



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB CAMPUS DE
ITAPETINGA – BA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PRO-
GRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

**OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENDOGLUCANASE DE *Aspergillus
niger* PARA APLICAÇÃO DO BLEND ENZIMÁTICO NA SACARIFICAÇÃO
DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Autor: Fabiane Neves Silva
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

Itapetinga
BAHIA, BRASIL
Março de 2024

FABIANE NEVES SILVA

OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENDOGLUCANASE DE *Aspergillus niger* PARA APLICAÇÃO DO BLEND ENZIMÁTICO NA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Área de Concentração: Ciências de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Franco

ITAPETINGA
BAHIA-BRASIL
Março de 2024

660.634 Silva, Fabiane Neves.

S58o Otimização e caracterização de endoglucanase de *Aspergillus niger* para aplicação do blend enzimático na sacarificação de resíduos agroindustriais. / Fabiane Neves Silva. – Itapetinga-BA: UESB, 2024.

111f.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Área de Concentração: Ciências de Alimentos. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Marcelo Franco.

1. Fermentação em estado sólido. 2. Hidrólise enzimática - Enzima - Resíduos agroindustriais. 3. Resíduos agroindustriais – *Aspergillus niger*. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Franco, Marcelo. III. Título.

CDD(21): 660.634

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. *Aspergillus niger* – Blend enzimático – Resíduos agroindustriais

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENDOGLUCANASE DE *Aspergillus niger* PARA APLICAÇÃO DO BLEND ENZIMÁTICO NA SACARIFICAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS”

Autor (a): **FABIANE NEVES SILVA**

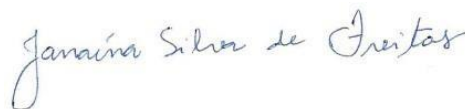
Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Franco

Coorientador (a): Prof. Dr. Igor Carvalho Fontes Sampaio

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTORA EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.



Prof. Dr. Nívio Batista Santana
UESB



Prof.^a Dr.^a Janaína Silva de Freitas
UESB



Prof.^a Dr.^a Jaci Lima Vilanova Neta
UESC



Prof. Dr. Igor Carvalho Fontes Sampaio
UESC



Prof. Dr. Marcelo Franco
Orientador - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 15 de março de 2024.

“O que temos que aprender a fazer,
aprendemos fazendo.”
Ralph Waldo Emerson

AGRADECIMENTOS

Hoje, com o coração cheio de gratidão e alegria, compartilho com vocês o término de uma jornada de quatro anos de doutorado. Foram anos de aprendizado, desafios e, especialmente, de reflexão sobre nossa vulnerabilidade como seres humanos. A pandemia nos mostrou o quanto é importante valorizar aqueles que nos apoiam em nossos sonhos.

Antes de tudo, quero expressar minha profunda gratidão a Deus, que me sustentou em todos os momentos em que pensei em desistir. Sem Sua força e orientação, eu não teria chegado até aqui.

Gostaria de dedicar este momento a expressar minha sincera gratidão a todos que contribuíram para o sucesso da minha tese. Esta é uma conquista que me traz imensa alegria, e reconheço que não teria sido possível sem o apoio e orientação de pessoas incríveis ao longo dessa jornada desafiadora.

Primeiramente, meu especial agradecimento ao meu orientador, o Prof. Dr. Marcelo Franco, cuja orientação sábia, paciência e até mesmo os “puxões de orelha” (que não foram poucos) foram fundamentais para o desenvolvimento e aprimoramento deste trabalho. Agradeço também aos colegas e grandes amigos do LABIOCAT que tornaram essa jornada mais leve com brincadeiras e risadas durante o dia a dia.

À minha querida família, incluindo meus pais (Marta e José Mário), meus irmãos (Fernanda, Fábio e Fabrícia), meus sobrinhos (Benício, Helena e Nathan), meu namorado (Thomás) e amigos, expressei meu profundo agradecimento. Seu apoio emocional e incentivo foram pilares essenciais para superar os desafios e manter o foco neste objetivo.

À UESB e UESC, minha gratidão por fornecerem o ambiente propício para meu desenvolvimento acadêmico e intelectual. Sinto-me honrada por fazer parte desta comunidade educacional.

À FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia), meu sincero agradecimento pelo apoio financeiro concedido, que foi crucial para a realização deste projeto.

Por fim, agradeço a cada um de vocês que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o sucesso desta jornada. Este é um marco significativo na minha vida acadêmica, e reconheço que cada um teve um papel fundamental nessa conquista.

Com gratidão,

Fabiane Neves Silva.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Geral	17
1.1.2 Específicos	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Fermentação em estado sólido.....	18
2.2 Matérias-primas	19
2.2.1 Casca da amêndoa de cacau	20
2.2.2 Casca de arroz.....	21
2.2.3 Palma forrageira.....	22
2.4 Parede celular vegetal.....	29
2.5 Hidrólise enzimática	31
2.5.1 Enzimas degradadoras da parede celular vegetal	33
2.5.2 Celulase.....	33
2.5.3 Endoglucanase	36
2.5.4 Exoglucanase.....	37
2.5.5 β-glicosidade.....	38
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
REFERÊNCIAS.....	40
CAPÍTULO 2	51
CAPÍTULO 3	95

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura do fruto do cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	18
Figura 2. Casca de arroz antes e após o processamento de moagem	20
Figura 3. Palma forrageira antes e após pré-tratamento de moagem.....	21
Figura 4. <i>Aspergillus niger</i> cultivado em meio PDA (Potato Dextrose Agar)	24
Figura 5. Morfologia representativa de espécies do gênero <i>Aspergillus</i>	25
Figura 6. Estrutura lignocelulósica colonizada por fungo <i>Aspergillus niger</i>	25
Figura 7. Estrutura da biomassa lignocelulósica contendo lignina, celulose e hemicelulose	27
Figura 7. Composição principal da biomassa lignocelulósicas com as estruturas da lignina, celulose e hemicelulose	29
Figura 8. Enzimas envolvidas na degradação da celulose.....	34

CAPÍTULO 2

Figura 1. Perfil fermentativo da produção de endoglucanase de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004 por FES.....	63
Figura 2. Efeitos padronizados para fatores investigados (Gráfico de pareto) planejamento de mistura simplex centroide (A) Amostra A (casca de cacau). Amostra B (palma forrageira). Gráfico de contorno (B) e superfície obtidos a partir do modelo especial cúbico (A). Amostra A (casca de cacau). Amostra B (palma forrageira). Amostra C (casca de arroz)	65
Figura 3. Gráfico pareto (A) obtido a partir do modelo quadrático em Planejamento Doehlert. Amostra A (Temperatura). Amostra B (Umidade). Gráfico de contorno (B) representando interações entre variáveis tendo como resposta à atividade de endoglucanase, obtidas a partir do modelo quadrático em Planejamento Doehlert. Amostra A (Temperatura). Amostra B (Umidade).....	67
Figura 4. Efeito da temperatura na atividade da endoglucanase de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004.....	68

Figura 5. Curvas de inativação térmica do blend enzimático por incubação em diferentes temperaturas (60 °C, 70 °C e 80 °C). Os testes de inativação foram realizados incubando-se a tampão acetato de sódio pH 5 (força iônica 0,05 mol. L ⁻¹)	70
Figura 6. Determinação da energia de inativação térmica (E _d) para o blend enzimático por gráfico de Arrhenius.....	72
Figura 7. Efeito de diferentes Phs (A). Estabilidade da endoglucanase de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004 com relação a diferentes pHs (B). *Barras de erros referentes ao desvio padrão < 0,053.....	74
Figura 8. Sacarificação da casca de arroz utilizando endoglucanase bruta de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004.....	81

CAPÍTULO 3

Figura 1. Perfil de sacarificação da casca da amêndoa do cacau antes e após pré-tratamento biológico com <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004.....	101
Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura da casca da amêndoa do cacau antes e após o pré-tratamento biológico e processo de sacarificação.....	103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Exemplos de enzimas produzidas por fungo <i>Aspegillus niger</i> em fermentação em estado sólido.....	26
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Matriz experimental do planejamento de mistura simplex-centroide e resposta experimental apresentada em valor real e codificado	56
--	----

Tabela 2. Matriz experimental Doehlert apresentada em valor real e codificado usada para otimizar as condições experimentais aplicadas à fermentação em estado sólido para produção de endoglucanase de <i>Aspergillus Niger</i> ATCC 1004.....	57
--	----

Tabela 3. Composição (% matéria seca) das matérias-primas estudadas.....	62
---	----

Tabela 4. Análise de variância para o modelo especial cúbico para simplex centroide (A). Análise de variância para o modelo quadrático (Planejamento Doehlert) aplicado na otimização das condições experimentais (B).....	65
---	----

Tabela 5. Cinética e parâmetros termodinâmicos na desnaturação térmica irreversível da endoglucanase obtida do <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004.....	71
---	----

Tabela 6. Efeito de diferentes sais e compostos orgânicos na atividade de endoglucanase de <i>Aspergillus niger</i> ATCC.....	76
--	----

Tabela 7. Efeito da adição de diferentes concentrações de solventes orgânicos sobre a atividade de endoglucanase <i>Aspergillus niger</i> ATCC 1004. Resultados expressos em atividade relativa (%) em que a atividade enzimática da amostra sem adição de solvente orgânico ($0,11 \pm 0,00$ U/mL) foi tomada como controle (100%)	78
---	----

Tabela 8. Composição individual de açúcares antes e após hidrólise enzimática (7 h), determinada por HPLC	82
--	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Composição química, expressa em % da matéria seca, da casca da amêndoa do cacau não tratada e dos resíduos sólidos após o pré-tratamento biológico	100
---	-----

LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS E SÍMBOLOS

FES: Fermentação em estado sólido
pH: Potencial hidrogeniônico
PDA: Potato Dextrose Agar
FeSO₄: Sulfato de ferro
CoSO₄: Sulfato de cobalto
CaCl₂: Cloreto de cálcio
MgSO₄: Sulfato de magnésio
Al (NO₃)₃: Nitrato de alumínio
NaSO₄: Sulfato de sódio
MgCl₂: Cloreto de magnésio
Pb(C₂H₃O₂): Acetato de chumbo
CaCO₃: Carbonato de cálcio
CuSO₄: Sulfato de cobre
Zn(C₂H₃O₂): Acetato de zinco
NaCO₃: Carbonato de sódio
ZnSO₄: Sulfato de zinco (ZnSO₄)
FeCl₂: Cloreto de ferro
KCl: Cloreto de potássio
NaCl: Cloreto de sódio
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
Trolox: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
SS: Soma quadrática
Df: Grau de liberdade
MS: Média quadrática
R²: Coeficiente de determinação
ANOVA: Análise de variância
CO₂: Dióxido de carbono
GH: Hidrolases de glicosídios
T: Temperatura
CMC: Carboximetilcelulose
DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico
K_d: Constante de inativação térmica
E_d: Energia de inativação térmica

ΔS : Entropia

ΔH : Entalpia

ΔG : Energia de Gibbs

K_B : Constante de Boltzmann

h : Constante de Planck

SILVA, Fabiane Neves. **Otimização e caracterização de endoglucanase de *Aspergillus niger* para aplicação do blend enzimático na sacarificação de resíduos agroindustriais**. Itapetinga, BA: UESB, 2024. 111 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Área de Concentração em Ciências de Alimentos.

RESUMO

A Fermentação em Estado Sólido (FES) é uma técnica biotecnológica que emprega microrganismos para a produção de substâncias valiosas. Essa metodologia é benéfica para a sustentabilidade, pois converte materiais lignocelulósicos abundantes em recursos úteis, minimizando o impacto ambiental e fomentando o desenvolvimento econômico local. Resíduos agroindustriais como a casca da amêndoa do cacau e casca de arroz, assim como a palma forrageira são matérias-primas potenciais na FES para a geração de enzimas. A otimização do processo e a seleção adequada do microrganismo são etapas cruciais. O fungo *Aspergillus niger*, por exemplo, é frequentemente utilizado na FES para a produção de celulasas, um conjunto de enzimas que decompõem a celulose para várias aplicações. Entre as celulasas, a endoglucanase desempenha um papel fundamental na fase inicial da hidrólise enzimática, atuando em sinergia com outras celulasas para a obtenção de hexoses, que são essenciais na biorrefinaria. Neste cenário, os blends enzimáticos produzidos pela FES representam uma alternativa viável, sendo simples de produzir, eficazes e econômicos. Além disso, esses blends possuem a vantagem de conter múltiplas enzimas, eliminando a necessidade de purificação.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido. Hidrólise enzimática. Celulase. Fungos filamentosos. Biorrefinaria.

SILVA, Fabiane Neves. **Otimização e caracterização de endoglucanase de *Aspergillus niger* para aplicação do blend enzimático na sacarificação de resíduos agroindustriais.** Itapetinga, BA: UESB, 2024. 111 p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Área de Concentração em Ciências de Alimentos.

ABSTRACT

Solid-State Fermentation (SSF) is an advanced biotechnological technique that employs microorganisms for the production of valuable substances, such as enzymes. This methodology is beneficial for sustainability, as it converts waste into useful resources, minimizing environmental impact and fostering local economic development. Agro-industrial residues such as cocoa almond shell, rice husk, and forage palm are potential feedstocks in SSF for enzyme generation. Process optimization and proper microorganism selection are crucial. For instance, *Aspergillus niger* is a fungus frequently used in SSF for the production of cellulases, a group of enzymes that decompose cellulose for various applications. Among cellulases, endoglucanase plays a fundamental role in the initial phase of enzymatic hydrolysis, acting synergistically with other cellulases to obtain hexoses, which are essential in biorefinery. In this scenario, enzyme blends produced by SSF emerge as a viable alternative, being simple to produce, efficient, and cost-effective. Moreover, these blends have the advantage of containing multiple enzymes, eliminating the need for purification.

Keywords: Solid-state fermentation (SSF). Enzymatic hydrolysis. Cellulase. Filamentous fungi. Biorefinery.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo de cultivo de microrganismos em uma matriz sólida na ausência (ou quase ausência) de água livre; no entanto, com umidade suficiente para manter o crescimento e o metabolismo dos microrganismos (Pandey, 2003). Através desse processo, as substâncias orgânicas presentes na matéria-prima podem ser convertidas em produtos de valor agregado, no qual se destacam as enzimas, que têm diversas aplicações industriais (Yafetto, 2022).

A eficiência desse bioprocessamento para produção enzimática depende de vários fatores, como o tipo de matriz sólida, o desempenho do microrganismo e as condições do processo. Os custos elevados de produção e purificação de enzimas são um obstáculo importante para as aplicações industriais. Portanto, o uso de matérias-primas de baixo custo pode ser uma alternativa viável para superar a dificuldade de aplicação de enzimas em processos industriais, anteriormente limitados pelo alto custo das mesmas (Sosa-Martínez et al., 2023 e Kumar et al., 2021).

A incorporação de resíduos agroindustriais e materiais regionais na FES não apenas proporciona benefícios multifacetados na obtenção de produtos de alto valor agregado, mas também, do ponto de vista ambiental, impulsiona a sustentabilidade ao reconfigurar resíduos em recursos valiosos e mitigar o impacto ambiental. O descarte inadequado desses materiais acarreta problemas como poluição, desperdício e desvalorização. Por meio da FES, esses resíduos são transformados em bioprodutos de elevado valor comercial, fomentando o desenvolvimento econômico e fortalecendo a autossuficiência (Wang et al., 2023, Da Rosa-Garzon et al., 2022).

Em suma, a otimização do uso de materiais regionais abundantes, incluindo resíduos e culturas locais, não apenas fomenta oportunidades econômicas nas comunidades, mas também impulsiona o desenvolvimento regional, enaltecendo a economia local. Em síntese, a abordagem de economia circular, ao utilizar materiais regionais, emerge como uma estratégia altamente benéfica para empresas, sociedade e meio ambiente. Essa prática não só promove a sustentabilidade, mas também agrega valor aos recursos locais, desempenhando um papel crucial no desenvolvimento regional (Belwal et al., 2022, Neves et al., 2022).

A otimização do processo fermentativo e o equilíbrio nutricional na FES garantem a eficiência e a qualidade dos produtos finais. Uma matéria-prima adequada para a FES

deve fornecer grande parte dos nutrientes essenciais para o crescimento e o metabolismo dos microrganismos envolvidos, além de um ambiente físico favorável para o desenvolvimento do processo fermentativo (Wang et al., 2023). Materiais lignocelulósicos são os mais aplicados na FES e são compostos, em sua maior parte, por polímeros de celulose, seguida de hemicelulose e lignina (Nogueira et al., 2022).

Além da matéria-prima, a escolha do microrganismo é um elemento fundamental e está relacionada a muitos fatores, como o desempenho, adaptação e tolerância a condições de processo (Yafetto, 2022). Dessa forma, os fungos filamentosos, a exemplo do *Aspergillus niger*, são fortes candidatos a aplicação em FES, pois essa técnica simula o seu habitat natural de forma eficiente (Wang et al., 2023). Esses fungos esporulantes produzem um conjunto diverso de enzimas, como as celulases, nas extremidades das hifas em crescimento para degradar a biomassa lignocelulósica (Jo et al., 2023).

Devido à sua abundância, natureza renovável e baixo custo, a biomassa lignocelulósica revela um potencial considerável para ser transformada em outros produtos de alto valor agregado, como açúcares destinados à produção de bioetanol (Zhou & Tian, 2022). Essa conversão requer a degradação da parede celular (Suryadi et al., 2022), e as enzimas celulolíticas, produzidas por meio da FES, destacam-se como candidatas robustas para esse processo. Especificamente, a endoglucanase desempenha um papel crucial na hidrólise das ligações glicosídicas, reduzindo o comprimento do polímero de celulose (Akram et al., 2021). A despolimerização da celulose em açúcares simples (hidrólise ou sacarificação) é um passo essencial para a produção de bioetanol (Ramos et al., 2022; Ruiz et al., 2023). No entanto, a viabilidade da hidrólise enzimática em larga escala é limitada pelo alto custo das enzimas.

Nesse cenário, os blends enzimáticos (extratos multienzimáticos) provenientes da FES emergem como uma alternativa altamente promissora. Sua produção é descomplicada, eficiente e economicamente vantajosa (De Carvalho et al., 2023). Além disso, esses blends enzimáticos destacam-se por conterem diversas enzimas, eliminando a necessidade de uma etapa adicional de purificação.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

O presente estudo tem o objetivo de produzir a enzima endoglucanase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 através da FES de matérias-primas lignocelulósicas e aplicá-la na sacarificação de resíduos agroindustriais.

1.1.2 Específicos

- Definir a melhor composição de mistura de matérias-primas lignocelulósicas para obtenção da endoglucanase;
- Definir as melhores condições para obtenção da endoglucanase por FES de matérias-primas lignocelulósicas pelo fungo *Aspergillus niger* ATCC 1004;
- Caracterizar a endoglucanase obtida quanto aos parâmetros de pH e temperatura ótimos, halotolerância, efeitos de sais, compostos orgânicos e solventes;
- Aplicar a enzima obtida na sacarificação da casca de arroz e casca da amêndoa do cacau
- Avaliar o efeito do pré-tratamento biológico na sacarificação da casca da amêndoa do cacau e identificar as alterações do pré-tratamento e sacarificação na estrutura lignocelulósicas da casca da amêndoa do cacau.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fermentação em estado sólido

A fermentação é uma prática milenar que acompanha a humanidade na transformação de alimentos, como o pão, vinho e cerveja. Atualmente, a fermentação também se tornou uma fonte de biomoléculas e produtos de interesse para diversos setores industriais, como alimentício, farmacêutico, têxtil, bioquímico e bioenergético (Soccol et al., 2017). Em especial, a fermentação em estado sólido (FES), emprega microrganismos, cultivados em substrato sólido como fonte de carbono na ausência total ou parcial de água livre, para converter substâncias orgânicas em compostos de valor agregado (Pandey, 2003).

A FES recria as condições naturais ideais para muitos microrganismos, especialmente fungos e bolores. Notavelmente, demanda baixa energia para esterilização, graças à sua baixa atividade de água, demonstrando resistência à contaminação bacteriana. Esta técnica possibilita uma produção enzimática abundante de várias enzimas, sendo pouco afetada pela inibição do substrato, resultando em uma significativa concentração final dos produtos desejados (Soccol et al., 2017). Além disso, as enzimas geradas exibem estabilidade frente a variações térmicas e de pH. A FES destaca-se ao aproveitar matérias-primas acessíveis, como resíduos agroindustriais, que fornecem carbono e energia para o crescimento dos microrganismos (Menezes et al., 2023).

No processo da FES o microrganismo se desenvolve sobre ou interstícios da matéria-prima sólida umedecida, que serve como fonte de nutrientes e suporte físico. O microrganismo utiliza a matéria-prima como fonte de nutriente e libera metabólitos, entre eles as enzimas, que podem ter diversas aplicações industriais (Yafetto, 2022). Além da produção de enzimas, a FES pode ser aplicada na produção de biocombustíveis (Yu et al., 2014), enriquecimento proteico para resíduos agroindustriais (Aruna et al., 2017), ácidos orgânicos (Akhtar et al., 2020) e biofertilizantes (Lim & Matu, 2015). Com base neste princípio, a FES já foi aplicada para produção de uma variedade de enzimas como lacase (XU et al., 2020), endoglucanase (Oliveira et al., 2019, De Brito et al., 2017), xilanase (Marques et al., 2018), lipase (Menezes et al., 2021), amilase (Almanaa et al., 2020) inulinase (Singh et al., 2020), β -glicosidase (Neves et al., 2022) e protease (Nogueira et al., 2022).

De maneira geral, a eficácia da FES na geração de produtos de alto valor agregado está intrinsecamente ligada a diversos fatores, incluindo a escolha adequada da matriz

sólida, o desempenho do microrganismo e as condições do processo fermentativo (Kumar et al., 2021). Os custos elevados associados à produção e purificação de enzimas representam um desafio significativo para aplicações industriais. Assim, a utilização de matérias-primas acessíveis emerge como uma alternativa viável para superar essa barreira, permitindo a expansão da aplicação de enzimas em processos industriais previamente limitados pelos custos elevados de sua implementação (Sosa-Martínez et al., 2023).

2.2 Matérias-primas

A seleção criteriosa da matéria-prima desempenha um papel decisivo na FES, influenciando tanto a qualidade do produto final quanto os custos associados ao processo (Hamrouni et al., 2020). Uma matéria-prima eficaz para a FES deve fornecer uma gama abrangente de nutrientes essenciais para sustentar o crescimento e o metabolismo dos microrganismos, além de criar um ambiente físico propício ao processo fermentativo. Resíduos agrícolas, alimentares e materiais lignocelulósicos destacam-se como exemplos representativos de matérias-primas utilizadas na FES (Wang et al., 2023). Essa matéria-prima deve apresentar a umidade apropriada para favorecer o crescimento microbiano, podendo desempenhar dupla função: como fonte de nutrientes ou como suporte inoculado com uma solução nutritiva essencial para o desenvolvimento dos microrganismos (Kumar et al., 2021). A combinação estratégica de diferentes matérias-primas também se configura como uma alternativa promissora para otimizar o equilíbrio nutricional e aprimorar o processo fermentativo (Nunes et al., 2020; Carvalho et al., 2023).

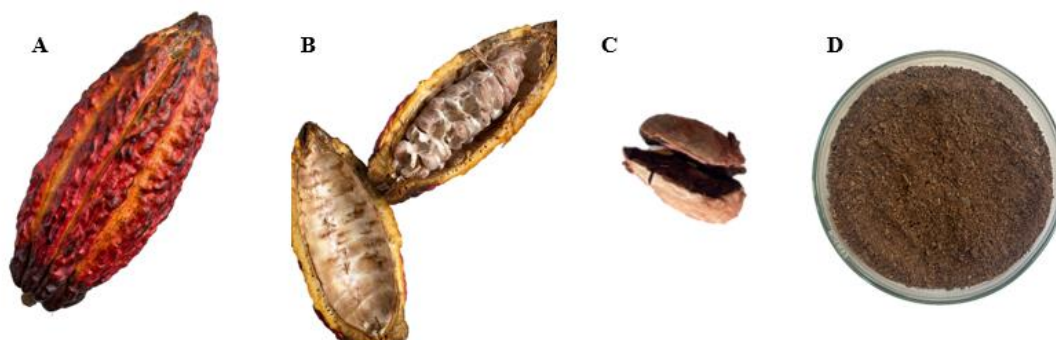
Para além da composição química, as propriedades físicas da matéria-prima, como o tamanho da partícula (Nogueira et al., 2022), exercem um impacto direto no desenvolvimento microbiano, influenciando a velocidade e a estabilidade do processo fermentativo. Partículas excessivamente pequenas podem propiciar maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio, acelerando a fermentação, porém, podem também resultar em complicações como entupimento e compactação, prejudicando a eficiência global do processo. Em contrapartida, partículas de maior tamanho podem conferir maior estabilidade e longevidade ao processo, embora possam limitar a relação superfície/volume e desacelerar a fermentação (Wang et al., 2023). Alguns estudos de FES empregaram matérias-primas com tamanho de partícula abaixo de 2 mm, obtendo resultados satisfatórios no que diz respeito ao processo fermentativo (Nogueira et al., 2022; Ferraz et al., 2020; Silva et al., 2018).

2.2.1 Casca da amêndoa de cacau

O cacau (*Theobroma cacao* L.) é uma fruta tropical de significativa relevância econômica e cultural, pois suas sementes são a fonte para diversos produtos, como a manteiga de cacau e o chocolate, apreciados globalmente (Afedzi et al., 2023). A produção mundial de grãos de cacau atingiu aproximadamente 4,9 milhões de toneladas no período 2022/2023. A África destaca-se como a principal contribuinte, representando 73,4% da produção global, com a Costa do Marfim (2,2 milhões de toneladas) e Gana (0,68 milhões de toneladas) liderando. As Américas, com 21,2% da produção mundial, têm o Brasil como o sétimo maior produtor, estimando-se uma produção de 0,22 milhões de toneladas (ICCO, 2023). No Brasil, o Pará e a Bahia lideram a produção de amêndoas de cacau, respondendo por cerca de 96% do total nacional. Outros estados, como Espírito Santo, Rondônia, Amazonas e Mato Grosso, também contribuem, enquanto estados como Roraima, Amapá, Ceará, Sergipe, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins iniciam sua participação em um mercado em expansão recente (Guirlanda; Da Silva; Takahashi, 2021).

