variables. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 1184–1215, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170070>

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.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 18, n. 3, p. 777–787, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira>

PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; SIM, S. J.; PANDEY, A. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 385–392, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.049>

PEREIRA, J. de C.; GIESE, E. C.; MORETTI, M. M. de S.; GOMES, A. C. dos S.; PERRONE, O. M.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Effect of Metal Ions, Chemical Agents and Organic Compounds on Lignocellolytic Enzymes Activities. In: **Enzyme Inhibitors and Activators**. [S. l.]: InTech, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/65934>

POTPROMMANEE, L.; WANG, X. Q.; HAN, Y. J.; NYOBE, D.; PENG, Y. P.; HUANG, Q.; LIU, J. Y.; LIAO, Y. L.; CHANG, K. L. Characterization of a thermophilic cellulase from *Geobacillus* sp. HTA426, an efficient cellulase-producer on alkali pretreated of lignocellulosic biomass. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175004>

RAJESH, R.; GUMMADI, S. N. Production of multienzymes, bioethanol, and acetic acid by novel *Bacillus* sp. PM06 from various lignocellulosic biomass. **Biomass**

**Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 15, p. 13949–13961, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02418-z>

RANJAN, R.; RAI, R.; BHATT, S. B.; DHAR, P. Technological Road map of Cellulase: A comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 198, p. 109020, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109020>

REIS, N. dos S.; LESSA, O. A.; PACHECO, C. S. V.; PEREIRA, N. E.; SOARES, G. A.; SILVA, E. G. P.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell as a substrate for obtaining endoglucanase and xylanase from *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 42, p. e48211, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v42i1.48211>

RIGOLDI, F.; DONINI, S.; REDAELLI, A.; PARISINI, E.; GAUTIERI, A. Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications. **APL Bioengineering**, v. 2, n. 1, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.4997367>

RODRIGUES, H. C. S. R.; CARVALHO, A. L.; SOUZA, C. O.; UMSZA-GUEZ, M. A. Evolution of world and Brazilian markets for enzymes produced by solid-state fermentation: A patent analysis. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 112–120, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1872208313666191017143845>

SALOMÃO, G. S. B.; AGNEZI, J. C.; PAULINO, L. B.; HENCKER, L. B.; DE LIRA, T. S.; TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1–6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.019>

SANTOS GOMES, M. M. O. dos; NICODEMOS, I. S.; COSTA SILVA, M. da; SANTOS, D. M. R. C. dos; SANTOS COSTA, F.; FRANCO, M.; PEREIRA, H. J. V. Optimization of enzymatic saccharification of industrial wastes using a thermostable and halotolerant endoglucanase through Box-Behnken experimental design. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2201936>

SHAH, F.; RANAWAT, B.; MISHRA, S. An Approach Toward Cellulase Production, Bioconversion, and Utilization. In: **Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 207–223. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817941-3.00011-5>

SHRUTHI, B. R.; ACHUR, R. N. H.; NAYAKA BORAMUTHI, T. Optimized Solid-State Fermentation Medium Enhances the Multienzymes Production from *Penicillium citrinum* and *Aspergillus clavatus*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2192–2206, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02036-w>

SIMON HAYKIN. **Neural Networks and Learning Machines**. Pearson Education India, n. 3, 2009.

SINGHVI, M. S.; ZINJARDE, S. S. Production of pharmaceutically important genistein and daidzein from soybean flour extract by using  $\beta$ -glucosidase derived from *Penicillium janthinellum* NCIM 1171. **Process Biochemistry**, v. 97, p. 183–190, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.014>

SIQUEIRA, J. G. W.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>

SRIVASTAVA, N.; ELGORBAN, A. M.; MISHRA, P. K.; MARRAIKI, N.; ALHARBI, A. M.; AHMAD, I.; GUPTA, V. K. Enhance production of fungal cellulase cocktail using cellulosic waste. **Environmental Technology and Innovation**, v. 19, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100949>

VATANEN, T.; OSMALA, M.; RAIKO, T.; LAGUS, K.; SYSI-AHO, M.; OREŠIČ, M.; HONKELA, T.; LÄHDESMÄKI, H. Self-organization and missing values in SOM and GTM. **Neurocomputing**, v. 147, p. 60–70, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neucom.2014.02.061>

ZHANG, B.; LI, J.; LIU, X.; BAO, J. Continuous simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) for cellulosic L-lactic acid production. **Industrial Crops and Products**, v. 187, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115527>

ZHANG, F.; BUNTERNGSOOK, B.; LI, J. X.; ZHAO, X. Q.; CHAMPREDA, V.; LIU, C. G.; BAI, F. W. Regulation and production of lignocellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* for biofuels production. In: **Advances in Bioenergy**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. v. 4, p. 79–119. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.aibe.2019.03.001>

ZUCCARO, G.; PIROZZI, D.; YOUSUF, A. Lignocellulosic biomass to biodiesel. In: **Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 127–167. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00004-6>

## CAPÍTULO 3

### **Aplicação das celulasas do *Penicilium roqueforti* ATCC 10110 na hidrólise de resíduos agroindustriais**

#### **RESUMO**

Os resíduos agroindustriais são uma crescente preocupação ambiental devido à produção anual de mais de 37 bilhões de toneladas de resíduos provenientes da agricultura, processamento de alimentos e criação de animais. Os resíduos agroindustriais contêm lignocelulose, composta por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um dos polímeros mais abundantes presente em boa parte dos resíduos. A celulose pode ser convertida em glicose através da hidrólise das ligações  $\beta$ -D-(1,4) pela ação de enzimas celulolíticas, endoglucanase (EGL), exoglucanase (EXG) e  $\beta$ -glicosidase (BGL). Neste estudo, as enzimas celulolíticas EGL, EXG e BGL obtidas do fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 através da FES foram extraídas com tampão citrato de sódio e água destilada, cujas atividades enzimáticas foram 10,36 U/g (EGL), 5,8 U/g (EXG) e 3086,15 UI/g (BGL); e 5,38 U/g (EGL), 1,01 U/g (EXG) e 2358,75 UI/g (BGL), respectivamente, mostrando uma eficiência maior para o tampão. O tampão manteve o pH ideal para as enzimas, prevenindo sua desnaturação e melhorando o rendimento da extração. A sacarificação dos resíduos agroindustriais sem e com pré-tratamento hidrotérmico foi realizado e o pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica facilitou a sacarificação dos resíduos: bagaço de cana (BC), casca de coco (CC) e palha de milho (PM). Sem pré-tratamento, o PM produziu 44 mg/g de açúcares redutores, enquanto com pré-tratamento atingiu 57 mg/g. Os resíduos de BC e CC, sem pré-tratamento, geraram 43,1 mg/g e 29,8 mg/g respectivamente, e com pré-tratamento, 48,24 mg/g e 42,83 mg/g. As enzimas demonstraram boa estabilidade térmica durante a sacarificação, mantendo cerca de 50% de sua atividade após 5 horas de reação. A proporção otimizada de biocatalisador e resíduo foi crucial para maximizar a eficiência do processo.

