



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC
DEPARTAMENTODECIÊNCIASEXATASETECNOLOGICAS–DCET PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQUIM MESTRADO EMQUÍMICA

MARISE SILVA DE CARVALHO

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE XILANASE PRODUZIDA
POR *Aspergillus oryzae* ATCC10124 PELA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
EM MISTURA DE RESÍDUOS

ILHÉUS-BA
JANEIRO DE2021

MARISE SILVA DE CARVALHO

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE XILANASE PRODUZIDA
POR *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 PELA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO
EM MISTURA DE RESÍDUOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos T. Dias.

ILHÉUS-BA

JANEIRO DE 2021

Ficha Catalográfica

C331 Carvalho, Marise Silva de.
Produção, caracterização e aplicação de xilana-
se produzida por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 pe-
-la fermentação em estado sólido em mistura de re-
síduos / Marise Silva de Carvalho. – Ilhéus, BA:
UESC, 2021.
77f.: il.
Orientador: Marcelo Franco.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em
em Química - PPGQUIM.
Inclui referências.
1. Enzimas. 2. Simplex (Matemática). 3. Plane-
jamento experimental. 4. Resíduos lignocelulósicos.
5. Mofo (Botânica). I. Título.
CDD 572.7

MARISE SILVA DE CARVALHO

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE XILANASE PRODUZIDA
POR *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 PELA FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO EM MISTURA DE RESÍDUOS**

Ilhéus - BA, 25 de janeiro de 2021.



Prof.º Dr. Marcelo Franco

UESC – Orientador



Prof.º Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva

UESC – Membro



Prof.ª Dra. Iasnaia Maria de Carvalho Tavares

UESB-BA – Membro

ILHÉUS-BA

JANEIRO DE 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meu pai Oxalá e minha mãe Iemanjá que sempre estiveram e estarão comigo em todos os momentos acompanhando e me guiando nesta caminhada de vida.

Ao meu querido companheiro Telynisson, pela força de todos os dias, pelas palavras de incentivo, por me socorrer no desespero e pela infinita paciência de ouvir as tristezas e compartilhar das alegrias de cada momento deste trabalho.

A meu pai Luiz, meus irmãos Gerino, Gildásio, e minha irmã Fátima, pois sempre acreditaram em mim, até quando eu mesma não acreditei cada conquista minha é também de cada um de vocês.

A meu orientador e meu co-orientador Prof^o. Dr. Marcelo Franco, por terem sido intermediários da relação construída com o conhecimento, e por toda dedicação no desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste Mestrado. A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo apoio técnico e administrativo, e a todos os docentes, técnicos e colegas do Programa de Pós-graduação em Química da UESC, em especial Adriana, Luiz e Thiago, que sempre estiveram dispostos a ajudar e a compartilhar conhecimento.

À meus amigos do Laboratório de Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LaBioCat), Nadabe, Ozana, Poly, Marta, Marcia, Adriana e Iasnaia, pelo compartilhamento de conhecimento, pelos momentos de descontração e até pelos de preocupação coletiva, sempre me apoiando, dando conselhos e vibrando por minhas conquistas durante a realização deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora, pela disponibilidade em participar e pelas contribuições acerca da dissertação. À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A xilanase é uma enzima que atua no componente hemicelulósico da parede celular das plantas. Sua função é catalizar a despolimerização da xilana clivando as ligações β -1,4. Esta função justifica sua grande importância no mercado industrial. O presente estudo buscou relatar a produção de xilanase pela técnica de fermentação em estado sólido por ação do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* ATCC 10124, em mistura dos resíduos, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e casca do fruto do cacau, a caracterização da enzima produzida quanto a termoestabilidade e estabilidade a diferentes pHs e sua atividade frente a adição de metais e por fim a aplicação da enzima contida no extrato bruto enzimático produzido na sacarificação de resíduos lignocelulósicos. Para o estudo das melhores condições de mistura dos resíduos foi utilizando o Desenho experimental simplex centróide, onde a combinação de 25% bagaço de cana-de-açúcar 25% de casca de arroz e 50% de casca de cacau, foi apontada pelo modelo como ótima. Estas condições foram validadas permitindo obter uma atividade enzimática de 10,85U/g, valores que elevaram em 22,05%, 117% e 11,85% a produção enzimática quando comparado a atividades obtidas com os resíduos separadamente. Foi também aplicado o planejamento experimental Box-Behnken para realizar a otimização de fatores que influenciam no processo de fermentação, sendo eles, temperatura, tempo de incubação e umidade inicial. O modelo encontrado apresentou como condições ótimas 25°C de temperatura, 100 horas e 55% de umidade inicial. Estas condições ótimas foram testadas e o valor de atividade real obtida foi de 12,15 U/g, o que representa um aumento de 11,98% em relação a atividade enzimática anterior à aplicação do planejamento experimental. Em seguida foi realizada a caracterização bioquímica da xilanase produzida quanto ao pH ótimo e a estabilidade em diferentes pHs, tendo o pH 7,0 como o melhor e estabilidade em pHs mais alcalinos. Também realizada a caracterização quanto a temperatura ótima e a termoestabilidade, tendo melhor desempenho a 60 °C e sendo estável até 4h de incubação. O estudo do comportamento da enzima frente a adição de metais também foi realizado, e foi possível observar que apenas o CuSO₄ apresentou efeito positivo na atividade enzimática. E por fim o extrato enzimático bruto contendo a xilanase foi aplicado na sacarificação da casca do fruto do cacau, bagaço de cana de açúcar, casca de arroz, casca de amendoim e palha de milho, sendo capaz de sacarificar todos os resíduos a que foi exposta, apresentando como melhor resíduo para a sacarificação a casca do fruto do cacau chegando a apresentar 994,33 mg/g de açúcares redutores. Estes resultados demonstram o potencial da xilanase de *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 para aplicação industrial.

Palavras chave: Enzimas, Simplex centróide, Box-Benhken, Resíduos lignocelulosicos, Fungo filamentoso.

ABSTRACT

Xylanase is an enzyme that acts on the hemicellulosic component of the cell wall of plants. Its function is to catalyze the depolymerization of xylan by cleaving the β -1,4 bonds. This function justifies its great importance in the industrial market. The present study sought to report the production of xylanase by the solid state fermentation technique by the action of the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* ATCC 10124, in a mixture of residues, sugarcane bagasse, rice husk and cocoa fruit peel, the characterization of the enzyme produced in terms of thermostability and stability at different pHs and its activity with the addition of metals and finally the application of the enzyme contained in the crude enzymatic extract produced in the saccharification of lignocellulosic residues. For the study of the best conditions for mixing the residues, the centroid simplex experimental Design was used, where the combination of 25% sugar cane bagasse, 25% rice husk and 50% cocoa husk, was pointed out by the model as excellent. These conditions were validated allowing an enzymatic activity of 10.85U / g to be obtained, values that increased enzyme production by 22.05%, 117% and 11.85% when compared to activities obtained with the residues separately. The Box-Behnken experimental planning was also applied to optimize factors that influence the fermentation process and enzymatic production, namely, temperature, incubation time and initial humidity. The model found presented as optimal conditions 25°C of temperature, 100 hours and 55% of initial humidity. These optimal conditions were tested and the value of real activity obtained was 12.15 U / g, which represents an increase of 11.98% in relation to the enzymatic activity prior to the application of the experimental Design. Then, the biochemical characterization of the xylanase produced was performed in terms of optimum pH and stability at different pHs, with pH 7.0 being optimal and having better stability at more alkaline pHs. Characterization was also carried out in terms of optimum temperature and thermostability, with better performance at 60 °C and being stable until 4 hours of incubation. The study of the behavior of the enzyme against the addition of metals was also carried out, and it was possible to observe that only CuSO₄ had a positive effect on the enzymatic activity. Finally, the crude enzymatic extract containing the xylanase was applied in the saccharification of the cocoa fruit husk, sugar cane bagasse, rice husk, peanut husk and corn straw, being able to saccharify all the residues to which it was exposed. , presenting as the best residue for saccharification the bark of the cocoa fruit reaching 994.33 mg / g of reducing sugars. These results demonstrate the potential of *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 xylanase for industrial application.

Keywords: Enzymes, Centroid Simplex, Box-Benhken, Lignocellulosic residues, Filamentous fungus.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 – (A) Bagaço de cana-de-açúcar. (B) Bagaço de cana-de-açúcar triturado em forma de pó.....	20
Figura 2 – Resíduo de casca de arroz.....	22
Figura 3 – Cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.), com destaque para as composições da casca (pericarpo).....	24
Figura 4 – (A) Representação morfológica do gênero <i>Aspergillus</i> . B) Micrografia Eletrônica de Varredura do conidióforo de <i>Aspergillus nidulans</i> . C) Micrografia de Epifluorescência de <i>Aspergillus nidulans</i>	26
Figura 5 – (A) Crescimento e coloração de <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 10124 em resíduo de cacau. (B) Colônia de <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 10124 em Agar-batata-dextrose.....	27
Figura 6 – (A) Representação da estrutura da xilana e os locais de atuação das enzimas envolvidas na hidrólise. (B) estrutura da xilobiose e o local de ataque das β -xilosidases.....	29
Figura 7 – Desenho Experimental Centróide Simplex para estudo de três componentes.....	33

Capítulo 2

Figura 1 - (a) Efeitos padronizados para fatores investigados (Gráfico de Pareto). (b) Gráfico de contorno e superfície obtidos a partir do modelo especial cúbico.....	61
Figura 2. (a) Efeitos padronizados para fatores investigados (Gráfico de Pareto). (b) Gráfico de contorno (temperatura). (c) Gráfico de contorno (tempo). (d) Gráfico de contorno (umidade).....	65
Figura 3. (a) Atividade de xilanase obtida em diferentes temperaturas (a atividade mais	

alta obtida em 60 °C foi tomada como 100%). (b) Perfil de termoestabilidade de xilanase (as atividades obtidas no tempo 0 h foram tomadas como 100%; condições de reação: pH: 4,8; tempo: 10 min). (c) Atividade de xilanase obtida em diferentes pHs (d) atividade mais alta obtida em pH 7 foi tomada como 100). (d) Perfil de estabilidade ao pH de xilanase (as atividades obtidas no tempo 0 h foram tomadas como 100%; condições de reação: temperatura 50°C; tempo: 10 min)..... **68**

Figura 4 - Sacarificação de Casca do fruto de cacau, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de arroz e casca de amendoim empregando xilanase bruta produzida por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. A sacarificação foi realizada em 50°C, pH 4,8, a 120 rpm por 6 h, utilizando uma carga de substrato de 1% e uma carga enzimática de 130 UI/g de substrato seco. Os experimentos foram realizados em duplicata..... **70**

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Área plantada, área colhida e produção das safras de 2019 e 2020 de cacau no Brasil e na Bahia.....	23
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Planejamento simplex centróide com valores reais e codificados que estão entre parênteses e a atividade enzimática da xilanase experimental e prevista. As quantidades do bagaço de cana-de-açúcar (BC), casca de arroz (CA) e casca do fruto do cacau (CC) foram expressas em gramas. A fermentação em estado sólido foi realizada a 27 °C, 144 h, 60% de umidade e 10^7 de esporos do <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 10124.....	55
Tabela 2. Planejamento Box-Behnken com valores reais e valores codificados que estão entre parênteses e a atividade enzimática da xilanase. A fermentação em estado sólido foi desenvolvida com 5g de mistura de resíduos agroindustriais (BC, CA e CC) e 10^7 de esporos do <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 10124 por grama de substrato.....	57
Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para o modelo especial cúbico.....	61
Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático.....	64
Tabela 5. Atividade de xilanase de <i>A. oryzae</i> ATCC 10124 frente a diferentes sais metálicos e compostos orgânicos (a atividade obtida utilizando o extrato xilanolítico bruto sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 2 mM; temperatura: 50°C; pH: 4,8; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata.....	69

SUMÁRIO

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Fermentação em Estado Sólido.....	17
3.1 Os resíduos lignocelulósicos.....	18
3.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar.....	19
3.2.2 Casca de arroz.....	21
3.2.3 Casca do cacau (pericarpo).....	22
3.3 O micro-organismo utilizado <i>Aspergillus oryzae</i>	25
3.4 Características gerais da xilanase.....	28
3.5 Xilanase e suas aplicações na sacarificação.....	30
3.6 Ferramentas estatísticas na otimização da produções de enzimas.....	31
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
5 REFERÊNCIAS.....	36
Capítulo 2: Aplicação da Fermentação em Estado Sólido na valorização de resíduos agroindustriais pela ação de <i>Aspergillus oryzae</i> ATCC 10124 para a produção de xilanase e sua aplicação na sacarificação de resíduos agroindustriais.	51
RESUMO.....	51

1 Introdução.....	52
2 Materiais e métodos.....	54
2.1 Substratos e microrganismo.....	54
2.2 Preparo dos substratos e inóculo.....	54
2.3 Métodos Estatísticos para a otimização da produção de xilanase por FES.....	55
2.3.1 Otimização da mistura de resíduos.....	56
2.3.2 Otimização dos parâmetros fermentativos.....	56
2.3.3 Obtenção do extrato enzimático.....	58
2.3.4 Determinação da atividade enzimática de xilanase.....	58
2.4 Caracterização bioquímica.....	58
2.4.1 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima.....	59
2.4.2 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima.....	59
2.4.3 Efeito dos sais metálicos.....	59
2.5 Aplicação do extrato bruto enzimático na sacarificação de resíduos agroindustriais.....	60
2.6 Análises estatísticas.....	60
3. Resultados e discussão.....	60
3.1 Otimização da mistura de resíduos.....	60
3.2 Otimização dos parâmetros fermentativos.....	63
3.3 Caracterização bioquímica.....	66
3.3.1 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima.....	66

3.3.2 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima.....	67
3.3.3 Efeito dos sais metálicos.....	68
3.5 Sacarificação de resíduos agroindustriais.....	69
4. Conclusão.....	71
5. Referências.....	71

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por produtos agrícolas em todo o mundo, devido principalmente ao aumento populacional dos últimos tempos reflete diretamente na geração de grandes volumes de subprodutos ou resíduos, que quando não tratados ou reaproveitados, acabam sendo dispostos em locais inadequados e gerando problemas ambientais cada vez piores (GARCIA et al., 2019). Assim, formas de aproveitamento destes materiais vêm ganhando destaque devido principalmente à sua constituição rica em celulose, hemicelulose e lignina (HOUFANI et al., 2020), o que favorece principalmente seu aproveitamento em bioprocessos, agregando bastante valor a este tipo de material (FERRAZ, et al. 2019).

A fermentação em estado sólido é um tipo de bioprocessos que vem se destacando como alternativa para o reaproveitamento de resíduos. A técnica consiste em utilizar superfícies sólidas como suporte e fonte de nutrientes para o desenvolvimento de um micro-organismo, com pouca disponibilidade de água, apenas o suficiente para permitir o crescimento e a atividade metabólica celular (COSTA et al., 2018; PANDEY, 2003).

Durante o processo fermentativo os componentes da matriz sólida são metabolizados pelos micro-organismos acompanhado da liberação de compostos, que apresentam importância no setor econômico, a exemplo das enzimas (AHMED et al., 2017; SRIVASTAVA, et al., 2019). Os micro-organismos que mais se destacam neste processo são os fungos filamentosos, pela facilidade de adaptação, justificada principalmente por este ambiente se aproximar do seu habitat natural (COSTA et al., 2018). O gênero *Aspergillus* apresenta registros de eficiência em processos de produção enzimática por fermentação em estado sólido (BRITO et al., 2017; REIS et al., 2018; FILIPE, et al., 2019; MELNICHUK et al., 2020), por adaptar-se a uma ampla faixa de temperatura e capacidade de utilizar diversos compostos químicos, além de excretar grandes quantidade de enzimas incluindo as xilanolíticas (MACHIDA et al., 2008, GOMI et al., 2014).

A preocupação com uma produção enzimática eficiente justifica-se pela crescente demanda que este mercado vem apresentando mundialmente. As xilanases juntamente com as celulasas e pectinases representam cerca de 20% deste mercado mundial (GUPTA, et al., 2019). As xilanases são responsáveis por catalizar a hidrólise da xilana na clivagem das ligações β 1-4 para formar xilo-oligossacarídeos e xilose. Essas características permitem sua

potencial aplicação nos setores industriais, a exemplo dos setores de alimentos e bebidas, ração animal, indústria têxtil e indústria farmacêutica (CHAKDAR et al. 2016; GUPTA et al., 2019).

Outro setor de importante crescimento da utilização da xilanase é o de sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos para a obtenção de açúcares fermentáveis na produção de biocombustíveis, pois 25 a 30% da composição do material lignocelulósico é hemicelulose, assim, a ação da xilanase pode elevar a quantidade dos açúcares disponíveis para etapa posterior (HALDAR; PURKAIT, 2019).

Neste sentido, a produção de xilanase fungica sob fermentação em estado sólido é uma opção com ganhos econômicos e ambientais. Levando em consideração a quantidade e a diversidade dos resíduos produzidos no setor agrícola, realizar mistura de substratos é uma alternativa promissora, considerando sempre as características destes como suporte, a disponibilidade de nutrientes, foi realizada uma mistura dos resíduos de cana-de-açúcar, casca de arroz e casca do fruto do cacau, utilizando o delineamento experimental simplex centróide para avaliar a melhor proporção de mistura dos resíduos. Para avaliação da influência de fatores como umidade inicial, temperatura e tempo de fermentação, bem como a melhor condição de cada um desses fatores para a produção máxima da enzima foi aplicado um planejamento Box-Behnker. Para a avaliação das características da xilanase produzida avaliações de estabilidade em diferentes pHs e de termoestabilidade foram realizadas, bem como a avaliação do desempenho da enzima frente a adição de metais. E posteriormente foi realizada a aplicação da enzima em processos de sacarificação dos resíduos lignocelulósicos casca de cacau, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e casca de amendoim.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar, caracterizar e aplicar a enzima xilanase pela ação do fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 por fermentação em estado sólido em mistura dos resíduos agroindustriais, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e casca do fruto do cacau.

2.2 Objetivos Específicos

- Aplicar o Desenho experimental simplex centróide para identificar a condição ótima de mistura dos resíduos para a produção de xilanase pelo *Aspergillus oryzae* ATCC 10124.
- Aplicar planejamento Box-Behnken para otimizar a produção de xilanase em mistura frente aos fatores que influenciam no processo, temperatura, tempo de incubação e umidade inicial.
- Caracterizar bioquimicamente a xilanase produzida quanto ao pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e termoestabilidade e adição de metais.
- Aplicar a xilanase produzida na sacarificação dos resíduos lignocelulósicos casca de cacau, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e casca de amendoim.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fermentação em Estado Sólido

Fermentação em estado sólido (FES) é um processo biotecnológico de baixo custo, que consiste no cultivo de micro-organismos sobre superfícies sólidas, sendo usadas como fonte de nutrientes e com presença de umidade (BÜCKA et al., 2015). Essa técnica se mostra eficaz, pois ocorre na presença de pouca umidade ou atividade de água livre (a_w), o que permite simular o habitat natural dos micro-organismos que são utilizados (RODRÍGUEZ-LEÓN ET al., 2018). A FES compreende fases sólida, líquida e gasosa, oferecendo benefícios para o cultivo microbiano (COSTA et al., 2018).

Devido às especificidades do processo de FES principalmente ao que diz respeito à disponibilidade de água livre, os micro-organismos mais adaptados encontram-se nos grupos das leveduras e dos fungos filamentosos, estes possuem a capacidade de crescer entre os espaços livres e/ou sobre a superfície do substrato, consumindo os nutrientes e excretando metabólitos, dentre eles, as enzimas (COSTA et al., 2018).

Além do micro-organismo a ser utilizado no processo, vários outros aspectos devem ser considerados, pois apresentam grande influência na FES, como o tipo e a granulometria do substrato, geralmente resíduos que ofereçam a possibilidade de crescimento e de produção dos metabólitos de interesse, a temperatura e o tempo de fermentação, além, da disponibilidade de água (ZANG et al., 2017).

Diversas são as vantagens apresentadas pela técnica de FES, as quais permeiam entre o âmbito econômico e ambiental, justamente pelas características que apresenta como a utilização de resíduos agroindustriais e agrofloretais como substrato, emprego de menor quantidade de energia no processo, maior rendimento, menor produção de águas residuais e produtos finais com propriedades funcionais adequadas para aplicações industriais (ALJAMMAS; ALKHALAF, 2018; COSTA et al., 2018; SRIVASTAVA, et al., 2019).