A estrutura do fruto do cacau (Figura 1) é formada por quatro partes principais: a casca externa, que protege o fruto; a polpa, que envolve as sementes e que possui um sabor adocicado; a amêndoa, que é a semente propriamente dita; e a casca da amêndoa, que é removida durante o processamento do cacau.

Figura 1. Estrutura do fruto do cacau (*Theobroma cacao* L.).



Legenda: A. Casca externa do cacau. B. Fruto aberto com polpa e amêndoas. C. Amêndoa com casca. D. Casca da amêndoa (resíduo do processamento) após moagem.

Fonte: Própria autora.

A produção de derivados do cacau, como chocolate, manteiga e cacau em pó, resulta na geração de uma considerável quantidade de resíduos com vastas possibilidades de aproveitamento (Afedzi et al., 2023). Esses subprodutos apresentam elevado valor nutricional e funcional, contendo elementos como fibra dietética, polifenóis, pectina,

metilxantina, gordura e fitoesteróis, que podem ser extraídos e incorporados em alimentos e produtos farmacêuticos (Belwal et al., 2022). Contudo, aproximadamente 85% da produção de cacau corresponde a subprodutos, incluindo cascas do grão, cascas do fruto e polpa. Quando não são devidamente aproveitados, esses resíduos podem acarretar problemas ambientais e econômicos, como poluição, desperdício e perda de valor agregado (Belwal et al., 2022).

A casca da amêndoa do cacau é o subproduto que envolve as amêndoas e é obtido em elevados volumes pela indústria de cacau, sendo composto principalmente por hemi-celulose, lignina macro e micronutrientes (Lessa et al., 2018). Nos últimos anos, em coerência com os objetivos de maior sustentabilidade e agregação de valor, a casca da amêndoa do cacau tem sido estudada para uma série de aplicações biotecnológicas, tais como a FES para produção das enzimas lipase (De Araújo et al., 2021; Menezes et al., 2021) e endoglucanase (Oliveira et al., 2019, De Brito et al., 2017) através de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, endoglucanase e xylanase através de *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 (Reis et al., 2020) e filmes biodegradáveis (Souza et al., 2022), evidenciando o sucesso de sua aplicabilidade nesse nicho.

2.2.2 Casca de arroz

O arroz (*Oryza sativa*) é uma das culturas cerealíferas mais cultivadas e consumidas em todo o mundo. É um material fibroso, composto principalmente de celulose, lignina e cinzas (Singh, 2018). O aumento da produção de arroz é um dos principais fatores que contribuem para o aumento da geração de resíduos agroindustriais. A casca de arroz (Figura 2) é o resíduo mais abundante, representando cerca de 28% do peso do grão (Jin; Peng; Nie, 2023).

Em 2022, a produção global de arroz alcançou $7,5 \times 10^8$ m³, com 90% dessa produção concentrada na região Ásia-Pacífico. Esse volume resulta em uma geração expressiva de resíduos, totalizando $1,5 \times 10^8$ m³, representando um desafio considerável para o meio ambiente (Mordor Intelligence, 2021). Segundo dados da Companhia Nacional do Abastecimento, o Brasil ocupa a 10^a posição em produção de arroz, atingindo a marca de 7,4 milhões de toneladas no anuário 2023/2024 (CONAB, 2024). Uma prática comum para aproveitar a casca de arroz é a sua queima ou utilização como combustível para parboilização e cozimento do grão. Entretanto, tal abordagem carrega consigo um impacto ambiental adverso, pois a queima da casca libera cinzas contendo quantidades

significativas de CO₂, contribuindo para a poluição do ar, solo e água (Anando et al., 2023).

Figura 2. Casca de arroz após processamento de moagem.



Legenda: A. Grãos de arroz com casca. Fonte: Freepik.
B. Casca do arroz após tratamento de moagem. Fonte: Própria autora.

A casca de arroz, caracterizada pela abundância em celulose, hemicelulose e lignina, emerge como uma valiosa e econômica matéria-prima para a produção de biomassa (Zhang et al., 2020). Diante desse cenário, torna-se imperativo explorar estratégias que maximizem o aproveitamento da casca de arroz, visando a geração de produtos com valor agregado mais elevado. Uma abordagem particularmente promissora consiste em utilizar a casca de arroz como substrato na produção de enzimas por fungos filamentosos (Marques et al., 2018; De Brito et al., 2017). Além disso, a sua aplicação como insumo para a obtenção de produtos de alto valor, como biorrefinaria e produtos químicos de plataforma, revela-se como uma opção viável devido ao notável teor de celulose (40%) e hemicelulose (30%) presente nesse material (Song et al., 2024). Dessa maneira, a produção de enzimas a partir da casca de arroz não só representa uma escolha ecologicamente consciente, mas também se revela economicamente vantajosa para o aproveitamento de resíduos agroindustriais (Da Rosa-Garzon et al., 2022).

2.2.3 Palma forrageira

A palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*), uma significativa cactácea originária do México, expandiu-se para regiões áridas e semiáridas em todo o mundo (Alencar et al., 2018). No Brasil, sua presença abrange mais de 500 mil hectares, principalmente na

região Nordeste. A adaptação bem-sucedida ao semiárido resulta de características fisiológicas que favorecem seu pleno desenvolvimento em condições desafiadoras (Rocha, 2012). Pertencente à família *Cactaceae*, esse grupo de plantas destaca-se pela diversidade morfológica, envolvendo caules suculentos e frutos comestíveis, exercendo um papel relevante na economia e cultura das populações rurais nos biomas onde se encontram (De Araújo et al., 2021).

A perspectiva de expansão do cultivo da palma forrageira surge em meio às mudanças climáticas e períodos de seca previstos (Alencar et al., 2018). Esse otimismo fundamenta-se na resiliência das cactáceas à seca e sua adaptação notável a ambientes áridos (Santos et al., 2016). Graças à sua elevada produtividade de biomassa, rica em carboidratos, tanto fibrosos quanto não fibrosos, essas plantas desempenham papéis cruciais na alimentação de ruminantes e humanos (Dubeux et al., 2021), na geração de energia, na fabricação de fármacos e cosméticos, além de contribuir para a proteção e conservação do solo (Filho et al., 2016). Na Figura 3 é apresentada a palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) antes e após o processo de moagem.

Figura 3. Palma forrageira antes e após o pré-tratamento de moagem.



Legenda: A. Palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*). B. Palma forrageira após moagem.

Fonte: Própria autora

A palma forrageira tem capturado a atenção de pesquisadores devido a suas inúmeras vantagens, como ampla disponibilidade, ausência de entressafra, baixa exigência tecnológica para cultivo e colheita, disseminação extensiva e notável resistência à seca (Filho et al., 2016). Dada a sua abundância natural, o desenvolvimento de tecnologias que

agreguem valor à palma, proporcionando alternativas para sua utilização, pode ser um impulso significativo para o desenvolvimento econômico nas regiões onde ela é cultivada. Como exemplos desse potencial ainda pouco explorado, pesquisadores têm utilizado a palma como plataforma para a produção de enzimas de aplicação industrial por meio da FES (Neves et al., 2022; Santos et al., 2017; Dos Santos et al., 2016).

Em síntese, ao explorar materiais regionais abundantes, como a palma forrageira proveniente de culturas locais, surgem oportunidades econômicas significativas para as comunidades. Essa prática contribui diretamente para o desenvolvimento regional e a valorização da economia local.

2.3 Microrganismos utilizados na FES

A seleção do microrganismo é um fator fundamental para a FES, pois influencia a produtividade, a eficiência e a qualidade do produto final (Wang et al., 2023). O processo de fermentação requer a escolha de microrganismos adequados, que tenham as seguintes características (Yafetto, 2022):

- Crescimento ótimo e tolerância nas condições do processo, como temperatura e pH;
- Rendimento elevado do produto desejado;
- Utilização eficiente da matéria-prima disponível como fonte de carbono e energia;
- Segurança para o consumo humano e animal do produto fermentado.

Os fungos desempenham um papel crucial na indústria, sendo responsáveis por aproximadamente 50% das enzimas utilizadas nesse setor. Entre os fungos, os filamentosos destacam-se como excelentes opções para a FES, uma vez que essa técnica replica eficientemente seu habitat natural (Wang et al., 2023). Esses fungos desenvolvem-se através de hifas multicelulares que se ramificam e entrelaçam, formando intrincadas redes miceliais (Jo et al., 2023). Nas extremidades dessas hifas, produzem um variado conjunto de enzimas capazes de degradar biomassa lignocelulósica, gerando produtos de alto valor agregado (Madhavan et al., 2022). Além de sua importância comercial, os fungos filamentosos têm relevância ecológica devido à presença de conidióforos, estruturas responsáveis pela produção e liberação de esporos assexuados (Troiano; Orsat; Dumont, 2020).

Em 1729, o sacerdote e micologista florentino Pier Antonio Micheli fez a primeira descrição do gênero *Aspergillus*. O nome foi escolhido devido à semelhança entre a estrutura portadora de esporos do fungo e o aspergillum, um instrumento utilizado na Igreja

Católica para aspergir água benta (Romero; Giudicessi; Vitale, 2021). Amplamente distribuído na natureza, o *Aspergillus* é um dos gêneros fúngicos mais economicamente relevantes, com aplicações que vão desde a produção de ácido cítrico, amilases, alimentos e bebidas asiáticas até compostos farmacêuticos como lovastatina, antibióticos e agentes antitumorais e antifúngicos. No entanto, algumas espécies desse gênero também apresentam aspectos negativos, sendo responsáveis por perdas agrícolas, produção de micotoxinas, deterioração de materiais e doenças em humanos e animais (Romero; Giudicessi; Vitale, 2021).

Os fungos filamentosos, especialmente do gênero *Aspergillus* spp., são preferidos para a produção de enzimas devido à sua alta produtividade, atividade enzimática em pH neutro e estabilidade térmica (Troiano; Orsat; Dumont, 2020). Espécies como *Aspergillus niger* e *Aspergillus ricinus* são capazes de sintetizar diversas substâncias de interesse industrial, incluindo enzimas extracelulares, ácidos orgânicos e metabólitos secundários, aplicáveis em biocombustíveis, biorremediação, alimentos, bebidas e outros setores (Troiano; Orsat; Dumont, 2020).

No âmbito macroscópico, as colônias de *Aspergillus* apresentam distintas características, como taxas de crescimento variáveis, mensuráveis pelo diâmetro da colônia em um dado momento. Além disso, exibem cores e texturas específicas (aveludadas, flocosas), podendo apresentar exsudatos e pigmentos solúveis dependendo do meio de cultura utilizado (Romero; Giudicessi; Vitale, 2021). Essas peculiaridades facilitam a identificação e o trabalho com esses microrganismos, como ilustrado na figura 4, que mostra o cultivo do fungo *Aspergillus niger* em meio PDA (Potato Dextrose Agar).

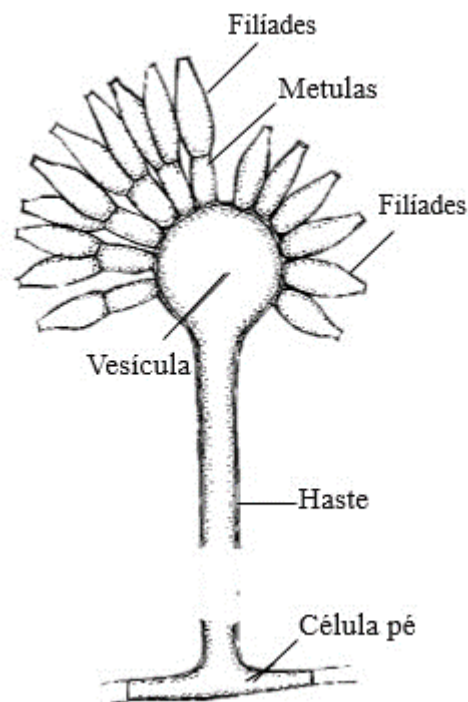
Figura 4. Cultivo de *Apergillus niger* em meio PDA (Potato Dextrose Agar)



Fonte: própria autora.

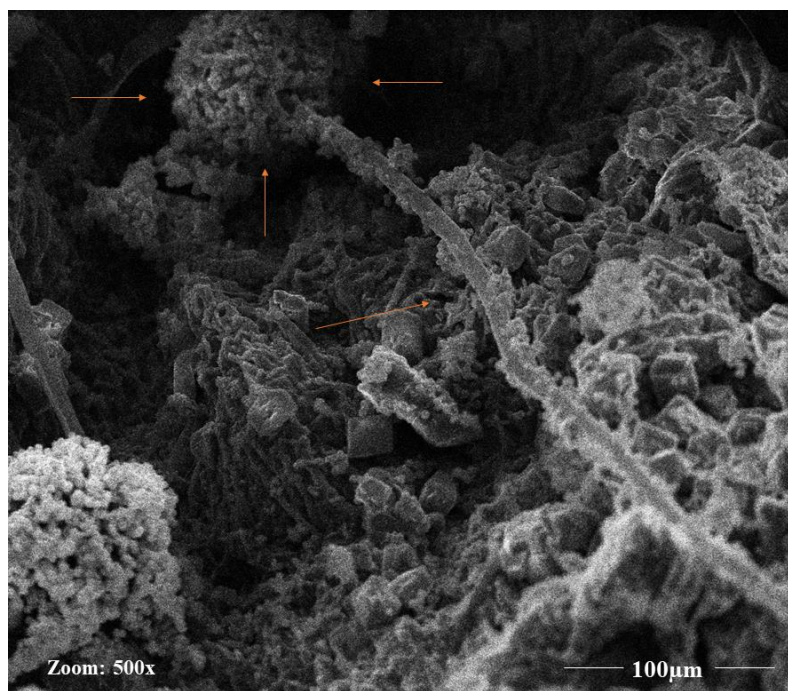
Morfologicamente, essas espécies ostentam o distintivo "aspegillum" ou "cabeça aspergillar". Essa estrutura (Figura 5) compreende uma haste que culmina em uma vesícula arredondada, onde se encontram células especializadas organizadas em uma ou duas camadas, conhecidas como filíades e metulas (Romero; Giudicessi; Vitale, 2021). As filíades desempenham um papel crucial na produção de conídios, os esporos assexuados. O conjunto de estruturas que suporta a formação de conídios - vesícula, metulas, filíades, além da haste e da célula pé - é denominado conidióforo (Romero; Giudicessi; Vitale, 2021). Na Figura 6, é apresentada uma estrutura lignocelulósica com a presença de um fungo do gênero *Aspergillus*, ampliada 500 vezes por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Destaca-se a abundância de esporos no material, permitindo a visualização detalhada da estrutura do fungo, incluindo a vesícula arredondada e as hifas.

Figura 5. Morfologia representativa de espécies do gênero *Aspergillus*



Fonte: Romero, Giudicessi e Vitale (2021) com adaptações.

Figura 6. Estrutura lignocelulósica colonizada por fungo *Aspergillus niger*



Aspergillus niger faz parte de um grupo de *Aspergillus* de cor negra, denominado *Aspergillus* section Nigri (Romero; Giudicessi; Vitale, 2021). Esse fungo é um agente comum de deterioração de alimentos e pode ser encontrado naturalmente em diversos

produtos alimentícios, tais como frutas, cebola, nozes e milho. Além disso, ele apresenta uma grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais, podendo resistir a temperaturas entre 6 e 47 °C e a níveis de pH entre 1,5 e 9,8 (Li et al., 2020).

O fungo *Aspegillus niger* é amplamente aplicado na produção de enzimas por FES com diferentes fontes de matérias-primas (Tabela 1).

Tabela 1. Exemplos de enzimas produzidas por fungo *Aspegillus niger* em fermentação em estado sólido

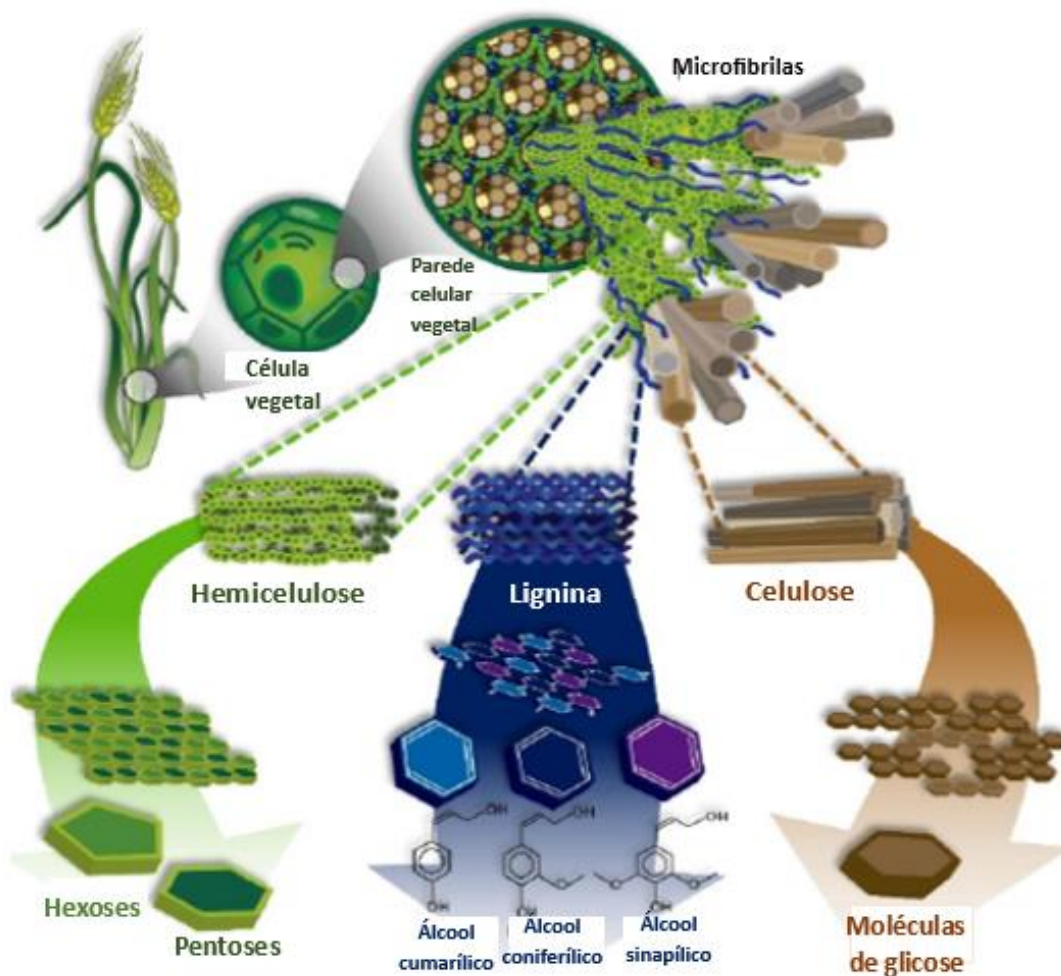
Matéria-prima	Enzima	Referência
Resíduo de ciriguela (<i>Spondias purpurea</i> L)	Endoglucanase e celulases totais	(Dos Santos et al., 2013)
Vagens de algaroba (<i>Prosopis juliflora</i>)	Lipase	(Mandari; Nema; Devarai, 2020)
Casca de batata	Xilanase	(Dos Santos et al., 2012)
Palma forrageira (<i>Nopalea cochenillifera</i>)	β -glicosidase	(Dos Santos et al., 2018)
Resíduos de acerola (<i>Malpighia Glabra.</i>), goiaba (<i>Psidium guajava</i>), mandioca (<i>Manihot Esculenta</i>), e maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	Carboximetilcelulase	(Junqueira et al., 2018)
Alfarroba	Inulinase e frutooligossacarídeo	(Canatar et al., 2023)
Casca de Satkara (<i>Citrus macroptera</i>)	Pectinase	(Ahmed et al., 2021)
Aquênios de Platanus e hispânica, casca de laranja, casca de soja e folhas erva-mate	Peptidase	(López et al., 2018)
Farelo de trigo, arroz e soja, farinha de casca de maracujá, de penas de frango e de vísceras de frango	L-asparaginase	(Da Cunha et al., 2018)
Casca de mandioca	Amilase	(Dos Santos et al., 2020)
Farelo de trigo, palha de arroz, casca de arroz, sabugo de milho, folhas de eucalipto, folhas de ricinus e bagaço de cana	Endoglucanase	(Dixit; Shukla, 2023)

Resíduo de vagens de ervilha	Celulase total, β -glicosidase, endoglucanase, xilanase, celobiohidrolase, β -xilosidase, α -l-arabinofuranosidase e xilanesterase	(Sharma et al., 2015)
Bagaço de cana-de-açúcar e grãos usados de cervejaria	Celulases totais, endoglucanase, feruloilesterase e xilanase	(Moran-Aguilar et al., 2021)
Folhas de dendê	Endoglucanase, celulase total e xilanase	(Tai et al., 2019)
Palha de arroz	Endoglucanase, β -glicosidase, exoglucanase, xilanase e mananase	(Kaur et al., 2020)

2.4 Parede celular vegetal

Os materiais lignocelulósicos apresentam uma composição onde a celulose se destaca como o componente mais abundante (40–45%), seguida pela hemicelulose (25–35%), lignina (15–30%) e componentes inorgânicos (até 10%) (Rico-García et al., 2020). A proporção precisa desses constituintes varia conforme a origem e a espécie da planta. Na parede celular vegetal (Figura 7), as celuloses estão principalmente envolvidas por hemicelulose e lignina, conferindo uma estrutura robusta, e todos esses polímeros participam de complexas interações físicas e químicas (Lv et al., 2022).

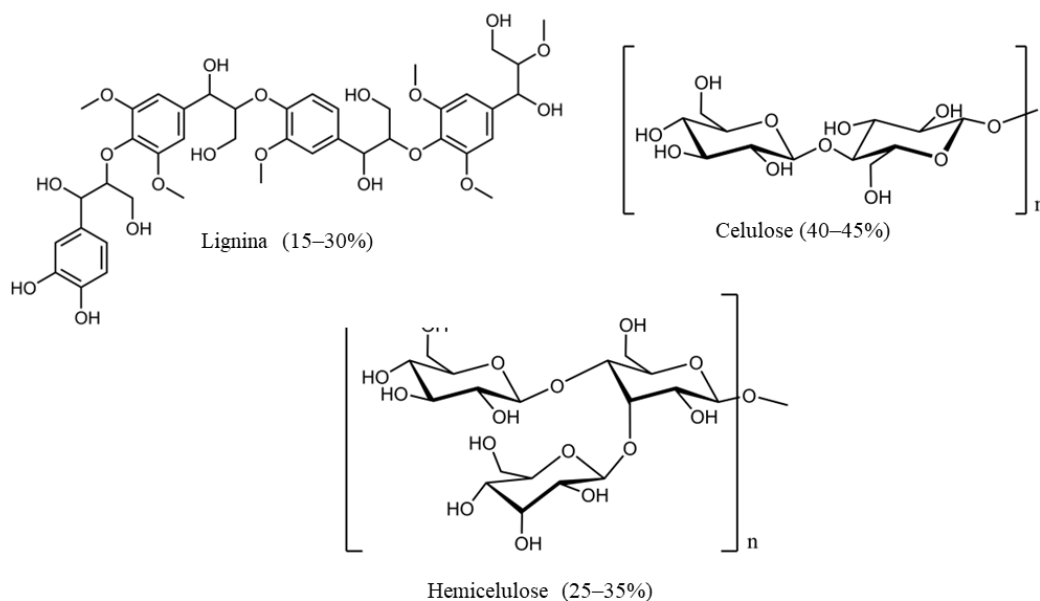
Figura 7. Estrutura da biomassa lignocelulósica contendo lignina, celulose e hemicelulose



Fonte: Hernández-Beltrán et al., (2019) com adaptações.

A celulose, um polímero linear, demonstra insolubilidade em água e em soluções ácidas ou alcalinas diluídas à temperatura ambiente (Suryadi et al., 2022). Atuando como um elemento estrutural, confere resistência ao material (Kumla et al., 2020). Sua estrutura molecular permanece inalterada, independentemente da origem, composta por uma extensa cadeia de unidades de glicose que se conectam por ligações β -1,4-glicosídicas (Jedvert & Heinze, 2017). As cadeias de celulose (Figura 8) são organizadas em regiões cristalinas e amorfas, desempenhando um papel crucial nas propriedades físicas dos materiais à base de celulose. As cadeias alinham-se paralelamente e conectam-se por meio de ligações de hidrogênio entre os átomos de oxigênio, formando microfibrilas, feixes compostos por centenas de unidades de celulose (Emenike et al., 2023).

Figura 8. Composição principal da biomassa lignocelulósicas com as estruturas da lignina, celulose e hemicelulose.



Fonte: Kumla et al., (2020) com adaptações.

Diferentemente da celulose, a estrutura da hemicelulose (Figura 8) depende de diversos fatores, como o tamanho da cadeia, suas ramificações e as unidades de açúcares. Esse heteropolímero é composto por uma espinha dorsal polissacarídica e ligações de pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos, além de pequenas quantidades de ramnose e fucose, e um grupo acetila (Kumla et al., 2020).

Por fim, a lignina (Figura 8) é um polímero amorfo e altamente ramificado que apresenta diversos grupos funcionais, tais como alifáticos, fenólicos, hidroxilas, carboxílicos, carbonilos e metoxil (Kumla et al., 2020). Com uma estrutura única e extremamente complexa, a quantidade, a composição unitária e as características estruturais da lignina variam entre as espécies vegetais, o ambiente e os estágios de crescimento (Wang & Deuss, 2023).

2.5 Hidrólise enzimática

A lignocelulose representa uma biomassa de grande relevância como fonte renovável de energia, produtos químicos e materiais para o desenvolvimento sustentável. Essa biomassa pode passar por hidrólise enzimática, convertendo-se em glicose e,

posteriormente, ser transformada em diversos produtos de alto valor agregado, marcando uma etapa promissora no contexto da biorrefinaria (Cai et al., 2023).

O termo "biorrefinaria" refere-se a uma tecnologia relativamente recente que realiza a transformação de biomassa em produtos e energia, visando reduzir a dependência de combustíveis fósseis. Este conceito mostra-se viável para biomassas abundantes e específicas, como a lignocelulose, que não competem com outras aplicações, como o petróleo (Bastos, 2007). Os processamentos associados a essa biomassa desempenham um papel crucial na promoção da bioeconomia sustentável, contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa, criação de empregos e desenvolvimento de novos produtos e materiais (Xu et al., 2023).