Palavras-chave: Agroresíduos, Bioconversão, enzimas celulolíticas, hidrólise enzimática

## 1 INTRODUÇÃO

Os resíduos agroindustriais representam uma significativa preocupação em meio ao cenário de industrialização intensiva, urbanização acelerada e aumento populacional (KUTHIALA *et al.*, 2022). Estima-se que mais de  $37003 \times 10^6$  t de resíduos são produzidos anualmente em todo o mundo, provenientes de atividades agrícolas, processamento de alimentos e criação de animais (ZUCCARO; PIROZZI; YOUSUF, 2019). Embora os resíduos agrícolas não sejam inerentemente poluentes, a produção extensiva destes e a má gestão representam potencial ameaça à poluição da terra, da água, como também, contribui a produção de gases ao efeito estufa (KUTHIALA *et al.*, 2022). Contudo, a biomassa lignocelulósica dos resíduos é composta por celulose, hemicelulose e lignina, e que pode ser considerada a fonte renovável neutra em carbono mais abundante, o que pode diminuir as emissões de CO<sub>2</sub> e a poluição atmosférica (ZUCCARO; PIROZZI; YOUSUF, 2019).

Para que a celulose, presente na biomassa lignocelulósica seja utilizada em diversas aplicações industriais, ela precisa primeiro ser convertida em seus blocos de construção (glicose) pela hidrólise de ligações glicosídicas  $\beta$ -D-(1,4) (AHMED; BIBI, 2018). Naturalmente, a degradação da celulose é mediada por um complexo enzimático, composto pelas enzimas celulase, endoglucanase (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EGL), EC 3.2.1.4), exoglucanase (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EXG), EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (1,4- $\beta$ -D-glucosidase (BGL), EC 3.2.1.21) (AHMED; BIBI, 2018; SINGHAL; BHAGYAWANT; SRIVASTAVA, 2021; SRIVASTAVA *et al.*, 2021). Estas enzimas trabalham sinergicamente para degradar a celulose em unidades de glicose que podem então ser utilizadas em diversas aplicações industriais, tais como indústria de papel e celulose (KORSA *et al.*, 2023), indústria de lavanderia (KUMARI *et al.*, 2019), têxtil (NYANHONGO *et al.*, 2016), além, da produção de biocombustíveis (Pendse *et al.*, 2023) e síntese de aminoácidos (AHMED; BIBI, 2018; RANJAN *et al.*, 2023; RAVEN *et al.*, 2019). Dentre os microrganismos, destacam-se os fungos filamentosos, na produção de enzimas celulolíticas via fermentação em estado sólido (FES) (AHMED; BIBI, 2018).

Logo a valorização dos resíduos agroindustriais por meio da FES emerge como uma estratégia promissora (AHMED; BIBI, 2018; BEHERA; KERKETTA; RAY,

2023; COTON *et al.*, 2020; RANA *et al.*, 2021) e tem se destacado como um bioprocesso eficaz auxiliando na produção de enzimas celulolíticas (BISWAL; MANDAVGANE, 2021; DASARI *et al.*, 2019; MAURICE, 2019). A FES é um método que simula o ambiente natural dos fungos, pois necessita de baixo requisito de água, o suficiente para simular a umidade de crescimento ideal do fungo (AHMED; BIBI, 2018; BEHERA; KERKETTA; RAY, 2023; METIN, 2023).

O complexo celulolítico fúngico através da FES pode ter diversas aplicações, tais como: em reações de sacarificação a partir de resíduos agroindustriais (GOMES *et al.*, 2023). Esse processo permite a transformação eficaz da celulose presente nos resíduos agroindustriais em açúcares fermentáveis, contribuindo ainda mais para a valorização dos resíduos agroindustriais (ACCOSSATO *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2021), e o açúcar pode ser aplicado, por exemplo; na indústria de alimentos (KUMAR; AGGARWAL, 2024) ou na produção de etanol de segunda geração (ALABDALALL *et al.*, 2023), demonstrando o potencial das celulasas na economia circular (KUMAR; AGGARWAL, 2024).

Para maximizar o rendimento da produção de açúcares pela reação de sacarificação, tornando-o mais eficiente, realiza o pré-tratamento hidrotérmico dos resíduos agroindustriais, que emerge como uma etapa crucial (ANU *et al.*, 2023; DA SILVA *et al.*, 2022; PENDSE; DESHMUKH; PANDE, 2023). O pré-tratamento hidrotérmico é um método físico-químico utilizado para decompor a biomassa lignocelulósica com água sob condições de alta temperatura e pressão, também conhecido como pré-tratamento com água quente líquida (PENDSE; DESHMUKH; PANDE, 2023). É um método verde e livre de poluição que promove a decomposição da biomassa lignocelulósica, facilitando a liberação dos açúcares complexos presentes na celulose (LI *et al.*, 2022; PENDSE; DESHMUKH; PANDE, 2023).

Aqui foram aplicadas as enzimas do complexo celulolítico (EGL, EXG e BGL) do *P. roqueforti* ATCC 10110 via FES em reações de sacarificação de resíduos agroindustriais. Um estudo comparativo dos resíduos sem e com pré-tratamento hidrotérmico foi realizado, buscando avaliar a eficácia dessas enzimas na conversão da celulose em açúcares simples, bem como a eficiência do processo de pré-tratamento,

assim, contribuindo com o avanço das tecnologias de bioconversão a açúcares e para o desenvolvimento sustentável.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Fermentação em estado sólido**

#### **2.1.1 Preparo do inóculo**

O fungo utilizado para a fermentação foi o *Penicilium roqueforti* ATCC 10110, fornecido pela coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil), registrado sob o número 40074 e lote 041140074. Este fungo foi preservado em meio de sílica e glicerol a -80°C em ultra-freezer.

As cepas, foram repicadas em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) (KASVI®, Paraná, PR, Brasil) em placas de Petri, previamente esterilizadas em autoclave vertical (121°C/1 atm/15 min) (PRISMATEC CS-50) e incubadas em câmara de incubação microbiológica (SL 222, SOLAB) a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  por 7 dias.

Após a incubação, a cultura esporulada foi raspada com auxílio de pérolas de vidro e 50 mL de água destilada estéril, previamente esterilizadas em autoclave vertical (121°C/1 atm/15 min) (PRISMATEC CS-50). A suspensão resultante foi coletada em frasco âmbar. Uma alíquota de 0,1 mL dessa solução foi diluída em tubo de Eppendorf para contagem do número de esporos utilizando câmara de Neubauer em microscópio binocular (BIOVAL® L1000).