A FES atualmente é empregada na produção de diversos produtos, dentre eles metabólitos secundários biologicamente ativos (LESSA, et al., 2018), biopesticidas (SALA, et al., 2019), biossurfactantes (NALINI; PARTHASARATHI, 2017), biocombustível (INTASIT, et al., 2019), enzimas (BRITO, et al., 2017; SOUZA, et al., 2018; FERRAZ, et al., 2019) entre outros. A produção de enzimas por FES apresenta-se em crescente expansão, principalmente, pelos seus êxitos em relação à obtenção de produtos com estabilidade a temperaturas mais altas e resistência a pHs extremos, atendendo às necessidades industriais (WANG et al., 2008; SADAF; KHARE, 2014; FERRAZ et al., 2017;). Diferentes enzimas podem ser produzidas

ao usar a FES, a exemplo de celulase, endoglucanase, exoglucanase, lacase, amilase, lipase, inulinases, xilanases, entre outras (SANTOS et al., 2016; SILVA, et al., 2017; FERRAZ, et al., 2019; REIS, et al., 2019; SINGH, et al., 2020).

Em especial a produção de xilanases em FES está ganhando bastante destaque. Pesquisas estão sendo realizadas na intenção de identificar o potencial de diferentes substratos combinados com diferentes espécies de micro-organismos, bem como otimizando as condições de fermentação para a obtenção desta enzima em maior quantidade e com características que atendam ao mercado industrial.

3.2 Os resíduos lignocelulósicos

A utilização dos resíduos lignocelulósicos agroindustriais e agroflorestais como substrato fermentativo é vantajosa em termos econômicos, devido a sua abundância e, sobretudo por ser uma alternativa ao descarte destes no ambiente. O Brasil dispõe atualmente de uma grande variedade de culturas agrícolas que por sua vez caracteriza resíduos agrícolas e agroindustriais de diferentes tipos, os quais possuem potencial para reaproveitamento, mas por muitas vezes não são aproveitados nem descartados de maneira correta. A geração destes resíduos vem aumentando em uma velocidade que se distancia da velocidade de degradação, o que contribui para aumentar os problemas ambientais (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). É neste ponto que se observa com bastante clareza uma das vantagens da FES como uma alternativa de reaproveitamento destes resíduos e mitigação dos problemas associados ao descarte destes no meio ambiente. Estes materiais apresentam grande eficiência quando aplicados à técnica de FES, devido a sua constituição (PANDEY, 2003), pois estes são compostos basicamente de celulose, hemicelulose e lignina.

Nos materiais lignocelulósicos, a parcela de celulose e hemicelulose compreendem até dois terços da sua composição (HOUFANI et al., 2020). A celulose é um homopolímero formado por cerca de 5 a 10 mil unidades de monossacarídeos de glicose unidas por ligações $\beta(1-4)$ em repetição formando cadeias longas e bem organizadas entre si, onde se observa ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que criam microfibrilas cristalinas insolúveis em água o que a caracteriza como estável e resistente ao ataque enzimático (TAIZ et al., 2017; CALIARI et al., 2017).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante das plantas, e por sua vez não é homogenia quimicamente, é constituída de cadeias ramificadas e estrutura amorfa que podem conter pentoses (β - d- xilose, α -L- arabinose), hexoses (β - D- manose, β - D - glicose, α - D- galactose) e ácidos urônicos (HOUFANI et al., 2020) dependendo, principalmente, do

seu material de origem, ou seja da planta que se origina. Essas características permitem à hemicelulose apresentar menor resistência a conversão em relação à celulose. As cadeias de hemicelulose interajam com mais de uma fibrila de celulose, de modo a formarem ligações cruzadas não covalentes entre feixes de celulose (DAVISSON et al., 2013; HOUFANI et al., 2020).

A lignina é o terceiro maior componente dos materiais lignocelulósicos, ficando atrás apenas da celulose e hemicelulose. A lignina é um material físico e quimicamente heterogêneo, uma molécula complexa, tridimensional, que apresenta uma rede de anéis aromáticos ligados por ligações alquil-aril-éter (TAIZ, et al., 2017), que se liga à hemicelulose e envolve parcialmente os polissacarídeos e as microfibrilas de celulose na parede celular de plantas o que proporciona suporte mecânico e elástico, facilita o transporte de água e nutrientes pela planta e dificulta a entrada de patógenos microbianos (DAVISON et al., 2013). Dentre os resíduos com grande quantidade de celulose, hemicelulose e lignina, estão o bagaço de cana-de-açúcar, a casca de arroz e a casca do fruto do cacaueiro bastante presente no Brasil e na região sul da Bahia.

3.2.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente à família Poaceae, uma família que se destaca por reunir plantas economicamente importantes a exemplo do milho e do arroz. Encontra-se no grupo de espécies de gramíneas perenes altas do gênero *Saccharum* sp. A espécie mais disseminada no Brasil é a *Saccharum officinarum* que apresenta caules bem desenvolvidos, fibrosos e com articulações bem definidas, sendo altamente rica em sacarose e também conhecida como cana nobre (SOARES, 2015).

A cana-de-açúcar cultivada inicialmente na Ásia e na Índia é a monocultura mais antiga explorada no Brasil sendo introduzida ainda na época colonial, e que ainda hoje ocupa lugar de destaque no Brasil e no mundo (SOARES, 2015). Estima-se que a área total de plantação a ser colhida em 2020 seja 8.481,2 mil hectares, o que equivale a uma produtividade de 75.783 kg/ha na safra de 2019/20, contabilizando 642,7 milhões de toneladas de cana produzida (CONAB, 2020) que serão destinadas à produção principal de açúcar e etanol. Este local de destaque também se repete quando o assunto é a geração de resíduos, sendo a cultura que mais produz resíduo no país. Os mais expressivos representantes são a palha, que geralmente é utilizada na alimentação animal, o bagaço que é o que resta depois do esmagamento da cana para retirada do líquido de onde se obtém os produtos de interesse açúcar e etanol (TORQUATO; RAMOS, 2013). A figura 1 mostra o resíduo do

bagaço de cana (figura 1 A) e sua forma depois de triturado (figura 1 B) para reaproveitamento.

Figura 1: (A) Bagaço de Cana-de-açúcar. (B) Bagaço de cana-de-açúcar triturado em forma de pó



Fonte: Nunes, 2019

A grande quantidade de bagaço de cana produzida que representa 25 a 30 % de cada tonelada de cana (TORQUATO; RAMOS, 2013) fez as pesquisas e o mercado voltarem se às possibilidades de utilização deste material que se caracteriza lignocelulósico para fins diversos. É possível relatar a utilização satisfatória deste material na geração de bioenergia principalmente para o próprio setor, garantido não apenas a autossuficiência do setor sucroenergético, como também um aumento nas receitas com a comercialização da energia excedente da queima desta biomassa (TROMBETA; FILHO, 2017).

Além do bom desempenho como gerador de energia, o bagaço, também, pode ser utilizado como aditivos na alimentação animal (LUNCIN et al., 2018) na produção de etanol de segunda geração, também chamado etanol celulósico, que por meio de algum processo de hidrólise atua diretamente nas fibras deste material ricamente lignocelulósico, o que possibilita a produção de até 50% a mais de etanol a partir do caldo hidrolisado (LORENZI; ANDRADE, 2019).

Muitas pesquisas sobre formas de utilização deste resíduo ainda são realizadas, podemos citar aqui a utilização deste na produção de biogás, endo como inóculo lodo ativado (VATS et al., 2019), na fermentação submersa na produção de lipídios por *Schizochytrium* sp. (NGUYEN et al., 2018), ou na co-produção de etanol e xilitol por *Candida tropicalis* (RAJ;

KRISHNAN, 2020) e utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* (UNREAN; KETSUB, 2018).

Outro potencial do bagaço de cana de açúcar é a utilização deste na FES, atualmente encontramos diversas pesquisas neste campo, Khonngam e Salakkam (2019) utilizaram o *Aspergillus niger* TKI na FES como um pré-tratamento do resíduo de bagaço de cana-de-açúcar, e posterior utilização do caldo produzido para fermentação e produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339. A FES também foi utilizada para a obtenção de enzimas com interesse industrial a partir deste resíduo. Salomão e colaboradores (2018) utilizaram o bagaço de cana com e sem pré-tratamento na produção de celulasas por fungos dos gêneros *Penicillium*, *Rhizomucor* e *Thricoderma*. Souza et al., (2018) relatam a utilização do bagaço na obtenção de xilanases de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 com características termoestáveis superiores à xilanases comerciais.

3.2.2 Casca de arroz

O arroz é uma planta herbácea botanicamente localizada na ordem *Poales*, pertencente à família *Poaceae*, mais especificamente representante do genro *Oryza*. O arroz (*Oryza sativa* L.) destaca se mundialmente por ser um dos cereais de maior consumo, conseqüentemente de maior produção, e uma importante fonte de nutrição para uma parcela bastante significativa da população mundial (SOUZA, 2019)

O arroz destaca se no Brasil, principalmente, pela sua ascensão em níveis econômicos. Segundo a CONAB (2020) há uma expectativa de produção projetada de 10,57 milhões de toneladas de grãos de arroz, o que movimenta bastante a economia, mas que por conseqüência aumenta, também, a quantidade de resíduos produzidos provenientes, principalmente, do beneficiamento deste grão para a comercialização.

O mercado nacional de arroz dedica se a produção, beneficiamento e comercialização de arroz branco polido, integral e parboilizado (SAIDELLES et al.,2012). O processo de beneficiamento gera uma variedade de resíduos ou subprodutos que podem ou não apresentar valor comercial, dentre os resíduos gerados o que apresenta maior destaque é a casca do arroz (Figura 2), principalmente por ser representativa em termos de quantidade de produção e por não ter uma boa degradabilidade quando lançada ao meio ambiente (LORENZETT et al., 2012).

A casca de arroz é um resíduo sólido constituído basicamente de proteínas, lignina; fibras, composto de nitrogênio; lipídeos; carboidratos e sílica (SAIDELLES et al.,2012). Essas características composicionais favorecem sua aplicação em alguns setores e diversas

pesquisas dedicam-se a explorar esse aspecto, a exemplo de Rattanachu et al. (2020) que relatam a adição deste material em forma de cinza como substituinte parcialmente o cimento, atuando como aglutinante para concreto moldado. É também relatada a utilização deste resíduo na produção de carvões ativos (ZANG et al., 2020; HUONG et al., 2020), na composição de compostos poliméricos (MOHAMED, et al., 2019; MARQUES et al., 2020), dentre outras utilidades.

Figura 2: Resíduo de casca de arroz



Fonte: Autora

Uma utilização que este resíduo vem ganhando destaque é como substrato na FES com diversos fins, a exemplo de Sala et al (2019) que utilizou a casca de arroz como suporte para a produção de biopesticida fungico por *Beauveria bassiana* ou *Trichoderma harzianum*. Postemsky et al (2019) agregaram valor à casca de arroz pela ação de *Pleurotus sapidus* na produção de enzimas lignolíticas. Perdani et al (2019) também utilizaram a casca de arroz para a produção de lacase por fermentação em estado sólido por *Trametes versicolore* posterior aplicação em biossensor de adrenalina. Trabalhos na produção de enzimas celulósicas e hemicelulósicas em FES também são encontrados, Brito et al (2017) produziram endogucanase pela ação do *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 e Marques et al (2018) que produziram xilanase e endoglucanase pela ação do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110.

3.2.3 Casca do cacau (pericarpo)

O cacaueiro é uma planta de característica arbórea pertencente à classe Magnoliopsida, ordem Malvales, família Malvaceae, representante do gênero *Theobroma*, gênero que

acondiciona mais 22 espécies dentre elas o cupuaçu, e é cientificamente conhecido como *Theobroma cacao* L. Este se destaca mundialmente pela importância das suas sementes que são a matéria prima do chocolate e da manteiga do cacau (FERREIRA, 2017; SOUZA et al., 2018).

Segundo dados do IBGE até o momento a produção de cacau na safra de 2020 foi de 281 mil toneladas, demonstrando aumento representativo em relação à safra anterior, com aumento da área plantada e da produtividade por área (Tabela 1), sendo a Bahia responsável pela produção de 122 mil toneladas deste total, porém com um total de área plantada igual ao da safra anterior (Tabela 1).

Tabela 1: Área plantada, área colhida e produção das safras de 2019 e 2020 de cacau no Brasil e na Bahia.

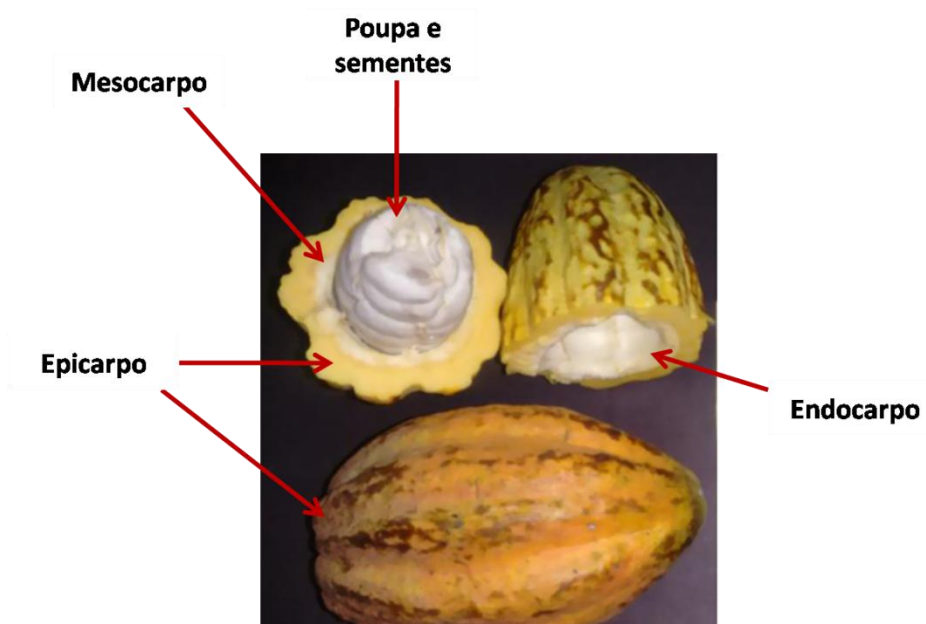
Área plantada (hectares)		
Local	Safra 2019	Safra 2020
Brasil	620.573	627.119
Bahia	450.045	450.045
Área colhida (hectares)		
Brasil	590.005	601.616
Bahia	420.045	425.045
Produção (toneladas)		
Brasil	252.540	281.240
Bahia	105.018	122.018

Fonte: IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola

O fruto do cacau é capsular e apresenta um pericarpo (casca) relativamente carnoso, composto por três partes distintas: o epicarpo, o mesocarpo e o endocarpo (Figura 3). O epicarpo é geralmente carnudo e espesso, sendo que a epiderme apresenta potencial de pigmentação entre o verde e o roxo quando imaturos ou amarelos e alaranjados quando atinge a maturidade, principalmente nas variedades encontradas no Brasil; o mesocarpo é fino e

resistente atuando como barreira às sementes em caso de choque físico e o endocarpo é carnudo, porém com pouca espessura e está em contato direto com as sementes, as quais possuem pigmentação forte e revestimento carnudo (poupa) (SOUZA et al, 2018).

Figura 3: Cacau (*Theobroma cacao* L.), com destaque para as composições da casca



(pericarpo).

Fonte: adaptado de Souza et al., 2018

A semente do cacau ou amêndoa do cacau como também é conhecida é a parte mais utilizada do cacau, ou seja, a mais importante em termos econômicos. Durante a colheita dos frutos, essas sementes e a poupa que as envolve são expostas através de uma abertura realizada na casca do fruto, esta é separada das cascas e acondicionadas em montantes para a etapa de fermentação e as cascas são deixadas no solo da área de cultivo (VÁSQUEZ et al. 2019). Este resíduo deixado nos campos de produção representa cerca de dois terços de todo o fruto do cacau, em outros termos cerca de 70% em peso seco. Esse descarte pode favorecer o desenvolvimento de diversos microorganismos dentre eles alguns com características patogênicas que podem causar doenças à lavoura e trazer danos a safra posterior (NAIR, 2010; VÁSQUEZ et al. 2019).

O aproveitamento deste subproduto tem sido bastante estudado em diversos setores, por exemplo, Sodré et al (2012) estudaram a potencialidade deste como fertilizante para a própria lavoura do cacau, através do estudo do composto orgânico extraído das cascas. Outra

área de aplicação bastante explorada deste resíduo é na ração animal ou como suplemento alimentar, embora este composto apresente theobromina, uma substância que é inadequada ao consumo animal, tratamentos podem ser realizados para possibilitar essa utilização e aproveitar o benefício da grande disponibilidade de fibras que este apresenta (ALEXANDER et al., 2008; ODDOYE, et al., 2010; LACONI; JAYANEGARA, 2015).

Relatos sobre a utilização deste resíduo como fonte de energia renovável também pode ser encontrado (SYAMSIRO et al. 2012), assim como, deste como catalisador sólido verde para a transesterificação do óleo de soja em biodiesel Ofori-Boatenge e Lee (2013) e deste como suporte enzimático na imobilização de lipase (KHANAHMADI et al., 2015). Santana et al. 2018 relatam a utilização do resíduo para a produção de xilitol a partir da fermentação por *Candida boidinii* XM02G. Atualmente, também se encontra trabalhos voltados a valorização dos compostos existentes na composição deste resíduo, como na extração de compostos fenólicos relatada por Valadez-Carmona et al., (2018), além de modelos de encapsulamento para a valorização de compostos bioativos por Belščak-Cvitanović et al. (2018).

3.3 O micro-organismo *Aspergillus oryzae*

O micro-organismo é parte fundamental para que todo o processo de FES seja eficiente, os mais adaptados encontram-se, principalmente, no grupo dos fungos filamentosos e algumas leveduras, pela capacidade que apresenta de desenvolvimento nos substratos, consumindo os nutrientes e excretando metabólitos (COSTA et al., 2018), pois os substratos e as condições aproximam-se dos ambientes naturais de desenvolvimento destes micro-organismos (PIROTA et al., 2016; ALJAMMAS; ALKHALAF, 2018). Segundo Gomes et al., (2018), o bom desenvolvimento destes fungos nos substratos está diretamente relacionado à morfologia filamentosa que apresenta e o crescimento direcionado por hifas, as quais apresentam características penetrativas e aéreas formando o micélio, que são responsáveis pela colonização superficial e a penetração no material sólido.

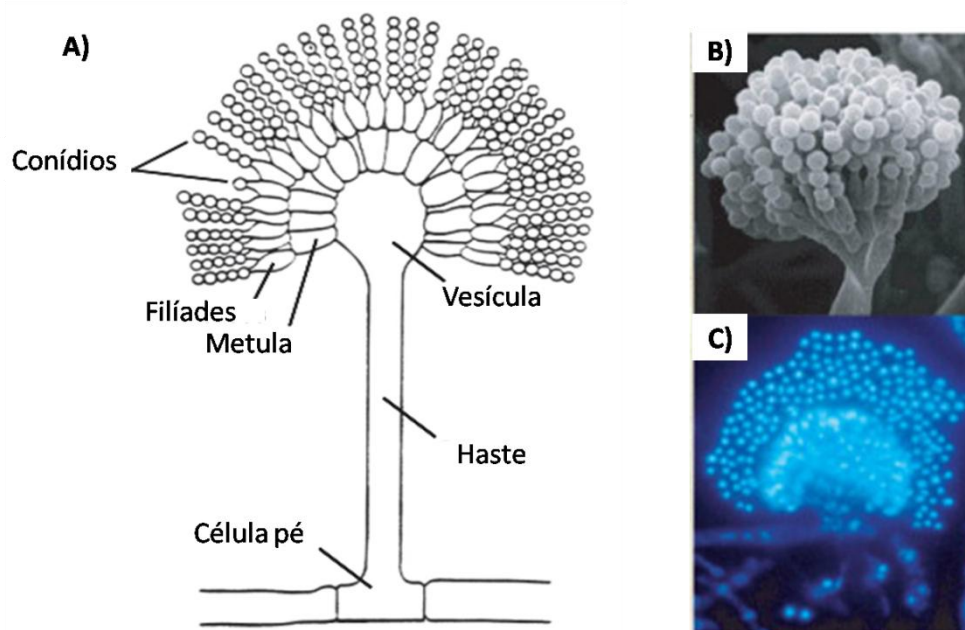
Diversos gêneros fúngicos são relatados com bom desempenho nos processos de FES, destacando-se *Penicillium*, *Trichoderma*, *Rizopium*, *Aspergillus* entre outros (SANTOS et al., 2016; Brito et al, 2017; FERRAZ, et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019; REIS et al., 2019). O gênero *Aspergillus* é relatado como sendo importante para aplicações biotecnológicas, principalmente pelo uso dos seus representantes *A. niger* e *A. oryzae* (Santos, et al., 2016; Reis, et al., 2019).