O processo de biorrefinaria lignocelulósica compreende quatro etapas essenciais: pré-tratamento (físico, químico ou biológico) para desestruturar a lignocelulose e facilitar o acesso das enzimas; sacarificação dos polissacarídeos em açúcares fermentáveis; conversão fermentativa dos açúcares monoméricos em produtos de interesse; e recuperação e purificação do produto final por meio de métodos como destilação, filtração ou adsorção (Xu et al., 2023).

A sacarificação pode ser feita por hidrólise ácida ou enzimática. Porém, a hidrólise enzimática tem vantagens: é mais ecológica, gasta menos energia, usa condições de reação suaves e baixo impacto ambiental. Também é mediada por enzimas celulolíticas (celulases e hemicelulases) que quebram polímeros (hemi-) celulósicos da biomassa em açúcares fermentáveis (Saini et al., 2022). A endoglucanase é uma das importantes enzimas que clivam as ligações β -1,4-glicosídicas entre as unidades de glicose na celulose (Sharma & Sarma, 2021).

A hidrólise enzimática, conduzida por enzimas celulolíticas, é fundamental para maximizar os rendimentos de açúcar e aumentar a eficiência e a economia da produção de biorrefinarias (Xu et al., 2023). A conversão da celulose em açúcares fermentáveis é relativamente simples, e ocorre, geralmente com temperaturas variando de 40 a 50 °C e valores de pH em torno de 4 a 5 (Vasić; Knez; Leitgeb, 2021). Primeiramente, as enzimas se acoplam ao substrato celulósico e, por difusão superficial, deslizam pelas cadeias de celulose, detectando locais adequados para hidrólise. Desse modo, catalisam a hidrólise da ligação β -1,4-glicosídica gerando produtos (celobiose, celo-oligossacarídeos ou glicose) que são liberados do sítio ativo da enzima (Xu et al., 2023).

2.5.1 Enzimas degradadoras da parede celular vegetal

A biomassa lignocelulósica se destaca como um recurso abundante, renovável e de baixo custo, com grande potencial para ser convertido em produtos de alto valor agregado, como açúcares, biocombustíveis, compostos funcionais e produtos químicos (Zhou & Tian, 2022). A degradação da parede celular vegetal é crucial para o aproveitamento dessa biomassa, liberando os componentes celulares que podem ser utilizados na produção de bioprodutos e bioenergia. Nesse contexto, a degradação biológica da parede celular emerge como um tema de pesquisa cada vez mais relevante para a bioeconomia do futuro, que se baseia no uso de recursos biológicos para a produção de produtos e energia (Suryadi et al., 2022).

A resistência à degradação é um desafio a ser superado, devido à presença de polissacarídeos como celuloses, hemiceluloses, ligninas, pectinas e outros compostos na parede celular vegetal. Para utilizar esse material como fonte de metabólitos de interesse, é necessário o uso de técnicas de pré-tratamento e de enzimas específicas para cada tipo de polímero (Houfani et al., 2020).

A classificação das enzimas destinadas à degradação de polímeros isolados da parede celular é guiada pela especificidade da enzima pelo substrato (Houfani et al., 2020). A desconstrução da biomassa lignocelulósica demanda a atuação sinérgica de uma variedade de enzimas, destacando-se as hidrolases responsáveis pela degradação de polímeros de carboidratos e as enzimas oxidativas que degradam a lignina (Guerriero et al., 2015; Saini & Sharma, 2021). As enzimas oxidativas englobam lacases e peroxidases, como a lignina-peroxidase, manganês peroxidase e peroxidases versáteis, enquanto as hidrolíticas compreendem celulasas e hemicelulasas (Qu et al., 2023; Guo et al., 2023).

É válido ressaltar que, para tornar as técnicas de bioconversão economicamente viáveis, é importante aprimorar a produção e a obtenção de enzimas a preços acessíveis. O cultivo de microrganismos produtores de enzimas em condições de investimento reduzido, como a FES, surge como uma alternativa promissora para a redução dos custos desses processos (Oliveira et al., 2020).

2.5.2 Celulase

A enzima celulase conquista a terceira posição em participação no mercado global de enzimas, com cerca de 15%, atrás apenas da amilase (25%) e da protease (18%) (Singh et al., 2021). Essa enzima, classificada como glicosídeo hidrolase (GH), faz parte de um grupo que domina o mercado, respondendo por mais de 70% de todas as vendas de

enzimas (Dadwal; Sharma; Satyanarayana, 2021). Sua versatilidade a leva a ser utilizada em uma ampla gama de setores, como alimentos, celulose e papel, fermentação, têxtil, agricultura, farmacêutica e biocombustíveis. A indústria de ração animal foi a pioneira em sua utilização na década de 1980, seguida pela indústria de alimentos. Mais tarde, outras indústrias, como têxtil, celulose e papel, incorporaram a celulase em seus processos (Singh et al., 2021).

A valorização de materiais lignocelulósicos em produtos de alto valor surge como uma oportunidade promissora para a indústria, impulsionando a rentabilidade e a sustentabilidade do setor. A hidrólise enzimática da celulose se configura como uma etapa crucial no processo de biotransformação, possibilitando a conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares simples. Essa etapa abre caminho para a produção de uma variedade de produtos de alto valor, incluindo bioprodutos e bioenergia, conforme destacado por Wu et al. (2022).

As celulasas assumem um papel fundamental na biotransformação da celulose, atuando na sua hidrólise e liberando hexoses, como glicose, celobiose e celo-oligosacarídeos (Paramjeet; Manasa; Korrapati, 2018). Entre as hexoses obtidas, a glicose se destaca como o produto mais desejável. Essa subunidade fundamental da celulose se configura como uma matéria-prima valiosa para a produção de diversas especialidades químicas, incluindo etanol e ácido orgânico, abrindo portas para uma gama de aplicações na indústria química e farmacêutica (Yoon et al., 2014).

As celulasas são agrupadas em famílias GH (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 26, 30, 39, 44, 45, 48, 51, 74, 124 e 116) (Dadwal; Sharma; Satyanarayana, 2021) e atuam em quatro etapas chave para degradar a fibra celulósica (Passos; Pereira; Castro, 2018):

1. Adsorção e Complexação: Na primeira etapa, a enzima se liga à celulose por meio de módulos de ligação de carboidratos (CBMs). Em seguida, na etapa de complexação, a celulose se aproxima estrategicamente do sítio ativo da enzima, garantindo que a quebra das ligações glicosídicas ocorra de forma precisa e eficiente.

2. Hidrólise e Dessorção: A terceira etapa é a hidrólise, na qual as ligações glicosídicas da celulose são quebradas, liberando produtos da reação. Por fim, na quarta etapa de dessorção, a celulase se difunde para a fase líquida, pronta para iniciar outro ciclo. Essa etapa garante que a enzima não se torne saturada e possa continuar atuando de forma eficiente.

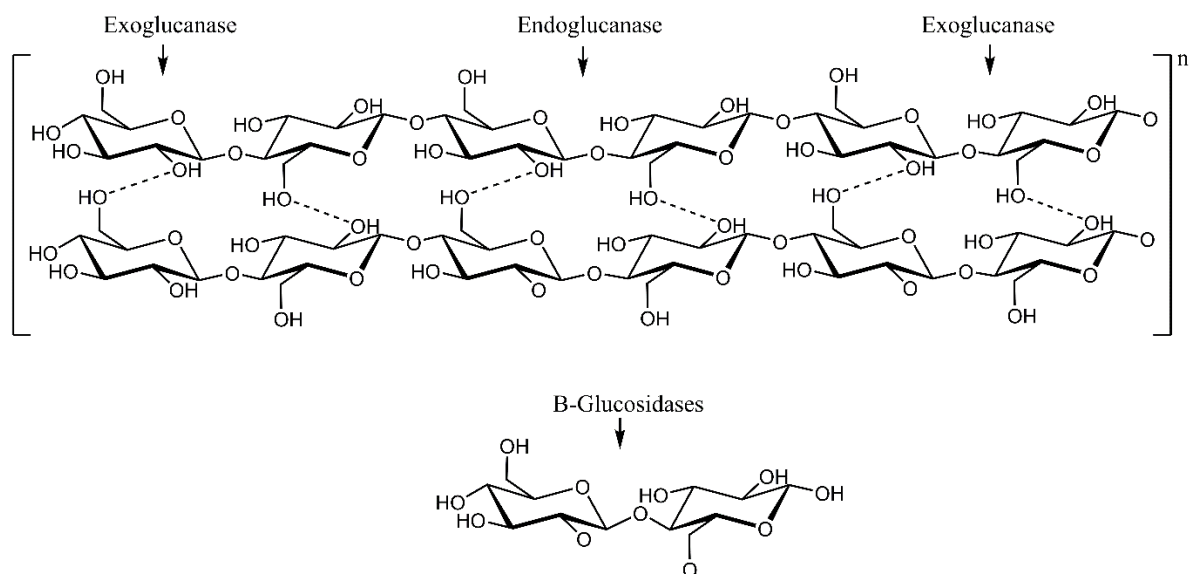
A hidrólise de uma ligação glicosídica pode resultar em dois possíveis cenários estereoquímicos: inversão ou retenção da configuração anomérica. Na inversão, a

hidrólise ocorre por desprotonação sequencial, sem a formação de um complexo enzima-substrato. Por outro lado, no mecanismo de retenção, a extremidade carboxílica de um aminoácido age como uma base nucleofílica, atacando a ligação glicosídica. Isso rompe a ligação e conecta a enzima a uma fração do oligômero, formando um complexo enzima-substrato (Siqueira et al., 2020). De maneira mais detalhada, o mecanismo de ação envolve a catálise ácido-base geral, utilizando dois resíduos de ácido carboxílico no sítio ativo da enzima. Um resíduo atua como um ácido, protonando o oxigênio da ligação glicosídica, enquanto o outro atua como um nucleófilo. A distância entre esses resíduos determina o tipo de reação. Na inversão, os resíduos carboxílicos estão a cerca de 10 Å de distância, e a reação ocorre por um mecanismo de deslocamento único. Um dos ácidos carboxílicos atua como base geral, e o outro como ácido geral. Na retenção, os resíduos carboxílicos estão a cerca de 5,5 Å de distância, e a reação ocorre por um mecanismo de duplo deslocamento (Rye; Withers, 2000).

Do ponto de vista estrutural, essas enzimas geralmente apresentam dois domínios distintos: um módulo de ligação à celulose (CBM) e um proeminente domínio catalítico (CD). O CD contém resíduos ativos que configuram uma bolsa ou fenda catalítica. A conexão entre os dois domínios modulares da proteína ocorre por meio de uma região de ligação flexível, rica em treonina e serina. O CBM, por sua vez, é composto por aproximadamente 35 resíduos de aminoácidos (Akram et al., 2018). Para efetuar a hidrólise da celulose, é essencial a colaboração sinérgica de três tipos principais de celulasas: endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases.

Essas enzimas atuam em diferentes sítios da molécula de celulose, promovendo a degradação em oligossacarídeos, celobiose e glicose (Kumla et al., 2020). A endoglucanase hidrolisa ligações glicosídicas, reduzindo o comprimento do polímero de celulose (Akram et al., 2021). A exoglucanase trabalha nas extremidades da celulose, liberando a celobiose como principal produto. Por fim, a β -glucosidase converte essa celobiose em glicose, concluindo o processo de hidrólise (Singh et al., 2021). O diagrama da degradação da celulose por diversas enzimas celulasas está representado na Figura 9.

Figura 9. Enzimas envolvidas na degradação da celulose.



Fonte: Kumla et al., (2020) com adaptações.

2.5.3 Endoglucanase

O complexo de endoglucanase é constituído por enzimas que desfazem ligações β -1,4-glicosídicas, sendo as principais endo- β -1,4-d-glucanase e endo- β -1,4-d-glucano-4-glucano-hidrolase (Singh et al., 2021). Ambas são referidas como CMCCase, devido à sua capacidade de hidrolisar carboximetilcelulose (CMC), um derivado solúvel da celulose desprovido da típica estrutura cristalina. A capacidade da CMCCase de quebrar ligações β -1,4-glicosídicas em β -1,4-glucanas é evidenciada pela hidrólise da CMC, independente da estrutura cristalina (Linton, 2020).

Endoglucanases representam a classe de celulases mais comercializada, ocupando aproximadamente 40% do mercado global (360 Researchreports, 2022). Sua aplicação mais expressiva está na ração animal, seguida por setores alimentícios, como sucos de frutas, cerveja, óleo e panificação, além das indústrias têxteis e de biocombustíveis (Chaudhary & Grover, 2023).

Figurando como um dos principais componentes nos coquetéis comerciais para a desconstrução de biomassa, as endoglucanases são enzimas que clivam as ligações β -1,4-glicosídicas na estrutura da celulose, gerando pequenos oligômeros de 4–6 unidades de glicose (Neis, 2021). Esses oligômeros, por sua vez, são hidrolisados em componentes menores (Linton, 2020). A atividade dessa enzima promove o aumento da acessibilidade nas extremidades das cadeias de celulose, ampliando a área superficial disponível para a ação catalítica da exoglucanase (Gan, Allen, Taylor, 2003).

Essas celulasas podem ser secretadas por diversos organismos, como arqueas, bactérias, fungos e outros eucariotos, sendo classificadas com base nos resíduos de aminoácidos e na estrutura tridimensional. Elas são distribuídas em famílias de GH (5, 9, 10, 12, 26, 44, 48, 51, 74, 81, 124 e 148), apresentando mecanismos catalíticos de inversão e retenção (Tong et al., 2023; Akram et al., 2018; Dabwal; Sharma; Satyanaryana, 2021).

A endoglucanase, por sua vez, desperta a atenção dos pesquisadores devido à sua notável capacidade processativa. Anteriormente associada principalmente às exoglucanases, essa capacidade é crucial para a hidrólise da celulose cristalina natural. Além disso, a endoglucanase exibe uma bifuncionalidade endo-/exo-, o que significa que não apenas quebra as ligações glicosídicas na região amorfa da celulose, mas também gera açúcares redutores solúveis de maneira processiva. Essa versatilidade faz da endoglucanase uma ferramenta promissora para a conversão eficiente da celulose em monossacarídeos e a produção de oligossacarídeos celulósicos (Wu, Wu, 2020).

2.5.4 Exoglucanase

Em contraste com as endoglucanases, que se concentram na região amorfa da celulose, as exoglucanases possuem a notável capacidade de atacar a estrutura cristalina deste polímero. Também conhecidas como celobiohidrolases (CBH), são enzimas que rompem as ligações β -1,4-glicosídicas da celulose, liberando moléculas de celobiose das extremidades das cadeias. Seu modo de atuação é processivo, o que significa que quebram a celulose ligação por ligação, partindo das extremidades e avançando progressivamente pela cadeia (Tong et al., 2023).

Existem muitos tipos diferentes de CBHs produzidos por bactérias e fungos, e podem ser encontradas nas famílias GH 5, 6, 7, 9 e 48. As exoglucanases ou CBHs também são classificadas como CBHI, aquelas que atuam a partir da extremidade redutora e (CBH II) aquelas que atuam a partir da extremidade não redutora da celulose (Dabwal; Sharma, Satyanaryana, 2021).

Pela forma de atuação em modo de sinergismo com as enzimas do complexo celololítico, são relatadas quatro combinações que beneficiam a hidrólise da celulose, sendo três delas em arranjo com a exoglucanase: (I) sinergia endo-exo, (II) sinergia exo-exo – esforço simultâneo na clivagem das extremidades redutoras e não-redutoras e (III) sinergia beta-exo (Fang et al., 2019; Thoresen et al., 2021).

2.5.5 β -glicosidade

A β -glucosidase ou celobiase é a principal enzima responsável pela etapa final da sacarificação da celulose, convertendo a celobiose em moléculas de glicose. Essa enzima catalisa a reação hidrolítica, quebrando a ligação glicosídica entre os resíduos de glicose na celobiose. Essa atividade pode ser através da transglicosilação, onde o grupo glicosil é transferido para outro nucleófilo, ou da hidrólise reversa, onde o β -glicosídeo é convertido em glicose (Paramjeet; Manasa; Korrapati, 2018).

Essas enzimas podem ser classificadas com base em sua atividade de substrato, ou seja, (I) aril- β -D-glucosidases (apresentam forte afinidade por aril- β -D-glicosídeos), (II) celobíases (hidrolisam apenas dissacarídeos e são consideradas celobíases verdadeiras) e (III) glicosidases de ampla especificidade (hidrolisam uma grande variedade de substratos, sendo as mais comuns) (Mól et al., 2023). Outra classificação se baseia na sua identidade de sequência de nucleotídeos, sendo agrupadas em famílias de GH1, 2, 3, 5, 9, 16, 30, 39 e 139 (Singh et al., 2021). A maioria e as principais β -glucosidases estão presentes nas famílias GH3 (secretadas por fungos) e GH1 (secretadas por bactérias) (Erkanli; El-Halabi; Kim, 2024).

Além da produção de biocombustível, são utilizadas em outras aplicações industriais, como na indústria de alimentos, cosméticos e tabaco (Erkanli; El-Halabi; Kim, 2024). Considerando a relevância do complexo celulolítico em diversas aplicações industriais e os altos custos e impactos ambientais da produção comercial de celulasas, a FES surge como uma alternativa promissora. Essa técnica é considerada simples e menos intensivo em energia, o que reduz significativamente os custos de produção. A produção de celulasas em um extrato multienzimático elimina a necessidade de etapas de purificação individual das enzimas. Além disso, a técnica permite a produção de celulasas com diferentes características, otimizadas para aplicações específicas (Lever; Ho; Cord-Ruwisch, 2010).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa em questão evidencia o potencial da FES como uma abordagem promissora na produção de celulases a partir de materiais lignocelulósicos regionais e resíduos agroindustriais. Os temas abordados neste estudo reforçam a viabilidade da FES para a transformação eficiente de biomassa lignocelulósica em produtos de valor agregado, tais como biocombustíveis, enzimas e bioprodutos.

A utilização da FES oferece diversas vantagens, como custos de produção reduzidos, facilidade de implementação, aproveitamento de matérias-primas regionais e resíduos agroindustriais, além de causar um impacto ambiental reduzido. Este estudo contribui de maneira significativa para o desenvolvimento de uma bioeconomia mais sustentável e ecológica, abrindo novas perspectivas para o fortalecimento de comunidades locais por meio da valorização de produtos anteriormente considerados de baixo valor comercial.

As perspectivas futuras incluem o aprimoramento da metodologia da FES visando o aumento da produção de celulases, bem como a expansão da aplicação dessa técnica em diferentes setores, como a indústria de alimentos e a produção de biocombustíveis. Essas iniciativas visam consolidar a FES como uma ferramenta versátil e eficaz na promoção de práticas econômicas e ambientais mais sustentáveis.

REFERÊNCIAS

360 RESEARCHREPORTS. **GLOBAL CELLULASE MARKET OUTLOOK 2022**. Pune, India: [s. n.], 2022.

AFEDZI, A. E. K.; OBENG-BOATENG, F.; ADUAMA-LARBI, M. S.; ZHOU, X.; XU, Y. Valorization of Ghanaian cocoa processing residues as extractives for value-added functional food and animal feed additives – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 52, p. 102835, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102835>

AHMED, T.; RANA, M. R.; ZZAMAN, W.; ARA, R.; AZIZ, M. G. Optimization of substrate composition for pectinase production from Satkara (*Citrus macroptera*) peel using *Aspergillus niger*-ATCC 1640 in solid-state fermentation. **Heliyon**, v. 7, n. 10, p. e08133, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08133>

AKHTAR, T.; HASHMI, A. S.; TAYYAB, M.; ANJUM, A. A.; SAEED, S.; ALI, S. Bio-conversion of Agricultural Waste to Butyric Acid Through Solid State Fermentation by *Clostridium tyrobutyricum*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 5, p. 2067–2073, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0475-7>

AKRAM, F.; HAQ, I. ul; AQEEL, A.; AHMED, Z.; SHAH, F. I. Thermostable cellulases: Structure, catalytic mechanisms, directed evolution and industrial implementations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 151, p. 111597, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111597>

AKRAM, F.; HAQ, I. ul; IMRAN, W.; MUKHTAR, H. Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review. **Renewable Energy**, v. 122, p. 225–238, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.01.095>

ALENCAR, B. R. A.; DUTRA, E. D.; SAMPAIO, E. V. de S. B.; MENEZES, R. S. C.; MORAIS, M. A. Enzymatic hydrolysis of cactus pear varieties with high solids loading for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 273–280, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.042>

ALMANAA, T. N.; VIJAYARAGHAVAN, P.; ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J. M.; ALYAHYA, S. A. Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 2, p. 1555–1561, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.12.011>

ARUNA, T. E.; AWORH, O. C.; RAJI, A. O.; OLAGUNJU, A. I. Protein enrichment of yam peels by fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* (BY4743). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 62, n. 1, p. 33–37, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aos.2017.01.002>

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinaria. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007. Disponível em: <http://web.bndes.gov.br/bib/jspui/handle/1408/2527>PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)

BELWAL, T.; CRAVOTTO, C.; RAMOLA, S.; THAKUR, M.; CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G. Bioactive Compounds from Cocoa Husk: Extraction, Analysis and Applications in Food Production Chain. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 798, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11060798>

CAI, C.; ZHANG, C.; LI, N.; LIU, H.; XIE, J.; LOU, H.; PAN, X.; ZHU, J. Y.; WANG, F. Changing the role of lignin in enzymatic hydrolysis for a sustainable and efficient sugar platform. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 183, p. 113445, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113445>

CANATAR, M.; TUFAN, H. N. G.; ÜNSAL, S. B. E.; KOC, C. Y.; OZCAN, A.; KUCUK, G.; BASMAK, S.; YATMAZ, E.; GERMEC, M.; YAVUZ, I.; TURHAN, I. Inulinase and fructooligosaccharide production from carob using *Aspergillus niger* A42 (ATCC 204447) under solid-state fermentation conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 245, p. 125520, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125520>

CARBOUÉ, Q.; CLAEYS-BRUNO, M.; BOMBARDA, I.; SERGENT, M.; JOLAIN, J.; ROUSSOS, S. Experimental design and solid state fermentation: A holistic approach to improve cultural medium for the production of fungal secondary metabolites. **Chemosometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 176, p. 101–107, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2018.03.011>

CHAUDHARY, N.; GROVER, M. Bioindustrial applications of thermostable Endoglucanase purified from *Trichoderma viride* towards the conversion of agrowastes to value-added products. **Protein Expression and Purification**, v. 211, p. 106324, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2023.106324>

DA CUNHA, M. C.; SILVA, L. C.; SATO, H. H.; DE CASTRO, R. J. S. Using response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 31–36, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.018>

DA ROSA-GARZON, N. G.; LAURE, H. J.; ROSA, J. C.; CABRAL, H. Valorization of agricultural residues using *Myceliophthora thermophila* as a platform for production of lignocellulolytic enzymes for cellulose saccharification. **Biomass and Bioenergy**, v. 161, p. 106452, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106452>

DE ARAÚJO, F. F.; DE PAULO FARIAS, D.; NERI-NUMA, I. A.; PASTORE, G. M. Underutilized plants of the Cactaceae family: Nutritional aspects and technological applications. **Food Chemistry**, v. 362, p. 130196, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130196>

DE BRITO, A. R.; SANTOS REIS, N. dos; SILVA, T. P.; FERREIRA BONOMO, R. C.; TROVATTI UETANABARO, A. P.; DE ASSIS, S. A.; DA SILVA, E. G. P.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. 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, n. 10, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1365247>

DE BRITO, A. R.; SANTOS REIS, N. dos; SILVA, T. P.; FERREIRA BONOMO, R. C.; TROVATTI UETANABARO, A. P.; DE ASSIS, S. A.; DA SILVA, E. G. P.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. 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 & Biotechnology**, v. 47, n. 10, p. 977–985, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1365247>

DE CARVALHO, M. S.; MENEZES, L. H. S.; PIMENTEL, A. B.; COSTA, F. S.; OLIVEIRA, P. C.; SANTOS, M. M. O.; TAVARES, I. M. C.; IRFAN, M.; BILAL, M.; DIAS, J. C.T.; OLIVEIRA, J.R.; FRANCO, M. Application of Chemometric Methods for the Optimization Secretion of Xylanase by *Aspergillus oryzae* in Solid State Fermentation and Its Application in the Saccharification of Agro-industrial Waste. *Waste and Bi-omass Valorization*, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01832-8>

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

DE OLIVEIRA RODRIGUES, P.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; BADOTTI, F.; GÓES-NETO, A.; BAFFI, M. A. Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. **Renewable Energy**, v. 145, p. 2683–2693, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>

DOS SANTOS, K. A.; DA COSTA ILHÉU FONTAN, R.; SANTOS, L. S.; DE CARVALHO BATISTA, I.; GANDOLFI, O. R. R.; DE SOUSA CASTRO, S.; SAMPAIO, V. S.; VELOSO, C. M.; BONOMO, R. C. F. Partitioning of amylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 116–125, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.028>

DOS SANTOS, T. C.; DE BRITO, A. R.; BONOMO, R. C. F.; PIRES, A. J. V.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; SILVA, T. P.; FRANCO, M. Statistical Optimization of Culture Conditions and Characterization for Ligninolytic Enzymes Produced from *Rhizopus* Sp. Using Prickly Palm Cactus Husk. **Chemical Engineering Communications**, v. 204, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00986445.2016.1230851>

DOS SANTOS, T. C.; DOS SANTOS REIS, N.; SILVA, T. P.; BONOMO, R. C. F.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Production, Optimisation and Partial Characterisation of Enzymes from Filamentous Fungi Using Dried Forage Cactus Pear as Substrate. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 4, p. 571–579, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-016-9810-z>

DOS SANTOS, T. C.; FILHO, G. A.; DE BRITO, A. R.; PIRES, A. J. V.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *aspergillus niger* and *rhizopus* sp. By solid state fermentation of prickly pear. **Revista**

Caatinga, v. 29, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n126rc>

DOS SANTOS, T. C.; FILHO, G. A.; OLIVEIRA, A. C.; ROCHA, T. J. O.; DE PAULA PEREIRA MACHADO, F.; BONOMO, R. C. F.; MOTA, K. I. A.; FRANCO, M. Application of response surface methodology for producing cellulolytic enzymes by solid-state fermentation from the purple mombin (*Spondias purpurea* L.) residue. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 1–7, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0001-4>