#### **2.1.2 Preparo dos resíduos**

Os resíduos de casca da amêndoa do cacau e casca do fruto do cacau (*Theobroma cacao*) e a borra do óleo de dendê (*Elaeis guineenses*) foram adquiridos junto a agroindústrias situadas na região sul da Bahia. A Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira - CEPLAC (Ilhéus, Bahia, Brasil) gentilmente cedeu os resíduos

de cacau, enquanto a borra do óleo de dendê líquido foi obtida da indústria de dendê MIL SELECT (Ituberá, Bahia, Brasil).

Os resíduos de cacau foram triturados em um moinho de facas tipo Willey (ACB LABOR) e dimensionados através de uma peneira granulométrica de 20 mesh e depois submetidos a esterilização em autoclave (121 °C/1 atm /15 min) (PRISMATEC-CS 50) seguido do processo de secagem em uma estufa de ventilação forçada de ar (SOLAB SL 102) a 50 °C por 24 horas. O material resultante foi armazenado em um recipiente fechado de plástico em local seco.

O resíduo da borra do óleo de dendê líquido também foi submetido a um processo de esterilização em autoclave (121 °C/1 atm /15 min) (PRISMATEC-CS 50). Posteriormente, o material esterilizado foi armazenado em um recipiente fechado, garantindo condições adequadas para sua preservação até o uso futuro.

### 2.1.3 Processo fermentativo

Uma mistura de resíduos (10 g) contendo 7,5 g de casca do fruto do cacau (CFC), 1,0 g de casca da amêndoa do cacau (CAC) e 1,5 g de óleo de dendê (OD) foram autoclavados (121 °C/1 atm /15 min) em Erlenmeyers (500 mL). Após o resfriamento, o substrato estéril foi inoculado com solução  $10^7$  esporos/g do *P. roqueforti* ATCC 10110 e água destilada estéril até 70% de umidade. As fermentações foram mantidas em câmara de incubação microbiológica (SL 222, SOLAB) a 28 °C por 72 horas.

## 2.2 Extração multienzimática

Após o período de fermentação, 250 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0) foram adicionados em frascos Erlenmeyer (500mL) aos meios fermentados para cada 1,0 g de resíduo. A mistura foi mantida em incubadora com agitação orbital (Q315IA, QUIMIS) a 200 rpm e 28 °C por 30 minutos. Posteriormente, a mistura foi prensada (prensa manual) através de gaze para separar o sólido do extrato enzimático. O filtrado foi coletado e centrifugado (CT-6000R; CIENTEC) a 3000 rpm por 10 minutos.

Os ensaios enzimáticos foram realizados utilizando-se a parte sobrenadante (extrato enzimático bruto).

#### 2.2.1 Ensaio da atividade da endoglucanase (EGL)

Seguindo a metodologia de Oliveira et al. (2019), a atividade de endoglucanase foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir da incubação de diferentes ensaios, controle e branco. As análises foram realizadas em triplicata. No tubo de ensaio com a reação foi adicionado 0,5 mL de carboximetilcelulose (CMC) na concentração de 2% (m/v) preparado em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), com 0,5 mL do extrato enzimático bruto e 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). Os tubos foram incubados em banho-Maria a 50 °C por 10 min. Após o período de incubação, os açúcares redutores foram dosados com adição de 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) aos meios reacionais, seguindo de incubação em água fervente por 5 minutos e posterior resfriamento em banho de gelo. Posteriormente, foi realizada uma diluição com 6,0 mL de água destilada, agitação em vortex (PHOENIX Ap 56) seguido da leitura das amostras em espectrofotômetro (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics) no comprimento de onda a 540 nm. A quantidade de açúcar redutor liberada foi quantificada usando curva padrão de glicose. Uma unidade internacional de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores por minuto a 50 °C. Os resultados dessas análises foram expressos em unidades internacionais por grama de substrato (UI/g) (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

#### 2.2.2 Ensaio da atividade da exoglucanase (EXG)

Seguindo a metodologia adaptada de Da Silva Nunes et al. (2020), a atividade de exoglucanase no extrato enzimático bruto foi avaliada em triplicata por degradação de 1,60 mL de Avicel® (Sigma-Aldrich) (1,25% w.v<sup>-1</sup>) suspenso em água destilada estéril e 0,40 mL de extrato bruto enzimático. O ensaio branco foi realizado de forma análoga

ao tubo de reação, substituindo o extrato enzimático por água destilada estéril e o ensaio da reação controle foi realizado substituindo a solução de avicel por água destilada estéril. Os ensaios foram incubados a 50 °C por 120 minutos. Após a incubação, 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich) foi adicionado, seguido de aquecimento por 5 minutos a 100 °C. Ao término do aquecimento, a mistura foi diluída em 6,0 mL de água, e a liberação de açúcares redutores foi determinada a 540 nm em um espectrofotômetro (SF200DM-UV-Vis; BEL PHOTONICS), utilizando o método de Miller. Uma unidade de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de açúcares redutores por minuto (DA SILVA NUNES *et al.*, 2020).

### 2.2.3 Ensaio da atividade da $\beta$ -glicosidases (BLG)

Seguindo a metodologia de Das Neves *et al.* (2022), a atividade enzimática foi determinada pelo extrato enzimático bruto utilizando *p*-NP  $\beta$  Glc (*p*-nitrofenil  $\beta$  - *D* – glicopiranosídeo) (Sigma-Aldrich) como substrato e a curva de calibração padrão foi preparada com *p*-nitrofenol (*p*-NP) (Sigma-Aldrich). O ensaio reacional foi realizado com 0,25 mL de extrato enzimático bruto e 1,0 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0), o meio reacional foi incubado em banho-Maria a 42 °C por 5 min seguido da adição de 0,25 mL do substrato com concentração 10 mM preparada em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0). Posteriormente, a reação foi incubada por 10 min a 42 °C e interrompida com a adição de 1,0 mL de uma solução de carbonato de sódio 1,0 M. O ensaio branco foi realizado sem a adição do extrato bruto enzimático ao meio e o ensaio de controle foi realizado com 1,25 mL da mesma solução tampão e 0,25 mL de extrato bruto enzimático. A concentração de glicose produzida é determinada indiretamente pela medida da concentração de *p*-nitrofenol no meio reacional, lida através de um espectrofotômetro (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics) a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (UI) é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0 µmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação (DAS NEVES *et al.*, 2022).