Aspergillus é um gênero de fungos ascomicetos que incluem mais de 200 espécies, muitas com importância direta na saúde pública por serem produtores de toxinas

contaminantes alimentares, mas também por ser modelo de estudos de diversos processos celulares assim como, por apresentar aplicações potenciais em processos biotecnológicos tradicionais e modernos, principalmente a FES (SCAZZOCCHIO, 2019).

O marcador taxonômico deste gênero é a morfologia do conidióforo (Figura 4A), o qual estrutura-se em uma célula basal, chamada de célula pé, de onde parte uma haste que segue longa que termina uma vesícula, geralmente globular de onde irradiam as filíades, células especializadas que possuem os esporos assexuais, os conídios, constituindo uma cabeça aspergilar unisseriada. Quando entre a vesícula e as filíades observa-se a presença de outra camada de células especializadas, as metulas, a cabeça aspergilar passa a ser bisseriada (SCAZZOCCHIO, 2019; CHANG, HORN e GOMI, 2014). As figuras 4B e 4C, são representações reais de microscopia e micrografia de representantes do gênero *Aspergillus*.

Figura 4: A) Representação morfológica do gênero *Aspergillus*. B) Micrografia Eletrônica de Varredura do conidióforo de *Aspergillus nidulans*. C) Micrografia de Epifluorescência de *Aspergillus nidulans*.



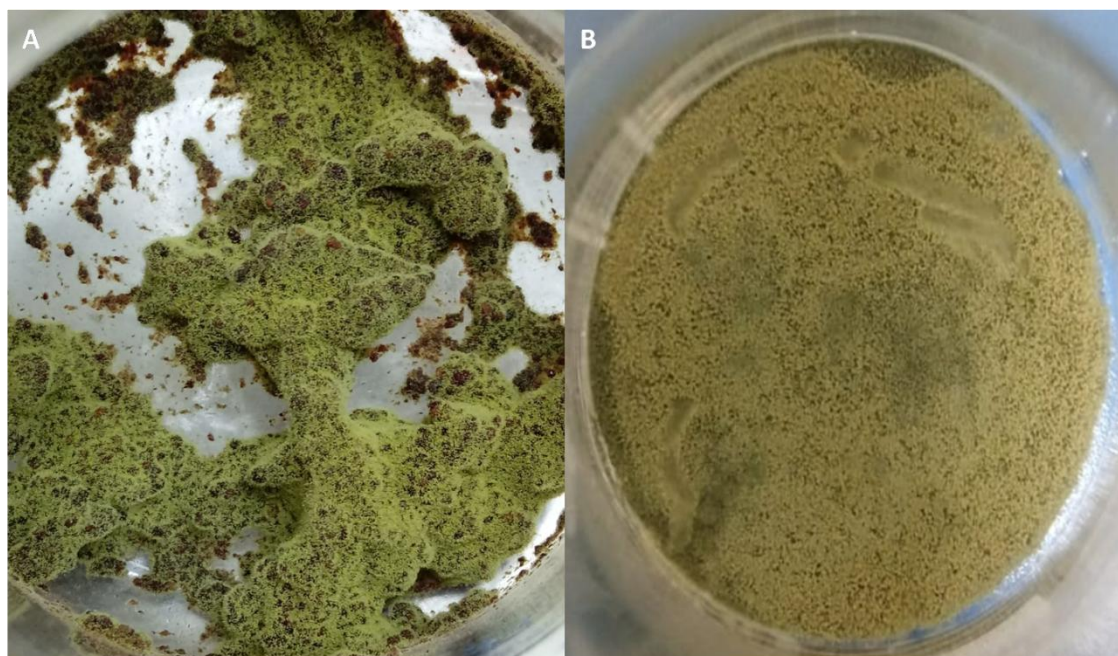
Fonte: A) Chang, Horn e Gomi, (2014). B) e C) Kues, U., Fischer., R. (Eds.), 2006 *apud* Scazzocchio, 2019.

O *Aspergillus oryzae* é um fungo filamentosso aeróbico que foi isolado primeiramente de solos e de plantas, principalmente do arroz (*Oryza sativa*) de onde adquire seu nome (GOMI, 2014), sendo amplamente usado em indústrias tradicionais japonesas e com destaque para a aplicação na biotecnologia moderna pelo grande potencial de secretar grandes

quantidades de diversidade de enzimas (MACHIDA et al., 2005; MACHIDA et al., 2008; GOMI et al., 2014).

O *A. oryzae* pode desenvolver-se em uma diversa faixa de temperatura apresentando desenvolvimento ótimo na faixa de 32 a 36 °C, podendo crescer até aos 44 °C. Estes crescem vegetativamente, com suas hifas estendendo-se nas pontas apicais que se multiplicam por ramificação, cuja colônia acaba cobrindo toda a superfície em que se encontra, apresentando coloração verde amarelado quando madura (Figura 5) (GOMI, 2014).

Figura 5: (A) Crescimento e coloração de *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 em resíduo de cacau. (B) Colônia de *Aspergillus oryzae* ATCC10124 em Agar-batata-dextrose.



Fonte: (A) e (B) Autora.

Devido às características potenciais que apresenta o *A. oryzae*, este vem sendo bastante explorado nos processos de fermentação em estado sólido para diversos fins, a exemplo da produção de compostos bioativos com atividade antioxidantes (HANDA et al., 2019; SHIN et al., 2019) e na produção de enzimas a exemplo de Brito et al (2017) que utilizaram *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 na fermentação em estado sólido dos resíduos de casca de arroz e casca de amendoim para a produção de endogucanase. Reis et al (2019) produziram endoglucanase em casca de amêndoa do cacau utilizando *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. Melnichuk et al (2020) utilizaram a mistura dos resíduos casca de soja e farelo de trigo na produção de α -amilase por *Aspergillus oryzae* NRRL 695. Oliveira et al. (2018) utilizaram três fungos do gênero *Aspergillus*, sendo um deles o *Aspergillus oryzae* para

produzir lipase e xilanase em uma mistura de bolo de palmiste e a fibra de dendê prensada, ambos resíduos da produção de óleo de dendê.

3.4 Características gerais da xilanase

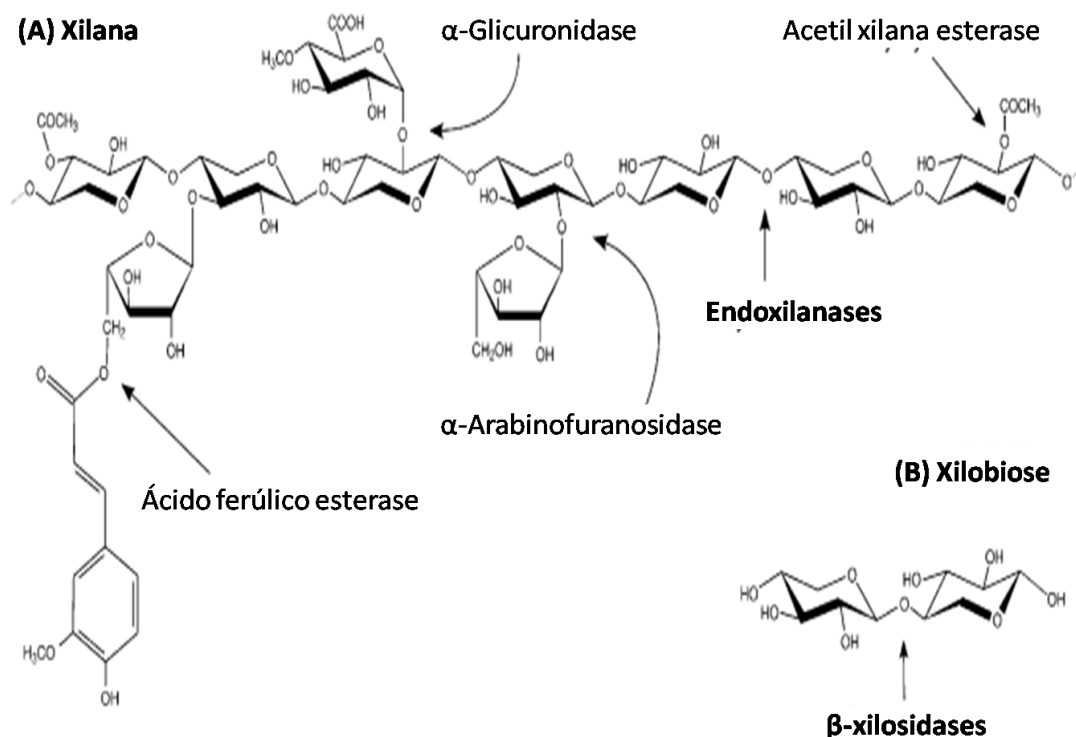
A fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos é constituída majoritariamente por um heteropolissacarídeo de grande complexidade e altamente ramificada, a xilana. Dentro da parede celular da planta ou material lignocelulósico a xilana encontra-se entre a fração da celulose e da lignina interagindo com as fibrilas de celulose, formando ligações cruzadas não covalentes entre feixes de celulose, ajudando efetivamente na integridade da planta (COLLINS et al., 2005; DAVISSON et al., 2013; HOUFANI et al., 2020).

Em termos estruturais, a xilana é composta por uma espinha dorsal D-xilopiranosil unidos por ligações β 1-4 com configuração equatorial e com grupos como arabinose, acetil, ácidos glucurônicos, ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico como ramificações. A organização complexa destes substituintes influencia diretamente nas características físico-químicas da xilana como solubilidade e viscosidade (MOREIRA; FILHO, 2016; GUPTA et al., 2019) influenciando também na degradabilidade pelas enzimas (MOREIRA; FILHO, 2016).

As xilanases por sua vez são enzimas hidrolíticas que realizam a despolimerização da xilana, clivando as ligações β 1-4 do seu esqueleto, possuem distribuição ampla em vários organismos, incluindo fungos filamentosos e bactérias (IRFAN, et al., 2014; GUPTA et al., 2019). É necessário para que a hidrólise completa da xilana ocorra que exista uma ação combinada de várias enzimas, isso devido à sua complexidade estrutural. As endo-1,4- β -xilanase (1,4- β -D-xilanaxilohidrolase, EC 3.2.1.8) atuam diretamente clivando as ligações glicosídicas internas da cadeia principal, diminuindo sua polimerização e formando oligômeros de β -D-xilopiranosil. Esta clivagem acontece de forma pontual, porém a identificação do ataque enzimático ocorrerá a depender das características da xilana em questão como tamanho da cadeia, grau de ramificação, que pode influenciar por vezes a formação de mono, di e trissacarídeos de β -D-xilopiranosil. As β -xilosidases (β -D-xilosídeoxilohidrolase, EC 3.2.1.37) atuam na clivagem das ligações terminais de pequenos xilo-oligossacarídeos e xilobiose liberando β -D-xilopiranosil (GIRIO, et al., 2010; MOREIRA; FILHO, 2016).

Enzimas acessórias também atuam neste processo, estas são necessárias para a clivagem das ramificações da cadeia principal, são elas acetil xilanaesterase (EC 3.1.1.16), α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), α -glicuronidase (EC 3.2.1.131), ácido *p*-cumáricoesterase e ácido ferúlicoesterase (Figura 6).

Figura 6: (A) Representação da estrutura da xilana e os locais de atuação das enzimas envolvidas na hidrólise. (B) estrutura da xilobiose e o local de ataque das β -xilosidases.



Fonte: Adaptado de Pastor et al., 2007.

As enzimas xilanolíticas apresentam variações nas formas, nos mecanismos de atividades, nas atividades hidrolíticas e nas características físico-químicas, justificadas por suas diferentes fontes de origem que as levam a serem classificadas em diferentes grupos de hidrolases glicosídicas (GH) dentro das famílias (5, 7, 8, 10, 11, 26, 30 e 43), sendo as mais estudadas as pertencentes ao GH10 e GH11 (POOSARLA; CHANDRA 2014). As xilanases da família GH10 são as menos específicas na clivagem da estrutura principal da xilana, ou seja, são as enzimas acessórias que atuam desramificando os grupos laterais. Já as xilanases da família GH11 são as que atuam diretamente na cadeia da xilana (IMJONGJAIRAK et al., 2015). As xilanases de GH10 apresentam ainda como características alto peso molecular e baixo ponto isoelétrico o que difere do baixo peso molecular e alto ponto isoelétrico observado na xilanases de GH11 (PASTOR et al., 2007).

As xilanases podem ser provenientes de diferentes fontes como, bactérias, leveduras, insetos, plantas e fungos. A fonte de produção fúngica é bastante utilizada devido às características que apresentam como ampla disponibilidade e produção enzimática, enzimas com grande estabilidade em altas temperaturas quando provenientes principalmente por

fungos termófilos e de atuação em uma faixa ampla de pHs, geralmente entre 3 e 10 (MOREIRA; FILHO, 2016; GUPTA, et al. 2019). Gêneros como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* e *Fusarium* são listados como bons produtores de xilanase (GUPTA et al, 2019).

O interesse comercial em enzimas xilanolíticas justifica se pela amplitude de utilidades que apresenta no setor industrial. Destaca se seu grande potencial na indústria de alimentos e bebidas em processos como, panificação, clarificação de sucos, fabricação de vinhos e óleos e amido de plantas. São também usadas na ração animal, onde os arabinoxilanos presentes nos ingredientes da ração são decompostos, além, da indústria farmacêutica na produção de xilooligosacarídeos com efeitos prebióticos e são também usadas no tratamento da indigestão. As xilanases também são utilizadas nas indústrias têxteis, na fabricação de fibras vegetais e no branqueamento da celulose. Como também, atuam no tratamento de resíduos pelo processo de biorremediação e na conversão de materiais lignocelulósicos em combustíveis (HARRIS; RAMALINGAM, 2010; DEUTSCHMANN; DEKKER, 2012; CHAKDAR et al. 2016; GUPTA et al., 2019).

3.5 Xilanase e suas aplicações na sacarificação

Como alternativa ao problema da limitação dos combustíveis fósseis, associada a preocupações do setor ambiental e econômico, fontes de energia renovável estão sendo cada vez mais procuradas e os biocombustíveis a exemplo do bioetanol ou etanol de segunda geração oferecem uma opção ecológica, pois pode ser um destino para os resíduos lignocelulósicos e de baixo custo por requerer um menor ciclo de produção (ZHENG; REHMANN, 2014; RASGOTI; SHRIVASTAVA, 2017).

Para a produção do bioetanol, a biomassa lignocelulósica deve ser convertida em açúcares fermentáveis, diversas tecnologias podem ser utilizadas neste processo, dentre elas a hidrólise enzimática ou sacarificação enzimática, que destacam se devido ao seu rendimento, a não produção de componentes tóxicos e inibitórios, e a redução de custos com processos detoxificantes (HALDAR; PURKAIT, 2019).

Para um processo eficiente de sacarificação enzimática é necessário a atuação de celulasas, hemicelulasas, ligninases e outras enzimas acessórias (FERRAZ et al, 2017). Muitos são os trabalhos que falam da atuação das celulasas neste processo, porém, segundo Haldar e Purkait (2019) a atividade das hemicelulasas também se configura de extrema importância, pois a hemicelulose é responsável por 25 a 30% da composição da biomassa lignocelulósica, tendo como principal componente a xilana, que são despolimerizadas pela ação das xilanases e assim produzindo xilose em condições favoráveis para reação.

Vários fatores influenciam a sacarificação, sendo a cristalinidade da celulose e a recalcitrância ocasionada, principalmente, pelo complexo xilana-lignina os mais exemplificados (CHAPLA et al, 2012; ZHANG et al., 2016; HALDAR; PURKAIT, 2019). Devido a estas características, etapas de pré-tratamento são frequentemente utilizadas, para reduzir essa recalcitrância promovida pela lignina e abrir espaço para uma sacarificação eficiente (LIU et al., 2020). Vários são os tipos de pré-tratamentos aplicados, que podem estar inclusos em métodos físicos, químicos e biológicos, os quais serão escolhidos de acordo com o material que se está utilizando. Porém, os altos custos a eles relacionados acabam levantando questões a cerca das vantagens de utilização deste método (GUO et al., 2018).

A aplicação de xilanases na sacarificação de resíduos lignocelulósicos ocorre geralmente em coquetéis enzimáticos, juntamente com as outras enzimas necessárias, porém a utilização destes eleva o custo o que influencia diretamente na viabilidade do processo, o que abre espaço para a utilização de enzimas produzidas por micro-organismos (THOMAS et al., 2016). Estudos relatam que as xilanases fúngicas provenientes de fermentação em estado sólido têm gerado bons resultados quando aplicadas a processos de sacarificação, Thomas et al. (2016) utilizaram xilanase de *Aspergillus* sp. produzida na fermentação de farelo de trigo e extrato de levedura na sacarificação da palha de arroz pré-tratada com NaOH e obteve um máximo de 574,8 mg / g de açúcares redutores. Ferraz et al. (2017) relatam a utilização de xilanase juntamente com celulasas produzidas por *Penicilium roqueforti* ATCC 10110 utilizando resíduo de *Spondias mombin* na sacarificação do bagaço de cana de açúcar, casca de amendoim, casca de arroz e casca de milho com resultados positivos tendo um destaque para o bagaço de cana de açúcar até 662.34 mg g⁻¹ de açúcares liberados quando adicionado Mn²⁺. Estes e outros exemplos comprovam a eficácia do uso de xilanases no processo apontando alternativa viável e econômica.

3.6 Ferramentas estatísticas na otimização da produção de enzimas

A fim de obter rendimentos maiores na produção enzimática pelo uso da técnica FES, a otimização dos fatores que influenciam diretamente como pH, temperatura, quantidade de inóculo, tipos de micro-organismos e composição de substrato pode ser realizada de maneira univariada (LUNDSTEDT et al., 1998) ou multivariada, sendo a última relatada com maior eficiência por levar em consideração o sinergismo existente entre cada um dos fatores estudados (BRITO et al, 2017).

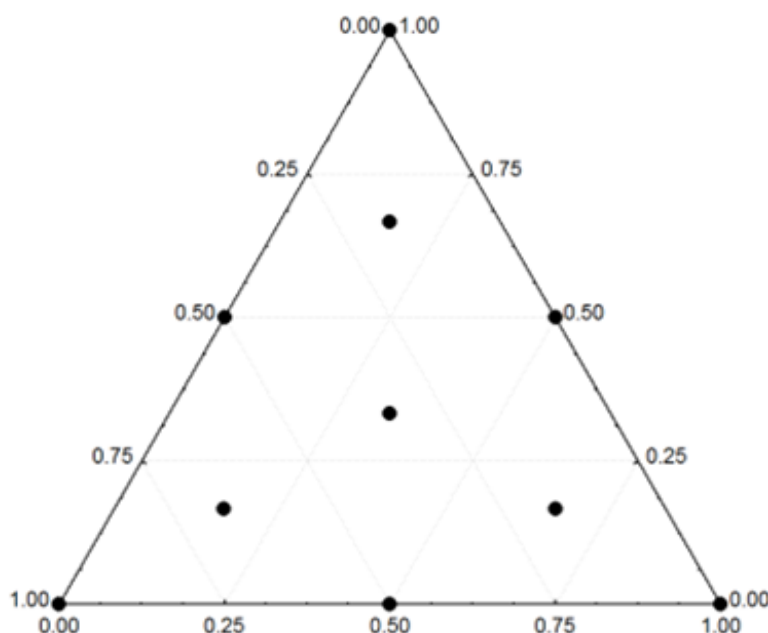
A abordagem multivariada oferece vantagens que justificam sua recorrente aplicação nos processos de FES, como por exemplo, o menor esforço do pesquisador e a consequente

redução dos gastos por requerer uma menor quantidade de experimentos, possibilita também o estudo das interações entre as variáveis estudadas, e permite encontrar as melhores condições para o desenvolvimento do trabalho (BEZERRA, et al. 2019). Estas variáveis são estudadas a partir de um projeto experimental integrado com uma Metodologia de Superfície de Resposta pode ser empregada na construção do modelo matemático e estatístico sobre as melhores condições para a realização de um experimento (SAHIN et al., 2016; BEZERRA et al., 2019), e as variáveis podem ser classificadas em variáveis de processo e variáveis de mistura. Para os estudos das variáveis de mistura é utilizado o desenho de mistura, um tipo de Metodologia de Superfície de Resposta especial, pois é estudado os componentes da mistura e as respostas obtidas são diretamente influenciadas pelas proporções destes componentes (SAHIN et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2019).