DOS SANTOS, T. C.; GOMES, D. P. P.; BONOMO, R. C. F.; FRANCO, M. Optimisation of solid state fermentation of potato peel for the production of cellulolytic enzymes. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1299–1304, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.115>

DUBEUX, J. C. B.; SANTOS, M. V. F. dos; CUNHA, M. V. da; SANTOS, D. C. dos; SOUZA, R. T. de A.; MELLO, A. C. L. de; SOUZA, T. C. de. Cactus (*Opuntia* and *Nopalea*) nutritive value: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 275, p. 114890, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114890>

EMENIKE, E. C.; IWUOZOR, K. O.; SALIU, O. D.; RAMONTJA, J.; ADENIYI, A. G. Advances in the extraction, classification, modification, emerging and advanced applications of crystalline cellulose: A review. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 6, p. 100337, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100337>

FERRAZ, J. L. A. de A.; OLIVEIRA SOUZA, L.; GUSTAVO DE ARAÚJO FERNANDES, A.; LUIZ FERREIRA OLIVEIRA, M.; DE 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, n. 1, p. 31–42, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1572000>

FILHO, P. F. de S.; RIBEIRO, V. T.; SANTOS, E. S. dos; MACEDO, G. R. de. Simultaneous saccharification and fermentation of cactus pear biomass—evaluation of using different pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 425–433, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.028>

GUERRIERO, G.; HAUSMAN, J.-F.; STRAUSS, J.; ERTAN, H.; SIDDIQUI, K. S. Destructuring plant biomass: Focus on fungal and extremophilic cell wall hydrolases. **Plant Science**, v. 234, p. 180–193, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.02.010>

GUO, H.; ZHAO, Y.; CHANG, J.-S.; LEE, D.-J. Enzymes and enzymatic mechanisms in enzymatic degradation of lignocellulosic biomass: A mini-review. **Bioresource Technology**, v. 367, p. 128252, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128252>

HAMROUNI, R.; CLAEYS-BRUNO, M.; MOLINET, J.; MASMOUDI, A.; ROUSOS, S.; DUPUY, N. Challenges of Enzymes, *Conidia* and 6-Pentyl- α -pyrone Production from Solid-State-Fermentation of Agroindustrial Wastes Using Experimental

Design and *T. asperellum* Strains. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 11, p. 5699–5710, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00908-2>

HERNÁNDEZ-BELTRÁN, J. U.; HERNÁNDEZ-DE LIRA, I. O.; CRUZ-SANTOS, M. M.; SAUCEDO-LUEVANOS, A.; HERNÁNDEZ-TERÁN, F.; BALAGURUSAMY, N. Insight into Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass to Increase Biogas Yield: Current State, Challenges, and Opportunities. **Applied Sciences**, v. 9, n. 18, p. 3721, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app9183721>

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. 105481, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105481>

IMTIAZ ANANDO, A.; EHSAN, M. M.; KARIM, M. R.; BHUIYAN, A. A.; AHIDUZZAMAN, M.; KARIM, A. Thermochemical pretreatments to improve the fuel properties of rice husk: A review. **Renewable Energy**, v. 215, p. 118917, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.118917>

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. **Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Cocoa year 2022/23**, vol. 49, n. 4, 2023. Disponível em: Home - International Cocoa Organization (icco.org)

JEDVERT, K.; HEINZE, T. Cellulose modification and shaping – a review. **Journal of Polymer Engineering**, v. 37, n. 9, p. 845–860, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/polyeng-2016-0272>

JIN, Z.; PENG, S.; NIE, L. Active compounds: A new direction for rice value addition. **Food Chemistry: X**, v. 19, p. 100781, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100781>

JO, C.; ZHANG, J.; TAM, J. M.; CHURCH, G. M.; KHALIL, A. S.; SEGRÈ, D.; TANG, T.-C. Unlocking the magic in mycelium: Using synthetic biology to optimize filamentous fungi for biomanufacturing and sustainability. **Materials Today Bio**, v. 19, p. 100560, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100560>

JUNQUEIRA, L.L.; DE-BRITO, A.R.; FRANCO, M.; DE-ASIS, S. A. Partial characterization and immobilization of carboxymethylcellulase from *Aspergillus niger* produced by solid-state fermentation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 19, n. 1, p. 241–250, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexin-guim/2019v18n1/Junqueira>

KUMAR, V.; AHLUWALIA, V.; SARAN, S.; KUMAR, J.; PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. **Bioresour Technol**, v. 323, p. 124566, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>

KUMLA, J.; SUWANNARACH, N.; SUJARIT, K.; PENKHRUE, W.; KAKUMYAN, P.; JATUWONG, K.; VADTHANARAT, S.; LUMYONG, S. Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-

- Industrial Waste. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2811, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25122811>
- LESSA, O. A.; REIS, N. dos S.; LEITE, S. G. F.; GUTARRA, M. L. E.; SOUZA, A. O.; GUALBERTO, S. A.; DE OLIVEIRA, J. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FRANCO, M. Effect of the solid state fermentation of cocoa shell on the secondary metabolites, antioxidant activity, and fatty acids. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 107–113, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0196-x>
- LEVER, M.; HO, G.; CORD-RUWISCH, R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 18, p. 7083–7087, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.012>
- LI, C.; ZHOU, J.; DU, G.; CHEN, J.; TAKAHASHI, S.; LIU, S. Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production. **Biotechnology Advances**, v. 44, p. 107630, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107630>
- LIM, S.-F.; MATU, S. U. Utilization of agro-wastes to produce biofertilizer. **International Journal of Energy and Environmental Engineering**, v. 6, n. 1, p. 31–35, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40095-014-0147-8>
- LÓPEZ, D. N.; GALANTE, M.; RUGGIERI, G.; PIARUCHI, J.; DIB, M. E.; DURAN, N. M.; LOMBARDI, J.; DE SANCTIS, M.; BOERIS, V.; RISSO, P. H.; SPELZINI, D. Peptidase from *Aspergillus niger* NRRL 3: Optimization of its production by solid-state fermentation, purification and characterization. **LWT**, v. 98, p. 485–491, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.013>
- LV, Y.; LIU, X.; ZHOU, S.; YU, Q.; XU, Y. Microbial saccharification – Biorefinery platform for lignocellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 189, p. 115761, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115761>
- MADHAVAN, A.; ARUN, K.; SINDHU, R.; ALPHONSA JOSE, A.; PUGAZHENDHI, A.; BINOD, P.; SIROHI, R.; RESHMY, R.; KUMAR AWASTHI, M. Engineering interventions in industrial filamentous fungal cell factories for biomass valorization. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126209, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126209>
- 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, 2020. Disponível em: <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. Production and Characterisation of Xylanase and Endoglucanases Produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 Through the Solid-State Fermentation of Rice Husk Residue. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 11, p. 2061–2069, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-017-9994-x>

MENEZES, L. H. S. de; CARNEIRO, L. L.; MARIA DE CARVALHO TAVARES, I.; SANTOS, P. H.; PEREIRA DAS CHAGAS, T.; MENDES, A. A.; PARANHOS DA SILVA, E. G.; FRANCO, M.; RANGEL DE OLIVEIRA, J. 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**, v. 31, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101885>

MORDOR INTELLIGENCE. **RICE MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS (2022 - 2027)**. Hyderabad, India: [s. n.], 2021.

NEIS, A.; DA SILVA PINTO, L. Glycosyl hydrolases family 5, subfamily 5: Relevance and structural insights for designing improved biomass degrading cocktails. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 980–995, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.062>

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

NOGUEIRA, L. S. TAVARES, I. M. C.; SANTANA, N. B.; FERRÃO, S. P.B.; TEIXEIRA, J. M.; COSTA, F. S. Thermostable trypsin-like protease by *Penicillium roqueforti* secreted in cocoa shell fermentation: Production optimization, characterization, and application in milk clotting. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 5, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bab.2268>

NUNES, N. DA S.; CARNEIRO, L. L.; DE MENEZES, L. H. S.; DE CARVALHO, M. S.; PIMENTEL, A. B.; SILVA, T. P.; CHAGAS, T. P.; SILVA, E. G. P.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium Roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. **BioEnergy Research**, v. 13, n. 4, p. 1130–1143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>

OLIVEIRA, P. C.; DE BRITO, A. R.; PIMENTEL, A. B.; SOARES, G. A.; PACHECO, C. S. V.; SANTANA, N. B.; DA SILVA, E. G. P.; FERNANDES, A. G. A.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 18, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira>

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 81-84, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)

QU, F.; CHENG, H.; HAN, Z.; WEI, Z.; SONG, C. Identification of driving factors of lignocellulose degrading enzyme genes in different microbial communities during rice straw composting. **Bioresource Technology**, v. 381, p. 129109, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129109>

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

RICO-GARCÍA, D.; RUIZ-RUBIO, L.; PÉREZ-ALVAREZ, L.; HERNÁNDEZ-OLMOS, S. L.; GUERRERO-RAMÍREZ, G. L.; VILAS-VILELA, J. L. Lignin-Based Hydrogels: Synthesis and Applications. **Polymers**, v. 12, n. 1, p. 81, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/polym12010081>

ROMERO, S. M.; GIUDICESSI, S. L.; VITALE, R. G. Is the fungus *Aspergillus* a threat to cultural heritage? **Journal of Cultural Heritage**, v. 51, p. 107–124, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.culher.2021.08.002>

SAINI, J. K.; HIMANSHU; HEMANSI; KAUR, A.; MATHUR, A. Strategies to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for biorefinery applications: A review. **Bioresource Technology**, v. 360, p. 127517, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127517>

SAINI, S.; SHARMA, K. K. Fungal lignocellulolytic enzymes and lignocellulose: A critical review on their contribution to multiproduct biorefinery and global biofuel research. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 2304–2319, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.063>

SANTOS, T. do N.; DUTRA, E. D.; GOMES DO PRADO, A.; LEITE, F. C. B.; DE SOUZA, R. de F. R.; DOS SANTOS, D. C.; MORAES DE ABREU, C. A.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A.; MENEZES, R. S. C. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 215–222, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.12.005>

SHARMA, S.; NAIR, A.; SARMA, S. J. Biorefinery concept of simultaneous saccharification and co-fermentation: Challenges and improvements. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 169, p. 108634, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108634>

SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L. de; SILVA, J. de C.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1039–1044, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.081>

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

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

- SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; KAUR, K.; PANDEY, A. Statistical optimization of solid-state fermentation for the production of fungal inulinase from apple pomace. **Biore-source Technology Reports**, v. 9, p. 100364, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100364>
- SIQUEIRA, J. G. W.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>
- SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>
- SONG, Y.; MASKEY, S.; LEE, Y. G.; LEE, D.-S.; NGUYEN, D.-T.; BAE, H.-J. Optimizing bioconversion processes of rice husk into value-added products: D-psicose, bioethanol, and lactic acid. **Bioresource Technology**, v. 395, p. 130363, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130363>
- SOSA-MARTÍNEZ, J. D.; MONTAÑEZ, J.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; BALAGURUSAMY, N.; GADI, S. K.; MORALES-OYERVIDES, L. Agroindustrial and food processing residues valorization for solid-state fermentation processes: A case for optimizing the co-production of hydrolytic enzymes. **Journal of Environmental Management**, v. 347, p. 119067, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.119067>
- SOUZA, L. O.; SANTOS, I. A.; TAVARES, I. M. DE C.; SAMPAIO, I. C. F.; DIAS, M. C.; TONOLI, G. H. D.; DE CARVALHO, E. E. N.; VILAS BOAS, E. V. DE B.; IRFAN, M.; BILAL, M.; DE OLIVEIRA J. R.; FRANCO, M. Procurement and Characterization of Biodegradable Films made from Blends of Eucalyptus, Pine and Cocoa Bean Shell Nanocelluloses. **Waste and Biomass Valorization**, n. 0123456789, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01762-5>
- SURYADI, H.; JUDONO, J. J.; PUTRI, M. R.; ECLESSIA, A. D.; ULHAQ, J. M.; AGUSTINA, D. N.; SUMIATI, T. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. **Heliyon**, v. 8, n. 2, p. e08865, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08865>
- TAI, W. Y.; TAN, J. S.; LIM, V.; LEE, C. K. Comprehensive studies on optimization of cellulase and xylanase production by a local indigenous fungus strain via solid state fermentation using oil palm frond as substrate. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.2781>
- THORESEN, M.; MALGAS, S.; MAFA, M.; PLETSCHE, B. Revisiting the Phenomenon of Cellulase Action: Not All Endo- and Exo-Cellulase Interactions Are Synergistic. **Catalysts**, v. 11, n. 2, p. 170, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal11020170>
- TONG, X.; HE, Z.; ZHENG, L.; PANDE, H.; NI, Y. Enzymatic treatment processes for the production of cellulose nanomaterials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 299, p. 120199, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120199>

TONG, X.; HE, Z.; ZHENG, L.; PANDE, H.; NI, Y. Enzymatic treatment processes for the production of cellulose nanomaterials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 299, p. 120199, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120199>

TROIANO, D.; ORSAT, V.; DUMONT, M. J. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 117, p. 109472, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109472>

VASIĆ, K.; KNEZ, Ž.; LEITGEB, M. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 753, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26030753>

WANG, J.; HUANG, Z.; JIANG, Q.; ROUBÍK, H.; XU, Q.; GHARSALLAOUI, A.; CAI, M.; YANG, K.; SUN, P. Fungal solid-state fermentation of crops and their by-products to obtain protein resources: The next frontier of food industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 138, p. 628–644, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.020>

WANG, Z.; DEUSS, P. J. The isolation of lignin with native-like structure. **Biotechnology Advances**, v. 68, p. 108230, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108230>

WU, S.; WU, S. Processivity and the Mechanisms of Processive Endoglucanases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 2, p. 448–463, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03096-w>

WU, Z.; PENG, K.; ZHANG, Y.; WANG, M.; YONG, C.; CHEN, L.; QU, P.; HUANG, H.; SUN, E.; PAN, M. Lignocellulose dissociation with biological pretreatment towards the biochemical platform: A review. **Materials Today Bio**, v. 16, p. 100445, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100445>

XU, C.; TONG, S.; SUN, L.; GU, X. Cellulase immobilization to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: An all-inclusive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 321, p. 121319, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121319>

XU, L.; SUN, K.; WANG, F.; ZHAO, L.; HU, J.; MA, H.; DING, Z. Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization. **Journal of Environmental Management**, v. 270, p. 110904, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110904>

YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. **Heliyon**, v. 8, n. 3, p. e09173, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09173>

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319–338, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>

YU, M.; LI, J.; LI, S.; DU, R.; JIANG, Y.; FAN, G.; ZHAO, G.; CHANG, S. A cost-effective integrated process to convert solid-state fermented sweet sorghum bagasse into

cellulosic ethanol. **Applied Energy**, v. 115, p. 331–336, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.11.020>

ZHANG, Y.; WANG, L.; LI, T.; SHEN, Y.; LUO, J. Acid soaking followed by steam flash-explosion pretreatment to enhance saccharification of rice husk for poly(3-hydroxybutyrate) production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 446–455, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.218>

ZHOU, M.; TIAN, X. Development of different pretreatments and related technologies for efficient biomass conversion of lignocellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 202, p. 256–268, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.036>

CAPÍTULO 2

***Aspergillus niger* ATCC 1004 como plataforma de produção de endoglucanase através da fermentação em estado sólido utilizando biomassa lignocelulósicas**

***Aspergillus niger* ATCC 1004 COMO PLATAFORMA DE PRODUÇÃO DE ENDOGLUCANASE ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

RESUMO

As celulasas, enzimas essenciais para a bioconversão de biomassa lignocelulósica, são altamente eficientes na degradação da celulose. O fungo *Aspergillus niger* oferece uma forma econômica para a produção dessas enzimas através da fermentação em estado sólido utilizando matérias-primas acessíveis. Utilizando o planejamento fatorial de simplex centróide, foi determinada a composição ideal da mistura para a produção de endoglucanase, composta por 80% de casca de amêndoa de cacau e 20% de palma forrageira. O planejamento de Doehlert identificou as condições ótimas de fermentação em 28 °C e 60% de umidade, com uma duração ideal de 96 horas. A caracterização da endoglucanase revelou uma natureza acidófila, com pico de atividade em pH 5 e temperatura ideal de 50 °C. As avaliações de estabilidade térmica indicaram resistência a temperaturas de 60 °C, 70 °C e 80 °C ao longo do período de avaliação. A enzima também exibiu características halotolerantes e considerável flexibilidade a íons e solventes. Notadamente, a hidrólise enzimática produziu $13,03 \pm 0,02$ mg de açúcares redutores por grama de resíduo de casca de arroz sem pré-tratamento ou aditivos, o que evidencia o potencial da enzima para processos biotecnológicos economicamente viáveis. A quantificação individual de açúcares identificou a produção de glicose (7,24 mg/L) e frutose (11,21 mg/L). Esses resultados demonstram o potencial da aplicação da endoglucanase de *Aspergillus niger* para a produção de xarope de alta frutose a partir da casca de arroz. As propriedades da enzima e a eficiência do processo biotecnológico desenvolvido abrem perspectivas promissoras para futuras aplicações em larga escala.

Palavras-chaves: Celulase; Hidrólise enzimática; Xarope de glicose; Resíduos agroindustriais.

***Aspergillus niger* ATCC 1004 AS A PLATFORM FOR ENDOGLUCANASE PRODUCTION THROUGH SOLID-STATE FERMENTATION USING LIGNOCELLULOSIC BIOMASS**

ABSTRACT

Cellulases, pivotal in lignocellulosic biomass bioconversion, are enzymes proficient in cellulose degradation. *Aspergillus niger* offers a cost-effective avenue for their production via solid-state fermentation using economical raw materials. Employing Simplex centroid design, the optimal mixture composition for endoglucanase production was determined, comprising 80% cocoa almond shell and 20% forage palm. Doehlert planning identified prime fermentation conditions at 28 °C and 60% humidity, with an optimal duration of 96 h. Endoglucanase characterization revealed an acidophilic nature, with peak activity at pH 5 and an ideal temperature of 50 °C. Thermal stability assessments indicated resilience at temperatures of 60 °C, 70 °C, and 80 °C throughout the evaluation period. The enzyme also displayed halotolerant traits and considerable flexibility to ions and solvents. Remarkably, enzymatic hydrolysis yielded 13.03 ± 0.02 mg of reducing sugars per gram of rice husk residue sans pretreatment or adjuncts, underscoring the enzyme's potential for cost-efficient biotechnological processes. Individual sugar quantification identified the production of glucose (7.24 mg/L) and fructose (11.21 mg/L). These results demonstrate the potential of applying *Aspergillus niger* endoglucanase to produce high-fructose syrup from rice husk. The enzyme properties and the efficiency of the developed biotechnological process open promising perspectives for future large-scale applications.

Keywords: Cellulase; Enzymatic hydrolysis; Glucose syrup; Agroindustrial residues.

1. INTRODUÇÃO

Celulases são um complexo de enzimas celulolíticas que atuam sinergicamente para a conversão de celulose em glicose, possibilitando uma miríade de aplicações a substratos que contenham esse polímero, tais como a fermentação de seus monômeros para produção de bioetanol de segunda geração (Kausar et al., 2021). Dentre as celulases, as endoglucanases (EC 3.2.1.4) hidrolizam ligações β -1,4-glicosídicas internas aleatórias de moléculas de celulose (Hoda; Tafaj; Sallaku, 2021).

A enzimas celulolíticas possuem um vasto nicho de aplicações (Ejaz; Sohail; Ghaneimi, 2021), abrangendo os setores de têxteis (Sarkar et al., 2020), biocombustíveis (Siqueira et al., 2020), sanitizantes (Niyonzima, 2021), alimentos (Santana et al., 2021), ração (Velázquez-de Lucio et al., 2021), polpa de frutas (Pradhan; Abdullah; Pradhan, 2021) e de papel (Singh et al., 2016). Ademais, também podem ser empregadas em digestivos de silagem animal (So; Cherdthong; Wanapat, 2020), gerenciamento de resíduos agroindustriais (Khan et al., 2016) e para o enriquecimento de células fúngicas (Tibbetts; Mann; Dumas, 2017).

Como o terceiro maior grupo de enzimas utilizadas no setor industrial (Wang *et al.*, 2016a), o capital de mercado das celulases foi estimado em 1,8 bilhão de dólares em 2022 e acredita-se que alcance 2,8 bilhões até 2029. A classe de celulases mais comercializada é a das endoglucanases com uma fatia de cerca de 40% do mercado e o maior nicho de aplicação o de ração animal, seguido pelos de alimentos, bebidas, têxteis e biocombustíveis (360 Researchreports, 2022).

Apesar de existirem celulases produzidas por artropodes (Lo; Tokuda; Watanabe, 2010) e plantas (Hayashi et al., 2005), os microrganismos apresentam vantagens para sua produção, pois seus produtos são mais estáveis, podem ser cultivados com menor custo, espaço e duração, sendo dessa forma, mais fácil a otimização de processos industriais (GURUNG et al., 2013). A obtenção industrial dessas enzimas é realizada através da fermentação de cepas altamente desenvolvidas de Ascomycota majoritariamente por companhias Norte Americanas e Européias (Mcmillan et al., 2011). Dentre esses, os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* são os mais utilizados.

Uma técnica chamada fermentação em estado sólido (FES) tem sido proposta nos últimos anos como uma forma de produzir enzimas mais eficiente, econômica e viável para o uso comercial (Vandenberghe et al., 2020). A FES permite a produção da enzima endoglucanase a partir de vários matérias-primas. Por exemplo, casca de arroz e cacau com *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 e *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 (Brito et al.,

2017, Marques et al., 2018, Oliveira et al., 2019, Reis et al., 2020). A palma forrageira foi empregada com *Aspergillus niger* e *Rhizopus sp* (Santos et al., 2016). Esses exemplos mostram o potencial das tecnologias baseadas na FES para aproveitar matérias-primas como resíduos de cacau e arroz, e palma forrageira, que são objetos de estudo promissores na área de bioprocessos.

Para aumentar a produção e reduzir os custos da produção enzimática, é essencial otimizar os parâmetros do processo. Uma técnica comum para otimizar as variáveis que afetam a produção de enzimas é por um fator de cada vez (OFAT), que consiste em alterar somente um fator ou variável por vez. No entanto, essa técnica tem desvantagens como alto custo e tempo, além de baixa eficácia quando há muitas variáveis envolvidas (Ahmed et al., 2019). Uma limitação dessa ferramenta é que ela não consegue identificar as condições ótimas de uma variável dependente do processo, pois ignora as relações entre um conjunto de experimentos planejados e as interações entre todas as variáveis (Amadi et al., 2020).

Para aumentar a produção e reduzir os custos da produção enzimática, é essencial otimizar os parâmetros do processo. Em comparação ao One Factor At a Time (OFAT), um planejamento experimental é mais eficiente para avaliar o efeito de dois ou mais fatores em uma variável dependente, pois usa menos recursos como número de experimentos, tempo e materiais. O planejamento de superfície de resposta (RSM) é uma técnica que permite otimizar sistematicamente múltiplos fatores e analisar as interações entre eles, sendo muito utilizada para otimizar processos, como a produção de enzimas (Suwannarangsee et al., 2012).

O design de mistura Simplex-Centroide é um método estatístico utilizado na RSM para otimizar misturas de substratos com o objetivo de identificar a composição ótima. Esse método mostra o percentual de cada componente que proporciona a máxima eficiência ao sistema (Nunes et al., 2020). A escolha estratégica da composição da mistura, quando se trata de FES usando diferentes substratos lignocelulósicos, pode proporcionar vantagens na obtenção de processos mais eficientes e lucrativos. Isso ocorre porque permite a combinação dos nutrientes essenciais de maneira sinérgica para o processo fermentativo. Em outras palavras, a escolha estratégica da composição da mistura pode ser uma forma eficiente de otimizar o processo fermentativo (Carvalho et al., 2022). Esse design foi aplicado para obter a composição ótima dos resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, casca de cacau e casca de amendoim) para a máxima produção da Xilanase por *Aspergillus oryzae* sob o FES e para avaliar os efeitos da interação em uma

mistura de componentes (Carvalho et al., 2022). Esse é um exemplo de como o design de mistura Simplex-Centroides pode ser utilizado para otimizar a produção de enzimas em processos fermentativos.

O planejamento Doehlert é uma técnica estatística que permite otimizar variáveis do processo, tais como tempo, temperatura e umidade. Essa técnica é um planejamento experimental de segunda ordem que pode avaliar duas, três ou mais variáveis. Nesse método, os pontos da matriz Doehlert formam figuras geométricas regulares, como um hexágono para duas variáveis ou um círculo, uma esfera ou uma hipersfera para três ou mais variáveis. O planejamento Doehlert pode proporcionar vantagens na obtenção de processos mais eficientes e lucrativos (Nogueira et al., 2022). Esse planejamento foi aplicado para estudar os parâmetros de temperatura e tempo de incubação para produção de xilanase e endoglucanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por FES (Marques et al., 2018).

Na seara do beneficiamento e valoração de resíduos agroindustriais, o fungo filamentososo *Aspergillus niger* tem se mostrado uma versátil biofactory para obtenção de enzimas de importância biotecnológica tal como endoglucanase (Santos et al., 2016). Sua incontestável importância industrial tem direcionado esforços para a otimização de processos para obtenção de enzimas por vias com melhor custo benefício e para o beneficiamento de resíduos agroindustriais. Esse microrganismo já foi empregado para obtenção de enzimas através de diversos substratos, tais como resíduos de *Croton linearifolius* (Luz et al., 2021), *cactus pear* (Reis et al., 2019), *prickly palm cactus* (Santos et al., 2016) e resíduos de manga (Santos et al., 2011) visando aplicações tais como a extração de óleos essenciais (Costa et al., 2022) e processos de sacarificação (Wang et al., 2019).

Dada a abrangência de uso e valor industrial da endoglucanase, faz-se necessário encontrar mistura de substratos lignocelulósicos que sejam eficazes para a sua produção, expandindo a valoração de matérias primas que, apesar de amplamente disponíveis, ainda não possuem um papel econômico relevante. Para tal, o presente trabalho otimizou a produção de endoglucanase através de misturas de palma forrageira e os resíduos de casca da amêndoa de cacau e arroz como matérias-primas para a fermentação em estado sólido através do fungo filamentososo *Aspergillus niger* ATCC 1004. Como forma de demonstrar sua utilização, a enzima produzida foi aplicada na sacarificação de casca de arroz. Adicionalmente, foram estudadas, as variáveis que influenciam na produção enzimática, como pH, temperatura, tempo de incubação e efeito de compostos através da caracterização bioquímica da endoglucanase.