## 2.3 Aplicação das celulasas em reações de sacarificação

### 2.3.1 Preparo dos substratos - Lavagem dos resíduos

Os resíduos utilizados foram moídos em um moinho de facas tipo Willey (ACB LABOR) e dimensionados através de uma peneira granulométrica de 20 mesh. Um processo de lavagem foi realizado na proporção sólido-líquido (1:5); 20 g de cada resíduo [bagaço de cana (BC)], [casca de coco (CC)] e [palha de milho (PM)] foram lavados em 100 mL de água destilada a 50 °C. A mistura sólido/líquido foi separada por filtração simples. 0,2 mL da fração líquida foram dosadas quanto à quantidade de açúcares redutores utilizando 0,2 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich). Uma curva padrão de glicose (0–1 mmol/mL) foi preparada utilizando um espectrofotômetro a 540 nm (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics). O processo foi realizado em triplicata até que fosse removido todo o açúcar presente no resíduo. 10g do resíduo sólido lavado foi coletada para aplicação no processo de pré-tratamento hidrotérmico e a quantidade restante do resíduo lavado foi armazenado para futura aplicação na reação de sacarificação (resíduo sem tratamento).

### 2.3.2 Pré-tratamento hidrotérmico dos resíduos

O pré-tratamento foi realizado em reator hidrotermal (150 mL com manifold e poço de aquecimento) (WT indústria, São Carlos, SP). Uma proporção sólido/líquido (1:10) (m/v) que continha 10g dos resíduos lavados em 100 mL de água destilada foi utilizada. O pré-tratamento hidrotérmico foi realizado entre 170-190 °C durante 30 min. A mistura (fração sólida e líquida) foi filtrada a vácuo (PRISMATEC, 131, 2VC) e a fração sólida dos resíduos foi submetida a secagem em uma estufa de ventilação forçada de ar (SOLAB SL 102) a 70 °C por 5 horas. A fração sólida foi armazenada para posterior aplicação nas reações de sacarificação.

### 2.3.3 Aplicação do extrato enzimático bruto na sacarificação de resíduos lignocelulósicos.

O extrato enzimático bruto produzido pelo *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 via FES foi aplicado na sacarificação dos resíduos BC, CC e PM sem pré-tratamento (seção 2.3.1) e com pré-tratamento hidrotérmico (seção 2.3.2). Em um frasco Schott (50 mL) preparou-se o meio reacional para sacarificação (1:20m/v), 1g de resíduo (p/v) em 20 mL de extrato enzimático bruto. O experimento controle foi realizado em frasco Schott (50 mL) contendo apenas o extrato enzimático bruto. As reações (sem e com pré-tratamento) foram submetidas a banho-Maria (TECNAL, T-054-MAG) a 50 °C por 5 horas. A cada 1 hora, 200 µL de cada reação foram retiradas e adicionadas em tubo de ensaio para quantificação do açúcar redutor, seguida da adição de 200 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e incubadas em água fervente por 5 min; e posteriormente resfriamento em banho de gelo. Adicionalmente, uma diluição com água destilada (4,0 mL) foi realizada e submetido à agitação em vortex (PHOENIX Ap 56). As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 540 nm. (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics). Para analisar a atividade das enzimas durante o processo de sacarificação, 200 µL do controle de reação foi adicionada em três diferentes tubos de ensaio para quantificar as enzimas EGL (seção 2.2.1), EXG (seção 2.2.2) e BGL (seção 2.2.3). Para determinar a quantidade de açúcares liberados, uma curva padrão de glicose (0–1 mmol/mL) foi preparada utilizando um espectrofotômetro (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics) a 540 nm. Ao fim do processo de sacarificação, 1,0 mL da solução sacarificada foi armazenada em tubos eppendorf para posterior análise em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Celulases do *P. roqueforti* ATCC 10110

As celulases (EGL, EXG e BGL) produzidas pelo fungo *P. roqueforti* ATCC 10110 através da Fermentação em Estado Sólido (FES). O meio de fermentação foi composto por CFC (7,5 g), CAC (1,0 g) e OD (1,5 g). Após um período de 72 horas a uma temperatura de 28 °C, realizou-se à extração enzimática utilizando tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0), seguida da quantificação enzimática das enzimas (EGL, EXG e BGL). Baseado em estudo preliminares, o pH 5,0 mostrou-se ideal para maximizar a atividade enzimática.

A avaliação das atividades enzimáticas do extrato multienzimático foi realizada tanto a partir da extração com tampão, quanto com água destilada estéril, cujos valores foram (EGL) (5,38 UI/g), (EXG) (1,01 UI/g) e (BGL) (2358,75 UI/g) para extração com água e (EGL) (10,36 U/g), (EXG) (5,8 U/g) e (BGL) (3086,15 UI/g) para extração com tampão. Pelas atividades alcançadas, observou-se que a extração com o tampão foi mais eficiente do que a extração realizada com água. As enzimas, incluindo as celulases, têm uma faixa de pH ideal onde são mais ativas e estáveis (DAS; NADAR; RATHOD, 2021; VALLE-PÉREZ *et al.*, 2023). Os tampões mantêm um pH constante durante a extração, garantindo que a enzima permaneça em seu ambiente de pH ideal, em contraste, o pH da água é variável e pode reduzir a eficiência da extração (DAS; NADAR; RATHOD, 2021; MONDAL *et al.*, 2020; VALLE-PÉREZ *et al.*, 2023). O pH ideal pode prevenir a desnaturação enzimática, e conseqüentemente, pode aumentar o rendimento e a pureza da extração (AMADI *et al.*, 2020; MONDAL *et al.*, 2020). Neste estudo, observou-se que a extração com o pH ideal acarretou unidades enzimáticas mais altas. A extração com pH ideal leva a obtenção de um blend de celulases mais concentrado sendo altamente atrativo para diversas aplicações, como em reações de sacarificação, podendo garantir maior eficiência na hidrólise enzimática potencializando a conversão de celulose em açúcares fermentáveis (OGUNYEWU *et al.*, 2020).

### **3.2 Aplicação das celulases (EGL, EXG e BGL) do *P. roqueforti* ATCC 10110 na hidrólise de resíduos agroindustriais**

No presente estudo, inicialmente, os resíduos bagaço de cana (BC), casca de coco (CC) e palha de milho (PM) foram lavados para remoção do açúcar e secos, após a secagem, os resíduos foram submetidos à reação de sacarificação por duas vias, com e sem pré-tratamento hidrotérmico. O pré-tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica dos resíduos agroindustriais foi realizado com o objetivo de decompor a estrutura lignocelulósica, e assim facilitar o acesso das enzimas EGL, EXG e BGL à fração polissacarídica de celulose. Os resultados mostraram que todos os resíduos sem pré-tratamento foram sacarificados pelo complexo celulolítico (EGL, EXG e BGL) (Figura 1).

No entanto, o resíduo PM levou aos melhores resultados e mais altas quantidades de conversão a açúcares redutores, chegando a 44 mg/g sem pré-tratamento (Figura 1) e 57 mg/g após o pré-tratamento hidrotérmico (Figura 2) durante 5 horas de sacarificação. Já o rendimento de sacarificação dos resíduos CC e BC sem pré-tratamento foi 29,8 e 43,1 mg/g, respectivamente (Figura 1) e 42,83 e 48,24 mg/g após o pré-tratamento, respectivamente (Figura 2) em 5 horas de sacarificação.