Dentre os tipos de desenho de misturas mais aplicados, o Desenho Centróide-Simplex é caracterizado por buscar os efeitos dos diferentes componentes, recorrendo a um número reduzido de experimentos, mas refletido ao espaço experimental (BAHRAMPARVAR et al., 2015). O Desenho Centróide-Simplex aplica-se quando seus componentes possuem o mesmo intervalo, o que neste caso deve estar entre 0 e 1, ou seja a soma da proporção total destes componentes deve resultar 1 (=100%) (ROSALES et al., 2015; SAHIN et al., 2016). O espaço experimental é constituído por diferentes pontos dispostos em um triângulo equilátero (Figura 7), com a inclusão de um ponto central onde as quantidades proporcionais de todos os componentes da mistura são iguais (SAHIN et al., 2016).

O delineamento de mistura estatístico quando aplicado permite o favorecimento dos estudos dos componentes e de como a interação entre eles afeta as respostas obtidas (CASTRO; SATO, 2013; BEZERRA, et al., 2019). Os modelos de mistura possuem uma função polinomial, a qual é representada por equações lineares, quadráticas e no desenho experimental centróide-simplex foi proposta uma função polinomial, denominada modelo cúbico especial, formulada para conter apenas termos que representassem pontos experimentais relacionados à presença de componentes em proporções iguais dentro do espaço experimental delimitado (SCHEFFÉ, 1963; BEZERRA et al. 2019).

Figura 7: Desenho Experimental Centróide Simplex para estudo de três componentes



Fonte: NOVAES et al., 2018

Muitos estudos de FES utilizaram Desenho Centróide-Simplex para avaliar as formulações dos diferentes substratos agroindustriais na produção de enzimas. Castro, et al. (2013) utilizaram Desenho Centróide-Simplex para avaliar os efeitos sinérgicos das proporções diferentes dos resíduos, farelo de trigo, farelo de soja e farelo de algodão na produção de protease e α -amilase por *Aspergillus oryzae*. Dias et al. (2015) utilizaram o Desenho Centróide-Simplex na produção de L-asparaginase de *Aspergillus niger* variando as proporções dos resíduos farelo de trigo, farelo de soja, farelo de algodão e casca de laranja. Já Ohara et al. (2018) utilizaram o Desing Centróide-Simplex produzir simultaneamente lipase, CMCase, α -amilase e β -glucosidase por *Aspergillus niger*, variando as concentrações de farelo de soja, farelo de trigo, sabugo de milho, casca de arroz e bolo de óleo de gengibre. Mandariet al. (2019) otimizaram as concentrações de *Prosopis juliflora*, cascas de gramíneas vermelhas e torta de semente de algodão para a produção de lipase por *Aspergillus niger* MTCC 872. De Oliveira et al. (2019) investigaram os efeitos de diferentes proporções de substratos, farelo de soja, farelo de trigo e farelo de aveia, na produção de β -frutofuranosidase por *Aspergillus tamarii* URM 4634. Filipe et al. (2019) utilizaram o Desing Centróide-Simplex para avaliar os efeitos sinérgicos do bagaço de azeitona bruto em combinações com o bagaço de azeitona já esgotado, brotos de videira e bagaço de uva também esgotado na

produção de xilanase, celulase e β -glicosidase por *Aspergillus niger* e *Aspergillus ibericus* e Papadaki et al (2020) otimizaram a produção simultânea de carboximetilcelulase, poligalacturonase, amilase, xilanase e protease ácida por *A. niger* B60.

Outros planejamentos experimentais também são frequentemente utilizados para estudo das variáveis que influenciam o processo fermentativo, variáveis como temperatura de fermentação, tempo de incubação e pH. O planejamento Box-Behnken é um tipo de planejamento que aparece com frequência nos estudos de variáveis de processo, Santos et al. (2016) utilizaram o planejamento Box-Behnken para estudar os efeitos da atividade de água, do tempo de fermentação e da temperatura sobre a produção enzimática dos fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp.* em palma forrageira. Brito et al. (2017) aplicaram o planejamento Box-Behnken na produção de endoglucanase por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 na fermentação de casca de arroz e casca de amendoim, para estudo das variáveis temperatura, tempo de fermentação e umidade inicial, o modelo gerado pelo planejamento apontou condições ótimas para a casca de arroz que permitiu obter uma atividade experimental de 17,2 U/g e nas condições ótimas da casca de amendoim foi possível obter 42,9 U/g de atividade. Ferraz et al. (2019) otimizaram a produção de xilanase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação de resíduos de cajá, estudando as variáveis Tempo de fermentação, temperatura e umidade inicial, alcançando um valor de atividade enzimática experimental de 14.03 U/g nas condições que o modelo sugerido pelo planejamento indicou. Oliveira et al. (2019) estudaram a influência das variáveis atividade de água, tempo de incubação e temperatura de fermentação, na produção de endoglucanase pela ação do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em farelo de cacau.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de xilanase tem sido estudada cientificamente devido a vasta aplicabilidade industrial que apresenta. Sua aplicação em processos de sacarificação vem sendo explorada por possibilitar uma produção maior de açúcares fermentáveis, pois atua diretamente na hemicelulose e quando combinada com celulasas permite um aproveitamento maior do resíduo utilizado. A produção de xilanase fugiu por fermentação vem ganhando destaque, principalmente devido aos benefícios que a técnica apresenta a exemplo de maior produtividade e possibilidade de produções de enzimas com estabilidade a temperaturas extremas.

O substrato utilizado para a produção de xilanase por fermentação em estado sólido necessita servir de suporte e proporcionar nutrição para o micro-organismo. O bagaço de cana é o resíduo mais produzido pelo processamento da cana-de-açúcar, assim como a casca de arroz e a casca do fruto do cacau que por sua vez chega a representar 80% do fruto. Estes resíduos apresentam características que favorecem a produção de xilanase que é a presença de hemicelulose, onde se encontra a xilana, seu substrato de atuação, além disso, a mistura de resíduos potencializa a resposta na produção da enzima, pela maior disponibilidade de substrato de diferentes fontes para a atuação dos fungos.

A escolha do micro-organismo também é parte importante do processo de FES, pois este deve ter a capacidade de excretar a enzima e desenvolver-se no substrato. O gênero *Aspergillus* possui bons representantes que comprovadamente desempenham um bom papel na produção de enzimas, em especial a xilanase e o *Aspergillus oryzae* tem sido um fungo bem estudado e que apresenta bons resultados neste processo. Com a intenção de melhorar a produtividade da enzima xilanase recursos estatísticos podem ser aplicados aos processos de fermentação. E para conhecer as características físico-químicas da enzima produzida o processo de caracterização pode ser aplicado o que ajudará a definir em quais processos industriais esta pode ser aplicada.

Portanto, a utilização do fungo *Aspergillus oryzae* em FES, em bagaço de cana, casca do fruto do cacau e casca de arroz é um processo alternativo e vantajoso principalmente pela ampla disponibilidade dos resíduos. Além disso, a caracterização bioquímica e a aplicação da xilanase produzida pelo fungo usando a FES em processos de sacarificação de resíduos lignocelulósicos pode apresentar mais uma forma econômica e sustentável de obtenção de biocatalizadores.

4 REFERÊNCIAS

- AHMED, A., ASLAM, M., ASHRAF, M., UL-HASSAN, N. F., BATOOL, K., BIBI, A. Microbial β -Glucosidases: Screening, Characterization, Cloning and Applications. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, v. 5, p. 57-73. 2017. doi.org/10.12691/jaem-5-2-2
- ALEXANDER, J., BENFORD, D., COCKBURN, A., CRAVEDI, J.-P., DOGLIOTTI, E., DI DOMENICO, A., LUISA FÉRNANDEZ-CRUZ, M., FÜRST, P., FINK-GREMMELS, J., LODOVICOGALLI, C., GRANDJEAN, P., GZYL, J., HEINEMEYER, G., JOHANSSON, N., MUTTI, A., SCHLATTER, J., VANLEEUEWEN, R., VANPETEGHEM, C., VERGER, P. Theobromine as undesirable substance sin animal feed-Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **EFSA Journal**, v. 725, p. 1-66. 2008. doi:10.2903/j.efsa.2008.725
- ALJAMMAS, H. A., ALKHALAF, H.A.F.W. Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using soli-state fermentation. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 213-216. 2017. doi:10.1016/j.jgeb.2017.10.004.
- BAHRAMPARVAR, M., TEHRANI, M. M., RAZAVI, S. M., KOOCHKEI, A. Application of simplex-centroid mixture design to optimize stabilizer combinations for ice cream manufacture. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p.1480-1488, 2015. doi.org/10.1007/s13197-013-1133-5
- BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A., VOJVODIĆ, A., BUŠIĆ, A., KEPLER, J., STEFFEN-HEINS, A., KOMES, D. Encapsulation templated approach to valorization of cocoa husk, poppy and hemp macrostructural and bioactive constituents. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 402–411. 2018. doi:10.1016/j.indcrop.2017.12.020
- BEZERRA, M. A., LEMOS, V. A., NOVAES, C. G., DE JESUS, R. M., FILHO, H. R. S., ARAÚJO, S. A., ALVES, J. P. S. Application of mixture design in analytical chemistry. **Microchemical Journal**, v. 152, p. 104-336. 2019. doi:10.1016/j.microc.2019.104336
- BRASIL, **Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Análise mensal de Cana-de-açúcar, Abril/Maio 2020**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>

BRASIL, **Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos, V. 7 - SAFRA 2019/20 - N. 8 - Oitavo levantamento | MAIO 2020.**

Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>

BRITO, A.R., REIS, N.S., BONOMO, F.C.R., UETANABARO, T. P. A., ASSIS, S.A., SILVA, P.G.E., ÁGUIAR-OLIVEIRA, E., OLIVEIRA, R.J. Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization of the endoglucanase produced in the solid-state fermentation by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, p.1-9. 2017. doi:10.1080/10826068.2017.1365247

BÜCKA, A., CASCIATORIB, F.P., THOMÉOB, J.C., TSOTSASA, E. Model-based control of enzyme yield in solid-state fermentation. **Procedia Engineering**, v. 102, p. 362– 371. 2015. doi:10.1016/j.proeng.2015.01.163.

CALIARI, Í. P., BARBOSA, M. H., FERREIRA, S. O., TEÓFILO, R. F. Estimation of cellulose crystallinity of sugarcane biomass using nearinfrared spectroscopy and multivariate analysis methods. **Carbohydrate polymers**, v. 158, p. 20-28. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.005>.

CAMPOS-VEGA, R., NIETO-FIGUEROA, K.H., OOMAH, B.D. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: renewable source of bioactive compounds, **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, p. 172-184. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>.

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

CHAKDAR, H., KUMAR, M., PANDIYAN, K., SINGH, A., NANJAPPAN, K., KASHYAP, P.L, SRIVASTAVA, A. K. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. **Biotech**, v.6, p.1– 15. 2016. doi:10.1007/s13205-016-0457-z

CHANG, P.K., HORN, B.M., ABE, K., GOMI, K. *Aspergillus*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v.1, p.77-82, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00010-0

CHAPLA, D., PANDIT, P., SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215–221. 2012. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.083

COSTA, J. A.V., TREICHEL, H., KUMAR, V., PANDEY, A. Advances in Solid-State Fermentation. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, Chapter 1, p.1–17. 2018. doi:10.1016/b978-0-444-63990-5.00001-3

COLLINS, T., GERDAY, C., FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3-23, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>

DAVISON, B.H., PARKS, J., DAVIS, M.F., DONOHOE, B.S. Plantcell walls: basics of structure,chemistry,accessibility and their fluence on conversion. **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**, v. 3, p. 23-38. 2013. doi:10.1002/9780470975831.ch3

DE OLIVEIRA, R. L., DA SILVA, M. F., CONVERTI, A., PORTO, T. S. Production of β -fructofuranosidase with transfructosylating activity by *Aspergillus tamaraii* URM4634 Solid-State Fermentation on agroindustrial by-products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 343-350. 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.08

DEUTSCHMANN, R., DEKKER, R. F. From plant biomass to bio-based chemicals: latest developments in xylan research. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1627- 1640, 2012. doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.07.001

DIAS, F. F. G., CASTRO, R. J. S. DE, OHARA, A., NISHIDE, T. G., BAGAGLI, M. P., SATO,H.H., Simplex centroid mixture design for improvel-asparaginase production in solid state fermentation using agroindustrial wastes, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 528-534. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.011>

FERRAZ, J. L. A. A., SOUZA, L. O., SOARES, G. A., COUTINHO, J. P., OLIVEIRA, J. R., AGUIAR-OLIVEIRA, E., FRANCO, M. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 214-220, 2017. DOI:10.1080/00986445.2019.1572000

FERRAZ, J. L. A. A., SOUZA, L. O., FERNANDES, A. G. DE A., OLIVEIRA, M. L. F., OLIVEIRA, J. R. FRANCO M. Optimization of the solid-state fermentation conditions and characterization of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 using yellow mombin residue (*Spondias mombin* L.). **Chemical Engineering Communications**, v. 207, p. 1–12. 2019. doi:10.1080/00986445.2019.1572000

FERREIRA, A. C. R. Indicação de Procedência Sul da Bahia-Manual de controle de qualidade do cacau do sul da Bahia. **Editora: PTCSB**, p. 31, 2017.

FILIPPE, D., FERNANDES, H., CASTRO, C., PERES, H., OLIVA- TELES, A., BELO, I., SALGADO, J. M. Improved lignocellulolytic enzyme production and antioxidant extraction using solid- state fermentation of olive pomace mixed with winery waste. **Biofuel Bioprod Bior**, v. 14, p. 78-91. 2019. doi:10.1002/bbb.2073

GARCIA, D. J., LOVETT, B. M., YOU, F. Considering agricultural wastes and ecosystem services in Food-Energy-Water-Waste Nexus system design. **Journal of Cleaner Production**. v. 228. p. 941-955. 2019. doi:10.1016/j.jclepro.2019.04.314

GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S., BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, p. 4775-4800. 2010. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.088

GOMES, E., SILVA, R., PEREIRA, J. C., LADINO-ORJUELA, G. Fungal Growth on Solid Substrates: A Physiological Overview. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, Chapter 3, p. 31–56, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63990-5.00003-7>

GOMI, K. *Aspergillus oryzae*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v.1, p. 92-96, 2014 doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00011-2.

GUO, H., CHANG, Y., LEE, D. -J. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. **Bioresource Technology**, v. 252, p. 198–215. 2018. doi:10.1016/j.biortech.2017.12.062

GUPTA, P. K. et al. Fungal Biodiversity Producing Xylanase Enzymes Involved in Efficient Uses of Xylanolysis. In: Naraian R. (eds) **Mycodegradation of Lignocelluloses**, Fungal Biology. Springer, Cham. p. 51-53. 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-23834-6_4

HALDAR, D., PURKAIT, M. K., Lignocellulosic conversion into value-added products: A review, **Process Biochemistry**, v. 89, p. 110-133. 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.001>

HANDA, C. L., DE LIMA, F. S., GUELF, M. F. G., FERNANDES, M. DA S., GEORGETTI, S. R., IDA, E. I. Parameters of the fermentation of soybean flour by *Monascus purpureus* or *Aspergillus oryzae* on the production of bioactive compounds and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 271, p. 274-283. 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.188

HARRIS, A. D., RAMALINGAM, C. Xylanases and its application in food industry: a review. **Journal of Experimental Sciences**. v. 1. p. 1–11. 2010. ISSN: 2218-1768

HOUFANI, A. A., ANDERS, N., SPIESS, A. C., BALDRIAN, P., BENALLAOUA, S. Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars –a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 134, p. 105-481. 2020. doi:10.1016/j.biombioe.2020.105481

HUONG, P. T., JITA, K., AL TAHTAMOUNI, T. M., LE MINH TRI, N., KIM, H.-H., CHO, K. H., LEE, C. Novel activation of peroxy monosulfate by biochar derived from rice husk toward oxidation of organic contaminants in wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, p. 101037. 2020. doi:10.1016/j.jwpe.2019.101037

INTASIT, R., CHEIRSILP, B., LOUHASAKUL, Y., BOONSAWANG, P., CHAIPRAPAT, S., YEESANG, J., Valorization of Palm Biomass Wastes for Biodiesel Feedstock and Clean Solid Biofuel through Non-sterile Repeated Solid-State Fermentation, **Bioresour. Technology**, v. 298, p. 122551. 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122551>

IMJONGJAI, S., JOMMUENGBOUT, P., KARPILANONDH, P., KATSUZAKI, H., SAKKA, M., KIMURA, T., ... SAKKA, K. *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 xylanase Xyn10C capable of producing a doubly arabinose-substituted xylose, α -l-Araf-(1→2)-[α -l-Araf-(1→3)]-d-Xylp, from rye arabinoxylan. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 72, p. 1–9. 2015. doi:10.1016/j.enzmictec.2015.02.002

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IRO5 in solid state fermentation. **Journal of Radiation**

Research and Applied Science, v. 7, p. 317-326. 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.04.004>

KHANAHMADI, S., YUSOF, F., AMID, A., MAHMOD, S.S., MAHAT, M.K., Optimized preparation and characterization of CLEA-lipase from cocoa podhusk. **Journal of Biotechnology**. v. 202, p. 153–161. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.11.015>.

KHONNGAM, T., SALAKKAM, A. Bioconversion of sugarcane bagasse and dryspentyeast to ethanol through a sequential process consisting of solid-state fermentation, hydrolysis, and submerged fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 150. p. 107284. 2019. doi:10.1016/j.bej.2019.107284

LACONI, E. B., & JAYANEGARA, A. Improving Nutritional Quality of Cocoa Pod (*Theobroma cacao*) through Chemical and Biological Treatments for Ruminant Feeding: In vitro and In vivo Evaluation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, p. 343–350. 2015. doi:10.5713/ajas.13.0798

LESSA, O. A.; REIS, N. S.; LEITE, S. G. F.; GUTARRA, M. L. E.; SOUZA, A. O.; GUALBERTO, S. A.; OLIVEIRA, J. R.; AGUIAR, O. E.; FRANCO, M. Effect of the solid State fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. **Foodscienceandbiotechnology**, v. 27, p. 1-8. 2017. doi:10.1007/s10068-017-0196-x

LIU, Y.-J., LI, B., FENG, Y., CUI, Q. Consolidated bio-saccharification: Leading lignocellulose bioconversion into the real world. **Biotechnology Advances**, v. 40. 107535. 2020. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107535

LORENZETT, D. B.; NEUHAUS, M.; SCHWAB, N. T. Gestão de resíduos e a indústria de beneficiamento de arroz. **Revista Gestão Industrial**, v. 08, p. 219-232. Santa Maria, RS, 2012. DOI:10.3895/S1808-04482012000100011

LORENZI, B. R., ANDRADE, T. H. N. O etanol de segunda geração no Brasil políticas e redes sociotécnicas. **Revista Brasileira de Ciências Sociais** v. 34. 2019. DOI: 10.1590/3410014/2019

LUNDSTEDT, T., SEIFERT, E. ABRAMO, L., THELIN, B., NYSTROM, J.; PETTERSEN, J., BERGMAN, R. Experimental design and optimization.

Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, v. 42, p. 3-40, 1998.
[https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00065-3)

LUNSIN, R., DUANYAI, S., PILAJUN, R., DUANYAI, S., SOMBATSRI, P. Effect of urea- and molasses-treated sugarcane bagasse on nutrient composition and in vitro rumen fermentation in dairy cows. **Agriculture and Natural Resources**. v. 52, p. 622-627. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.11.010>

MANDARI, V., NEMA, A., DEVARAI, S.K., Sequential optimization and large scale production of lipase using tri-substrate mixture from *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid state fermentation, **Process Biochemistry**, v. 89, p. 46-54. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.026>

MACHIDA, M., ASAI, K., SANO, M., TANAKA, T., KUMAGAI, T., TERAII, G. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, p. 1157 – 1161. 2005.
[doi:10.1038/nature04300](https://doi.org/10.1038/nature04300).