2. METODOLOGIA

2.1 Microrganismo

A cepa de *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizada neste estudo foi adquirida do INCQS/Fiocruz (município de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) e pode ser consultado sob o código 40018. A cepa foi mantida a 4 °C em meio ágar-dextrose-batata (PDA). A suspensão de esporos foi preparada utilizando o microrganismo cultivado em meio PDA por 7 dias a 26 °C. Após a incubação, a cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 (0,01%, v/v) e a contagem do número de esporos foi realizada com o auxílio de um microscópio binocular (modelo BA-210, Motic) e uma câmara de Neubauer.

2.2 Biomassa lignocelulósica

O resíduo de casca de arroz (CA) (*Oryza Sativa*) foi obtido de agroindústria de beneficiamento de arroz, localizada na região oeste do estado da Bahia, no Brasil. A casca da amêndoa do cacau (CC) (*Theobroma cacao*) foi cedido pela empresa Barry Callebaut (município de Itabuna, Bahia, Brasil). A palma forrageira (PA) (*Nopalea cochenillifera*) foi doada pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) (Itapetinga, Bahia, Brasil).

Os materiais foram submetidos a moagem em um moinho Wiley para um tamanho de partícula de aproximadamente 2 mm. A umidade da biomassa foi determinada em um equipamento de infravermelho (ID200, MARTE, São Paulo, Brasil).

Para a caracterização das matérias-primas foram aplicadas análises bromatológicas para obtenção dos teores de lignina, celulose, hemicelulose, material mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e extrato etéreo (EE) (Detmann et al., 2012). Os valores foram expressos em porcentagem (g/100 g) de matéria seca.

2.3 Fermentação em estado sólido

O processo de fermentação foi realizado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g das misturas de biomassas. A inoculação foi realizada com 10^7 de esporos/grama de biomassa e a umidade desejada foi obtida com adição de água destilada autoclavada. As culturas foram conduzidas em uma incubadora BOD (TE-371, Tecnal, Piracicaba, Brasil) com temperatura controlada (Silva et al., 2018).

O tempo ótimo para a máxima atividade da endoglucanase foi determinado

através de testes com intervalos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h. Aliquotas foram retiradas a cada intervalo de tempo para fazer a quantificação da atividade da enzima. Nessa etapa foram fixadas as condições de temperatura (26° C) e umidade (70 %) a partir de trabalhos previamente realizados pelo grupo de pesquisa.

2.4 Obtenção do blend enzimático

Após a fermentação, 50 mL de água destilada foram adicionados matéria-prima fermentada e a mistura foi agitada em uma incubadora (QUIMIS, São Paulo, Brasil) a 30 °C e 200 rpm por 30 min. A fase líquida foi separada por prensagem mecânica, obtendo-se a permeação da gaze seguida de centrifugação (modelo CT-6000R, Cientec, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) por 10 minutos a 4000 rpm para remoção das impurezas (Silva et al., 2018) com modificações.

2.5 Otimização multivariada

A otimização da produção de endoglucanase foi realizada em duas etapas, utilizando-se dois delineamentos estatísticos. Na primeira etapa, foi realizada a otimização da mistura de materiais lignocelulósicos de forma multivariada, a partir da aplicação de um delineamento Simplex-Centroide, para obtenção da melhor composição para a produção da enzima. Os componentes foram estudados em frações percentuais utilizando um desenho de mistura com nove corridas experimentais (Tabela 1), incluindo repetições dos níveis do ponto central para estimar o erro experimental. O delineamento experimental foi utilizado para obter a composição ótima das biomassas lignocelulósicas (CC, CA e PA), para a máxima produção da enzima endoglucanase e para avaliar os efeitos da interação em uma mistura de componentes.

Tabela 1. Matriz experimental do planejamento de mistura simplex-centroide e resposta experimental apresentada em valor real e codificado

Experimento	Casca de Cacau – A (g)	Palma – B (g)	Casca de arroz – C (g)	Endoglucanase (U/mL)
1	5 (1)	0 (0)	0 (0)	0.77 ($\pm 0,01$)
2	0 (0)	5 (1)	0 (0)	0.60 ($\pm 0,00$)
3	0 (0)	0 (0)	5 (1)	0.00 ($\pm 0,00$)
4	2.5 (0,5)	2.5 (0,5)	0 (0)	0.57 ($\pm 0,02$)
5	2.5 (0,5)	0 (0)	2.5 (0,5)	0.47 ($\pm 0,02$)
6	0 (0)	2.5 (0,5)	2.5 (0,5)	0.31 ($\pm 0,01$)
7*	1.66 (0,33)	1.66 (0,33)	1.66 (0,33)	0.26 ($\pm 0,01$)
8*	1.66 (0,33)	1.66 (0,33)	1.66 (0,33)	0.25 ($\pm 0,03$)
9*	1.66 (0,33)	1.66 (0,33)	1.66 (0,33)	0.23 ($\pm 0,00$)

Na segunda etapa, realizou-se a otimização das condições aplicadas no processo de fermentação, como temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e umidade (%), por meio do Planejamento Doehlert. A matriz experimental foi composta por seis corridas experimentais (Tabela 2), incluindo as repetições dos níveis de ponto central. A atividade de endoglucanase (U/mL) foi a resposta experimental utilizada para obter os modelos matemáticos.

Tabela 2. Matriz experimental Doehlert apresentada em valor real e codificado usada para otimizar as condições experimentais aplicadas à fermentação em estado sólido para produção de endoglucanase de *Aspergillus niger* ATCC 1004.

Experi- mento	Temperatura – A ($^{\circ}\text{C}$)	Umidade – B (%)	Endoglucanase (U/mL)
1	36 (1)	70 (0)	0,32 ($\pm 0,00$)
2	32 (0,5)	80 (0,866)	0,34 ($\pm 0,01$)
3	20 (-1)	70 (0)	0,27 ($\pm 0,00$)
4	24 (-0,5)	60 (-0,866)	0,42 ($\pm 0,03$)
5	32 (0,5)	60 (-0,866)	0,40 ($\pm 0,02$)
6	24 (-0,5)	80 (0,866)	0,30 ($\pm 0,01$)
7*	28 (0)	70 (0)	0,40 ($\pm 0,01$)
8*	28 (0)	70 (0)	0,41 ($\pm 0,00$)
9*	28 (0)	70 (0)	0,38 ($\pm 0,01$)

As condições experimentais ótimas estabelecidas para os testes foram obtidas por meio de trabalhos previamente realizados pelo grupo de pesquisa do presente estudo. Os modelos de regressão foram ajustados para variações de resposta em função dos efeitos de interação significativos ($p < 0,05$) entre as variáveis. Finalmente, a qualidade do ajuste do modelo foi avaliada considerando coeficiente de determinação (R^2) e o teste F obtidos na análise de variância (ANOVA). O software Statistica 12 (Statsoft, EUA) foi utilizado no processamento dos dados experimentais, incluindo a análise estatística e determinação dos pontos ótimos.

2.6 Determinação da atividade da endoglucanase

Foi aplicado o método baseado na medição dos açúcares redutores produzidos pela degradação de 2% (p/v) de carboximetilcelulose (CMC) (Cromoline, Diadema, Brasil) diluído em $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ de tampão acetato de sódio em pH 5,0 (Miller, 1959). O método do ácido dinitrosalicílico – DNS – (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado para a quantificação de açúcares redutores de acordo com (Silva et al., 2018) com modificações. Os ensaios de reação foram conduzidos pela adição de $100 \mu\text{L}$ da solução de CMC em $100 \mu\text{L}$ do blend enzimático. Os blends foram diluídos na proporção de 1/5. O ensaio em branco continha $100 \mu\text{L}$ de CMC (Cromoline, Diadema, Brasil) e $100 \mu\text{L}$ de água destilada.

As amostras foram incubadas em banho maria (TE-054; Tecnal) a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min, seguidas da adição de $200 \mu\text{L}$ de DNS (Sigma-Aldrich). Posteriormente, os tubos foram submetidos a banho maria a 100°C por 5 min e seguida da adição de 2 mL de água destilada para medição de absorbância em 540 nm em um espectrofotômetro (UV-M51 UV/Vis; Spectrophotometer). Uma unidade internacional de atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol}$ de redução de açúcares por minuto a 50°C .

2.7 Caracterização bioquímica

2.7.1 Efeito da temperatura e estabilidade térmica com estimativa dos parâmetros termodinâmicos

O efeito da temperatura na atividade da endoglucanase prosseguiu com a determinação padrão da atividade enzimática na hidrólise de carboximetilcelulose com incubação do blend enzimático em diferentes temperaturas (40 a $80 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 15 minutos de reação (Brito et al., 2017).

Os ensaios de estabilidade térmica procederam com a incubação das amostras da solução enzimática em diferentes temperaturas (60, 70 e 80°C) em tampão acetato de sódio em pH 5,0 (força iônica 0,1 mol. L⁻¹). Em tempos pré-determinados, alíquotas do sistema foram coletadas e imediatamente resfriadas em banho de gelo por 1 min para interromper o processo de inativação, seguida da determinação da atividade enzimática residual na hidrólise de carboximetilcelulose a 50 °C. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática determinada antes da incubação.

Neste estudo, os modelos cinéticos de decaimento linear (Saleem et al., 2005) e não linear (Sadana; Henley, 1987) foram ajustados aos dados experimentais obtidos com o intuito de elucidar o processo de inativação térmica da enzima. O método cinético de melhor ajuste, baseado no coeficiente de correlação (R²), foi empregado para determinar os parâmetros cinéticos (constante de inativação térmica – k_d) e termodinâmicos (Energia de inativação, entalpia, energia de Gibbs e entropia. As constantes de inativação (k_d) foram determinadas usando o modelo de decaimento exponencial não-linear proposto por (Sadana; Henley, 1987) e o modelo de decaimento linear (Sonkar; Singh, 2020) apresentados nas Equações (1) e (2), respectivamente. Os dados experimentais foram analisados empregando o software Origin Pro versão 8.0.

$$a_r = \alpha + (1+\alpha)xe^{-k_d t} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$A = A_0 e^{(-k_d t)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde a_r é a atividade relativa (adimensional); α é a razão entre a atividade específica do estado final (E1) e o estado inicial (E); k_d é a constante de inativação (min⁻¹); t é o tempo de inativação térmica (min) e k_d , T , k_B , h , ΔS^* , ΔH^* e R são velocidade de reação específica, temperatura absoluta, constante de Boltzmann, constante de Planck, entropia de inativação, entalpia de inativação e constante de gás, respectivamente.

A energia de inativação térmica (E_d) para a inativação da endoglucanase foi determinada por um gráfico de logaritmo natural da constante de inativação térmica (lnk_d) pelo inverso da temperatura absoluta (1/T) conforme indicado na Eq. (3) (Kumar et al., 2013).

$$\ln k_d = \ln A - \frac{E_d}{R} \frac{1}{T} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: A é o fator de frequência (s⁻¹).

Os valores de entalpia ($\Delta H^\# - \text{kJ/mol}$), energia de Gibbs ($\Delta G^\# - \text{kJ/mol}$) e entropia ($\Delta S^\# - \text{kJ/mol.K}$) para a inativação térmica da enzima foram determinados por meio das respectivas equações (Eqs. (4), (5), (6)) (Kumar et al., 2013).

$$\Delta H^\# = Ed - RT \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\Delta G^\# = -RT \ln \left(\frac{k_d h}{k_B T} \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\Delta S^\# = \frac{\Delta H^\# - \Delta G^\#}{T} \quad (\text{Eq. 6})$$

Em que: T é a temperatura absoluta (K), h é a constante de Planck ($11,04 \times 10^{-36}$ J.s), e k_B é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23}$ J/K).

2.7.2 Estabilidade e efeito do pH

O pH da reação para a máxima atividade da endoglucanase foi determinado por meio da substituição do tampão acetato de sódio (0,1 mol. L⁻¹, pH 5) no ensaio de atividade por tampões com pH 3 a 9 (Brito et al., 2017). Esses valores de pH foram obtidos com tampão citrato de sódio (0,05 mol. L⁻¹, pH 3, 4 e 5), tampão fosfato de sódio (0,05 mol. L⁻¹, pH 6 e 7) e tampão tris-HCl (0,05 mol. L⁻¹, pH 8 e 9). Para os ensaios de estabilidade do pH, o blend enzimático (diluído em tampão com pH 3 a 9) foi incubado a 50°C por 5 h e alíquotas foram retiradas em intervalos de 1 hora e submetidas ao ensaio de atividade de endoglucanase. As respostas foram expressas como atividade relativa (%), sendo considerada como 100% a atividade enzimática determinada antes da incubação.

2.7.3 Efeito de íons metálicos e compostos orgânicos

A influência de espécies iônicas metálicas e compostos orgânicos na atividade da endoglucanase foi avaliada com diferentes aditivos: Sulfato de ferro (FeSO₄), Sulfato de cobalto (CoSO₄), Cloreto de cálcio (CaCl₂), Sulfato de magnésio (MgSO₄), Nitrato de alumínio Al (NO₃)₃, Sulfato de sódio (NaSO₄), Cloreto de magnésio (MgCl₂), Acetato de chumbo (Pb(C₂H₃O₂)), Carbonato de cálcio (CaCO₃), Sulfato de cobre (CuSO₄), Acetato de zinco (Zn(C₂H₃O₂)), Carbonato de sódio (NaCO₃), Sulfato de zinco (ZnSO₄), Cloreto de ferro (FeCl₂), Cloreto de potássio (KCl), EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid), Triton X-100 e Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). Os testes consistiram na diluição do blend enzimático em solução 2 mmolL⁻¹ de cada aditivo em tampão acetato de sódio pH 5 (força iônica 0,1 mol. L⁻¹) e posterior determinação da atividade enzimática. A resposta foi expressa como atividade relativa (%) considerada

como 100% da atividade isolada da endoglucanase sem qualquer aditivo (Nunes et al., 2020).

2.7.4 Efeito de solventes

Os solventes orgânicos dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), metanol, acetonitrila, acetona, éter etílico, diclorometano e hexano foram avaliados na atividade da endoglucanase (Nunes et al., 2020). Os diferentes solventes foram adicionados a 1 ml de tampão acetato de sódio 0,1 mol. L⁻¹, pH 5 para obter as concentrações 20% e 30%, v/v e, em seguida, determinar a atividade da endoglucanase. Os resultados foram expressos em atividade relativa (%), a atividade enzimática da amostra sem adição de solvente orgânico foi tomada como controle (100%).

2.7.5 Halotolerância

Foi analisada a capacidade de resistência ao sal da endoglucanase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 através da avaliação da sua atividade de hidrólise em diferentes níveis de concentração de cloreto de sódio (NaCl) (Nunes et al., 2020). Foram testadas várias concentrações de NaCl preparadas em água destilada nas reações (0 mol. L⁻¹, 0,01 mol. L⁻¹, 0,05 mol. L⁻¹, 1 mol. L⁻¹, 2 mol. L⁻¹, 3 mol. L⁻¹, 4 mol. L⁻¹, 5 mol. L⁻¹ e 6 mol. L⁻¹) em condições de ensaio otimizadas através do método padrão de quantificação da enzima. A resposta foi expressa como atividade relativa (%) considerada como 100% da atividade isolada da endoglucanase sem adição das concentrações salinas (NaCl 0 mol. L⁻¹).

2.7.6 Sacarificação enzimática

O blend enzimático produzido por *Aspergillus niger* ATCC 1004 foi utilizado para sacarificar a casca de arroz. O meio reacional consistiu em 60 mL do blend enzimático extraído em tampão citrato de sódio (0,05 mol. L⁻¹, pH 5) e um controle continha apenas o blend enzimático, sem resíduo e outro controle com apenas o resíduo e 60 mL de tampão.

A sacarificação foi realizada em um banho maria com agitação a 50 °C por 7 h, e alíquotas foram retiradas do meio em intervalos de 1 h. Após a reação, o sobrenadante foi utilizado para estimar a quantidade de açúcares redutores liberados (Miller, 1959) com base em uma curva padrão de glicose (1 mmol/mL).

Os açúcares fermentáveis foram detectados por HPLC com base no índice de refração (IR). O cromatógrafo foi equipado com bomba ProStar 210 (Varian), injetor

manual (modelo 80765, Hamilton) com laço de 20 μL e detector IR (modelo 356 LC). A coluna cromatográfica de 87H foi utilizada para a determinação do produto (comprimento, 300 mm; diâmetro interno, 7,8 mm; MetaCarb), operado nas seguintes condições: temperatura da coluna de 55°C, ácido sulfúrico (0,005 mol·L⁻¹) como fase móvel e fluxo de 0,70 mL·min⁻¹. Todas as reações enzimáticas foram realizadas em triplicata com base na metodologia de Silva et al., (2022) com modificações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição físico-química dos substratos

As composições (% matéria seca) obtidas a partir das análises bromatológicas das matérias-primas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Composição (% matéria seca) das matérias-primas estudadas.

Composição (%)	Matéria-prima		
	Palma Forrageira	Casca da amêndoa do cacau	Casca de arroz
FDN	23,81 \pm 0,02	49,44 \pm 0,00	91,92 \pm 0,00
FDA	8,03 \pm 0,00	36,69 \pm 0,01	69,29 \pm 0,01
Hemicelulose	15,84 \pm 0,02	11,37 \pm 0,01	22,07 \pm 0,00
Lignina	0,19 \pm 0,00	16,67 \pm 0,00	20,91 \pm 0,00
Celulose	7,89 \pm 0,00	20,67 \pm 0,00	48,91 \pm 0,00
Proteína bruta	7,27 \pm 0,01	21,26 \pm 0,00	3,03 \pm 0,20
Extrato etéreo	0,77 \pm 0,01	11,15 \pm 0,00	0,18 \pm 0,02
Matéria mineral	25,94 \pm 0,01	9,91 \pm 0,00	9,23 \pm 0,00

Estes resultados evidenciam a adequação dos materiais lignocelulósicos utilizados para a FES visando a produção de enzimas. Destaca-se a casca da amêndoa do cacau como a matéria-prima mais promissora, devido à sua composição nutricional rica e equilibrada. Os materiais lignocelulósicos consistem predominantemente em celulose, o principal polissacarídeo estrutural presente nas paredes celulares das plantas, seguido pela hemicelulose e lignina (Costa et al., 2022).

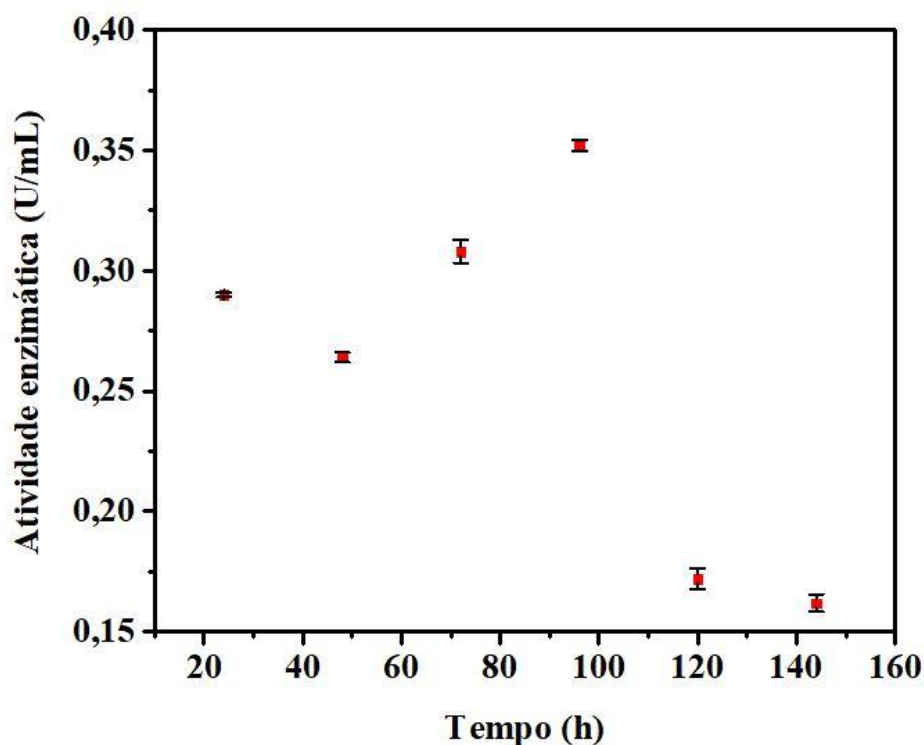
A proporção desses componentes desempenha um papel crucial no êxito da FES, uma vez que proporciona carbono e nutrientes essenciais para os microrganismos, além de servir como suporte para a absorção de nutrientes e crescimento da biomassa. Este estudo destaca o notável potencial da FES empregando materiais lignocelulósicos na

produção eficaz de enzimas. Vale ressaltar que fatores como custo e disponibilidade também influenciam significativamente na seleção da matéria-prima (Valladares-Diestra; Vandenberghe; Soccol, 2022).

3.2 Perfil de fermentação

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de atividade enzimática em diferentes tempos, indicaram 96 h como o melhor tempo de fermentação para a máxima produção da endoglucanase ($0.352 \pm 0,00$ U/mL). Após esse tempo, a atividade enzimática diminuiu consideravelmente. Esse tempo ótimo depende do microrganismo usado e das condições de cultivo (Figura 1).

Figura 1. Perfil fermentativo da produção de endoglucanase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 por FES da mistura contendo 80 % da casca de casca de amêndoa de cacau e 20 % de palma forrageira sob as condições de temperatura de 26 °C e 70 % de umidade.



O gênero *Aspergillus* é conhecido por sua capacidade de produzir endoglucanase a partir de diversas matérias-primas lignocelulósicas. Essa habilidade permite que esses fungos decomponham polímeros, como celulose, hemicelulose e lignina, presentes nas matrizes vegetais. Como resultado, são liberados açúcares e outros compostos, que servem como nutrientes para o crescimento microbiano (Singh et al., 2016b).

Estudos anteriores com *Aspergillus niger* demonstraram que a máxima atividade da endoglucanase ocorre após 70,35 horas em prickly pear e 72 horas em resíduos de manga (Santos et al., 2016; Santos et al., 2011). A natureza fibrosa e o teor de celulose/hemicelulose dessas matérias-primas podem estimular a produção de enzimas pelo microrganismo.

A diferença no tempo de fermentação observada neste estudo, em comparação com outros estudos, pode ser explicada pelo maior teor de celulose nas matérias-primas mencionadas (Manhongo et al., 2021). Além disso, a presença de uma ampla gama de compostos, como hemicelulose, compostos fenólicos, grupos acetila e lignina, pode limitar a ação das enzimas celulases. Esses compostos atuam como barreiras físicas e podem causar a desativação das celulases por adsorção não produtiva na superfície da lignina (Pino et al., 2019).

A literatura também relata que a máxima atividade enzimática de endoglucanase ocorre após 141,5 e 192 horas quando *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 é cultivado em casca de arroz e casca de amendoim, respectivamente (Brito et al., 2017). Além disso, *Botrytis ricini* URM 5627 apresentou atividade máxima de endoglucanase após 144 horas de fermentação em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar e 72 horas em meio contendo fibra de coco (Silva et al., 2018).

O tempo de fermentação é um fator intrinsecamente vinculado às condições do meio, uma vez que a atividade enzimática demonstra variações ao longo do processo, influenciada pela composição nutricional do substrato. Nesse contexto, micronutrientes e macronutrientes presentes e disponíveis no substrato exercem um papel determinante no desempenho dessa atividade enzimática. Essa influência é multifatorial, incluindo a exaustão dos nutrientes no substrato, a acumulação de produtos metabólicos que podem inibir a produção de enzimas, e a inativação natural das enzimas ao longo do tempo (Neves et al., 2022).

Os resultados obtidos sugerem que as matérias-primas investigadas possuíam nutrientes preexistentes que favoreceram o crescimento fúngico até atingir o pico de atividade enzimática. Subsequentemente, a disponibilidade de nutrientes se esgotou ou os subprodutos metabólicos se acumularam, ocasionando a inibição da produção de enzimas, resultando em uma redução regulatória na secreção enzimática. Nos estágios iniciais do crescimento microbiano, o maquinário enzimático adapta-se e concentra-se no consumo das matérias-primas disponíveis. Após essa fase de adaptação (Lag), ocorre um aumento na atividade metabólica e excreção enzimática, atingindo o ponto máximo (Neves et al.,

2022; Silva et al., 2018; Brito et al., 2017).

3.3 Otimização da composição do substrato por simplex centroide para fermentação em estado sólido para produção de endoglucanase usando *Aspergillus niger* ATCC 1004.

A escolha da melhor composição de matérias-primas para a FES é essencial para a produção de enzimas de forma eficiente e econômica. As matérias-primas devem ser de fácil acesso e baixo custo. Com o planejamento experimental, foi possível obter resultados significativos com apenas 9 experimentos (incluindo 3 repetições do ponto central). A matriz experimental (Tabela 1) mostrou que o *Aspergillus niger* ATCC 1004 pode secretar endoglucanase em matérias-primas lignocelulósicos sem precisar de outras fontes de carbono, nitrogênio e minerais.

A análise de variância (Tabela 4) demonstrou que o modelo matemático foi estatisticamente validado com um nível de significância de $p=0,05$. Essa validação é fundamentada pelos elevados valores de R^2 e R^2 ajustado, 0,999 e 0,997, respectivamente. Esses coeficientes indicam que o modelo apresenta um excelente ajuste aos resultados experimentais, sobretudo considerando a complexidade do sistema em questão.

Tabela 4. Análise de variância para o modelo especial cúbico para simplex centroide (A). Análise de variância para o modelo quadrático (Planejamento Doehlert) aplicado na otimização das condições experimentais (B).