Figura 1 – Hidrólise dos resíduos: bagaço de cana (BC), casca de coco (CC) e palha de milho (PM) sem pré-tratamento pela EGL, EXG e BGL do *P. roqueforti* ATCC 10110.

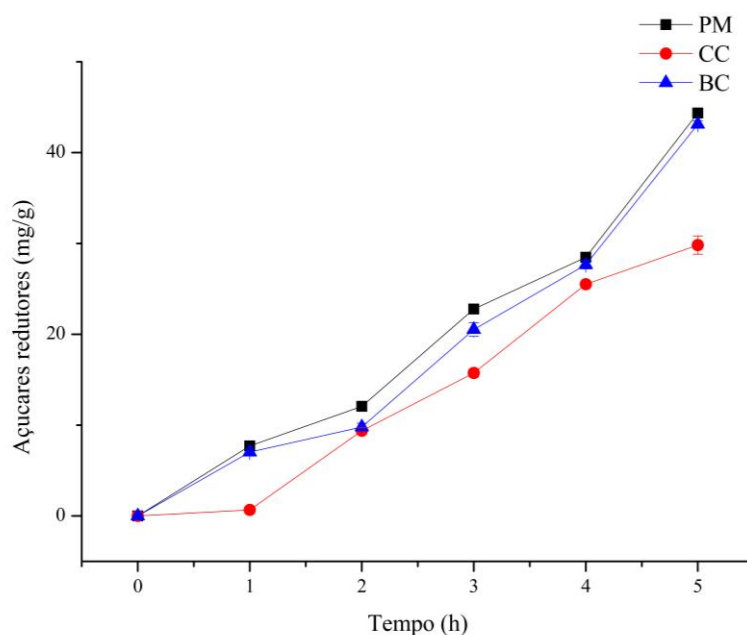
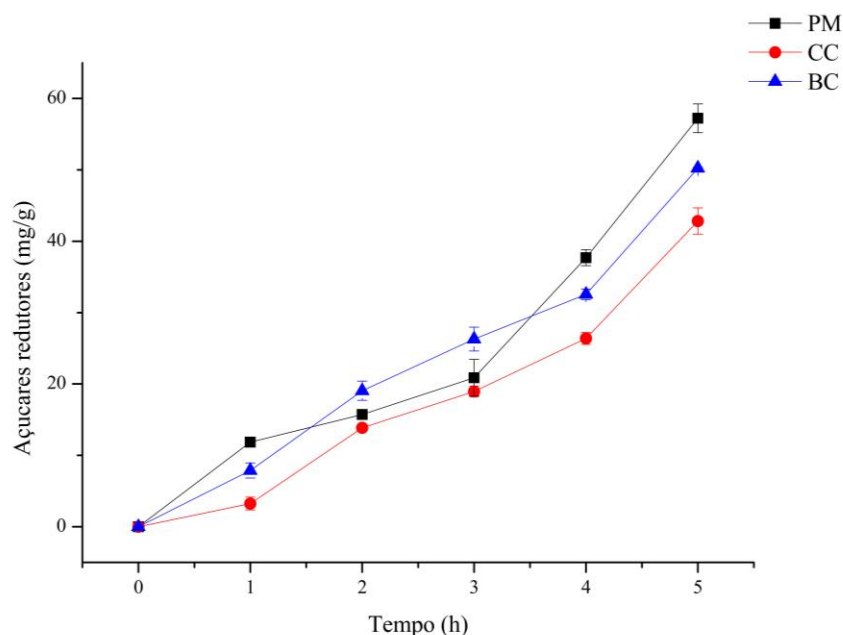


Figura 2 – Hidrólise dos resíduos: bagaço de cana (BC), casca de coco (CC) e palha de milho (PM) com pré-tratamento pela EGL, EXG e BGL do *P. roqueforti* ATCC 10110



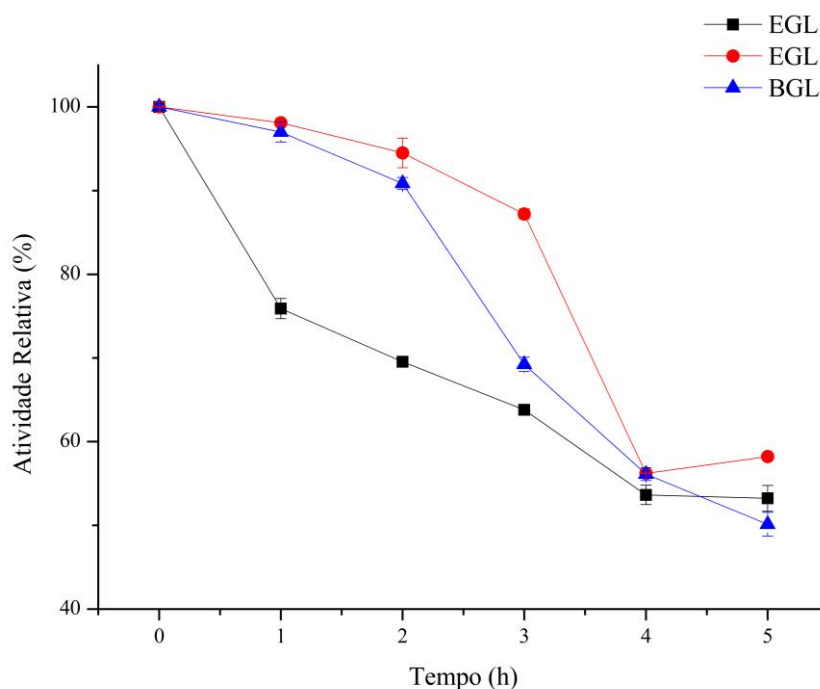
Esses resultados sugerem que após o pré-tratamento hidrotérmico as enzimas celulasas (EGL, EXG e BGL) do *P. roqueforti* ATCC 10110 hidrolisaram com mais facilidade a celulose presente no resíduo após a decomposição da lignocelulose por tratamento hidrotérmico (ANU *et al.*, 2023).

Ao avaliar a atividade enzimática em relação ao tempo de sacarificação (5 horas), pode-se observar que as enzimas EGL, EXG e BGL mantiveram aproximadamente 50% de sua atividade relativa (Figura 3). O tempo de 5 horas, pré-estabelecido para as reações de sacarificação, foi o que melhor adequou-se para quantificação dos açúcares redutores devido às análises no espectrofotômetro.