MACHIDA, M., YAMADA, O., GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **DNA Research**, v. 15, p. 173-183. 2008. [doi:10.1093/dnares/dsn020](https://doi.org/10.1093/dnares/dsn020)

MARQUES, G. L., REIS, N. S. SILVA T. P., FERREIRA M. L. O., AGUIAR-OLIVEIRA, E. 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 Biomass Valor**, v. 9, p. 2061–2069. 2018. DOI [10.1007/s12649-017-9994-x](https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x)

MARQUES, B., TADEU, A., ANTÓNIO, J., ALMEIDA, J., & DE BRITO, J. Mechanical, thermal and acoustic behaviour of polymer-based composite materials produced with rice husk and expanded cork by-products. **Construction and Building Materials**, v. 239, p. 117851. 2020. [doi:10.1016/j.conbuildmat.2019.117851](https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.117851)

MELNICHUK, N., BRAIA, M. J., ANSELMINI, P. A., MEINI, M.-R., ROMANINI, D. Valorization of two agroindustrial wastes to produce alpha-amylase enzyme from *Aspergillus oryzae* by solid-state fermentation. **Waste Management**, v. 106, p. 155-161. 2020.
[doi:10.1016/j.wasman.2020.03.025](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.03.025)

MOHAMED, S. A. N., ZAINUDIN, E. S., SAPUAN, S. M., AZAMAN, M. D., ARIFIN, A. M. T. Energy behavior assessment of rice husk fibres reinforced polymer composite. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 9, p. 383-393. 2019. doi:10.1016/j.jmrt.2019.10.067

MOREIRA, L. R. S., FILHO, E. X. F. Insights in to the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 5205–5214. 2016. doi: 10.1007/s00253-016-7555-z

NAIR, K. P. P. Cocoa (*Theobroma cacao* L.). **The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World**, p. 131–180. 2010. doi:10.1016/b978-0-12-384677-8.00005-9

NALINI, S., PARTHASARATHI, R. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium* wilt of eggplant. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, p. 108–115. 2018. doi:10.1016/j.aasci.2017.11.002

NGUYEN, H. C., SU, C.-H., YU, Y.-K., HUONG, D. T. M. Sugarcane bagasse as a novel carbon source for heterotrophic cultivation of oleaginous microalga *Schizochytrium* sp. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 99–105. 2018. doi:10.1016/j.indcrop.2018.05.005

NOVAES, C. G., BEZERRA, M. A., SILVA, E. G. P., SANTOS, A. M. P., ROMÃO, I. L. DAS., SANTOS NETO, J. H. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICPOES), **Microchemical Journal**, v. 128, p. 331–346, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.05.015>

NUNES, N. S. **Aplicação do desenho experimental centróide simplex e da rede neural artificial híbrida com algoritmo genético na maximização da produção de exoglicanase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por fermentação em estado sólido**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química)–Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus, Bahia, 2019.

ODDOYE, E. O. K., RHULE, S. W. A., AGYENTE-BADU, K. V. OWUSUANSAH F. Fresh Cocoa podhusk as an ingredient in the diets of growing pigs. *Sci. Res. Essays*. v. 5, p. 1141–1144, 2010. ISSN1992-2248

OFORI-BOATENG, C., LEE, K.T., 2013. The potential of using cocoa pod husks as green solid base catalysts for the transesterification of soybean oil into biodiesel: effects of biodiesel on engine performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 220, p. 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.01.046>.

OHARA, A. et al. A multicomponent system based on a blend of agroindustrial wastes for the simultaneous production of industrially applicable enzymes by solid-state fermentation. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 131-137, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.17017>

OLIVEIRA, P.C., DEBRITO, A. R., PIMENTEL, A. B., SOARES, G. A., PACHECO, C. S. V., SANTANA, N. B., DA SILVA, E. G. P., FERNANDES, A. G. D. E. A., FERREIRA, M. L. O., OLIVEIRA, J. R., FRANCO, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, p. 777-787. 2019. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira>

OLIVEIRA, A. C., AMORIM, G. M., AZEVÊDO, J. A. G., GODOY, M. G., FREIRE, D. M. G. Solid-state fermentation of co-products from palm oil processing: Production of lipase and xylanase and effects on chemical composition. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 36, p. 1–8. 2018. doi:10.1080/10242422.2018.1425400

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p.81–84, 2003. doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3

PAPADAKI, E., KONT/OGIANNOPOULOS, K.N., ASSIMOPOULOU, A. N., & TH. MANTZOURIDOU, F. 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. **Bioresour. Technol**, v. 309, 123317. 2020. doi:10.1016/j.biortech.2020.123317

PASTOR, F. I. J., GALLARDO, O., SANZ-APARICIO, J., DÍAZ, P. Xylanases: Molecular proprieties and applications. In: Polaina, J.; MacCabe, A. P. (eds.) **Industrial enzymes**, p. 65–82. 2007.doi:10.1007/1-4020-5377-0_5

PERDANI, M. S., MARGARETHA,G., SAHLAN, M., HERMANSYAH, H. Solid state Fermentation method for production of laccase enzyme with bagasse, cornstalk and rice husk as substrates for adrenaline biosensor. **Energy Reports**, v. 6, p. 336-340. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2019.08.0652352-4847/>

PIROTA, R. D. P. B., TONELOTTO, M., DELABONA, P. S., FONSECA, R. F., PAIXÃO, D. A. A., BALEEIRO, F. C. F., BERTUCCI NETO, V., FARINAS, C. S. Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae*cultivated under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 21-31, 2016. [dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20160331s00003520](https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160331s00003520)

POOSARLA,V.G.,CHANDRA,T.S.Purification and Characterization of Novel Halo-Acid Alkali-Thermo-stable Xylanase from *Gracilibacillus* sp. TSCPVG. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 173, p. 1375–1390. 2014. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0939-6>

POSTEMSKY, P. D., BIDEAIN, M. A., LLUBERAS, G., LOPRETTI, M. I., BONIFACINO, S., INÉS LANDACHE, M.,... OMARINI, A. B. Biorefining via solid-state fermentation of rice and sunflower by-products employing novel monosporic strains from *Pleurotus* spp. **Bioresource Technology**, v. 298, p. 121692. 2019. doi:10.1016/j.biortech.2019.121692

RAJ, K., KRISHNAN, C. Improved co-production of ethanol and xylitol from low-temperature aqueous ammonia pretreated sugarcane bagasse using two-stage high solids enzymatic hydrolysis and *Candida tropicalis*. **Renewable Energy**, v. 153, p. 392-403. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.042>

RASTOGI, M., SHRIVASTAVA, S.Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, p. 330–340. 2017. doi:10.1016/j.rser.2017.05.225

RATTANACHU, P., TOOLKASIKORN, P., TANGCHIRAPAT, W., CHINDAPRASIRT, P., JATURAPITAKKUL, C. Performance of Recycled Aggregate Concrete with Rice Husk

Ash as Cement Binder. *Cement and Concrete Composites*, v. 108, p. 103533. 2020. doi:10.1016/j.cemconcomp.2020.103533

RAVINDRAN, R., JAISWAL, A. K. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. **Trends In Biotechnology**, v. 34, p. 58-69, 2016. doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008

REIS, N. S., OLIVEIRA, P. C., LESSA, O. A., SANTOS, M. M. O., CARVALHO, M. S., GONÇALVES, M. S., FRANCO, M. Obtenção de endoglucanases por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 em casca da amêndoa de cacau através de fermentação em estado sólido. In: Viera, V. B., Piovesan, N. **Tópicos em nutrição e tecnologia de alimentos 2**. 1 ed. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, v. 2, p.170-175. 2019.

RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A., CARVALHO, J. C., PANDEY, A., SOCCOL, C.R., RODRÍGUES-FERNÁNDEZ, D. E. Kinetics of the Solid-State Fermentation Process. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 57-82. 2018. doi: 10.1016/B978-0-444-63990-5.00004-9

ROSALES, E., FERREIRA, L., SANROMÁN, M. Á., TAVARES, T., PAZOS, M. Enhanced selective metal adsorption on optimised agroforestry waste mixtures. **Bioresource Technology**, v. 182, p. 41-49, 2015. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.094

SADAF, A., KHARE, S.K. Production of *Sporotrichum thermophile* xylanase by solid state fermentation utilizing deoiled *Jatropha curcas* seed cake and its application in xylooligosachharide synthesis. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 126–130, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech. 2013.11.058

SAIDELLES, A. P. F., SENNA, A. J. T., KIRCHNER, R., BITENCOURT, G. Gestão de Resíduos Sólidos na Indústria de Beneficiamento de Arroz. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental REGET/UFMS**, v. 5, p. 904 - 916, 2012.

SAHİN, Y. B., DEMİRTAŞ, E. A., BURNAK, N. Mixture design: A review of recent applications in the food industry. **Pamuk kale Univ Muh Bilim Derg**, v. 22, p. 297-304, 2016. doi: 10.5505/pajes.2015.98598

SALA, A., ARTOLA, A., SÁNCHEZ, A., BARRENA, R., Rice husk as a source for fungal biopesticide production by solid-state fermentation using *B. bassiana* and *T. harzianum*,

Bioresource Technology, v. 296, p. 122322. 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122322>

SALOMÃO, S. 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. 2018. doi:10.1016/j.bcab.2018.10.019

SANTANA, N. B., DIAS, J. C. T., REZENDE, R. P., FRANCO, M., OLIVEIRA, L. K. S., SOUZA, L. O. Production of xylitol and bio-detoxification of cocoa pod husk hemicellulose hydrolysate by *Candida boidinii* XM02G. **PloS one**, v. 13, e0195206. 2018.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195206>

SANTOS, T. C. dos.; FILHO, G. A.; BRITO, A. R.; PIRES, A.J.V.; BONOMO, R.C.F.; FRANO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. By Solid State Fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, v. 29, p. 222-233, 2016. doi:10.1590/1983-21252016v29n126rc.

SCAZZOCCHIO, C. *Aspergillus*: A Multifaceted Genus. **Reference Module in Life Sciences**, v. 1, p. 262-292. 2019. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.20803-0

SCHEFFÉ, H. The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 2, p. 235-251, 1963.
<https://br9.com.br/kL70lu>.

SHIN, H.-Y., KIM, S.-M., LEE, J. H., & LIM, S.-T. Solid-state fermentation of black rice bran with *Aspergillus awamori* and *Aspergillus oryzae*: Effects on phenolic acid composition and antioxidant activity of bran extracts. **Food Chemistry**, v. 272, p. 235–241. 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.174

SILVA, T. P., SOUZA, L.O., REIS, N.S., ASSIS, S. A., FERREIRA, M. L. O., OLIVEIRA, J. R., FRANCO, M. Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, p. 745-756, 2017.

SINGH, R. S., KANIKA C. KAUR, K. PANDEY A. Statistical optimization of solid-state fermentation for the production of fungal inulinase from apple pomace. **Bioresource Technology**, v. 9, 100364, 2020. doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100364

SOARES, M. S., PIRES A. J. V., SILVA, L. G., GUIMARÃES, J. O., MACHADO, T. C., FRAZÃO, O. S. Utilização do bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. **Revista Eletrônica Nutritime** v. 12, p. 3837-3855, 2015. Disponível em: <https://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/ARTIGO287.pdf>.

SODRÉ, G.A., VENTURINI, M.T., RIBEIRO, D.O., MARROCOS, P.C.L. Extrato da casca do fruto do cacauieiro como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacauieiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 881–887. 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000300030>.

SOUZA, J. V. **Industrialização e gestão de resíduos de arroz no Brasil**. 2019. 32. TCC (Bacharel em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal de Uberlândia–Campus Patos de Minas. Patos de Minas. 2019.

SOUZA, L. O., DE BRITO, A. R., BONOMO, R. C. F., SANTANA, N. B., ALMEIDA ANTUNES FERRAZ, J. L. DE, ARAÚJO FERNANDES, A. G. DE, ...FRANCO, M. Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 277-284. 2018. doi:10.1016/j.bcab.2018.08.016

SOUZA, P.A.; MOREIRA, L.F.; DIÓGENES, H.A.; SARMENTO, F.M.D. Cacao – *Theobroma cacao*. **Exotic Fruits**, p. 69–76, 2018. doi:10.1016/B978-0-12-803138-4.00010-1

SRIVASTAVA, N., SRIVASTAVA, M., RAMTEKE, P.W., MISHRA, P.K. Solid-State Fermentation Strategy for Microbial Metabolites Production: An Overview. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 345 – 354, 2019. doi.org/10.1016/B978-0-444-63504-4.00023-2

SYAMSIRO, M., SAPTOADI, H., TAMBUNAN, B.H., PAMBUDI, N.A., A preliminary study on use of cocoa pod husk as a renewable source of energy in Indonesia. **Energy Sustain**, v. 16, p. 74–77. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2011.10.005>.

- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. São Paulo: ARTMED, 2017.
- THOMAS, L., PARAMESWARAN, B., PANDEY, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 98, p. 9–15. 2016. doi:10.1016/j.renene.2016.05.011
- TORQUATO S. A., RAMOS, R. C. Biomassa da cana-de-açúcar e a geração de bioeletricidade em São Paulo: usinas signatárias ao Protocolo Agroambiental Paulista. **Informações Econômicas**, SP, v. 43, 2013.
- TROMBETA N. C., FILHO J. V. C. Potencial e Disponibilidade de Biomassa de Cana-de-açúcar na Região Centro-Sul do Brasil: indicadores agroindustriais. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 55, p. 479-496, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-94790550304>
- UNREAN, P., KETSUB, N. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of thanol and xylitol from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 238– 246. 2018. doi:10.1016/j.indcrop.2018.06.071
- VALADEZ-CARMONA, L., ORTIZ-MORENO, A., CEBALLOS-REYES, G., MENDIOLA, J. A., IBÁÑEZ, E. Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 131, p. 99–105. 2018. doi:10.1016/j.supflu.2017.09.011
- VÁSQUEZ, Z. S., DE CARVALHO NETO, D. P., PEREIRA, G. V. M., VANDENBERGHE, L. P. S., DE OLIVEIRA, P. Z., TIBURCIO, P. B., SOCCOL, C. R. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. **Waste Management**, v. 90, p. 72–83. 2019. doi:10.1016/j.wasman.2019.04.030
- VATS, N., KHAN, A. A., & AHMAD, K. Observation of biogas production by sugarcane bagassen and food wastein different composition combinations. **Energy**, v. 185, p. 1100-1105. 2019. doi:10.1016/j.energy.2019.07.080
- WANG, Q., HOU, Y., XU, Z., MIAO, J., LI, G. Optimization of coldactive protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1926-1931, 2008.

ZHANG, Z., HU, S., CHEN, D., ZHU, B. An analysis of an ethanol-based, whole-crop refinery system in China. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 24, p. 1609–1618. 2016. doi:10.1016/j.cjche.2016.05.036

ZHANG, Y., WANG, L., HENH, C. Correlation of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, v. 165, p. 65–73. 2017. doi.org/10.1016/j.ces.2017.02.039.

ZHANG, S., ZHU, S., ZHANG, H., LIU, X., XIONG, Y. Synthesis and characterization of rice husk-based magnetic porous carbon by pyrolysis of pretreated rice husk with FeCl_3 and ZnCl_2 . **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 147, 104806. 2020. doi:10.1016/j.jaap.2020.104806

ZHENG, J., REHMANN, L. Extrusion Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 18967-18984. 2014. doi.org/10.3390/ijms151018967

CAPÍTULO 2

Aplicação da Fermentação em Estado Sólido na valorização de resíduos agroindustriais pela ação de *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 para a produção de xilanase e sua aplicação na sacarificação de resíduos lignocelulósicos

Marise Silva de Carvalho^a, Adriana Bispo Pimentel^b, Luiz Henrique Sales de Menezes^a, Floriatan dos Santos Costa^c, Polyane Cabral Oliveira^d, Marta Maria Oliveira dos Santos^d, Iasnaia Maria de Carvalho Tavares^d, Julieta Rangel de Oliveira^a, João Carlos Teixeira Dias^e, Marcelo Franco^{a*}.

^a Departamento de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Estadual de Santa Cruz, 45654-370, Ilhéus, Brasil.

^b Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, 45654-370, Ilhéus, Brasil

^c Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil..

^d Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Suldoeste da Bahia 45700-000, Itapetinga, Brasil

^e Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Santa Cruz, 45654-370, Ilhéus, Brasil.

*Autor correspondente: Tefone = +55 073 3231 4158; Fax = +55 073 3680 5355;

e-mail = mfranco@uesc.br

Resumo: A produção de resíduos agroindustriais tem sido uma preocupação crescente e se faz necessário a busca de alternativas para diminuir essa problemática. O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de xilanase pela técnica de fermentação em estado sólido por ação do fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* ATCC 10124, em mistura dos resíduos, bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e casca do fruto do cacau, realizar a caracterização da enzima produzida e aplicar o extrato bruto enzimático produzido na sacarificação de resíduos lignocelulósicos. O planejamento Centróide-Simplex foi utilizado para avaliar a melhor composição da mistura dos resíduos para a produção da enzima, sendo 50% de casca de cacau, 25% de casca de arroz e 25% de bagaço de cana-de-açúcar com uma atividade enzimática de $10,85 \pm 0,184$ U/g o que representa um aumento de até 22% em relação a atividade encontrada com resíduo individual. Foi realizado também a otimização dos fatores temperatura, tempo e umidade inicial da fermentação pelo planejamento Box-Behnken, o que apresentou uma atividade de $12,15 \pm 0,77$ U/g no ponto ótimo indicado, o que representa um aumento de 11,98% em relação à atividade obtida sem a otimização dos fatores. A xilanase produzida apresentou característica alcalina e termoestáveis. E o extrato bruto contendo a xilanase que foi utilizado na sacarificação dos resíduos lignocelulósicos apresentou resultados promissores, pois todos os resíduos expostos ao processo apresentaram produções de açúcares

com maiores valores obtidos na casca de cacau de até 994,33mg/g de açúcares produzidos, resultados promissores para a enzima produzida.

1 Introdução

As xilanases são enzimas hidrolíticas que atuam na fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos despolimerizando um heteropolissacarídeo de grande complexidade e altamente ramificada, a xilana (Irfan, et al., 2014; Gupta et al, 2019). Para a hidrólise completa da xilana é necessário que exista uma ação combinada de várias enzimas devido à sua complexidade estrutural. As endo-1,4- β -xilanase (1,4- β -D-xilanaxilohidrolase, EC 3.2.1.8) atuam diretamente clivando as ligações glicosídicas internas da cadeia principal, diminuindo sua polimerização e formando oligômeros.

As xilanases podem ser provenientes de diferentes fontes como, bactérias, leveduras, insetos, plantas e fungos. A fonte de produção fúngica é bastante utilizada devido às características que apresentam como ampla disponibilidade e produção enzimática, enzimas com grande estabilidade em altas temperaturas quando provenientes principalmente por fungos termófilos e de atuação em uma faixa ampla de pHs, geralmente entre 3 e 10 (Moreira; Filho, 2016; Gupta, et al. 2019). Gêneros como *Aspergillus*, *Tricoderma*, *Penicillium* e *Fusarium* são listados como bons produtores de xilanase (Gupta et al, 2019).

O *Aspergillus oryzae* é um fungo filamentosso aeróbico pertencente ao gênero *Aspergillus*, amplamente utilizado em indústrias com aplicação biotecnológica pelo potencial de secretar grandes quantidades de diversidade de enzimas (Machida et al., 2005; Machida et al., 2008;), a exemplo Brito et al. (2017) que utilizaram *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 na produção de endoglucanase em fermentação em estado sólido da casca de arroz e da casca de amendoim e Reis et al. (2020) que produziram endoglucanase e xilanase pela ação do *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 utilizando casca da amêndoa do cacau apresentando atividades enzimática significativas em processo de fermentação em estado sólido.

O processo de fermentação em estado sólido uma técnica eficiente que permite o desenvolvimento do micro-organismo, utilizando resíduos como suporte e fonte de nutrientes, desenvolvida com pouca disponibilidade de água livre e simulando o habitat natural dos micro-organismos (Santos et al., 2015; Santos et al., 2016 ;Costa et al., 2018). Diversos fatores influenciam processo de fermentação e a identificação de cada um é de fundamental importância para maximizar excreção de enzima pelo fungo (Santos et al., 2016). Para a identificação e otimização desses fatores algumas técnicas estatísticas estão sendo aplicadas, desde o método de otimização de fator único de cada vez (De Oliveira et al., 2019) à aplicação de Metodologias de Superfície de Resposta (RSM), que possibilitam a obtenção de

modelos matemáticos capazes de descrever um comportamento de uma resposta experimental de acordo com variação dos níveis dos fatores investigados, além de possibilitar avaliações sobre o sinergismo existente entre os fatores estudados (Brito et al., 2017; Ferraz et al., 2019; Filipe et al., 2019).

Nesta categoria, o planejamento de mistura e o Box-Behnken são estratégias extensivamente utilizadas. A modelagem de mistura possibilita a obtenção de misturas binárias ou ternárias, cujos pseudocomponentes apresentam proporções bem definidas (Bezerra et al., 2020) onde os fatores são os componentes de uma mistura e as respostas são influenciadas pela variação de proporções destes componentes (De Oliveira et al., 2019). Assim, os substratos se delimitam em um triângulo equilátero como espaço experimental, onde cada vértice representa o componente puro, e o restante da área do triângulo representa a interação entre os componentes. As proporções entre os substratos devem ser expressas como frações e a sua somatória deve ser igual a 100% (Bezerra et al., 2020; Nunes et al., 2020).

Por outro lado, o planejamento Box-Behnken possibilita investigar de forma independente e simultânea três ou mais fatores em três níveis. No total de experimentos (N) necessários para a obtenção dos coeficientes do modelo matemático é definido como $N = 2k(k - 1) + C$, onde k é o número de fatores e C número de pontos centrais (Ferreira et al., 2007; Ferreira, 2015).