Fonte de variação	SS	Df	MS	Fcalculado	p-value	R ²
A. Otimização da composição do substrato por simplex centroide						
Regressão	0,448	6	0,075	319,8	0,003	0,999
Erro total	0,001	2	0,001			R ² ajustado
Total	0,449	8	0,056			0,996
B. Otimização das condições de fermentação por planejamento Doehlert						
Regressão	0,023	5	0,005	21,40	0,01	0,973
Falta de ajuste	0,001	1	0,001	0,60	0,52	
Erro puro	0,001	2	0,001			
Total	0,025	8				

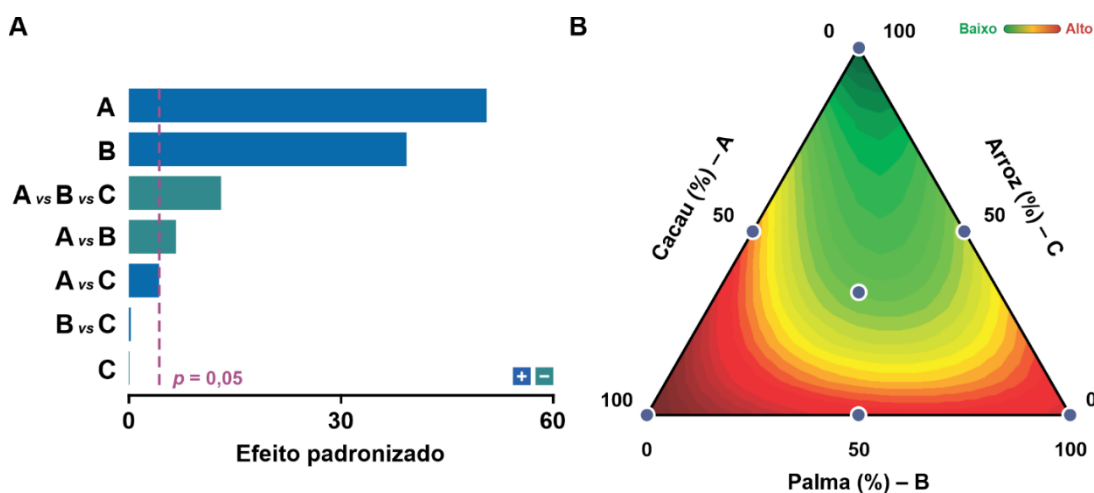
Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), coeficiente de determinação (R^2). *Nível de confiança de 95% ($p = 0,05$).

O gráfico de Pareto (Figura 2B) possui uma linha vertical que indica o fator mínimo de significância de 95% de confiabilidade e permite observar quais variáveis tem maior e menor efeito. Todos os termos quadráticos significativos sugeriram que duas

variáveis (A e B) investigadas foram críticas para a produção de endoglucanase, sendo a variável C, insignificante para o processo.

Ao examinar o gráfico de contorno (Figura 2A), destaca-se que a área com a atividade enzimática mais intensa (região vermelha) está associada às matérias-primas A e B. Ao realizar uma inspeção detalhada da superfície, observa-se que ambos os substratos exercem efeitos positivos e significativos na produção da enzima. No entanto, é evidente que o componente A possui uma influência mais pronunciada, indicando um aumento proporcional em sua presença na mistura. Em contrapartida, o componente B, embora também contribua positivamente, demonstra uma influência menor, sugerindo uma proporção reduzida desse composto na mistura. Diante dessas observações, a combinação de substratos composta por 80% de casca de amêndoa do cacau e 20% de palma forrageira foi estabelecida como a mais adequada para este estudo.

Figura 2. Efeitos padronizados para fatores investigados (Gráfico de pareto) planejamento de mistura simplex centroide (A) Amostra A (casca da amêndoa do cacau). Amostra B (palma forrageira). Gráfico de contorno (B) e superfície obtidos a partir do modelo especial cúbico (A). Amostra A (casca da amêndoa do cacau). Amostra B (palma forrageira). Amostra C (casca de arroz). B.



3.5 Otimização multivariada das condições de umidade e temperatura

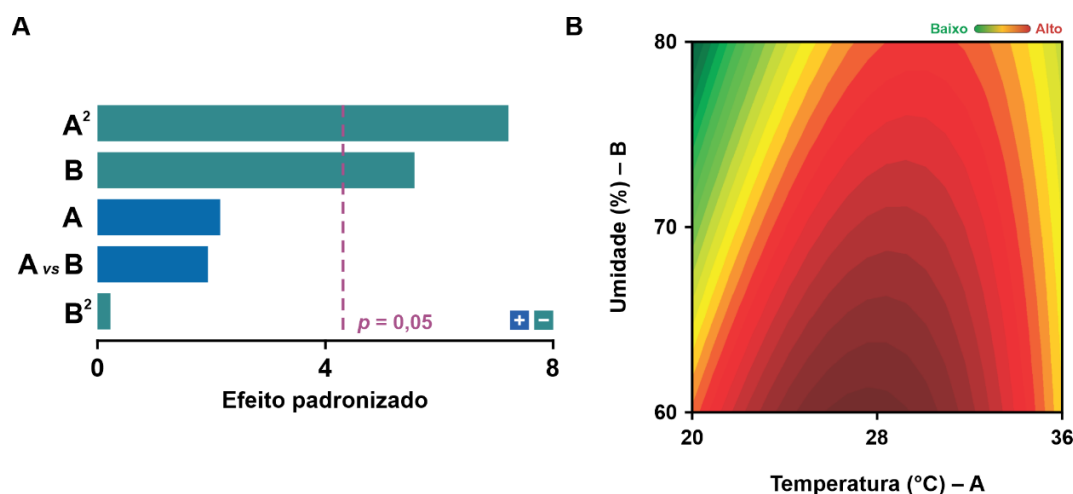
Os resultados experimentais obtidos nas condições de planejamento Doehlert podem ser vistos na Tabela 3. Os valores de resposta são as médias das triplicatas realizadas nos ensaios de determinação da atividade enzimática. Uma análise preliminar destes resultados mostra que o fungo *Aspergillus niger* ATCC 1004 foi capaz de secretar

endoglucanase em todas as combinações das variáveis investigadas de acordo com a matriz.

Conforme apresentado na Tabela 2, o modelo matemático foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para endoglucanase em que o R^2 (0,973) indica que o modelo estava bem ajustado aos resultados experimentais e a falta de ajuste não foi significativa.

A significância estatística dos termos quadrático e linear e sua interação é apresentada no gráfico de Pareto (Figura 3A) em que, com nível de confiança de 95% representado pela linha pontilhada vertical, todas as variáveis (temperatura e umidade) do modelo quadrático foram significativas, especialmente a temperatura para produção de endoglucanase.

Figura 3. Gráfico pareto (A) obtido a partir do modelo quadrático em Planejamento Doehlert. Amostra A (Temperatura). Amostra B (Umidade). Gráfico de contorno (B) representando interações entre variáveis tendo como resposta à atividade de endoglucanase, obtidas a partir do modelo quadrático em Planejamento Doehlert. Amostra A (Temperatura). Amostra B (Umidade).



No gráfico de contorno (Figura 3B), observa-se que a maior atividade enzimática foi alcançada quando as condições foram mantidas no nível central, destacado pela região de vermelho mais intenso, ou seja, com uma umidade de 60% e uma temperatura de 28 °C, resultando em uma atividade predita de 0,435 U/mL. Este resultado encontra respaldo em outros estudos que utilizaram fungos do gênero *Aspergillus* e substratos lignocelulósicos. Por exemplo, a temperatura ótima para a produção de endoglucanase por *Aspergillus niger* foi relatada como 29,56 °C (Santos et al., 2016). Outros trabalhos também destacaram condições específicas, como 33 °C e 58,5% de umidade para a endoglucanase

produzida pelo fungo *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 (Brito et al., 2017), e 30 °C como a melhor temperatura para a produção dessa mesma enzima por *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 (Reis et al., 2020). Esses resultados sublinham a importância de considerar a dependência dessas condições em relação a vários fatores, incluindo o tipo de fungo investigado e as propriedades dos diferentes substratos utilizados.

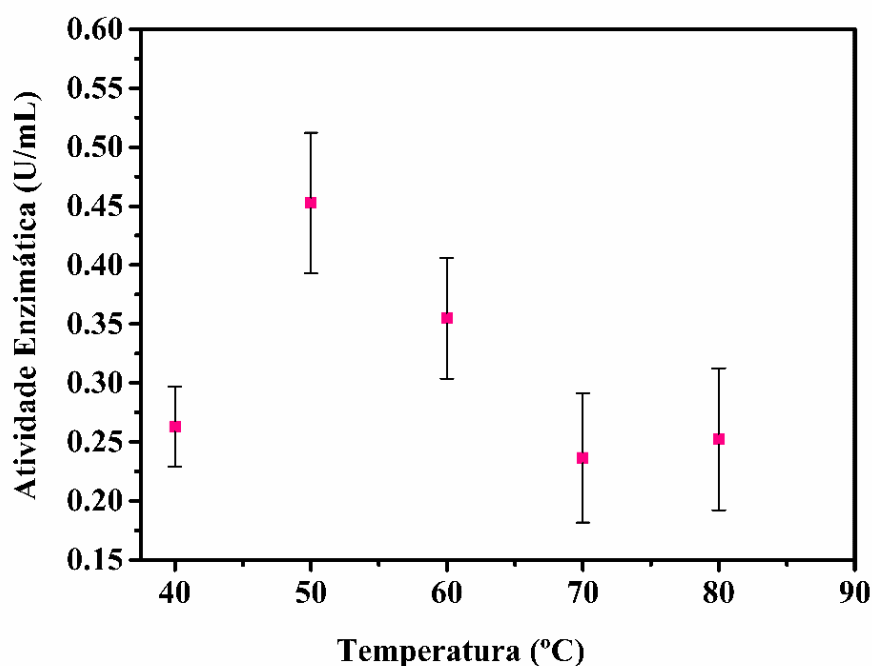
A temperatura e a umidade desempenham papéis essenciais na análise do crescimento do fungo, uma vez que as enzimas são produtos do metabolismo fúngico, e variações nessas condições são esperadas afetar sua produção, resultando em níveis mais altos ou mais baixos de atividade enzimática (Marques et al., 2019). O aumento da umidade pode reduzir a porosidade do substrato, dificultando a penetração de oxigênio. Por outro lado, a umidade reduzida pode levar a uma menor disponibilidade de nutrientes, resultando em um crescimento microbiano limitado (Santos et al., 2016).

A temperatura também exerce influência no metabolismo microbiano, controlando o crescimento, a germinação, a formação de esporos e a produção do produto desejado. Em um bioprocessamento, temperaturas relativamente baixas podem resultar na diminuição da produção enzimática, possivelmente associada a uma redução no metabolismo microbiano (Santos et al., 2016). Enquanto temperaturas muito elevadas podem comprometer a atividade enzimática e outras reações bioquímicas, já que, com o aumento da temperatura, as moléculas ganham maior agitação, acelerando o metabolismo e resultando em um rápido crescimento celular. No entanto, após atingir um ponto crítico, essas atividades ocorrem em ritmo excessivamente acelerado, levando à desnaturação das enzimas (Reis et al., 2020; Santos et al., 2016). Portanto, é crucial encontrar um equilíbrio adequado na escolha das condições para otimizar a produção e a eficiência dos bioprocessos industriais.

3.6 Efeito da temperatura e ensaios de estabilidade térmica: estimativa dos parâmetros termodinâmicos

A análise do impacto da temperatura na atividade da endoglucanase (Figura 4) revelou um incremento na atividade enzimática à medida que a temperatura aumentava, atingindo seu ponto máximo a 50 °C. No entanto, observou-se uma diminuição gradual da atividade enzimática conforme a temperatura continuava a subir.

Figura 4. Efeito da temperatura na atividade da endoglucanase de *Aspergillus niger*.



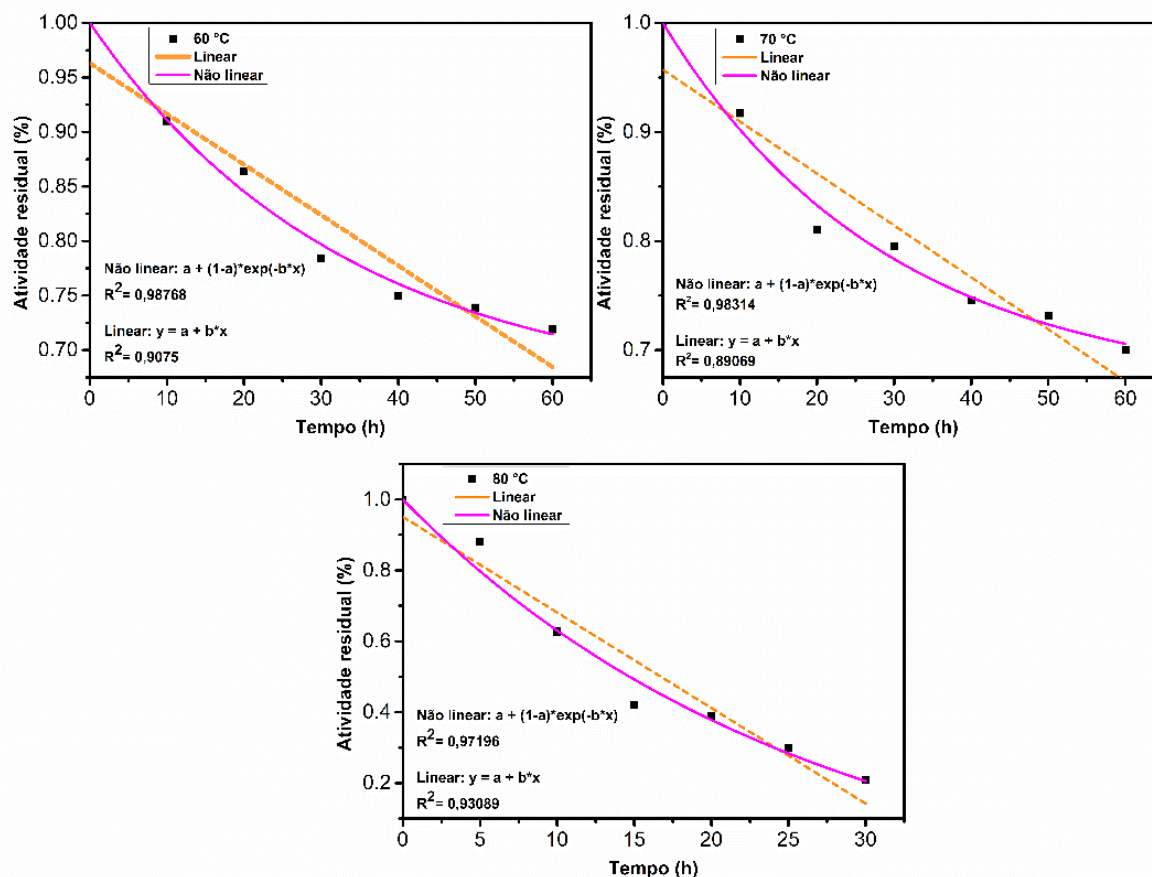
Este fenômeno também foi observado em endoglucanases produzidas por outros microrganismos, como *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, que apresentou sua máxima atividade a 50 °C (Marques et al., 2018), e *Rhizopus* sp, cuja atividade ótima ocorre entre 50 e 60 °C (Santos et al., 2016). Além disso, a endoglucanase produzida por *Botrytis ricini* URM 5627 também demonstrou temperatura ótima de atividade a 50 °C, o que facilita sua aplicação industrial, uma vez que grande parte dos processos industriais ocorre em temperaturas próximas a 50 °C (Silva et al., 2018).

Vale ressaltar que o aumento da temperatura exerce um impacto positivo na taxa de catálise em reações químicas. Além disso, as elevadas temperaturas estão associadas à redução do risco de contaminação microbiana no meio e à melhoria da solubilidade de compostos em um ambiente reacional, favorecendo a difusão do substrato na reação química (Neves et al., 2022). Em resumo, o controle preciso da temperatura pode representar uma estratégia eficaz para aumentar a eficiência e a taxa de reação em processos catalíticos e hidrolíticos, tornando-se essencial para otimizar diversas reações químicas em ambientes industriais e de pesquisa.

Conforme pode ser observado na Figura 5, a inativação enzimática aumentou com a temperatura de incubação, conforme esperado. A endoglucanase produzida neste estudo apresentou maior estabilidade em 60 °C, conservando 75 % da atividade após 1 h de incubação. Em 70 °C, a atividade foi reduzida para 70 % no mesmo período. Em 80 °C, houve uma queda acentuada da atividade com a retenção de apenas 20% da atividade

original após 30 min. De fato, a constante de inativação térmica (K_d) aumentou com o aumento da temperatura de 60 °C (0,0301 h⁻¹) a 80 °C (0,0381 h⁻¹).

Figura 5. Curvas de inativação térmica do blend enzimático por incubação em diferentes temperaturas (60 °C, 70 °C e 80 °C). Os testes de inativação foram realizados incubando-se a tampão acetato de sódio pH 5 (força iônica 0,05 mol. L⁻¹).



A temperatura ótima de uma enzima é influenciada por fatores como sequências de aminoácidos e presença de carboidratos não covalentemente ligados. As enzimas possuem estruturas tridimensionais específicas, determinadas por suas sequências de aminoácidos. A estabilidade dessas estruturas depende de interações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes salinas. Quando as enzimas são expostas a altas temperaturas, essas interações podem ser rompidas, levando à perda da conformação nativa e, conseqüentemente, da atividade enzimática (Saqib et al., 2010).

A presença de resíduos hidrofóbicos e uma maior proporção de resíduos de aminoácidos carregados polares resultam em rigidez das proteínas, contribuindo para sua estabilidade. Um exemplo é a endoglucanase FpCel45, da subfamília C de GH45, cuja

sequência de aminoácidos inclui resíduos como Ser18, Thr20, Asn95, Trp98, Cys99, Asn108, His115 e Asp117, importantes para sua termoestabilidade. Comparada a outras enzimas GH45 fúngicas estudadas, a FpCel45 exibe maior resistência a altas temperaturas. Vale mencionar que diversas endoglucanases termoestáveis de organismos mesófilos e termofílicos também foram descritas na literatura para a família GH45 (Cha, Yoon, Cha 2018).

Elevados coeficientes de correlação (R^2) foram notados em ambos os perfis de inativação, com R^2 acima de 0,89%, conforme ilustrado na Figura 5. No entanto, o coeficiente foi mais expressivo para o modelo de decaimento exponencial não linear, como antecipado dada a complexidade das estruturas proteicas das enzimas. Com base nos resultados obtidos, o modelo cinético de decaimento não linear proposto por (Sadana; Henley, 1987) destacou-se como o mais adequado para ajustar aos dados experimentais, sendo, portanto, empregado para determinar os parâmetros termodinâmicos de inativação da enzima.

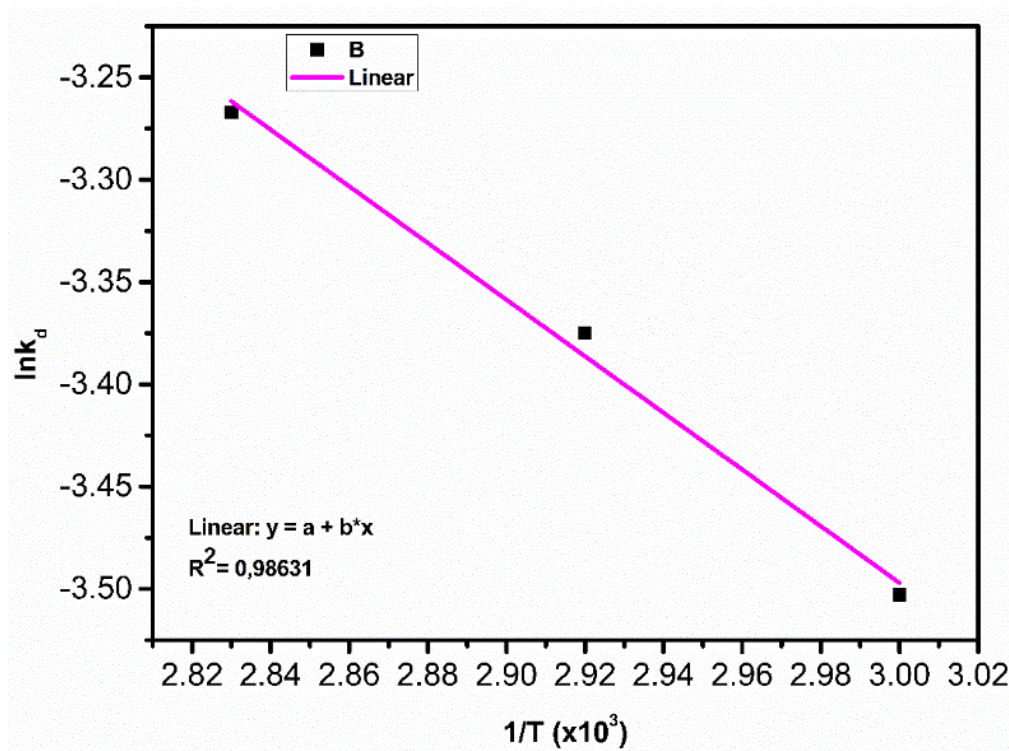
Com o intuito de compreender como as moléculas se comportam em diversas condições, é necessário ter conhecimento dos parâmetros termodinâmicos que governam sua estabilidade. Neste estudo, os parâmetros termodinâmicos da inativação térmica da endoglucanase foram estimados a partir dos dados experimentais apresentados na Figura 6. Os valores obtidos para entalpia, entropia e energia livre de ativação estão detalhados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros termodinâmicos na desnaturação térmica irreversível da endoglucanase obtida do *Aspergillus niger* ATCC 1004

Temperatura		Kd ^a (min ⁻¹)	$\Delta H^\#$ (KJ mol ⁻¹)	$\Delta G^\#$ (KJ mol ⁻¹)	$\Delta S^\#$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
°C	K				
60	333	0,0301	8,741	91,56	-248,7
70	343	0,0342	8,657	94,03	-248,9
80	353	0,0381	8,574	96,53	-249,2

Legenda: Os valores de Kd foram obtidos a partir da Figura 3. A energia de ativação para desnaturação, $E_d = -$ coeficiente angular x R (constante universal dos gases) = 11,51 kJ/mol.

Figura 6. Determinação da energia de inativação térmica (E_d) para o blend enzimático por gráfico de Arrhenius



A endoglucanase obtida da *Aspergillus niger* ATCC 1004 por fermentação em estado sólido apresentou E_d de $11,51 \text{ kJ mol}^{-1}$. Este parâmetro foi empregado na determinação da entalpia do processo de inativação da enzima.

A entalpia é proporcional à energia de ativação. Logo, quanto maior for a E_d , maior será o ΔH^\ddagger esperado. A endoglucanase secretada pelo *Aspergillus niger* ATCC 1004 apresentou termoestabilidade, com ΔH^\ddagger de $8,741 \text{ KJ mol}^{-1}$ e $8,574 \text{ KJ mol}^{-1}$ nas temperaturas máxima e mínima, respectivamente. Esses valores positivos de ΔH^\ddagger (Tabela 5) indicam um processo endotérmico, no qual a enzima precisa de energia para ser inativada. O ΔH^\ddagger está relacionado com o número de ligações que se rompem durante a inativação enzimática. Valores baixos de ΔH^\ddagger refletem a resistência das enzimas à exposição térmica (Heidtmann et al., 2012).

A variação de entropia (ΔS^\ddagger) reduziu conforme o aumento da temperatura e valores negativos foram observados para esse parâmetro. Valores negativos de ΔS^\ddagger também foram observados para endoglucanase GluCB31 de *Bacillus subtilis*. A inativação térmica é um parâmetro dependente da entropia, uma vez que, uma ΔS^\ddagger negativa mostra uma menor aleatoriedade ou desordem na reação devido à possível agregação de proteínas

envolvidas na formação de poucas ligações intra e intermoleculares (Chinyelum; Henry; Iruoghene, 2021).

No presente estudo, o ΔG^\ddagger teve aumento proporcional ao aumento da temperatura, o que sugere uma maior resistência a desnaturação (Souza et al., 2015). Em concordância, valores positivos de ΔG^\ddagger também foram observados para diferentes enzimas. Para a endoglucanase produzida por *Aspergillus fumigatus* sob fermentação em estado sólido, registraram-se valores de 110, 112 e 107 kJ mol⁻¹ para 60 °C, 70 °C e 80 °C, respectivamente (Saqib et al., 2010). Um aumento de ΔG^\ddagger também foi notado com o aumento da temperatura, 96,6 kJ mol⁻¹ em 80 °C, para a protease alcalina de *Aspergillus tamarii* URM4634 (Silva et al., 2018). Além disso, reportou-se um valor máximo de 24618.915 KJ mol⁻¹ em 80°C para a glicose isomerase de *Streptomyces roseiscleroticus* (Chinyelum; Henry; Iruoghene, 2021).

Esses estudos afirmam que valores positivos de ΔG^\ddagger indicam que a enzima é termicamente estável em altas temperaturas e a reação catalisada não é espontânea. Ou seja, é necessária uma enzima termoestável para catalisar a reação. Em complemento, foi sugerido que a enzima possui uma resistência ao desdobramento térmico em temperaturas mais elevadas, possibilitando que ela suporte a alta energia necessária para o processo, o que indica termoestabilidade (Iruoghene et al., 2022).