No entanto, durante um tempo maior de reação, é importante considerar que, a possível presença de inibidores como o hidroximetilfurfural (HMF) (YAYERINO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2024). O HMF é formado principalmente pela desidratação de monômeros de açúcar, como a glicose (MENEGAZZO; GHEDINI; SIGNORETTO, 2018; YAYERINO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2024). A presença de HMF no processo pode reduzir significativamente a eficiência da hidrólise enzimática, pois ele interfere na ação

das enzimas, dificultando a conversão completa aos açúcares fermentáveis (CHANDA *et al.*, 2021; YAVERINO-GUTIÉRREZ *et al.*, 2024).

Figura 3 – Atividade relativa da EGL, EXG e BGL durante a reação de sacarificação dos resíduos: bagaço de cana (BC), casca de coco (CC) e palha de milho (PM).



Neste estudo, o meio reacional foi composto por 1,0 g de resíduo e 20 mL de extrato enzimático bruto, que corresponde a 5% da carga de substrato/resíduos (m/v). Logo a quantidade de biocatalisador (extrato enzimático bruto) foi maior que a quantidade de resíduo. O aumento da concentração do biocatalisador aumenta a quantidade de sítios ativos disponíveis para a reação (CHAVAN; SHETE; DHARNE, 2024b). Essa proporção foi necessária, pois tentativas de análise com apenas 10 mL de extrato enzimático resultaram na completa retenção do extrato na matriz sólida dos resíduos. Portanto, otimizar a proporção entre biocatalisador e resíduo é crucial para a eficiência do processo. Em um estudo recente, Gomes (2023) e seus colaboradores realizaram a sacarificação de diferentes resíduos: bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, farelo de trigo, casca do fruto do cacau e casca de semente de cacau a partir da endoglucanase de *P. roqueforti* ATCC 10110 sem uso do pré-tratamento hidrotérmico. A sacarificação ocorreu a 50 °C, utilizando tampão acetato de sódio (0,1M, pH 5,0) por

24 horas. A carga de substrato/resíduos foi 1% (m/v) com 5,0 mL de extrato enzimático e 5,0 mL de tampão acetato de sódio (0,1M a pH 5,0). Os resultados mostraram que o resíduo farelo de trigo apresentou 6,1 mg/g de açúcares redutores em 24 horas, enquanto os resíduos de bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, casca do fruto do cacau e casca de semente de cacau tiveram concentrações 4,4; 4,23; 4,76 e 4,69 mg/g, respectivamente, nas primeiras 3 horas (GOMES et al., 2023). Ou seja, o tempo de sacarificação dos resíduos e a carga enzimática foram superiores ao estudo apresentado aqui, e os resultados obtidos para os resíduos bagaço de cana-de-açúcar, casca de coco, por exemplo, foram inferiores. Logo, o uso de uma quantidade maior de biomassa lignocelulósica, assim, como o processo de pré-tratamento hidrotérmico da biomassa pode ser benéfico na sacarificação, pois pode resultar na liberação de uma maior quantidade de açúcares, como a glicose.

Por exemplo, Wang (2019) e seus colaboradores conduziram um estudo utilizando a palha de colza. Eles realizaram o pré-tratamento hidrotérmico com 10,0 g do resíduo misturado com 200 mL de água deionizada em diferentes temperaturas (variando de 145 a 205 °C) por vários tempos de retenção (15–120 min). O tratamento a 190 °C por 15 min foi identificado como a condição ótima para a sacarificação. Durante a hidrólise enzimática, utilizaram uma concentração de substrato de 2% e uma adição de enzima de 115 mg/g de substrato/resíduo. Como resultado, o pré-tratamento hidrotérmico a 190 °C por 15 min resultou em um rendimento significativamente maior de glicose, sendo 3,5 vezes maior em relação ao material não tratado (WANG *et al.*, 2019). Os resultados alcançados neste estudo corroboram com a literatura, mostrando, assim, que o pré-tratamento hidrotérmico pode aumentar significativamente a eficiência da hidrólise enzimática em menor tempo de sacarificação tornando atrativo industrialmente.

### **3.3 Identificação dos açúcares redutores por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Em todos os sistemas foram observados sinais nos cromatogramas correspondentes à formação de sacarose e glicose, com diferenças notáveis entre as amostras com e sem pré-tratamento hidrotérmico (Tabela 1).

Tabela 1- Concentração dos açúcares detectados por CLAE.

| Amostras                    | Sacarose     |              | Frutose      |              | Glicose      |              |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                             | Ci<br>(mg/L) | Cf<br>(mg/L) | Ci<br>(mg/L) | Cf<br>(mg/L) | Ci<br>(mg/L) | Cf<br>(mg/L) |
| Controle                    | 10771,6      | 929,7        | 1607,8       | 2,7          | 3312,6       | 289,7        |
| Palha milho <sup>1</sup>    | 4670,4       | 402,9        | 996,7        | 81,1         | 4595,5       | 396,5        |
| Palha milho <sup>2</sup>    | 5896,9       | 508,2        | 919,7        | 40,9         | 9451,8       | 813,2        |
| Casca de coco <sup>1</sup>  | 10196,8      | 877,1        | 451,3        | 73,4         | 266,9        | 25,1         |
| Casca de coco <sup>2</sup>  | 9888,8       | 850,7        | 830,3        | 60,4         | 2058,3       | 178,8        |
| Bagaço de cana <sup>1</sup> | 9275,8       | 798,1        | 678,4        | 60,9         | 146,9        | 14,8         |
| Bagaço de cana <sup>2</sup> | 5628,5       | 485,1        | 684,2        | 140,1        | 4595,5       | 396,5        |

Ci – Concentração inicial; Cf – Concentração final; <sup>1</sup> sem pré-tratamento hidrotérmico; <sup>2</sup> Com pré-tratamento hidrotérmico

Para a palha de milho (PM), o pré-tratamento hidrotérmico resultou em um aumento significativo na concentração de glicose, passando de 4595,5 mg/L para 9451,8 mg/L, um incremento de mais de 100%. Esse aumento pode ser atribuído à maior acessibilidade das enzimas a celulose após o pré-tratamento, o que corrobora com a maior eficiência de sacarificação observada anteriormente. A concentração de frutose, no entanto, apresentou uma leve redução, de 996,7 mg/L para 919 mg/L, o que pode sugerir uma maior conversão preferencial a glicose em relação a frutose no processo.

Em relação a casca de coco (CC), houve uma notável elevação na concentração de glicose com o pré-tratamento, passando de 266,9 mg/L para 2058,3 mg/L, o que também corrobora com o resíduo de sacarificação apresentado nas figuras 1 e 2. Além disso, a concentração de frutose aumentou de 451,3 mg/L para 830,3 mg/L, evidenciando que o pré-tratamento hidrotérmico foi eficaz em liberar açúcares fermentáveis. No entanto, a concentração de sacarose, que inicialmente era de 10196,8 mg/L, apresentou um declínio para 9888,8 mg/L, o que pode indicar uma maior conversão da sacarose em monossacarídeos de glicose durante a sacarificação.