As xilanases apresentam grande importância no setor industrial como na indústria de alimentos e bebidas em processos, alimentação animal, indústria farmacêutica, indústria têxtil. Outro campo que vem sendo bastante estudado para aplicação industrial é a utilização de xilanase em processos de sacarificação, parte importante do processo de produção de etanol de segunda geração, e para um processo eficiente de sacarificação enzimática é necessário a atuação de celulasas, hemicelulasas, ligninases e outras enzimas acessórias (Ferraz et al., 2017). A aplicação de xilanases na sacarificação de resíduos lignocelulósicos ocorre geralmente em coquetéis enzimáticos, juntamente com as outras enzimas necessárias, o que acaba elevando o custo do processo, o que abre espaço para a utilização de enzimas produzidas por micro-organismos (THOMAS et al., 2016). O que pode ser visto no estudo de Thomas et al. (2016) que utilizaram xilanase de *Aspergillus* sp. produzida pela fermentação de farelo de trigo e extrato de levedura na sacarificação da palha de arroz pré-tratada com NaOH e obteve um máximo de 574,8 mg / g de açúcares redutores e em Ferraz et al. (2017) que relatam a utilização de xilanase no extrato bruto enzimático produzido pela ação do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 utilizando resíduo de *Spondias mombin* na sacarificação

diversos resíduos com resultados positivos tendo um destaque para o bagaço de cana de açúcar até 662.34 mg g⁻¹ de açúcares liberados quando adicionado Mn²⁺.

Desse modo o estudo teve como objetivo inicial a produção de xilanase por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 em mistura de bagaço de cana, casca de arroz, e casca de cacau por FES aplicando o Design simplex-centróide, em seguida a otimização desta produção pelo estudo dos fatores influentes aplicando o planejamento Box-Behnken, a caracterização bioquímica da enzima produzida e finalmente a aplicação do extrato bruto enzimático contendo xilanase na sacarificação dos resíduos agroindustriais, casca de cacau, bagaço de cana, casca de arroz e casca de amendoim.

2 Materiais e Métodos

2.1 Substratos e microrganismo

O Bagaço de Cana de açúcar (BC) foi disponibilizado por agroindústrias regionais na cidade de Ilhéus, Bahia, a Casca de Arroz (CA) foi doada pela empresa de arroz Tio Mário (Barreiras, Bahia, Brasil) a Casca do fruto do cacau (pericarpo) (CC) foi obtida em uma fazenda localizada no distrito de Sambaituba, Ilhéus, Bahia, Brasil e as cascas de amendoim foram adquiridas no mercado local (Itabuna, Bahia, Brasil).

O fungo utilizado o *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 foi obtido da coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, RJ, Brasil) sob o número de registro 01771, preservado em sílica gel e glicerol.

2.2 Preparo dos substratos e inóculo

Os substratos (BC, CA e CC) foram higienizados e secos em estufa com circulação de ar forçado (SL 102, Solab, Piracicaba, Brasil) a 70 °C por seis dias e posteriormente triturados em moinho de facas tipo Willey mill (ACB, Labor, São Paulo, Brasil) para obtenção de partículas com 2 mm.

O preparo da solução de esporos foi realizado utilizando microorganismo cultivado em meio de Agar-dextrose-batata (PDA), em Erlenmeyer de 250 mL em estufa bacteriológica (SL 222, Solab, Piracicaba, Brasil) a 27°C por sete dias. Após o período de sete dias de incubação, a cultura esporulada foi submetida a uma raspagem com auxílio de pérolas de vidro e suspensa em solução Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA) (0,01%, v/v), ambos previamente esterilizados em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos. A suspensão foi coletada em frasco Erlenmeyer e uma alíquota de 0,1 mL foi tomada e diluída em eppendorf para a

contagem de esporos que foi realizada em microscópio binocular (L1000, BIOVAL, São Paulo, Brasil) utilizando câmara de Neubauer.

2.3 Métodos Estatísticos para a otimização da produção de xilanase por FES

2.3.1 Otimização da mistura de resíduos

Os ensaios fermentativos foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g da mistura dos resíduos, os quais foram previamente esterilizados a 121 °C, 1atm por 15 minutos em autoclave (CS, Prismatec, São Paulo, Brasil), em seguida foram adicionados água estéril até o valor de 60 % de umidade, posteriormente, inoculado 10^7 de esporos do fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. O processo fermentativo foi realizado de acordo com a tabela 1, em estufa bacteriológica (SL222, Solab, Piracicaba, Brasil) a 27 °C.

O Design Experimental Simplex Centróide foi aplicado com o objetivo de encontrar a composição ótima da mistura dos resíduos agroindustriais (CC, BC e PA) para a produção de xilanase. Conforme definição teórica, as proporções entre os substratos devem ser expressas como frações e a sua somatória deve ser igual a 100%, como mostrado na Eq. (1).

$$\sum X_i = X_1 + X_2 + X_3 = 5,0 \text{ g} = 100 \% \quad (1)$$

O delineamento experimental foi realizado com três componentes, tendo cada um destes seis níveis, totalizando 12 ensaios com três repetições no ponto central (tabela 1). Os modelos de regressão foram ajustados para variações de todas as respostas estudadas em função de efeitos de interação significativos entre as proporções ($p < 0,10$), com coeficientes de determinação aceitáveis ($R^2 > 0,90$) e teste F e análise de variância [ANOVA] foram utilizados para verificar a qualidade dos modelos. O Software STATISTICA® v. 12.0 (Statsoft, EUA) foi empregado para o planejamento experimental, análise de dados e construção de modelos.

Tabela 1. Planejamento simplex centróide com valores reais e codificados que estão entre parênteses e a atividade enzimática da xilanase experimental e prevista. As quantidades do bagaço de cana-de-açúcar (BC), casca de arroz (CA) e casca do fruto do cacau (CC) foram expressas em gramas. A fermentação em estado sólido foi realizada a 27 °C, 144 h, 60% de umidade e 10^7 de esporos do *Aspergillus oryzae* ATCC 10124.

Substrato (g)				Resposta	
Ensaios	BC	CA	CC	Atividade enzimática	Atividade enzimática

				experimental (U/ g)	prevista (U/g)
1	5,0 (1)	0 (0)	0 (0)	$8,89 \pm 0,033$	8,75
2	0 (0)	5,0 (1)	0 (0)	$5,0 \pm 0,018$	9,72
3	0 (0)	0 (0)	5,0 (1)	$9,7 \pm 0,015$	10,01
4	2,5 (0,5)	2,5 (0,5)	0 (0)	$7,1 \pm 0,059$	6,96
5	2,5 (0,5)	0 (0)	2,5 (0,5)	$9,6 \pm 0,007$	9,97
6	0 (0)	2,5 (0,5)	2,5 (0,5)	$9,8 \pm 0,008$	10,11
7	3,33 (0,66)	0,83 (0,16)	0,83 (0,16)	$9,1 \pm 0,035$	9,34
8	0,83 (0,16)	3,33 (0,66)	0,83 (0,16)	$9,95 \pm 0,032$	9,78
9	0,83 (0,16)	0,83 (0,16)	3,33 (0,66)	$11,9 \pm 0,010$	10,81
10	1,66 (0,33)	1,66 (0,33)	1,66 (0,33)	$10,25 \pm 0,016$	10,83
11	1,66 (0,33)	1,66 (0,33)	1,66 (0,33)	$9,4 \pm 0,009$	10,83
12	1,66 (0,33)	1,66 (0,33)	1,66 (0,33)	$11,2 \pm 0,035$	10,83

2.3.2 Otimização dos parâmetros fermentativos

Os ensaios para a otimização dos parâmetros fermentativos temperatura, umidade inicial e tempo de fermentação que exercem influência direta na produção enzimática foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g da mistura dos resíduos, os quais foram previamente esterilizados a 121 °C, 1 atm por 15 minutos em autoclave (CS, PRISMATEC, São Paulo, Brasil), em seguida adicionado aos recipientes água estéril para atingir a umidade desejada (50, 55 ou 60) e inoculado 10^7 de esporos do fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. O processo fermentativo foi realizado de acordo com a tabela 2, em estufa bacteriológica (SL222, Solab, Piracicaba, Brasil).

Foi utilizado um planejamento Box-Behnken para investigar a influência dos fatores temperatura, umidade e tempo de fermentação sobre a produção de xilanase, bem como determinar os níveis mais adequados de cada um dos fatores para o alcance de produção máxima enzimática. A matriz consistiu em 15 experimentos incluindo três repetições do ponto

central. A atividade de xilanase (UI/g) foi o valor de resposta e os fatores temperatura de incubação (°C) umidade inicial (%), e tempo de fermentação (h), foram selecionados como variáveis independentes, sendo avaliados em três níveis, baixo, médio e alto, que foram codificados como -1, 0 e +1, respectivamente, como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Planejamento Box-Behnken com valores reais e valores codificados que estão entre parênteses e a atividade enzimática da xilanase. A fermentação em estado sólido foi desenvolvida com 5g de mistura de resíduos agroindustriais (BC, CA e CC) e 10^7 de esporos do *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 por grama de substrato.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Umidade (%)	Atividade enzimática (U/g)
1	26 (-1)	48 (-1)	55 (0)	15,18 ± 0,012
2	26 (-1)	144 (+1)	55 (0)	13,88 ± 0,016
3	40 (+1)	48 (-1)	55 (0)	14,84 ± 0,015
4	40 (+1)	144 (+1)	55 (0)	12,34 ± 0,007
5	33 (0)	48 (-1)	50 (-1)	13,75 ± 0,024
6	33 (0)	144 (+1)	50 (-1)	7,98 ± 0,014
7	33 (0)	48 (-1)	60 (+1)	9,97 ± 0,016
8	33 (0)	144 (+1)	60 (+1)	13,78 ± 0,019
9	26 (-1)	96 (0)	50 (-1)	9,78 ± 0,010
10	40 (+1)	96 (0)	50 (-1)	5,05 ± 0,006
11	26 (-1)	96 (0)	60 (+1)	8,94 ± 0,006
12	40 (+1)	96 (0)	60 (+1)	6,31 ± 0,003
13 (CP)	33 (0)	96 (0)	55 (0)	11,47 ± 0,032
14 (CP)	33 (0)	96 (0)	55 (0)	10,81 ± 0,011
15 (CP)	33 (0)	96 (0)	55 (0)	11,46 ± 0,009

2.3.3 Obtenção do extrato enzimático

Após período de fermentação realizado no estudo do Design de mistura e do planejamento Box-Behnken foi adicionado a cada Erlenmeyer da fermentação 50 mL de água estéril e levados a agitação em incubadora orbital (Q315IA, QUIMIS, São Paulo, Brasil) a 200 rpm, 35°C por 20 min, o extrato obtido foi submetido à centrifugação (CT-6000R; CIENTEC, Campinas, Brasil) a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante ao qual chamaremos de extrato bruto enzimático foi separado e utilizado para determinação das atividades enzimática.

2.3.4 Determinação da atividade enzimática de xilanase

Os ensaios de atividade da xilanase foram com base em procedimento padrão recomendados pela IUPAC (Ghose e Bisaria, 1987). Uma solução de xilana de “beechwood” (Sigma®) a 1% em tampão citrato (0,5 M; pH 4,8) foi preparada, cuja solução (0,25 mL) foi adicionada a um tubo de ensaio, juntamente a 0,25 mL do extrato bruto enzimático (previamente diluído em água seis vezes) e 0,25 mL de tampão citrato (0,05 M; pH 4,8). Ao tubo controle, foi adicionado 0,5 mL tampão citrato (0,5 M; pH 4,8) e 0,25 mL de extrato enzimático. Os experimentos todos preparados em triplicata foram levados a banho Maria a 50 °C por 10 min. As reações foram interrompidas adicionando 0,5 mL de ácido dinitrossalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a cada um dos tubos e levados a banho Maria a 100 °C por 5 min. Após este período os tubos foram retirados, resfriados até temperatura ambiente e adicionou se água (6,5 mL). A liberação de açúcares redutores foi determinada pelo método de Miller (1959) e medida a 450 nm em espectrofotômetro (SF200DM-UV Vis; Bel Photonics, Osasco, Brasil). A quantidade de açúcar redutor liberada foi quantificada usando a curva de xilose (1 a 10 $\mu\text{mol/mL}$).

Uma unidade internacional de atividade enzimática (UI) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcares redutores por minuto, a 50°C. Os resultados dessas análises foram expressos em unidades internacionais por grama de substrato (UI/g).

2.4 Caracterização bioquímica

A caracterização bioquímica da enzima possibilita a identificação de características como temperatura e pH ótimos de atuação, bem como o efeito da variação destas na atividade e estabilidade da enzima, permitindo avaliar e apontar a sua aplicação de modo mais eficiente.

2.4.1 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima

A temperatura ótima de reação para a atividade enzimática da xilanase foi realizada em meio padrão para a determinação da atividade enzimática da enzima (item 2.3.4), apenas modificando a temperatura de incubação (50-80°C). As respostas foram expressas em atividade relativa considerando o maior valor obtido como o 100%.

A estabilidade térmica foi avaliada pela incubação do extrato enzimático bruto em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8) sob diferentes temperaturas (50-80°C) por 5h. Em intervalos de 1 h foram retiradas alíquotas e submetidas à determinação da atividade de xilanase. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática determinada antes da incubação.

2.4.2 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima

O efeito do pH de reação foi avaliado na faixa de 3 a 9. Para tal avaliação foi necessário a diluição do extrato enzimático bruto seis vezes em tampão citrato (0,05M, pH 3 a 6), tampão fosfato de sódio (0,05M, pH 7 e 8) e tampão borato (0,05M, pH 9). A atividade da xilanase foi determinada a 50°C e expressa como atividade relativa (%), tendo como 100% o maior valor obtido.

A mesma diluição foi necessária para os ensaios da estabilidade na faixa de pHs. As amostras foram incubadas em banho Maria a 50°C por 5h, e em intervalos de 1h alíquotas foram retiradas e realizadas à determinação da atividade enzimática. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática determinada antes da incubação.

2.4.3 Efeito dos sais metálicos

Foram avaliados os efeitos dos sais metálicos $MgCl_2$, $Pb(C_2H_3O_2)_2$, $CaCO_3$, $MnSO_4$, $CoCl_2$, $CuSO_4$, $Zn(C_2H_3O_2)_2$, $Al(NO_3)_3$, Na_2CO_3 , na atividade da xilanase. Os ensaios foram realizados incubando o extrato enzimático em tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8), juntamente com os sais na concentração de 2 mmol/L por 30 minutos, em temperatura de 50°C seguido da determinação da atividade de xilanase. A atividade enzimática é expressa como atividade relativa (%), admitindo como 100% a atividade de xilanase obtida utilizando se apenas o extrato enzimático bruto.

2.5 Aplicação do extrato bruto enzimático na sacarificação de resíduos lignocelulósicos

A xilanase contida no extrato enzimático bruto produzido por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 foi aplicada na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, casca de do fruto do cacau e sabugo de milho. O meio reacional consistiu em 0,05g de resíduo, 5 mL do extrato enzimático bruto e 5 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M, pH 4,8). Para controle foram utilizados 0,05g do resíduo sem adição do extrato enzimático bruto. A sacarificação foi realizada em banho Maria incubador com movimento orbital circular (501-D; Ethiktechnology, Vargem Grande Paulista, Brasil) (a 50 °C por 360 min, sendo retiradas alíquotas em intervalos de 1h min para estimar a quantidade de açúcares redutores liberados (Miller, 1959) com base em uma curva padrão de glicose (0 a 1 $\mu\text{mol/mL}$).

2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados e a elaboração dos gráficos foram realizadas utilizando o Software STATISTICA[®] v. 12.0 (Statsoft, EUA).

3 Resultados e discussão

3.1 Otimização da mistura de resíduos

Selecionar adequadamente os substratos a serem utilizados na FES influencia diretamente na eficiência e na economia do processo (Nunes et al., 2020), e a utilização do Design de mistura permite identificar a proporção ideal de cada substrato, a influência das interações existentes, pois as respostas obtidas dependem diretamente deste comportamento. As interações entre as três matérias primas utilizadas (BC, CA e CC) na produção de xilanase por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 foram analisadas aplicando o Design simplex centróide, com matriz totalizando 12 experimentos e três repetições do ponto central. Uma análise realizada preliminarmente permitiu observar que o fungo conseguiu secretar a enzima em todas as combinações das variáveis a que foi exposto (Tabela 1). Nenhuma fonte externa de nitrogênio, carbono ou sais minerais, foi adicionada o que demonstra a capacidade do micro-organismo de desenvolver-se em diferentes tipos de substratos e do potencial comprovado do gênero em excretar enzimas hidrolíticas (De Oliveira et al., 2019, Melnichuk et al., 2020). Estes resultados das atividades enzimáticas da matriz do planejamento podem ser vistos na tabela 1 e são referentes à média obtida dos ensaios enzimáticos da xilanase, realizados em triplicata.

Os resultados obtidos foram analisados e o modelo especial cúbico foi o modelo que mais se ajustou à produção da enzima, o nível de confiança de acordo com o teste F. A partir da Análise de variância – ANOVA (Tabela 3), foi possível avaliar que a regressão foi

significativa e o coeficiente de determinação (R^2) de 0,834. Com o teste F foi possível observar que o modelo não apresentou falta de ajuste, a função resposta adequou-se aos dados experimentais demonstrando que o modelo estatístico pode ser usado para prever a produção de xilanase por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 durante a FES nos três substratos analisados.

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

Fonte de variação	SS	Df	MS	Fcalculado	Ftabelado*	p-value	R^2
Regressão	29,84	6	4,97	4,21	3,40	0,068	0,834
Erro total	5,90	5	1,18				R^2 ajustado
Total	35,74	11	3,25				0,636

Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), coeficiente de determinação (R^2).

*Nível de confiança de 90% ($p = 0,10$).

Através da análise do gráfico de Pareto (Figura 1a) é possível analisar os efeitos padronizados e observar que todos componentes apresentaram efeitos significativos, sendo o cacau o de maior efeito, seguido da cana e do arroz e as interações entre os componentes não foram significativos. Este gráfico foi gerado com um significado estatístico para $p < 0,10$. A maximização da produção enzimática foi encontrada através da análise do gráfico de contorno (Figura 1b) que foi gerado com o auxílio do Software STATISTICA® v. 12.0 (Statsoft, EUA), considerando o modelo adequado.

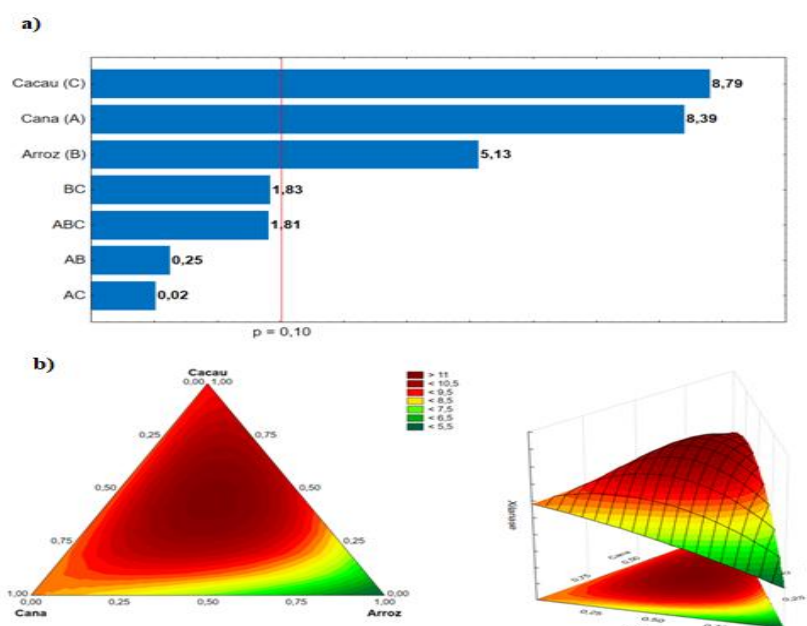


Figura 1: (a) Efeitos padronizados para fatores investigados (Gráfico de Pareto). (b) Gráfico de contorno e superfície obtidos a partir do modelo especial cúbico.