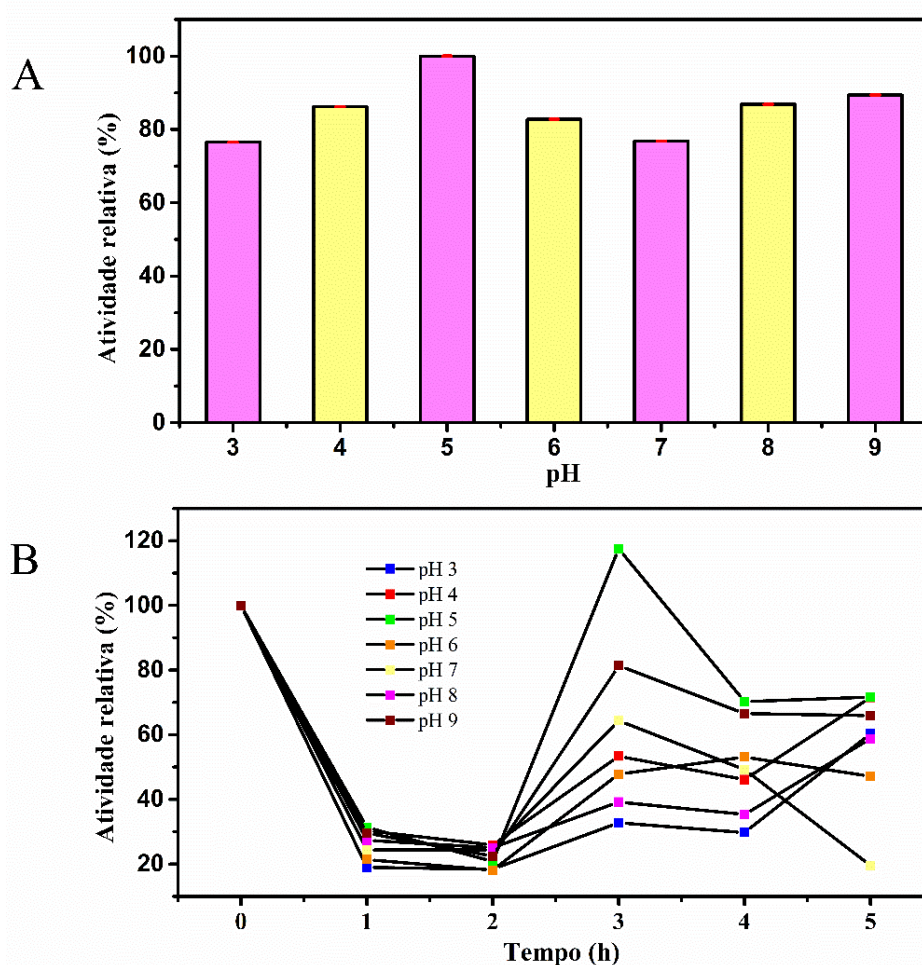
As celulasas termoestáveis destacam-se por sua notável versatilidade industrial, oferecendo vantagens significativas em comparação com as enzimas tradicionais. Sua capacidade de tolerar altas temperaturas, resistir a agentes desnaturantes, manter atividade prolongada e apresentar menor risco de contaminação as torna ideais para uma variedade de processos. Na sacarificação da biomassa lignocelulósica, por exemplo, essas enzimas asseguram maior estabilidade, atividade específica e flexibilidade, resultando em doses menores de enzima, tempos de hidrólise reduzidos e desempenho aprimorado, mesmo em elevadas temperaturas. Com base em sua eficiência aprimorada e benefícios econômicos, as celulasas termoestáveis têm o potencial de impulsionar o crescimento do mercado de biocombustíveis e outros produtos provenientes da biomassa lignocelulósica (Dadwal et al., 2021).

3.7 Efeito e estabilidade do pH

A Figura 7.A mostra o efeito do pH na atividade da endoglucanase produzida pelo *Aspergillus niger* ATCC 1004. A maior atividade enzimática foi observada em pH 5, sem diferença marcante entre as faixas de pH de 4 e 6. Isso sugere que a enzima prefere pH

ácido para ter seu melhor desempenho. Porém, a atividade enzimática não diminuiu mais do que 20% nas outras faixas de pH testadas. Esse resultado evidencia que, apesar de ser uma enzima acidófila, possui uma ampla tolerância a variações de pH, tornando-a altamente promissora para aplicações industriais que requerem processos em diversas faixas de pH. Sua versatilidade e estabilidade nessas condições a tornam uma candidata atrativa para diversas aplicações na indústria.

Figura 7. Efeito de diferentes pH (A). Estabilidade da endoglucanase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 com relação a diferentes pHs (B). *Barras de erros referentes ao desvio padrão < 0,053.



Coerentemente, endoglucanases fúngicas também apresentaram comportamento acidófilo. Foram reportadas atividades máximas de endoglucanase em pH 5 quando de *Aspergillus oryzae* ATCC 10124 (Santos et al., 2017) e pH 5 e 4.8 quando de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 (Oliveira et al., 2019, Marques et al., 2018). É possível observar que na primeira hora de incubação houve um decaimento acentuado para todas as faixas de pH avaliadas (Figura 6. B). Entretanto, a partir da segunda hora de incubação, houve

um aumento expressivo da atividade relativa em todas as faixas de pH, destacando-se a atividade em pH 5, superior a 100 %. Posteriormente, observou-se um decaimento não excedente a 30 % durante as últimas horas de incubação. Em sequência, em pH 9 a atividade relativa foi de 80 % e se manteve estável em 70 % até o fim do estudo, quando em pH 7 a atividade relativa foi de 60 %. A endoglucanase produzida pelo *Aspergillus niger* ATCC 1004 tem sua maior atividade e estabilidade em pH 5, mas também atua bem em outras faixas de pH. Essa característica é vantajosa para usos industriais que precisam de pH ácido, como a produção de polpa de frutas, por exemplo (Pradhan; Abdullah; Pradhan, 2021).

Outro exemplo de aplicação em que a acidofilia da enzima é de grande interesse, é em processos industriais que envolvem a hidrólise enzimática de biomassa vegetal. O pré-tratamento com líquidos iônicos e ácidos é comum para liberação de açúcares redutores e produção de biocombustíveis. Se a enzima não for acidofílica, o pH precisa ser ajustado após o pré-tratamento, o que acarreta custos adicionais. A enzima acidofílica também é vantajosa no tratamento de resíduos de vinagre, que exigem um pH ácido de 1 e posterior neutralização com NaOH. Eliminar a etapa de ajuste de pH representa uma economia significativa. (Khan et al, 2021).

Comparativamente, essa enzima foi mais estável que a endoglucanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110, a qual apresentou estabilidade nos pHs 4 e 8, com manutenção da atividade enzimática de cerca de 80 % e máxima de 71 % para faixa de pH 6, 7 e 8 após 5 h de incubação a 50 °C (Oliveira et al., 2019). Outra endoglucanase de *Aspergillus niger* apresentou-se estável por 4 h com, aproximadamente, 100 % de atividade relativa em pH 5 e 6. Já a atividade residual da endoglucanase de *Rhizopus sp.*, entretanto, foi de 100 % em pH 5 após 4 h, mantendo-se superior a 70 % quando em pH 4, 6 e 7 (Santos et al., 2016). As melhores condições de estabilidade observadas para a endoglucanase originária da casca de arroz, produzida pelo *Aspergillus oryzae* ATCC 10124, também ocorreram em um ambiente mais ácido, com pH entre 3 e 5. Nesse intervalo de pH, a enzima manteve cerca de 80 % de sua atividade após 6 horas. No caso da endoglucanase proveniente da casca de amendoim, as maiores faixas de estabilidade foram encontradas em pH de 3 a 6, também conservando aproximadamente 80 % de sua atividade inicial após as 6 horas de incubação (Santos et al., 2017).

3.8 Efeito de sais e compostos orgânicos

Na Tabela 6, é possível notar que o íon Ca^{2+} apresentou o maior efeito positivo na atividade enzimática, superior a 60 % comparado a amostra controle (sem aditivo), seguido do Co^{2+} que elevou a atividade em 57 %. Também tiveram efeito positivo os íons $\text{Zn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Na}^+$, confirmando que a atividade enzimática foi grandemente influenciada pela presença de íons existentes nos sais.

Tabela 6. Efeito de diferentes sais e compostos orgânicos na atividade de endoglucanase de *Aspergillus niger* ATCC 1004

Sais e compostos Orgânicos	Atividade residual (%)
Amostra controle	100 \pm 0,01
CaCl ₂	166.70 \pm 0,00
CoSO ₄	157.70 \pm 0,02
CaCO ₃	145.80 \pm 0,00
ZnSO ₄	131.00 \pm 0,00
FeSO ₄	125,00 \pm 0,00
MgCl ₂	123.20 \pm 0,00
CuSO ₄	122.60 \pm 0,00
Zn(C ₂ H ₃ O ₂)	119.60 \pm 0,00
FeCl ₂	115.50 \pm 0,00
Na ₂ CO ₃	110.10 \pm 0,00
Na ₂ SO ₄	101.20 \pm 0,00
Al (NO ₃) ₃	98.80 \pm 0,00
Pb (C ₂ H ₃ O ₂)	96.40 \pm 0,01
MgSO ₄	88.10 \pm 0,02
KCl	86.90 \pm 0,00
TRITON X-100	46.14 \pm 0,01
EDTA	12.08 \pm 0,02
TROLOX	9.57 \pm 0,01

De forma geral, íons metálicos possuem a habilidade de formar complexos, afetando o processo de doação ou recepção de elétrons (Nunes et al., 2020). Essa particularidade está associada ao papel dos íons de atuarem na conformação estrutural da enzima

ao se ligarem aos grupos amino ou grupo carboxílico dos aminoácidos. Esse processo pode levar à inibição ou ativação da atividade enzimática (Nogueira et al., 2022).

Quando comparado com dados da literatura, a endoglucanase obtida de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 foi afetada positivamente pela presença de íons Mg^{2+} com aumento da atividade de em cerca de 5,14%. A presença do íon Pb^{2+} , assim como foi observado no presente estudo, reduziu a atividade enzimática (Oliveira et al., 2019). Também foram observadas, para outra endoglucanase estudada, o aumento da atividade com Cu^{2+} , enquanto K^+ e Pb^+ causaram inibição e Na^+ não resultou em influência significativa (Marques et al., 2018). A atividade das enzimas pode ser aumentada ou diminuída por certos compostos pela interferência na sua estrutura tridimensional ou bloqueio do sítio ativo. A presença de certos íons e metais pesados pode levar à oxidação de grupos localizados nas cadeias laterais dos aminoácidos, resultando na redução da atividade enzimática (Marques et al., 2018, Oliveira et al., 2019).

Por outro lado, EDTA, TRITON X-100 e TROLOX apresentaram efeito inibidor na atividade da endoglucanase. Uma inibição pelo agente quelante (EDTA) indica se tratar de uma metaloenzima. Efeito inibidor de TRITON X-100 e EDTA também foi observado na caracterização de endoglucanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 (Oliveira et al., 2019). O TRITON X-100 apresentou efeito inverso para a endoglucanase GluCB31 de *Bacillus subtilis* e os autores justificaram que o detergente não afetou a estrutura secundária da GluCB31. Pelo contrário, foi observado um aumento na conformação de folhas beta (β -sheet) com uma fenda cruzada em um dos lados, onde o substrato se liga, levando a um aumento na atividade da enzima (Regmi et al., 2020).

As celulasas ocupam o segundo lugar no pódio das enzimas mais utilizadas na indústria. Sua demanda cresce exponencialmente para atender às diversas aplicações em áreas como produção de bioetanol, ácido láctico, biohidrogênio, detergentes, papel e celulose (Dadwal et al., 2021). A caracterização, incluindo o estudo do efeito de sais e compostos orgânicos na atividade da endoglucanase abre portas para o desenvolvimento de aplicações mais eficientes e robustas para essa enzima, além de aprofundar na compreensão de sua bioquímica.

3.9 Efeito de solventes

Para avaliar a influência deste estudo, foram testados diferentes solventes com diferentes polaridades, determinadas pelos valores de coeficiente de partição ($\log P$), amplamente empregados em reações catalisadas por enzimas. O $\log P$ indica o grau de

hidrofobicidade de uma substância e a sua solubilidade em um solvente orgânico. Solventes que se misturam bem com água (hidrofílicos) têm $\log P$ menor que 1,0, ao passo que solventes que não se misturam com água (hidrofóbicos) têm $\log P$ maior que 4,0. Isto é, quanto maior o $\log P$, mais hidrofóbica e mais solúvel em solvente orgânico é a substância (Wang et al., 2016). Neste estudo, foram empregados solventes com $\log P$ variando de -1,35 a 3,98. Os efeitos desses diferentes solventes na atividade da enzima foram avaliados e os resultados estão sumarizados na Tabela 6 em termos de atividade relativa.

Tabela 7. Efeito da adição de diferentes concentrações de solventes orgânicos sobre a atividade de endoglucanase *Aspergillus niger* ATCC 1004. Resultados expressos em atividade relativa (%) em que a atividade enzimática da amostra sem adição de solvente orgânico foi tomada como controle (100 %). 64

Solvent	log P	Relative activity (% solvent)		
		0	20	30
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	-1.35	100	169.56 ± 0.00	151.09 ± 0.01
Dimethylformamide (DMF)	-1.01	100	39.26 ± 0.00	35.56 ± 0.02
Methanol	-0.77	100	98.89 ± 0.00	145.5 ± 0.00
Acetonitrile	-0.45	100	32.61 ± 0.00	23.91 ± 0.00
Acetone	-0.24	100	92.75 ± 0.03	93.69 ± 0.00
Ethyl ether	0.89	100	105.55 ± 0.01	133.82 ± 0.06
Dichloromethane	1.5	100	131.60 ± 0.04	110.57 ± 0.00
Hexane	3.98	100	60.57 ± 0.02	67.23 ± 0.00

Legenda: o Log P é o logaritmo do coeficiente de partição, P, do solvente entre n-octanol e água e é usado como uma medida quantitativa da polaridade do solvente.

Entre os solventes investigados (Tabela 7), o DMSO, o metanol, o éter etílico e o diclorometano aumentaram a atividade enzimática da endoglucanase estudada. Em outro estudo, também se observou uma ativação na presença de metanol em endoglucanase de *Penicillium roqueforti* ATCC 10110. Os autores destacaram que, dependendo da polaridade dos solventes, grande parte das enzimas pode sofrer inativação ou ser ativada pela criação de um microambiente que favoreça uma conformação mais favorável à enzima (Oliveira et al., 2019).

Conforme pode ser observado, acetona, um solvente pouco polar (Log P: -0.24),

reduziu moderadamente a atividade da enzima, preservando mais de 90 % da atividade inicial durante os 15 minutos de reação, nas concentrações 20 % e 30 % (v/v). No entanto, DMF e a acetonitrila, solventes altamente polares e de baixos valores de $\log P$, resultaram em uma redução da atividade com o aumento da concentração de solventes. Essa ocorrência pode ser explicada pela remoção da monocamada crucial de água ligada à molécula enzimática, essencial para a sua atividade catalítica (Wang et al., 2016b)

A atividade enzimática aumenta com a adição de 20 a 30 % v/v de éter etílico ($\log P$: 0.89) ou diclorometano ($\log P$: 1.5), que são solventes hidrofóbicos (com alto $\log P$). Esses solventes mantêm a camada de hidratação da enzima, favorecendo sua conformação nativa e influenciando positivamente sua atividade (Neves et al., 2022).

Em geral, os solventes orgânicos hidrofílicos inibiram mais a atividade da endoglucanase do que os solventes hidrofóbicos. Porém, de forma surpreendente, a enzima conseguiu aumentar ou manter sua atividade com os dois tipos de solventes orgânicos. Excepcionalmente, a concentração maior de metanol e DMSO estimulou a atividade hidrolítica. O contrário aconteceu com o hexano, que reduziu a atividade enzimática, mas a manteve em 60 % da atividade inicial. A enzima tolerante a solventes (DMSO, metanol, éter etílico, acetona e diclorometano) mostrou efeitos de ativação e estabilidade em misturas aquoso-orgânicas, indicando que ela pode evitar a inativação por solvente orgânico e fazer várias ligações de hidrogênio com a água, o que lhe confere flexibilidade estrutural e mobilidade conformacional para uma catálise eficiente (Bisht; Yadav; Darmwal, 2013). Logo, a endoglucanase estudada tem uma estabilidade variável e interessante para a sua aplicação em síntese orgânica.

Estes dados obtidos estão de acordo com estudos anteriores descritos na literatura (Bisht; Yadav; Darmwal, 2013, Oliveira et al., 2019). No estudo de outra endoglucanase de *Haloarcula* sp. G10 foi observado que a enzima foi mais ativa e estável na presença de solventes hidrofóbicos apolares com maiores valores de $\log P$ e as atividades foram drasticamente reduzidas após incubação com solventes orgânicos polares ($\log P_{ow} \leq -0.3$) (Saleem et al., 2005).

3.10 Halotolerância

A endoglucanase de *Aspergillus niger* ATCC 1004 manteve sua atividade em todas as concentrações salinas estudadas e apresentou atividade relativa de 260,71, 297,62, 317,85, 322,62, 345,24, 378,57, 318,00 222,62 %, respectivamente para 0,01, 0,05, 1, 2,

3, 4, 5 e 6 mol. L⁻¹ de NaCl. A atividade máxima da enzima ocorreu com NaCl 4 M. A endoglucanase examinada é classificada como uma enzima halofílica (Nunes et al., 2020).

Essa capacidade de resistir a concentrações mais elevadas de NaCl é pouco comum em fungos, sendo mais observada em enzimas provenientes de bactérias (Nunes et al., 2020). Portanto, essa propriedade confere à enzima investigada um considerável potencial biotecnológico, sendo cabível estudos mais aprofundados sobre tal particularidade. Ao avaliarem uma endoglucanase de *Botrytis ricini* URM 5627, os autores observaram uma máxima atividade na concentração 2 mol. L⁻¹ de NaCl com aumento de 75 % na atividade (Silva et al., 2018).

A estabilidade halofílica e a adaptação a concentrações de NaCl sugerem a presença de uma superfície mais ácida na enzima, juntamente com um núcleo menos hidrofóbico (Regmi et al., 2020). Essa peculiaridade em algumas enzimas pode ser atribuída a uma série de fatores inter-relacionados. Um dos principais mecanismos é a presença de um grande número de resíduos ácidos na superfície da proteína, que atraem e se ligam a moléculas de água e íons metálicos, criando uma camada de hidratação que protege a enzima do ambiente salino. Além disso, outros fatores que contribuem para a halotolerância incluem a estrutura secundária, como alfa-hélices e beta-folhas, e a formação de pontes salinas entre resíduos de aminoácidos específicos. A combinação desses fatores permite que as enzimas halotolerantes funcionem em ambientes com alta salinidade, o que é crucial para diversas aplicações biotecnológicas (Cai et al., 2022).

Um exemplo de aplicação biotecnológica dessa particularidade em algumas enzimas é o pré-tratamento ácido/alcalino. Frequentemente utilizado na hidrólise enzimática, essa técnica eleva a concentração de NaCl no substrato de celulose. Sem a dessalinização, a etapa subsequente de hidrólise enzimática precisa ser realizada em ambiente de alta salinidade, o que prejudica sua eficiência. A utilização de celulasas halotolerantes surge como uma solução promissora para eliminar ou minimizar esses efeitos adversos, abrindo caminho para a produção mais eficiente e econômica de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica (Cai et al., 2022).

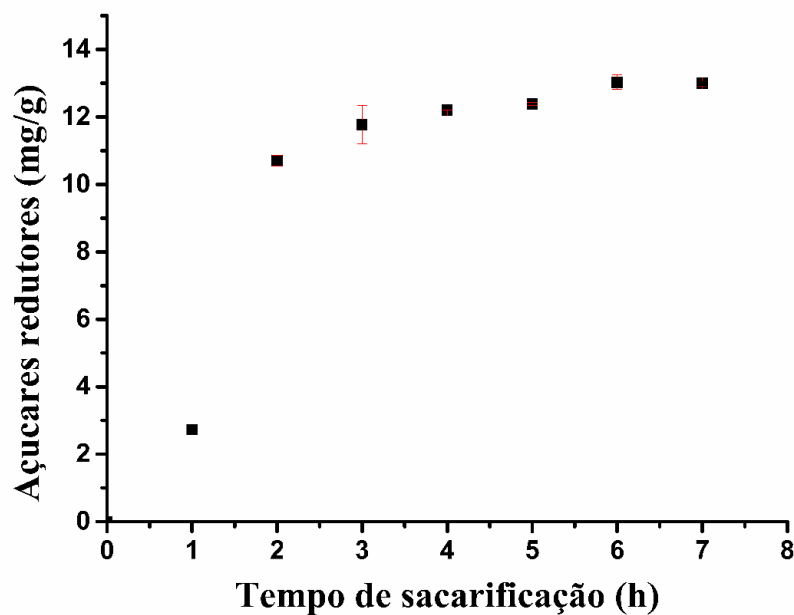
4.0 Sacarificação

O blend enzimático produzido por *Aspergillus niger* ATCC 1004 foi empregado para sacarificar a casca de arroz. A quantidade máxima de açúcares redutores obtida foi de $13,03 \pm 0,02$ mg/g de resíduo em um processo de 6 horas (Figura 8).

É importante ressaltar que a casca de arroz contém carboidratos como celulose e hemicelulose nas paredes celulares, representando uma valiosa fonte de açúcares para aplicação na fermentação e na produção de etanol. No entanto, esses carboidratos estão intrincadamente envoltos por camadas de lignina na matriz lignocelulósica, o que forma uma espécie de barreira que dificulta a eficácia da hidrólise enzimática (Matei et al., 2020). Por esse motivo, é comum a aplicação de etapas de pré-tratamento para eliminar essa barreira e expor os carboidratos à ação das enzimas e assim, alcançar uma sacarificação eficiente.

No presente estudo, foi possível realizar a sacarificação da casca de arroz sem a utilização de etapas de pré-tratamento (exceto secagem e moagem do resíduo) ou adição de compostos para melhorar o processo. Isso a torna um potencial candidata a processo biotecnológico promissor e de baixo custo.

Figura 8. Sacarificação da casca de arroz utilizando endoglucanase bruta de *Aspergillus niger* ATCC 1004.



O blend enzimático não purificado (endoglucanase bruta) é preferível à enzima em sua forma isolada, pois contém diversas outras enzimas hidrolíticas fundamentais para a efetiva degradação da biomassa (Ferraz et al., 2018). Além disso, a sacarificação enzimática apresenta vantagens como alto desempenho, menor gasto energético e baixo custo de processo em comparação com a sacarificação química (Silva et al., 2018). Por fim, a

sacarificação enzimática tem suscitado considerável interesse na indústria biotecnológica atual, destacando-se principalmente na produção de bioetanol (Ferraz et al., 2018).

4.1 Análise da composição dos açúcares individuais

Através da análise por HPLC (Tabela 7) foi possível observar a eficiência da liberação de dois monossacarídeos de maior interesse industrial para conversão posterior, a glicose para a indústria de biocombustíveis e a frutose para a indústria alimentícia. A partir da aplicação do blend enzimático na sacarificação da casca de arroz sem a utilização de etapas de pré-tratamento (exceto secagem e moagem do resíduo), foi possível aumentar o teor de glicose em 51% e de frutose em 513%.

Tabela 8. Composição individual de açúcares antes e após hidrólise enzimática (7 h), determinada por HPLC

Tempo (h)	Concentração de açúcares individuais (mg/L)		
	Frutose	Glicose	Total
0	2.17	14.59	
7	13.38	22.03	
Açúcares liberados	11.21	7.24	17.45

O que torna essa pesquisa ainda mais inovadora é a proporção final de frutose e glicose. Ao contrário da maioria dos estudos, que observam uma produção majoritária de glicose (Silva et al. 2022, Karp et al., 2021, Pino 2019), nesse processo obteve um teor de frutose 50% superior. Isso demonstra o ineditismo da pesquisa e abre portas para novas aplicações.

A presença da glicose isomerase no blend enzimático é fundamental para este resultado. Essa enzima converte a D-glicose em D-frutose (Geng *et al.*, 2024), possibilitando a produção de um xarope com alto teor de frutose. A isomerização de aldose em cetose, presente nesse processo, é resultado da complexa composição do blend enzimático utilizado. Por ser um extrato de enzimas não comerciais, este blend apresenta uma rica variedade de enzimas com diferentes atividades. Além da endoglucanase, a presença de xylanase, exoglucanase (Ferraz 2018) e isomerases, por exemplo, contribui para a eficiência e versatilidade do processo.

Convencionalmente, uma forma de obtenção de xarope rico em frutose a partir de resíduos agroindustriais é fazer a sacarificação e a isomerização em etapas distintas. Porém, esse método tem baixa eficiência e pode exigir o uso de metais e outras suplementações, tornando o processo mais complexo e custoso (Geng et al., 2024). O presente estudo propõe uma alternativa inovadora; um blend enzimático contendo isomerases que converte glicose em frutose simultaneamente à sacarificação, simplificando o processo e aumentando sua eficiência.

CONCLUSÃO

A combinação de otimização multivariada e avaliação bioquímica resultou na produção de uma endoglucanase altamente eficiente pelo *Aspergillus niger*. A enzima apresentou alta estabilidade térmica e de pH, o que possibilita a sua atuação em temperaturas entre 60 e 80°C e em uma ampla faixa de pH, demonstrando robustez em diferentes condições. Foi observada tolerância a compostos orgânicos, sais e solventes, ampliando o leque de aplicações da enzima em processos biotecnológicos.

O blend enzimático contendo a endoglucanase obtida neste estudo possibilitou a sacarificação eficiente de resíduo agroindustrial, como casca de arroz, sem a necessidade de pré-tratamento ou aditivos. Essa capacidade abre caminho para processos biotecnológicos mais simples e econômicos através da redução de custos, otimização da produção de xarope rico em frutose. A utilização de matérias-primas de baixo custo é uma forma de agregar valor à resíduos agroindustriais, promovendo a sustentabilidade.

Em suma, o presente trabalho demonstra o potencial da aplicação da endoglucanase de *Aspergillus niger* na produção de xarope rico em frutose a partir de casca de arroz. As propriedades da enzima e a eficiência do processo biotecnológico desenvolvido abrem perspectivas promissoras para futuras aplicações em larga escala.

REFERÊNCIAS

360 RESEARCHREPORTS. **GLOBAL CELLULASE MARKET OUTLOOK 2022**. Pune, India: [s. n.], 2022.

AHMED, S. A.; ABDELLA, M. A. A.; EL-SHERBINY, G. M.; IBRAHIM, A. M.; EL-SHAMY, A. R.; ATALLA, S. M. M. Application of one –factor- at-a-time and statistical designs to enhance α -amylase production by a newly isolate *Bacillus subtilis* strain-MK1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101397>

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

BISHT, D.; YADAV, S. K.; DARMWAL, N. S. An oxidant and organic solvent tolerant alkaline lipase by *P. aeruginosa* mutant: downstream processing and biochemical characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1305–1314, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000400040>

CAI, L.-N.; XU, S.-N.; LU, T.; LIN, D.-Q.; YAO, S.-J. Salt-tolerant and thermostable mechanisms of an endoglucanase from marine *Aspergillus niger*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 9, n. 1, p. 44, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00533-3>

CHA, J.-H.; YOON, J.-J.; CHA, C.-J. Functional characterization of a thermostable endoglucanase belonging to glycoside hydrolase family 45 from *Fomitopsis palustris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6515–6523, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9075-5>

CHINYELUM, O.P.; HENRY, O.; IRUOGHENE, O. Thermostability Studies of *Streptomyces Roseiscleroticus* Glucose Isomerase. **Journal of Thermodynamics & Catalise**, v. 12, n. 2, p. 1–8, 2021.