No caso do bagaço de cana (BC), o efeito do pré-tratamento também foi evidente. A concentração de glicose aumentou significativamente, de 146,9 mg/L para 4595,5 mg/L, demonstrando uma eficiente conversão de celulose. Curiosamente, a

concentração de frutose manteve-se praticamente constante, com valores de 678,4 mg/L sem pré-tratamento e 684,2 mg/L após o pré-tratamento. A sacarose, entretanto, apresentou uma queda acentuada, de 9275,8 mg/L para 5628,5 mg/L, o que reflete uma maior conversão da sacarose em glicose, como foi demonstrado para a palha de milho.

A formação dos monossacarídeos foi significativamente mais pronunciada quando as amostras foram expostas ao reator. Os resultados sugerem que o pré-tratamento hidrotérmico não apenas aumenta a eficiência da sacarificação, mas também possibilita a liberação de açúcares fermentáveis, como a glicose, sacarose, frutose, favorecendo a hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos. A maior formação de monossacarídeos nas amostras pré-tratadas é um indicativo de que o pré-tratamento não apenas facilita a sacarificação, mas também melhora a qualidade dos açúcares obtidos, o que pode ser benéfico para processos industriais que visam a produção de bioetanol ou outros bioprocessos subsequentes, que utilizam a fermentação para produção de álcoois.

#### 4 CONCLUSÃO

As celulasas (EGL, EXG e BGL) a partir do *P. roqueforti* ATCC 10110 através da FES, mostraram mais eficiente quando extraídas com tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 5,0) em relação a extração com água destilada, provavelmente devido à preservação de um pH ideal para a atividade enzimática.

O pré-tratamento hidrotérmico dos resíduos agroindustriais facilitou a ação do complexo celulolítico, resultando em uma maior conversão de celulose em açúcares redutores. O resíduo palha de milho demonstrou melhores resultados e mais altas quantidades de conversão a açúcares redutores, chegando a 44 mg/g sem pré-tratamento e 57 mg/g após o pré-tratamento hidrotérmico durante 5 horas de sacarificação.

Os resultados obtidos a partir da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) demonstram que o pré-tratamento hidrotérmico dos resíduos lignocelulósicos é altamente eficaz em aumentar a concentração dos açúcares, como a glicose, com destaque para a palha de milho (9451,8 mg/L) e casca de coco (4595,5 mg/L).

Este estudo demonstra o potencial das celulasas produzidas pelo *P. roqueforti* ATCC 10110 na bioconversão de resíduos agroindustriais em açúcares fermentáveis.

No entanto, a otimização do processo, incluindo o pré-tratamento dos resíduos e a proporção entre biocatalisador e resíduo, é crucial para aumentar a eficiência do processo. Esses resultados abrem caminho para futuras pesquisas sobre a aplicação dessas enzimas na produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado a partir de resíduos agroindustriais.

## REFERÊNCIAS

ACCOSSATO, S.; GRANATA, M.; FAÈ, M.; CELLA, R.; TOSI, S.; CCO, A. M. Solid-state fermentation using a strain of *Trichoderma asperellum* improves the saccharification of rice straw. **Acta Microbiologica Bulgarica**, v. 35, n. 3, p. 133–140, 2019.

AHMED, A.; BIBI, A. Fungal cellulase; production and applications: minireview. **LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences**, v. 4, n. 1, p. 19–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20319/ijhls.2018.41.1936>

ALABDALALL, A. H.; ALMUTARI, A. A.; ALDAKEEL, S. A.; ALBARRAG, A. M.; ALDAKHEEL, L. A.; ALSOUFI, M. H.; ALFURAIH, L. Y.; ELKOMY, H. M. Bioethanol production from lignocellulosic biomass using *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* hydrolysis enzymes through immobilized *S. cerevisiae*. **Energies**, v. 16, n. 2, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/en16020823>

AMADI, O. C.; EGONG, E. J.; NWAGU, T. N.; OKPALA, G.; ONWOSI, C. O.; CHUKWU, G. C.; OKOLO, B. N.; AGU, R. C.; MONEKE, A. N. Process optimization for simultaneous production of cellulase, xylanase and ligninase by *Saccharomyces cerevisiae* SCPW 17 under solid state fermentation using Box-Behnken experimental design. **Heliyon**, v. 6, n. 7, p. e04566, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04566>

ANU; KUMAR, V.; SINGH, D.; SINGH, B. A greener, mild, and efficient bioprocess for the pretreatment and saccharification of rice straw. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 5, p. 4121–4133, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01450-9>

BEHERA, S. S.; KERKETTA, A.; RAY, R. C. Solid-state fermentation for the production of microbial cellulases. In: BRAHMACHARI, G. (org.). **Biotechnology of Microbial Enzymes**. 2. ed. [S. l.]: Academic Press, 2023. p. 59–88. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19059-9.00012-8>

BISWAL, D.; MANDAVGANE, S. A. Biomass waste: A potential feedstock for cellulase production. In: **Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases**. [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 347–359. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821882-2.00017-X>

- CHANDA, K.; MOZUMDER, A. B.; CHOREI, R.; GOGOI, R. K.; PRASAD, H. K. A lignocellulolytic *Colletotrichum* sp. OH with broad-spectrum tolerance to lignocellulosic pretreatment compounds and derivatives and the efficiency to produce hydrogen peroxide and 5-hydroxymethylfurfural tolerant cellulases. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 785, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7100785>
- CHAVAN, S.; SHETE, A.; DHARNE, M. S. Strain improvement for cellulolytic enzymes for effective saccharification of lignocellulosic biomass by mutant of *Penicillium funiculosum* NCIM 1228. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 4, n. 2, p. 716–730, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43393-024-00247-x>
- COTON, E.; COTON, M.; HYMER, N.; MOUNIER, J.; JANY, J.-L. *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. **Fungal Biology Reviews**, v. 34, n. 2, p. 59–73, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>
- DA SILVA, F. L.; MAGALHÃES, E. R. B.; DE SÁ LEITÃO, A. L. O.; DOS SANTOS, E. S. Production of lignocellulolytic enzymatic complex using pretreated carnauba straw as carbon source and application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 7, p. 2611–2622, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00815-w>
- DA SILVA NUNES, N. et al. Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. **BioEnergy Research**, v. 13, n. 4, p. 1130–1143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>
- DAS NEVES, C. A.; DE MENEZES, L. H. S.; SOARES, G. A.; DOS SANTOS REIS, N.; TAVARES, I. M. C.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Production and biochemical characterization of halotolerant  $\beta$ -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown in forage palm under solid-state fermentation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 8, p. 3133–3144, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00930-8>
- DAS, S.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Integrated strategies for enzyme assisted extraction of bioactive molecules: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 899–917, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.060>
- DASARI, P. R.; RAMTEKE, P. W.; KESRI, S.; KONGALA, P. R. Comparative Study of Cellulase Production Using Submerged and Solid-State Fermentation. In: [S. l.: s. n.]. p. 37–52. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_3)
- GOMES, M. M. O. dos S.; SANTOS, D. M. R. C. dos; SILVA, M. da C.; SOUZA, C. B. de; FERREIRA, A. N.; FRANCO, M.; PEREIRA, H. J. V. Aplicações biotecnológicas da enzima endoglucanase microbiana. In: **A pesquisa em ciências**