De acordo com a figura 1b, a região de produção máxima de xilanase é encontrada com a mistura de 50% de casca do fruto do cacau, 25% de bagaço de cana e 25% de casca de arroz, com o tempo de fermentação de sete dias, umidade inicial 60%, a 27 °C, com esporos de 10^7 de *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. Com essas condições, a atividade enzimática prevista foi 11,11 U/g, estas condições foram testadas e validadas pela realização dos experimentos em triplicata, onde foi possível encontrar uma atividade $10,85 \pm 0,184$ U/g. Este resultado representa um erro de aproximadamente 1,5%, valor que confirma o modelo matemático. O gráfico de contorno da atividade enzimática em função dos três substratos é construído a partir da equação (2) que ilustra a interação entre eles.

$$\text{Xilanase} = 752\text{CC} + 9,720\text{BC} + 10,00\text{CA} - 9,094*\text{BC}* \text{CA} + 0,974*\text{CA}* \text{CC} + 55,6776*\text{BC}* \text{CA}* \text{CC} + 0.$$

Neste trabalho, a atividade de xilanase obtida aplicando as proporções de mistura determinadas pelo planejamento, representou aumento de 22,05%, 117% e 11,85% em relação às atividades encontradas ao testar individualmente o bagaço de cana (8,89 U/g), a casca de arroz (5,0 U/g) e a casca do fruto de cacau (9,7 U/g), respectivamente, reforçando a eficiência do planejamento estatístico.

Outros estudos utilizando Design centróide simplex também apresentaram bons desempenhos de produção enzimática após aplicação das proporções determinadas pelo modelo, Castro et al. (2013) trabalharam com *Aspergillus oryzae* na produção de protease e α -amilase, utilizando o para avaliar os efeitos sinérgicos e antagônicos das diferentes proporções binárias e ternárias de farelo de trigo, farelo de soja e farelo de algodão. Os autores observaram observados efeitos sinérgicos que elevaram até 106,1% à produção de protease e 58,9% a produção de α -amilase na mistura binária de farelo de trigo e de soja em relação à produção com os resíduos isolados, e efeitos antagônicos quando o farelo de algodão foi adicionado à mistura. Filipe et al. (2019) utilizaram o Desing Centróide-Simplex para avaliar os efeitos sinérgicos do bagaço de azeitona bruto em combinações com o bagaço de azeitona já esgotado, brotos de videira e bagaço de uva na produção de xilanase, celulase e β -glicosidase por *Aspergillus niger* e *Aspergillus ibericus*. Quando aplicaram as proporções que o modelo sugeriu foi possível alcançar uma produção enzimática muito alta, alcançando níveis de até 316% de produção de xilanase por *Aspergillus niger* com relação à produção deste com o bagaço de uva apenas. Mandari et al. (2019) otimizaram as concentrações de *Prosopis juliflora*, cascas de gramíneas vermelhas e torta de semente de algodão para a produção de lipase por *Aspergillus niger* MTCC 872 utilizando o Design Centróide-Simplex,

conseguiram observar um aumento de 1,47% na atividade aplicando as combinações que o modelo sugeriu em relação à atividade utilizando apenas as cascas de gramíneas vermelhas. Nunes et al. (2020) utilizaram o Design Centróide-Simplex na produção de exoglucanase por *P. roqueforti* ATCC 10110, utilizando sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e casca da amêndoa do cacau e obtiveram aumentos de 146%, 172% e 217%, respectivamente. No entanto Papadaki et al. (2020) otimizaram a produção simultânea de várias enzimas por *A. niger* B60, dentre elas a xilanase, aplicando o design simplex centróide, porém a mistura dos resíduos bagaço de uva branca, bagaço de uva roxa e farelo de trigo não proporcionou bons resultados em relação à atividade da xilanase, pois com as proporções indicadas pelo modelo houve ou uma redução de 42,47% em relação à atividade obtida apenas com o resíduo de farelo de trigo, demonstrando a não eficiência do planejamento estatístico aplicado neste caso.

3.2 Otimização dos parâmetros fermentativos

Um planejamento Box-Behnken foi aplicado para investigar as melhores condições das variáveis, temperatura, umidade inicial e tempo de incubação na obtenção da xilanase. As condições aplicadas neste planejamento, bem como os resultados obtidos a cada experimento podem ser encontrados na tabela 2. Os valores de atividade enzimática são correspondentes à média dos ensaios de atividade realizados em triplicata. É possível observar que em todas as combinações de variáveis houve produção enzimática, o que pode ser explicado observando a característica fibrosa dos materiais utilizados (Ferraz et al., 2019; Souza et al., 2018), o que influencia na indução do fungo a excretar a xilanase. Outra explicação possível é a grande capacidade de desenvolvimento que o gênero estudado apresenta bem como, sua fácil adaptação a condições adversas (De Oliveira et al., 2019).

Os dados da tabela foram submetidos à avaliação matemática e é possível observar pela ANOVA, que o modelo quadrático obtido apresentou uma regressão bastante significativa e com boa capacidade preditiva, apresentando um R^2 de 0,963 e o R ajustado de 0,898, sendo estes bons parâmetros de avaliação. Através da observação dos valores no teste F é possível ver que o valor do F calculado é maior que o do F tabelado mostrando que o modelo não apresentou falta de ajuste.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático

Fonte de variação	SS	Df	MS	Fcalculado	Ftabelado*	p-value	R ²
Regressão	126,58	9	14,06	14,70	4,77	0,004	0,963
Falta de ajuste	4,50	3	1,50	10,48	19,16	0,088	
Erro puro	0,29	2	0,14				R ² ajustado
Total	131,37	14					0,898

Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), coeficiente de determinação (R²).

*Nível de confiança de 95%.

O gráfico de Pareto (figura 2a) foi gerado com $p < 0,05$, nele é possível observar o efeito de cada fator na produção da enzima, de acordo com o gráfico (figura 2a) o tempo e a umidade foram as variáveis que apresentaram maior efeito, sendo o tempo um efeito negativo e a umidade um efeito positivo, ou seja, a redução para o fator tempo aumenta a resposta e para umidade o aumento do fator é quem aumenta a resposta. Para a temperatura o termo quadrático não foi significativo, pois se posiciona anterior a linha horizontal desenhada que delimita o nível de confiança de 95% e uma menor temperatura influencia no aumento da resposta.

Reis et al. (2020) obtiveram resultado semelhante quando aplicaram o planejamento Box-Behnken no estudo da produção de xilanase por *A. oryzae* ATCC 10124 pela FES da casca da amêndoa do cacau, onde observaram que o tempo também foi o fator de maior influencia na produção enzimática. Ferraz et al. (2019) aplicaram o Box-Behnken para avaliar os fatores de maior influencia na produção de xilanase por *P. roquefortii* ATCC 10110 em resíduo de cajá e observaram que o tempo também foi o fator de maior influência. Este efeito do tempo pode estar relacionado com a disponibilidade de macro e micronutrientes no processo de fermentação (Santos et al., 2016). Inicialmente se apresenta uma produção reduzida, pois ainda está ocorrendo o processo de crescimento dos fungos, tendo um aumento significativo pelo aproveitamento dos nutrientes presentes e decai pelo esgotamento destes no fim do período fermentativo (Ferraz et al., 2019).

Os gráficos de contorno dispostos na figura 2(b, c e d) ilustram também os efeitos dos fatores e suas interações. Outro fator de grande influência foi a umidade inicial, a qual exerce muita influência nos processos fermentativos para a formação de produtos, pois qualquer alteração do valor ótimo de umidade para atuação do microorganismo afeta diretamente a produção enzimática (Ferraz et al., 2019). Neste trabalho o valor ótimo de umidade se concentrou na região central com 55% como o valor ótimo de atuação do fungo

para produção de xilanase, apresentando redução quando exposto aos níveis extremos de umidade. Resultado semelhante foi encontrado por Souza et al. (2018), observando que a produção de xilanase por *P. roquefortti* ATCC 10110 aumentou quando a umidade inicial se concentrou na faixa de 55 – 70%. Níveis de umidade fora do ideal podem influenciar na disponibilidade dos nutrientes e nas trocas de oxigênio.

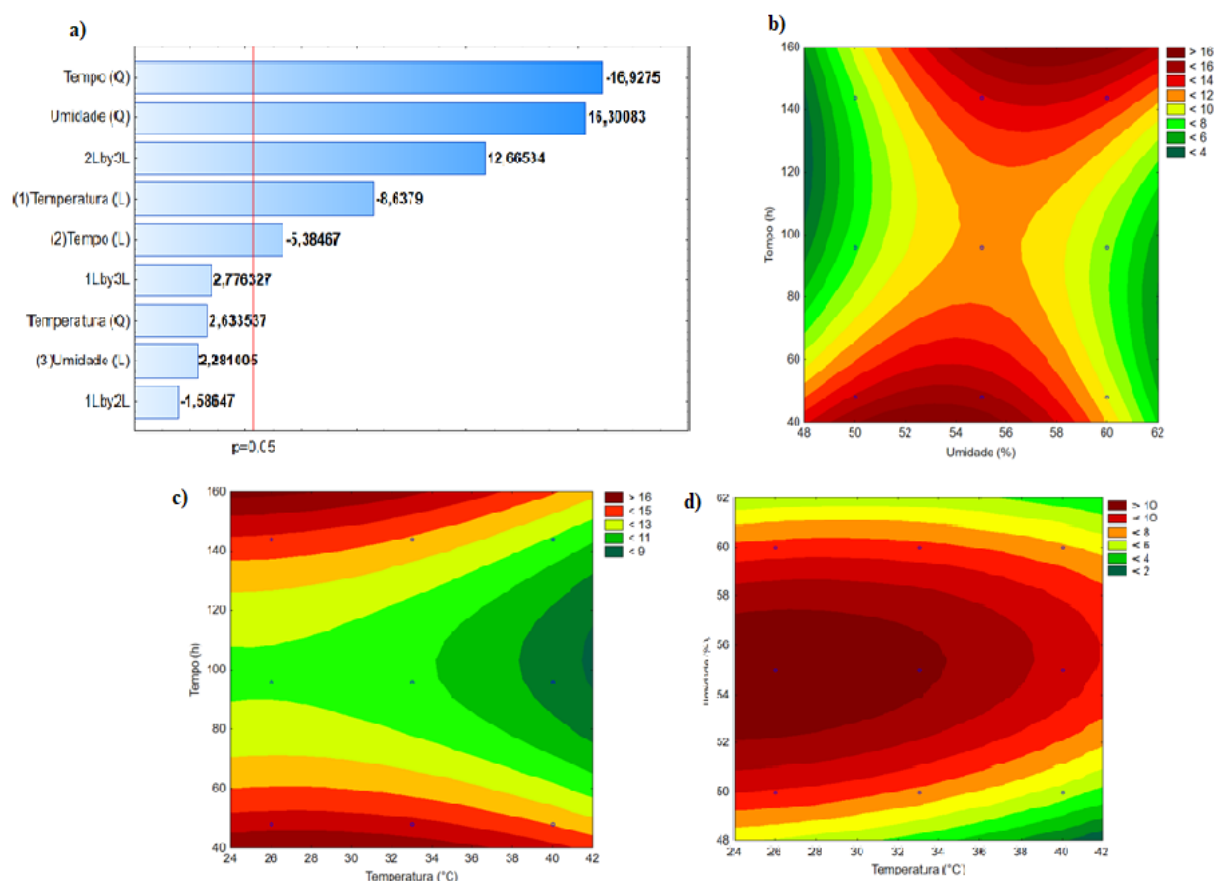


Figura 2. (a) Efeitos padronizados para fatores investigados (Gráfico de Pareto). (b) Gráfico de contorno (temperatura). (c) Gráfico de contorno (tempo). (d) Gráfico de contorno (umidade).

Como resultado o modelo indicou a otimização em 25 °C de temperatura, 100 horas e 55% de umidade inicial, com uma atividade prevista de 11,88 U/g. Uma validação ponto ótimo indicado pelo modelo foi realizada em triplicata, os resultados foram analisados e a média resultou numa atividade de $12,15 \pm 0,77$ U/g, no ponto ótimo indicado, o que representa um aumento de 11,98% em relação à atividade obtida sem a otimização dos fatores, o que indica que o modelo é confiável para prever a produção de xilanase por *A. oryzae* ATCC 10124, em mistura de BC, CA e CC. A eficiência deste tipo de planejamento também foi registrada por Brito et al. (2017) aplicaram o planejamento Box-Behnken na produção de endoglucanase por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 na fermentação de casca de

arroz e casca de amendoim, para estudo das variáveis temperatura, tempo de fermentação e umidade inicial, o modelo gerado pelo planejamento apontou condições ótimas para a casca de arroz que permitiu obter uma atividade experimental de 17,2 U/g e nas condições ótimas da casca de amendoim foi possível obter 42,9 U/g de atividade. Ferraz et al. (2019) otimizaram a produção de xilanase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em fermentação de resíduos de cajá, estudando as variáveis Tempo de fermentação, temperatura e umidade inicial, alcançando um valor de atividade enzimática experimental de 14.03 U/g nas condições que o modelo sugerido pelo planejamento indicou. Oliveira et al. (2019) estudaram a influencia das variáveis atividade de água, tempo de incubação e temperatura de fermentação, na produção de endoglucanase pela ação do *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 em farelo de cacau.

3.3 Caracterização bioquímica

3.3.1 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da enzima

O estudo referente ao comportamento da enzima em relação à temperatura é de extrema importância, dado a influência que este fator exerce na atividade enzimática. O comportamento enzimático foi analisado em diferentes temperaturas conforme (Figura 3a), onde podemos observar que a maior atividade foi alcançada na temperatura de 60°C, apresentando declínio acentuado quando esta foi elevada. Segundo Gupta et al. (2019) o gênero *Aspergillus* é pertencente a classe dos fungos mesófilos, ou seja, dos que geralmente produzem enzimas com temperatura ótima entre 30 e 50°, a exemplo de Bhardwaj et al. (2019) que caracterizaram uma xilanase clonada de *Aspergillus oryzae* LC1 em *Escherichia coli* BL21(DE3) encontrando 30°C como temperatura ótima, o que difere do resultado obtido neste estudo. Resultados similares de xilanases com temperatura ótima nessa faixa é descrito por Ang et al. (2013) que caracterizaram a xilanase produzida por *Aspergillus fumigatus* SK1 e encontraram 60°C como temperatura ótima e por Ferraz et al. (2018) que realizaram a caracterização da xilanase produzida por *Penicilium roqueforti* ATCC 10110 e também obtiveram 60°C como resultado.

A termoestabilidade foi avaliada nas temperaturas 50, 60, 70 e 80°C em incubação por 5 horas, como é possível observar (Figura 3b), que a xilanase apresentou estabilidade maior dentro das primeiras 3h de incubação em todas as temperaturas, permanecendo com atividade residual de 50% ao final da 5h a 50°C, e reduzindo a menos que 50% nas outras temperaturas a partir de 4h de incubação, porém mantendo alguma atividade residual. Essa

observação sugere que a enzima pode ser considerada termooestável por conseguir apresentar atividade em altas temperaturas por um período considerado de tempo.

Bhardwaj et al. (2018) ao realizarem o estudo da termooestabilidade da xilanase de *Aspergillus oryzae* LC1 encontraram resultados semelhantes, com atividades residuais maiores que 50% ao final do período de incubação na temperatura de 50°C, assim como puderam observar um declínio da atividade residual enzimática a partir de 4h de incubação para as temperaturas de 60 e 70°C. Resultado que semelhante encontrado por Bhardwaj et al. (2019) com a enzima xilanase de *Aspergillus oryzae* LC1 clonada em *Escherichia coli* BL21(DE3) que apresentou atividade residual de 55% até o fim do estudo a 50°C e redução a baixo de 50% para as demais temperaturas a partir de 4h de incubação.

3.3.2 Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado na faixa de 3 a 9 (Figura 3c). A máxima atividade enzimática foi observada no pH 7,0, sendo as menores atividades registradas (pHs 3,0 e 9,0) ficaram em torno de 50% em relação ao pH 7,0. Este comportamento permite classificar essa xilanase como alcalina. É comum encontrar registros diferentes do encontrado neste estudo, os pHs citados como ótimo para xilanases do gênero *Aspergillus* ficam em torno de uma faixa de 3,0 a 6,0 (Gupta et al., 2019), como é o caso da xilanase produzida por *Aspergillus oryzae* LC1 descrita por Bhardwaj et al. (2018) que apresenta pH 5,0 como seu ótimo e de Ang et al (2013) que obteve pH 4,0 como ótimo para xilanase de *Aspergillus fumigatus* SK1.

A estabilidade foi avaliada na faixa de pH 3 a 9 (Figura 3d) por 5 h, a xilanase de apresentou estabilidade em todas as faixas de pHs, sendo as melhores nos pHs de 7, 8 e 9, apresentando manutenção de 100% de atividade nas três primeiras horas em pH 7, e de 90% até o final das 5h em pH 8, confirmando assim a característica alcalina da xilanase produzida por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124.

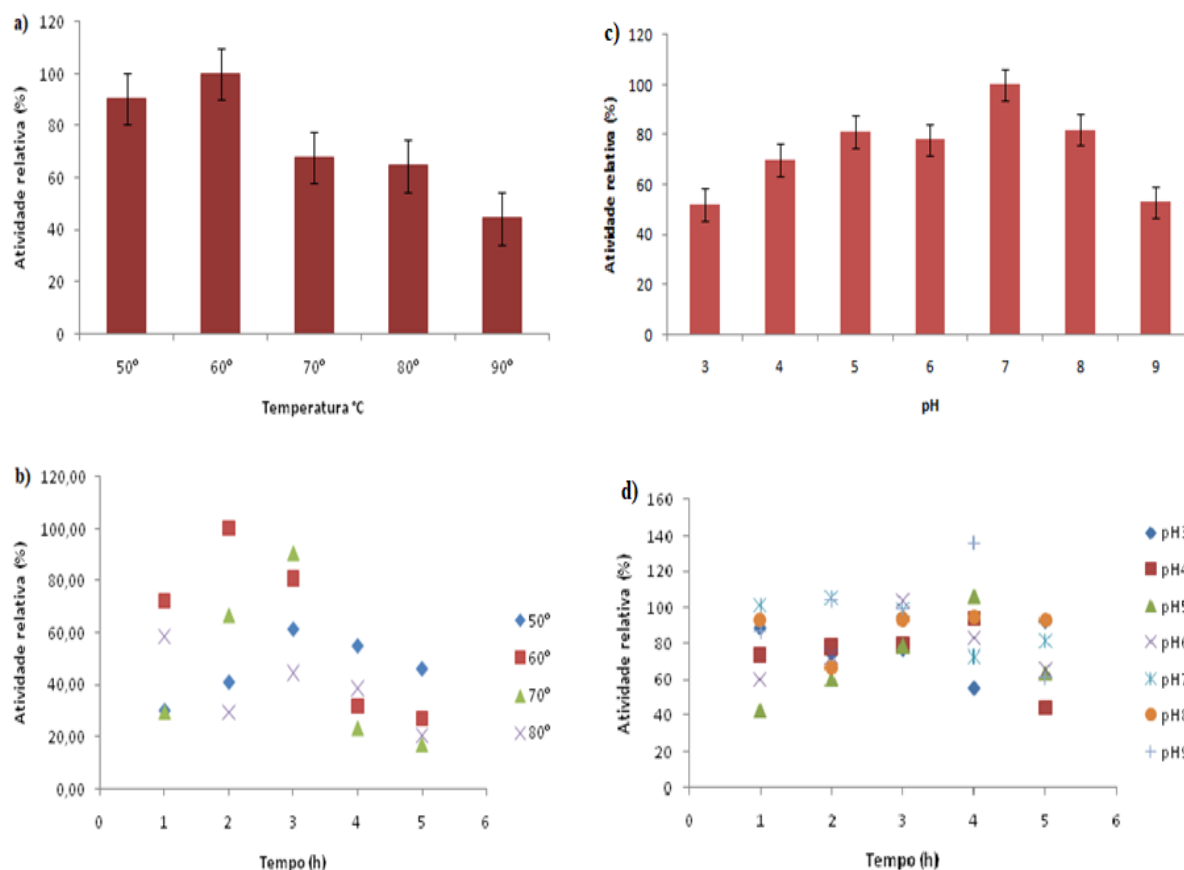


Figura 3 - **(a)** Atividade de xilanase obtida em diferentes temperaturas (a atividade mais alta obtida em 60 °C foi tomada como 100%). **(b)** Perfil de termoestabilidade de xilanase (as atividades obtidas no tempo 0 h foram tomadas como 100%; condições de reação: pH: 4,8; tempo: 10 min). **(c)** Atividade de xilanase obtida em diferentes pHs (d) atividade mais alta obtida em pH 7 foi tomada como 100). **(d)** Perfil de estabilidade ao pH de xilanase (as atividades obtidas no tempo 0 h foram tomadas como 100%; condições de reação: temperatura 50°C; tempo: 10 min).

3.3.3 Efeito dos sais metálicos

Foram avaliados o efeito de 9 sais metálicos diferentes na atividade da enzima xilanase (Tabela 5) dentre eles apenas um apresentou efeito positivo o CuSO_4 . Os demais apresentaram efeito negativo chegando a redução de quase 50% da atividade enzimática na presença de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ e MnSO_4 . Algumas enzimas podem reagir positivamente à presença de metais, pois, estes podem atuar como cofatores, ou podem agir reversivelmente com a formação de complexos que não são ativos (Ferraz et al. 2018), o que pode ter ocorrido neste caso com a enzima e os metais estudados.

Tabela 5 - Atividade de xilanase de *A. oryzae* ATCC 10124 frente a diferentes sais metálicos e compostos orgânicos (a atividade obtida utilizando o extrato xilanolítico bruto sem aditivos foi tomada como 100% - controle; condições de reação: concentração de aditivos: 2 mM; temperatura: 50°C; pH: 4,8; tempo: 10 min). Os experimentos foram realizados em duplicata.

Atividade Relativa (%)	
Controle	100
MgCl ₂	68,37
CaCO ₃	85,46
(CH ₃ COO) ₂ Zn	77,18
Al(NO ₃) ₃	52,33
CuSO ₄	106,26
Na ₂ CO ₃	63,79
CoCl ₂	83,26
(CH ₃ COO) ₂ Pb	61,76
MnSO ₄	53,30

Comportamento semelhante foi observado por Souza et al. (2018), onde em sua comparação de xilanase produzida por *P. roquefortti* ATCC 10110 com xilanase comercial observou que a presença dos metais também inibia a atividade desta xilanase comercial. Ferraz et al. (2019) também estudaram o comportamento da enzima xilanase obtida pela ação do fungo *P. roquefortti* ATCC 10110 por FES em resíduo de cajá e observaram efeito bastante positivo ao adicionarem MnSO₄, chegando a apresentar atividade 40% maior que aquela obtida sem a adição do metal, de modo contrário foi observado que a adição de CuSO₄ ocasionou redução que quase 50% na atividade da xilanase, resultado que difere do observado neste estudo onde o aumento de atividade ocorreu apenas na adição de CuSO₄, correspondendo a um aumento de apenas 6% na atividade.

3.5 Sacarificação de resíduos agroindustriais

O extrato enzimático bruto foi aplicado na sacarificação de cinco resíduos, bagaço de cana, casca de arroz, casca do fruto do cacau, casca de amendoim e palha de milho. Os resultados dispostos na figura 5 demonstram que a enzima xilanase foi capaz de sacarificar todos os resíduos a que foi exposta. Esses resultados podem estar relacionados com a taxa de concentração de hemicelulose nos materiais, além do fator da utilização de um extrato enzimático bruto, o que permite um sinergismo entre a xilanase e outras enzimas (Ferraz et

al., 2017) aumentando a eficiência no resultado da sacarificação dos resíduos. A casca do fruto do cacau foi o resíduo que apresentou os melhores resultados com a maior produção de açúcares redutores, chegando a 994,33 mg/g em 5h de sacarificação, caindo consideravelmente o rendimento nas horas seguintes. A sacarificação da casca de amendoim, palha de milho, casca de arroz e bagaço de cana de açúcar resultaram na produção de 586,73 mg/g, 587,73 mg/g, 382,90 mg/g e 388,99 mg/g respectivamente como seus maiores índices.

O uso de xilanases associadas a celulases em processos de sacarificação apresenta grande eficiência, pois pode melhorar significativamente os rendimentos da sacarificação de resíduos lignocelulósicos, justamente por aumentar a acessibilidade da celulase, removendo o revestimento de xilana (Mukasekuru et al., 2020). Procedimento semelhante pode ocorrer na utilização do extrato bruto que contém xilanase e possivelmente celulases. Ferraz et al. (2017) utilizaram xilanase bruta de *P. roquefortii* ATCC 10110 na sacarificação de vários resíduos agroindustriais, tendo como melhor resíduo a ser sacarificado o bagaço de cana de açúcar apresentando 259,45 mg/g como produção maior de açúcares redutores após 4h de sacarificação. Prajapati et al. (2020) utilizaram coquetel enzimático contendo xilanase de *Aspergillus tubingensis* na sacarificação do bagaço de cana de açúcar, obtendo um total de 165mg/g de açúcares redutores. Sharma et al., (2017) aplicou xilanase de *A. terreus* S9 na sacarificação de palha de arroz pré-tratada com ácido a 1% e obteve 406,98 mg/g de açúcares reduzidos. É importante salientar que os valores aqui descritos foram obtidos sem aplicação de nenhum tipo de pré-tratamento.

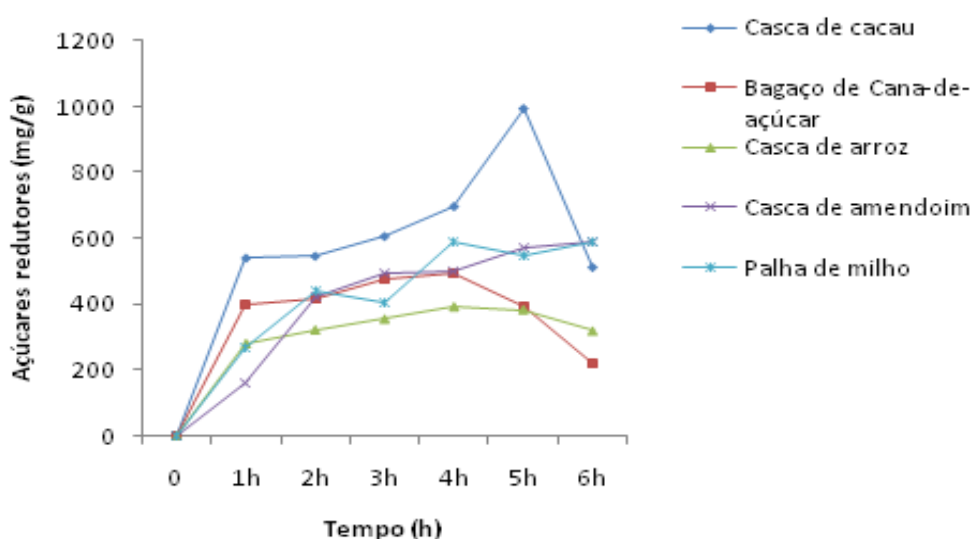


Figura 4 - Sacarificação de Casca do fruto de cacau, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de arroz e casca de amendoim empregando xilanase bruta produzida por

Aspergillus oryzae ATCC 10124. A sacarificação foi realizada em 50°C, pH 4,8, a 120 rpm por 6 h, utilizando uma carga de substrato de 1% e uma carga enzimática de 130 UI/g de substrato seco. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4 Conclusão

A produção de xilanase utilizando mistura dos resíduos, bagaço de cana de açúcar, casca de arroz e casca do cacau pela ação de *A. oryzae* ATCC 10124 é promissora. A xilanase produzida apresentou características alcalinas e termoestáveis até 60 °C de temperatura. A aplicação do extrato bruto enzimático resultou na sacarificação de todos os resíduos a que foi exposto, apresentando valores altos de produção de açúcares redutores sem aplicação de nenhum tipo de pré-tratamento nos resíduos, e sem adição de ativadores, demonstrando a eficiência da xilanase produzida.

5 Referências

- Amorim, G.M., Oliveira, A.C., Gutarra, M.L.E., Godoy, M.G. Freire, D.M.G., 2017. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal, Biocatal. Agric. Biotechnol. 11, 34-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.05.009>
- Ang, S. K., Shaza, E.M., Adibah Y., Suraini A.A., Madihah, M.S., 2013. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. Process. Biochem, 48, 1293–1302. doi:10.1016/j.procbio.2013.06.019
- Bezerra, M.A., Lemos, V.A., Novaes, C.G., de Jesus, R.M., Filho, H.R.S., Araújo, S.A., Alves, J.P.S. 2020. Aplicação do projeto de mistura em química analítica. Microchem J, 152, 104-336. doi: 10.1016 / j.microc.2019.104336
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agarwal, K., Chaturvedi, V., Verma, P. 2018. Purification and characterization of a thermo-acid/alkali stable xylanases from *Aspergillus oryzae* LC1 and its application in Xylo-oligosaccharides production from lignocellulosic agricultural wastes. Int. J. Biol. Macromol. 122, 1191-1202. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.09.070
- Bhardwaj, N., Verma, V.K., Chaturvedi, V., Verma, P., 2019. Cloning, expression and characterization of a thermo-alkali-stable xylanase from *Aspergillus oryzae* LC1 in *Escherichia coli* BL21(DE3). Protein Expr. Purif. 168, 105551. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105551>

Brito, A.R.; Reis, N.S.; Bonomo, F.C.R.; Uetanabaro, T. P. A.; Assis, S.A.; Silva, P.G.E.; Águiar-Oliveira, E.; Oliveira, R.J. 2017. Comparison between the univariate and multivariate analysis on the partial characterization of the endoglucanase produced in the solid-state fermentation by *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. Prep Biochem Biotech, 47, 977-985, .doi: 10.1080/10826068.2017.1365247

Castro, R.J.S., Sato, H.H. 2013. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. Ind Crops Prod, 49, 813-821. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.002>

Costa, J.A.V., Treichel, H., Kumar, V., Pandey, A. 2018 Advances in Solid-State Fermentation. In: Wong, J.W.C., Tyagi, R.D., Pandey, A. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, 1, 1–17. doi:10.1016/b978-0-444-63990-5.00001-3

De Oliveira, R.L., Da Silva, M.F., Converti, A., Porto, T.S. 2019. Production of β -fructofuranosidase with transfructosylating activity by *Aspergillus tamarii* URM4634 Solid-State Fermentation on agroindustrial by-products. Int. J. Biol. Macromol. 144, 343-350. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.084

Ezeilo U.R., Lee, C.T., Huyop, F., Zakaria, I.I., Wahab, R.A. 2019. Raw oil palm frond leaves as cost-effective substrate for cellulase and xylanase productions by *Trichoderma asperellum* UC1 under solid-state fermentation. J Environ Manage, 243, 206-217, <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.113>.

Ferraz, J.L.A.A, Souza, L.O., Soares, G.A., Coutinho, J.P., de Oliveira, J.R., Aguiar-Oliveira, E., Franco, M., 2017. Enzymatic saccharification of lignocellulosic residues using cellulolytic enzyme extract produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 cultivated on residue of yellow mombin fruit, Bioresour. Technol. 248, 214-220. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.048>

Ferraz, J.L.A., Souza L.O., Fernandes, A.G.A., Ferreira, M.L.O., Oliveira, J.R., Franco. M. 2019. Optimization of the solid-state fermentation conditions and characterization of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 using yellow mombin residue (*Spondias mombin* L.). Chem Eng Commun 206, 1–12. <https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1572000>

Ferreira, S.L., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandão, G.C., da Silva, E.G., Portugal, L.A, dos Reis, P.S, Souza, A.S., dos Santos, W.N. 2007. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta*. 597, 179-86. doi: 10.1016/j.aca.2007.07.011. Epub 2007 Jul 23. PMID: 17683728.

FERREIRA, S. L. C. Introdução às técnicas de planejamento de experimentos. Salvador: Vento Leste, 2015.

Filipe, D., Fernandes, H., Castro, C., Peres, H., Oliva- Teles, A., Belo, I., Salgado, J. M. 2019. Improved lignocellulolytic enzyme production and antioxidant extraction using solid- state fermentation of olive pomace mixed with winery waste. *Biofuel Bioprod Bior*. 14, 78-91. doi:10.1002/bbb.2073

Garcia, D.J., Lovett, B.M., You, F. 2019. Considering agricultural wastes and ecosystem services in Food-Energy-Water-Waste Nexus system design. *J. Clean. Prod*. 228, 941-955. doi:10.1016/j.jclepro.2019.04.314

Ghose, T., Bisaria, V.S., 1987. Measurement of hemicellulase activities. Part 1: Xylanases. *Pure Appl. Chem*. 591, 739-52. DOI: 10.1351/pac198759121739

Gupta P.K., Choudhary, S. Chandrananthi, C. Sharon Eveline, J., Sushmitha, S.P., Hiremath L., Srivastava A.K., Kumar S.N. 2019 Fungal Biodiversity Producing Xylanase Enzymes Involved in Efficient Uses of Xylanolysis. In: Naraian R. (eds) *Mycodegradation of Lignocelluloses. Fungal Biology*. Springer, Cham. 1, 51-63. DOI: 10.1007/978-3-030-23834-6_4

Hashemi, S.S., Karimi, K., e Karimi, M.A. 2019. Ethanolic ammonia pretreatment for efficient biogas production from sugarcane bagasse. *Fuel*, 248, 196–204. doi:10.1016/j.fuel.2019.03.080

Intasit, R., Cheirsilp, B., Louhasakul, Y., Boonsawang, P., Chaiprapat, S., Yeesang, J. 2019. Valorization of Palm Biomass Wastes for Biodiesel Feedstock and Clean Solid Biofuel through Non-sterile Repeated Solid-State Fermentation, *Bioresour. Technol*. 298, 122551. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122551>

Irfan, M.; Nadeem, M.; Syed, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IRO5 in solid state fermentation. J. Radiat. Res. Appl. Sci. 7, 317-326. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.04.004>

Irfan, M., Asghar, U., Nadeem, M., Nelofer, R., Syed, Q., Shakir, HA, Qazi, JI 2016. Otimização estatística da sacarificação de palha de trigo pré-tratada com álcali para produção de bioetanol. Waste Biomass Valorization, 7, 1389–1396. doi: 10.1007 / s12649-016-9540-2

Lessa, O.A.; Reis, N.S.; Leite, S.G.F.; Gutarra, M.L.E.; Souza, A.O. Gualberto, S.A.; Oliveira, J. R.; Aguiar, O. E.; Franco, M. 2017. Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. Food Sci. Biotechnol. 27, 1-8. doi: 10.1007/s10068-017-0196-x

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. Nature, 438, 1157–1161. 2005. doi:10.1038/nature04300.

Machida, M., Yamada, O., Gomi, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. DNA Res., 15, 173-183. 2008. doi:10.1093/dnares/dsn020

Mandari, V., Nema, A., Devarai, S.K. 2019. Sequential optimization and large scale production of lipase using tri-substrate mixture from *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid state fermentation. Process Biochem. 89, 46-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.026>

Marques, G. L., dos Santos Reis, N., Silva, T.P., Ferreira, M.L.O., Aguiar-Oliveira, E., de Oliveira, J.R., & Franco, M. 2017. Production and Characterisation of Xylanase and Endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through the Solid-State Fermentation of Rice Husk Residue. Waste Biomass Valorization 9, 2061–2069. doi:10.1007/s12649-017-9994-x

Melnichuk, N., Braia, MJ, Anselmi, PA, Meini, M.-R., & Romanini, D. 2020. Valorização de dois resíduos agroindustriais para produção da enzima alfa-amilase de *Aspergillus oryzae* por fermentação em estado sólido. Waste Manage. 106, 155-161. doi: 10.1016 / j.wasman.2020.03.025

Moreira, L. R. S., Filho, E. X. F. Insights in to the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5205–5214. 2016. doi: 10.1007/s00253-016-7555-z

Menezes, L. H. S., Carneiro, L. L., Maria de Carvalho Tavares, I., Santos, P. H., Pereira das Chagas, T., Mendes, A. A., ... Rangel de Oliveira, J. 2020. Artificial neural network hybridized with a genetic algorithm for optimization of lipase production from *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31. 101885. doi:10.1016/j.bcab.2020.101885

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31, 426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030

Mukasekuru, M.R., Kaneza, P., Sun, H., Sun, F. F., He, J., Zheng, P. 2020. Fed-batch high-solids enzymatic saccharification of lignocellulosic substrates with a combination of additives and accessory enzymes. *Ind Crop Prod*, 146, 112156. doi:10.1016/j.indcrop.2020.112156

Nalini, S., Parthasarathi, R. 2018. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium* wilt of eggplant. *Ann. Agrar. Sci.* 16, 108–115. doi:10.1016/j.aasci.2017.11.002

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. 2020. Production and biochemical characterization of halotolerant β -glucosidase by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 grown in forage palm under solid-state fermentation. *Biomass Convers. Biorefin.* 11, 1-12. doi:10.1007/s13399-020-00930-8

Nunes, N.S., Carneiro, L.L., Menezes, L.H.S., et al. 2020. Projeto Simplex-Centroid e Rede Neural Artificial-Algoritmo Genético para Otimização da Produção de Exoglucanase por *Penicillium Roqueforti* ATCC 10110 Por Fermentação em Estado Sólido Usando Mistura de Resíduos Agroindustriais. *Bioenerg. Res.* 13, 1130–1143. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>

Oliveira, P.C., Brito, A.R., Pimentel, A.B., Soares, G.A., Pacheco, C.S.V., Santana, N.B., Silva, E.G.P., Fernandes, A.G. de A. Ferreira, M.L.O., Oliveira, J.R., Franco, M. 2019. Cocoa Shell for the Production of Endoglucanase by *Penicillium Roqueforti* ATCC 10110 in Solid State Fermentation and Biochemical

Properties. Rev Mex Ing Quim 18, 777-787.
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira>

Papadaki, E., Kontogiannopoulos, K.N., Assimopoulou, A. N., & Th. Mantzouridou, F. 2020. 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. Bioresour. Technol, 309, 123317. doi:10.1016/j.biortech.2020.123317

Prajapati, B.P., Jana, U.K., Suryawanshi, R.K., Kango, N. 2020. Sugarcane bagasse saccharification using *Aspergillus tubingensis* enzymatic cocktail for 2G bio-ethanol production. Renew. Energy. 152, 653-663. doi:10.1016/j.renene.2020.01.063

Reis, N. dos S., Lessa, O. A., Pacheco, C. S. V., Pereira, N. E., Soares, G. A., Silva, E. G. P., ... Franco, M. 2020. Cocoa shell as a substrate for obtaining endoglucanase and xylanase from *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. Acta sci., Technol. 42, 48211. doi:10.4025/actascitechnol.v42i1.48211

Rodríguez, P., Cerda, A., Font, X., Sánchez, A., Artola, A. 2019. Valorisation of biowaste digestate through solid state fermentation to produce biopesticides from *Bacillus thuringiensis*. Waste Management, 93, 63-71. doi:10.1016/j.wasman.2019.05.026

Sala, A., Artola, A., Sánchez, A., Barrena, R. 2019. Rice husk as a source for fungal biopesticide production by solid-state fermentation using *B. bassiana* and *T. harzianum*, Bioresour. Technol. 296, 122322. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122322>

Santos, T. C., Filho, G. A., Oliveira, A. C., Rocha, T. J. O., de Paula Pereira Machado, F., Bonomo, R. C. F., ... Franco, M. 2013. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the puple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. Food Sci. Biotechnol. 22, 1–7. doi:10.1007/s10068-013-0001-4

Santos, T. C. D., Diniz, G. A., Brito, A. R. D., Pires, A. J. V., Franco, M. 2015. Effect Of Solid State Fermentation on Nutritional Content and Evaluation of Degradability in Cactus Pear. Revista Caatinga, 28, 248–254. doi:10.1590/1983-21252015v28n328rc

Santos, T. C. dos.; Filho, G. A.; Brito, A. R.; Pires, A.J.V.; Bonomo, R.C.F.; Franco, M. 2016. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp.

by Solid State Fermentation of prickly pear. *Rev. Caatinga*, 29, 222-233. doi: 10.1590/1983-21252016v29n126rc.

Sharma, S., Bajaj, B. K. 2017. Xylanase production from a new strain of *Aspergillus terreus* S9 and its application for saccharification of rice straw using combinatorial approach. *Environ. Prog. Sustain. Energy*, 37, 1210–1219. doi:10.1002/ep.12779

Silva, T.P., Souza, L.O., Reis, N.S., Assis, S. A., Ferreira, M.L.O., Oliveira, J.R., Aguiar-Oliveira, E., Franco, M. 2017. cultivation of *penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. *Rev Mex Ing Quim.* 16, 745-756.

Singh, B. 2018. Rice husk ash. Waste and Supplementary Cementitious Materials in Concrete, 1, 417–460. doi:10.1016/b978-0-08-102156-9.00013-4

Souza, L.O., Brito, A.R., Bonomo, R.C.F., Santana, N.B., Almeida Antunes Ferraz, J.L. de, Araújo Fernandes, A. G. De, ...Franco, M. 2018. Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 16, 277-284. doi:10.1016/j.bcab.2018.08.016

Thomas, L., Parameswaran, B., Pandey, A. Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus* sp. for bioethanol production. *Renew. Energy*, 98, 9–15. 2016. doi:10.1016/j.renene.2016.05.011

Vásquez, Z.S., De Carvalho N.D.P., Pereira, G.V.M., Vandenberghe, L.P.S., De Oliveira, P.Z., Tiburcio, P.B., Soccol, C.R. 2019 Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Manag*, 90, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>