**biológicas: Desafios atuais e perspectivas futuras.** [S. l.]: Atena Editora, 2021. p. 1–12. Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.3002104101>

KORSA, G.; KONWARH, R.; MASI, C.; AYELE, A.; HAILE, S. Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. **Annals of Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 13, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13213-023-01715-w>

KUMAR, N.; AGGARWAL, N. K. Process development for fungal cellulase production and enzymatic saccharification of *Parthenium hysterophorus* for bioethanol production. **Waste Management Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2023.11.004>

KUMARI, U.; SINGH, R.; RAY, T.; RANA, S.; SAHA, P.; MALHOTRA, K.; DANIELL, H. Validation of leaf enzymes in the detergent and textile industries: launching of a new platform technology. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, n. 6, p. 1167–1182, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pbi.13122>

KUTHIALA, T.; THAKUR, K.; SHARMA, D.; SINGH, G.; KHATRI, M.; ARYA, S. K. The eco-friendly approach of cocktail enzyme in agricultural waste treatment: A comprehensive review. [S. l.]: Elsevier B.V., 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.173>

LI, X.; SHI, Y.; KONG, W.; WEI, J.; SONG, W.; WANG, S. Improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by bio-coordinated physicochemical pretreatment—A review. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.12.015>

MAURICE, N. Role of solid-state fermentation to enhance cellulase production. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 127–153. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00009-6>

MENEGAZZO, F.; GHEDINI, E.; SIGNORETTO, M. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) production from real biomasses. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2201, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23092201>

METIN, B. *Penicillium roqueforti* secondary metabolites: biosynthetic pathways, gene clusters, and bioactivities. **Fermentation**, v. 9, n. 9, p. 836, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9090836>

MONDAL, S.; SOREN, J. P.; MONDAL, J.; RAKSHIT, S.; KUMAR HALDER, S.; MONDAL, K. C. Contemporaneous synthesis of multiple carbohydrate debranching enzymes from newly isolated *Aspergillus fumigatus* SKF-2 under solid state fermentation: A unique enzyme mixture for proficient saccharification of plant bioresources. **Industrial Crops and Products**, v. 150, p. 112409, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112409>

NYANHONGO, G.; HERRERO ACERO, E.; MATUCHAKI, M. D. D. J.; RAU, M.; GUEBITZ, G.; ANDREAUS, J. Microbial applications for fabric and textile industries.

In: **Microbial Applications**. [S. l.]: De Gruyter, 2016. p. 33–78. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/9783110412789-004>

OGUNYEWO, O. A.; RANDHAWA, A.; JOSHI, M.; JAIN, K. K.; WADEKAR, P.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M.; YAZDANI, S. S. Engineered *Penicillium funiculosum* produces potent lignocellulolytic enzymes for saccharification of various pretreated biomasses. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 49–60, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.02.029>

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.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 18, n. 3, p. 777–787, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira>

PENDSE, D. S.; DESHMUKH, M.; PANDE, A. Different pre-treatments and kinetic models for bioethanol production from lignocellulosic biomass: A review. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16604>

RANA, P.; INBARAJ, B. S.; GURUMAYUM, S.; SRIDHAR, K. Sustainable Production of Lignocellulolytic Enzymes in Solid-State Fermentation of Agro-Industrial Waste: Application in Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Juice Clarification. **Agronomy**, v. 11, n. 12, p. 2379, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy11122379>

RANJAN, R.; RAI, R.; BHATT, S. B.; DHAR, P. Technological road map of Cellulase: A comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 198, p. 109020, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109020>

RAVEN, S.; SRIVASTAVA, C.; KAUSHIK, H.; HESUH, V.; TIWARI, A. Fungal Cellulases: New Avenues in Biofuel Production. In: [S. l.: s. n.]. p. 1–18. E-book. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14726-6_1)

SANTOS GOMES, M. M. O. dos; NICODEMOS, I. S.; COSTA SILVA, M. da; SANTOS, D. M. R. C. dos; SANTOS COSTA, F.; FRANCO, M.; PEREIRA, H. J. V. Optimization of enzymatic saccharification of industrial wastes using a thermostable and halotolerant endoglucanase through Box-Behnken experimental design. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2201936>

SINGHAL, G.; BHAGYAWANT, S. S.; SRIVASTAVA, N. Cellulases through thermophilic microorganisms: Production, characterization, and applications. In: Current Status and Future Scope of Microbial Cellulases. [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 39–57. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821882-2.00005-3>

SRIVASTAVA, N.; MOHAMMAD, A.; SINGH, R.; SRIVASTAVA, M.; SYED, A.; BAHADUR PAL, D.; ELGORBAN, A. M.; MISHRA, P. K.; GUPTA, V. K.

Evaluation of enhanced production of cellulose deconstructing enzyme using natural and alkali pretreated sugar cane bagasse under the influence of graphene oxide. **Bioresource Technology**, v. 342, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126015>

VALLE-PÉREZ, A. U.; GÓMEZ-ANGULO, J. H.; FLORES-COSÍO, G.; AMAYA-DELGADO, L. Interaction of Fungal Strains, Biomass, and pH to Produce Lignocellulosic Enzymes in Solid-State Fermentation for Sustainable Biotransformation of Sugarcane and Agave Bagasse. **Bioenergy Research**, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10695-3>

WANG, Z.-W.; ZHU, M.-Q.; LI, M.-F.; WEI, Q.; SUN, R.-C. Effects of hydrothermal treatment on enhancing enzymatic hydrolysis of rapeseed straw. **Renewable Energy**, v. 134, p. 446–452, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.11.019>

YAYERINO-GUTIÉRREZ, M. A.; WONG, A. Y. C.-H.; IBARRA-MUÑOZ, L. A.; CHÁVEZ, A. C. F.; SOSA-MARTÍNEZ, J. D.; TAGLE-PEDROZA, A. S.; HERNÁNDEZ-BELTRAN, J. U.; SÁNCHEZ-MUÑOZ, S.; SANTOS, J. C. dos; DA SILVA, S. S.; BALAGURUSAMY, N. Perspectives and Progress in Bioethanol Processing and Social Economic Impacts. **Sustainability**, v. 16, n. 2, p. 608, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su16020608>

ZUCCARO, G.; PIROZZI, D.; YOUSUF, A. Lignocellulosic biomass to biodiesel. In: *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 127–167. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00004-6>