COSTA, M. A. R. et al. Application crude multienzyme extract from *Aspergillus niger* as a pretreatment for the extraction of essential oil from *Croton argyrophyllus* leaves. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1843–1856, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bab.2251>

COSTA, M. A. R.; GUALBERTO, S. A.; OLIVEIRA, P. C.; TAVARES, I. M. C.; SANTANA, N. B.; LEÃO, D. J.; SILVA, D. C.; RIBEIRO, D. DOS S.; SILVA, N. M.; SANTOS, P. H.; CARVALHO, M. G.; FRANCO, M. Application crude multienzyme extract from *Aspergillus niger* as a pretreatment for the extraction of essential oil from *Croton argyrophyllus* leaves. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 5, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bab.2251>

DADWAL, A.; SHARMA, S.; SATYANARAYANA, T. Thermostable cellulose saccharifying microbial enzymes: Characteristics, recent advances and biotechnological

applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 188, p. 226–244, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.024>

DE BRITO, A. R.; REIS, N. S.; SILVA, T. P.; BONOMO, R. C. F.; TROVATTI UETA-NABARO, A. P.; DE ASSIS, S. A.; DA SILVA, E. G. P.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. 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 & Biotechnology**, v. 47, n. 10, p. 977–985, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1365247>

DE CARVALHO, M. S.; MENEZES, L. H. S.; PIMENTEL, A. B.; COSTA, F. S.; OLIVEIRA, P. C.; SANTOS, M. M. O.; TAVARES, I. M. C.; IRFAN, M.; BILAL, M.; DIAS, J. C. T.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Application of Chemometric Methods for the Optimization Secretion of Xylanase by *Aspergillus oryzae* in Solid State Fermentation and Its Application in the Saccharification of Agro-industrial Waste. **Waste and Biomass Valorization**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01832-8>

DETMANN, E.; SILVA, L. F. C.; ROCHA, G. C.; PALMA, M. N. N.; RODRIGUES, J. P. P. **Métodos para análise de alimentos**. 2. ed. Visconde do Rio Branco, MG: 2012, 2012.

DOS SANTOS, T. C.; DE BRITO, A. R.; BONOMO, R. C. F.; PIRES, A. J. V.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; SILVA, T. P.; FRANCO, M. Statistical Optimization of Culture Conditions and Characterization for Ligninolytic Enzymes Produced from *Rhizopus Sp.* Using Prickly Palm Cactus Husk. **Chemical Engineering Communications**, v. 204, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00986445.2016.1230851>

DOS SANTOS, T. C.; REIS, N. S.; SILVA, T. P.; MACHADO, F. de P.; FEREREIRA BONOMO, R. C.; FRANCO, M. Prickly palm cactus husk as a raw material for production of ligninolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. 1, 2016 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0031-9>

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

FERRAZ, J. L. de A. A.; SOUZA, L. O.; SOARES, G. A.; COUTINHO, J. P.; DE 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, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bior-tech.2017.06.048>

GENG, X.; LI, Y.; WANG, R.; JIANG, S.; LIANG, Y.; LI, T.; LI, C.; TAO, J.; LI, Z. Enhanced High-Fructose Corn Syrup Production: Immobilizing *Serratia marcescens* Glucose Isomerase on MOF (Co)-525 Reduces CO₂ Dependency in Glucose Isomerization to Fructose. *Foods*, v. 13, n. 4, p. 527, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods13040527>

- GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; RAI, V. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–18, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- HAYASHI, T.; YOSHIDA, K.; WOO PARK, Y.; KONISHI, T.; BABA, K. **Cellulose metabolism in plants**. [S. l.: s. n.] Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)47001-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)47001-1)
- HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P. de; BRAGA, A. R. C.; KALLIL, S. J. Kinetics and thermodynamic characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fractionated with ammonium sulphate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1981-67232012000100005>
- HODA, A.; TAJAJ, M.; SALLAKU, E. In silico Structural, Functional and Phylogenetic Analyses of cellulase from *Ruminococcus albus*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 58, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00162-x>
- IRUOGHENE, O.; LINUS, E. A.; ONYEBUCHI, E. S. O.; CHIEMEKA, C. F. Kinetics and Thermodynamic Properties of Glucose Oxidase Obtained from *Aspergillus fumigatus* ASF4. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 3, n. 6, p. 438–445, 2022.
- KARP, S. G.; ROZHKOVA, A. M.; SEMENOVA, M. V.; OSIPOV, D. O.; DE PAULI, S. T. Z.; SINITSYNA, O. A.; ZOROV, I. N.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P.; SOCCOL, C. R.; SINITSYN, A. P. Designing enzyme cocktails from *Penicillium* and *Aspergillus* species for the enhanced saccharification of agro-industrial wastes. *Biore-source Technology*, v. 330, p. 124888, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124888>
- KAUSAR, F.; IRFAN, M.; SHAKIR, H. A.; KHAN, M.; ALI, S.; FRANCO, M. Challenges in Bioethanol Production: Effect of Inhibitory Compounds. *In*: SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, N.; SINGH, R. (org.). **Bioenergy Research: Basic and Advanced Concepts**. Singapore: Springer Singapore, 2021. p. 119–154. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-33-4611-6_5
- KHAN, A.; KHAN, H.; FAHEEM, M.; ZEB, A.; BADSHAH, M.; CHUNG, Y. R. Isolation and Characterization of an Acidic, Salt-Tolerant Endoglucanase Cel5A from a Bacterial Strain *Marteella endophytica* YC6887 Genome. *Molecular Biotechnology*, v. 63, n. 4, p. 305–315, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12033-020-00295-3>
- KHAN, M. N.; LUNA, I. Z.; ISLAM, Md. M.; SHARMEEN, S.; SALEM, K. S.; RASHID, T. U.; ZAMAN, A.; HAQUE, P.; RAHMAN, M. M. Cellulase in Waste Management Applications. *In*: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. [S. l.]: Elsevier, 2016. p. 237–256. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00021-6>
- KLEY VALLADARES-DIESTRA, K.; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; RICARDO SOCCOL, C. A biorefinery approach for pectin extraction and second-

generation bioethanol production from cocoa pod husk. *Bioresource Technology*, v. 346, p. 126635, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126635>

KUMAR, D.; NAGAR, S.; BHUSHAN, I.; KUMAR, L.; PARSHAD, R.; GUPTA, V. K. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 87, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mol-catb.2012.10.002>

LO, N.; TOKUDA, G.; WATANABE, H. Evolution and Function of Endogenous Termite Cellulases. *In: Biology of Termites: a Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. p. 51–67. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-90-481-3977-4_3

LUZ, J. A.; RIBEIRO, D. dos S.; TEIXEIRA, J. M.; SILVA, T. M.; LEÃO, D. J.; FRANCO, M.; GUALBERTO, S. A.; FREITAS, J. S. de. α -amylase production obtained from *Aspergillus niger* ATCC 1004 by solid state fermentation using Croton linearifolius residues as substrate. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e510101119891, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19891>

MANHONGO, T. T.; CHIMPHANGO, A.; THORNLEY, P.; RÖDER, M. An economic viability and environmental impact assessment of mango processing waste-based biorefineries for co-producing bioenergy and bioactive compounds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 148, p. 111216, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111216>

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

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

MARQUES, G. L.; SILVA, T. P.; LESSA, O. A.; DE BRITO, A. R.; REIS, N. S.; DE, A. G.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Production of xylanase and endoglucanase by solid-state fermentation of jackfruit residue. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 18, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n2/Marques>

MATEI, J. C.; SOARES, M.; BONATO, A. C. H.; DE FREITAS, M. P. A.; HELM, C. V.; MAROLDI, W. V.; MAGALHÃES, W. L. E.; HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M. Enzymatic delignification of sugar cane bagasse and rice husks and its effect in

saccharification. **Renewable Energy**, v. 157, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.028>

MCMILLAN, J. D.; JENNINGS, E. W.; MOHAGHEGHI, A.; ZUCCARELLO, M. Comparative performance of precommercial cellulases hydrolyzing pretreated corn stover. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 29, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-29>

MILLER, G. L. MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428. **Anal. Chem**, v. 31, 1959.

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

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

NOGUEIRA, L. S. TAVARES, I. M. C.; SANTANA, N. B.; FERRÃO, S. P.B.; TEIXEIRA, J. M.; COSTA, F. S. Thermostable trypsin-like protease by *Penicillium roqueforti* secreted in cocoa shell fermentation: Production optimization, characterization, and application in milk clotting. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 5, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bab.2268>

NUNES, N. DA S.; CARNEIRO, L. L.; DE MENEZES, L. H. S.; DE CARVALHO, M. S.; PIMENTEL, A. B.; SILVA, T. P.; CHAGAS, T. P.; SILVA, E. G. P.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Simplex-Centroid Design and Artificial Neural Network-Genetic Algorithm for the Optimization of Exoglucanase Production by *Penicillium Roqueforti* ATCC 10110 Through Solid-State Fermentation Using a Blend of Agroindustrial Wastes. **Bioenergy Research**, v. 13, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10157-0>

OLIVEIRA, P. C.; DE BRITO, A. R.; PIMENTEL, A. B.; SOARES, G. A.; PACHECO, C. S. V.; SANTANA, N. B.; DA SILVA, E. G. P.; FERNANDES, A. G. A.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell for the production of endoglucanase by *penicillium roqueforti* ATCC 10110 in solid state fermentation and biochemical properties. **Revista Mexicana de Ingeniera Quimica**, v. 18, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n3/Oliveira>

PINO, M. S.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; MICHELIN, M.; RUIZ, H. A. Enhancement and modeling of enzymatic hydrolysis on cellulose from agave bagasse hydrothermally pretreated in a horizontal bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, v. 211, p. 349–359, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.111>

PORTO DE SOUZA, V. L.; KARP, S. G.; BINDER PAGNONCELLI, M. G.; VON LINSINGEN, T. M.; LIBARDI JUNIOR, N.; VALLADARES, D. K.; VIESSER, J. A.; SOCCOL, C. R. Classification of enzymes and catalytic properties. *In: Biomass, Biofuels, Biochemicals*. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 11–30. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819820-9.00002-8>

- PRADHAN, D.; ABDULLAH, S.; PRADHAN, R. C. Chironji (*Buchanania lanzan*) fruit juice extraction using cellulase enzyme: modelling and optimization of process by artificial neural network and response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 3, p. 1051–1060, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04619-8>
- REGMI, S.; CHOI, Y. S.; KIM, Y. K.; KHAN, M. M.; LEE, S. H.; CHO, S. S.; JIN, Y. Y.; LEE, D. Y.; YOO, J. C.; SUH, J. W. Endoglucanase Produced by *Bacillus subtilis* Strain CBS31: Biochemical Characterization, Thermodynamic Study, Enzymatic Hydrolysis, and Bio-industrial Applications. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 25, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0338-5>
- REIS, N. dos S.; LESSA, O. A.; PACHECO, C. S. V.; PEREIRA, N. E.; SOARES, G. A.; SILVA, E. G. P.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Cocoa shell as a substrate for obtaining endoglucanase and xylanase from *Aspergillus oryzae* ATCC 10124. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 42, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4025/ACTASCI-TECHNOL.V42I1.48211>
- REIS, N. S.; BRITO, A. R.; PACHECO, C. S. V.; COSTA, L. C. B.; GROSS, E.; SANTOS, T. P.; COSTA, A. R.; SILVA, E. G. P.; OLIVEIRA, R. A.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Improvement in menthol extraction of fresh leaves of *Mentha arvensis* by the application of multi-enzymatic extract of *Aspergillus niger*. **Chemical Engineering Communications**, v. 206, n. 3, p. 387–397, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1494580>
- SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 6, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bit.260300604>
- SALEEM, M.; RASHID, M. H.; JABBAR, A.; PERVEEN, R.; KHALID, A. M.; RAJOKA, M. I. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized endoglucanase from *Arachniotus citrinus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 849–855, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.026>
- SANTANA, M. L.; BISPO, J. A. C.; DE SENA, A. R.; TESHIMA, E.; DE BRITO, A. R.; COSTA, F. S.; FRANCO, M.; DE ASSIS, S. A. Clarification of tangerine juice using cellulases from *Pseudomya sp.* **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 44–51, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04511-5>
- SANTOS, T. C. dos; CAVALCANTI, I. S.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FRANCO, M. Optimization of productions of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* using residue of mango a substrate. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2210–2216, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000145>
- SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.12.011>

SARKAR, S.; SOREN, K.; CHAKRABORTY, P.; BANDOPADHYAY, R. Application of Enzymes in Textile Functional Finishing. *In: [S. l.: s. n.]*. p. 115–127. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-15-3669-4_5

SILVA, O. S. da; LIRA DE OLIVEIRA, R.; DE CARVALHO SILVA, J.; CONVERTI, A.; SOUZA PORTO, T. Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.081>

SILVA, O. S. da; OLIVEIRA, R. L. de; SILVA, J. de C.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1039–1044, 2018 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.081>

SILVA, T. P.; DE ALBUQUERQUE, F. S.; DOS SANTOS, C. W. V.; FRANCO, M.; CAETANO, L. C.; PEREIRA, H. J. V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 263–269, 2018 c. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.022>

SILVA, T. P.; DE ALBUQUERQUE, F. S.; NASCIMENTO FERREIRA, A.; SANTOS, D. M. R. C. dos; SANTOS, T. V. dos; MENEGHETTI, S. M. P.; FRANCO, M.; LUZ, J. M. R. da; PEREIRA, H. J. V. Dilute acid pretreatment for enhancing the enzymatic saccharification of agroresidues using a *Botrytis ricini* endoglucanase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 70, n. 1, p. 184–192, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/bab.2341>

SINGH, S.; SINGH, V. K.; AAMIR, M.; DUBEY, M. K.; PATEL, J. S.; UPADHYAY, R. S.; GUPTA, V. K. Cellulase in Pulp and Paper Industry. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. [S. l.]*: Elsevier, 2016 a. p. 152–162. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00013-7>

SINGH, S.; SINGH, V. K.; AAMIR, M.; DUBEY, M. K.; PATEL, J. S.; UPADHYAY, R. S.; GUPTA, V. K. Cellulase in Pulp and Paper Industry. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Cellulase System Properties and Applications. [S. l.: s. n.]*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63507-5.00013-7>

SIQUEIRA, J. G. W.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, p. 105419, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105419>

SO, S.; CHERDTHONG, A.; WANAPAT, M. Improving sugarcane bagasse quality as ruminant feed with *Lactobacillus*, cellulase, and molasses. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 62, n. 5, p. 648–658, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.5.648>

SONKAR, K.; SINGH, D. P. Biochemical characterization and thermodynamic study of lipase from psychrotolerant *Pseudomonas punonensis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 28, p. 101686, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101686>

SOUZA, P. M.; ALIAKBARIAN, B.; FILHO, E. X. F.; MAGALHÃES, P. O.; JUNIOR, A. P.; CONVERTI, A.; PEREGO, P. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043>

SUWANNARANGSEE, S.; BUNTERNGSOOK, B.; ARNTHONG, J.; PAEMANEE, A.; THAMCHAIPENET, A.; EURWILAICHITR, L.; LAOSIRIPOJANA, N.; CHAMPREDA, V. Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. **Bioresource Technology**, v. 119, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.098>

TIBBETTS, S. M.; MANN, J.; DUMAS, A. Apparent digestibility of nutrients, energy, essential amino acids and fatty acids of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diets containing whole-cell or cell-ruptured *Chlorella vulgaris* meals at five dietary inclusion levels. **Aquaculture**, v. 481, p. 25–39, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.08.018>

VELÁZQUEZ-DE LUCIO, B. S.; HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, E. M.; VILLAGARCÍA, M.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; MANDUJANO-GONZALEZ, V.; MENDOZA-MENDOZA, B.; ÁLVAREZ-CERVANTES, J. Exogenous Enzymes as Zootechnical Additives in Animal Feed: A Review. **Catalysts**, v. 11, n. 7, p. 851, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal11070851>

WANG, B.; DONG, F.; CHEN, M.; ZHU, J.; TAN, J.; FU, X.; WANG, Y.; CHEN, S. Advances in Recycling and Utilization of Agricultural Wastes in China: Based on Environmental Risk, Crucial Pathways, Influencing Factors, Policy Mechanism. **Procedia Environmental Sciences**, v. 31, p. 12–17, 2016 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.02.002>

WANG, J.; CHIO, C.; CHEN, X.; SU, E.; CAO, F.; JIN, Y.; QIN, W. Efficient saccharification of agave biomass using *Aspergillus niger* produced low-cost enzyme cocktail with hyperactive pectinase activity. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 26–33, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.069>

WANG, S.; MENG, X.; ZHOU, H.; LIU, Y.; SECUNDO, F.; LIU, Y. Enzyme stability and activity in non-aqueous reaction systems: a mini review. **Catalysts**, v. 6, n. 2, p. 32, 2016 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal6020032>

CAPÍTULO 3

SACARARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE CASCA DA AMÊNDOA DO CACAU POR BLEND ENZIMÁTICO DE *Aspergillus niger* ATCC 1004

SACARARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE CASCA DA AMÊNDOA DO CACAU POR BLEND ENZIMÁTICO DE *Aspergillus niger* ATCC 1004

RESUMO

A casca da amêndoa do cacau apresenta grande potencial para a produção de compostos de alto valor agregado, como açúcares, através da sacarificação. Essa prática contribui para o reaproveitamento do material, a redução do impacto ambiental e a promoção da economia circular. A aplicação de blends enzimáticos obtidos por fermentação em estado sólido (FES) surge como uma alternativa eficiente e de baixo custo para a hidrólise enzimática. O pré-tratamento biológico, por sua vez, é utilizado para reduzir a recalcitrância da biomassa e aumentar a conversão em açúcares. Este estudo avaliou o potencial de um blend enzimático contendo endoglucanase na sacarificação da casca da amêndoa do cacau utilizando pré-tratamento biológico com *Aspergillus niger*. A composição lignocelulósica do subproduto e o efeito do pré-tratamento foram analisados. A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para verificar as modificações na estrutura do material. O pré-tratamento reduziu os teores de hemicelulose e elevou os teores de celulose, uma vez que a hemicelulose, por ser um polímero amorfo, é degradada antes da celulose. A presença de celulose é importante para a hidrólise enzimática. A sacarificação de 72 h evidenciou que o pré-tratamento elevou a conversão em açúcares redutores em 24%. Esse aumento pode ser explicado pela maior disposição da estrutura da celulose após o pré-tratamento. A análise de MEV confirmou a alteração na estrutura do resíduo pelo pré-tratamento, mostrando uma estrutura danificada com buracos e trincas. A sacarificação, por sua vez, deixou a estrutura esponjosa, com buracos, trincas e formação de blocos em grande parte da superfície. Essas alterações indicam a destruição da fibra da estrutura, o que explica a concentração de açúcares obtida na sacarificação. A aplicação do blend enzimático contendo endoglucanase foi eficiente para a sacarificação da casca da amêndoa do cacau. A utilização de pré-tratamentos se configura como uma alternativa viável para elevar a conversão em açúcares.

Palavras-chaves: Hidrólise enzimática. Resíduo agroindustrial. Pré-tratamento biológico. Lignocelulose. Biorrefinaria. Extrato multienzimático.

ENZYMATIC SACCHARIFICATION OF COCOA ALMOND SHELL BY *Aspergillus niger* ATCC 1004 ENZYME BLEND

ABSTRACT

Cocoa almond shell has great potential for the production of high value-added compounds, such as sugars, through saccharification. This practice contributes to the reuse of the material, the reduction of environmental impact and the promotion of circular economy. The application of enzyme blends obtained by solid state fermentation (SSF) emerges as an efficient and low-cost alternative for enzymatic hydrolysis. Biological pretreatment, in turn, is used to reduce biomass recalcitrance and increase sugar conversion. This study evaluated the potential of an enzyme blend containing endoglucanase on the saccharification of cocoa almond shell using biological pretreatment with *Aspergillus niger*. The lignocellulosic composition of the byproduct and the effect of the pretreatment were analyzed. Scanning electron microscopy (SEM) was used to verify the modifications in the material structure. The pretreatment reduced hemicellulose content and increased cellulose content, since hemicellulose, being an amorphous polymer, is degraded before cellulose. The presence of cellulose is important for enzymatic hydrolysis. The 72 h saccharification showed that the pretreatment increased the reducing sugar conversion by 24%. This increase can be explained by the greater availability of the cellulose structure after the pretreatment. SEM analysis confirmed the alteration in the residue structure by the pretreatment, showing a damaged structure with holes and cracks. Saccharification, in turn, left the structure spongy, with holes, cracks and block formation on a large part of the surface. These changes indicate the destruction of the fiber structure, which explains the sugar concentration obtained in the saccharification. The application of the enzyme blend containing endoglucanase was efficient for the saccharification of cocoa almond shell. The use of pretreatments is configured as a viable alternative to increase sugar conversion.

Keywords: Cocoa almond shell; enzymatic saccharification; *Aspergillus niger*; enzyme blend; biorrefinery; circular economy.

1. INTRODUÇÃO

Resíduos agrícolas representam uma importante fonte de material lignocelulósico com considerável potencial para uso na conversão de biomassa em etanol (Ruiz et al., 2012). Resíduos do processamento do cacau (*theobroma cacao*) são subprodutos gerados durante a produção de seus derivados, como chocolate e cacau em pó. Esses resíduos representam cerca de 85% da produção total de cacau e são compostos da casca dos grãos de cacau, cascas dos frutos do cacau e a polpa (Belwal et al., 2022). Caso não sejam gerenciados adequadamente, esses resíduos podem representar riscos ambientais e de saúde (Afedzi et al., 2023). Estima-se que a produção mundial de amêndoa de cacau foi de 4953 mil toneladas em 2023 (ICCO, 2023). A reutilização de resíduos do processamento do cacau para produção de compostos com alto valor agregado é uma oportunidade promissora de redução do impacto ambiental, promovendo a economia circular (De Menezes et al., 2021; Araujo et al., 2021).

A produção de bioetanol utilizando esses resíduos como matéria prima é uma alternativa viável, que apresenta vantagens em relação a outras formas de produção de bioenergia como combustão ou produção de biogás (Valladares-Diestra, Vandenberghe, Soccol, 2022). O processo de conversão do material lignocelulósico em bioetanol ocorre, basicamente, em 2 etapas: despolimerização da celulose em monômeros de açúcares (hidrólise ou sacarificação) e fermentação dos açúcares liberados (Ramos et al., 2022; Ruiz et al., 2023). A primeira etapa é crucial no rendimento de obtenção do bioetanol, pois maximizando a produção de açúcares resulta em um maior rendimento global (Li et al., 2024).

O uso de enzimas na hidrólise de resíduos lignocelulósicos oferece vantagens significativas em relação a hidrólise ácida (química) (Shiva et al., 2023). A hidrólise enzimática oferece maior seletividade, uma vez que as enzimas atuam de forma específica nas ligações de celulose e hemicelulose, resultando em produtos mais puros e facilmente recuperáveis. Além disso, as enzimas operam em condições suaves de temperatura e pH, reduzindo o consumo energético, o desgaste de equipamentos e o impacto ambiental do processo (Ramos et al., 2022).

O alto custo associado a obtenção das enzimas utilizadas na hidrólise de materiais lignocelulósicos (celulases e hemicelulases) eleva o valor do produto final, este é o principal desafio para a consolidação da hidrólise enzimática em escala industrial (Sóti, Lenaerts, Cornet, 2018). Para melhorar o custo benefício da utilização de enzimas em

biorrefinarias, é necessário reduzir os custos associados à produção e aplicação dessas enzimas (Gomes et al., 2024). Uma alternativa que tem se consolidado pela sua facilidade e eficiência é a utilização de blends enzimáticos (extrato bruto) de baixo custo produzidos por fermentação em estado sólido (FES) (De Carvalho et al., 2023).

Blends enzimáticos, compostos por diversas enzimas, oferecem a vantagem de serem utilizados sem necessidade de purificação. Por exemplo, o blend produzido por Marriki et al. (2020) apresentou uma eficácia de sacarificação da casca de arroz muito próxima à enzima comercial, com um custo significativamente inferior, visto que foi produzido por FES de resíduos sólidos. De Carvalho et al. (2023) conseguiu um sacarificar diferentes resíduos agroindustriais utilizando um blend produzido por FES.

No entanto, a aplicação em larga escala da lignocelulose representa um grande desafio, uma vez que a recalcitrância da biomassa limita a hidrólise enzimática, resultando em uma baixa taxa de sacarificação e um elevado custo de produção (Wu et al., 2022, Yoo et al., 2020). Essa resistência natural das paredes celulares vegetais deve-se principalmente à complexidade e à heterogeneidade da biomassa, que é formada por uma estrutura tridimensional de polímeros de celulose, hemicelulose e lignina (Ruiz et al., 2020). O pré-tratamento é uma estratégia eficaz para superar as dificuldades da conversão da biomassa em açúcares simples. Esses processos de pré-tratamento visam alterar a composição e a estrutura da lignocelulose, para que as enzimas possam atuar com mais facilidade e a produção de açúcares seja maior (Ruiz et al., 2020).

Métodos físicos, químicos e biológicos têm sido amplamente utilizados para o pré-tratamento de lignocelulose. O pré-tratamento biológico com metabólitos microbianos é uma tecnologia promissora com diversas vantagens, como ser ecologicamente correta, economicamente viável e aumentar a taxa de sacarificação enzimática. Além disso, não requer reciclagem de produtos químicos e não libera compostos tóxicos ao meio ambiente (Sindhu; Binod; Pandey, 2016). Pode ser realizado por diferentes microrganismos, incluindo fungos, bactérias, consórcios microbianos e tratamentos enzimáticos. Os fungos têm excelente capacidade de degradação e são a melhor escolha para a produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósicas (Wu *et al.*, 2022).

Sendo assim, o objetivo do trabalho é avaliar o potencial de um blend enzimático contendo endoglucanase na sacarificação da casca da amêndoa do cacau, utilizando pré-tratamento biológico com *Aspergillus niger*. A fim de verificar as possíveis modificações promovidas pelo pré-tratamento e pela hidrólise enzimática, foi aplicada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2. METODOLOGIA

2.1 Biomassa lignocelulósica

A casca da amêndoa do cacau (CC) (*Theobroma cacao*) foi cedida pela empresa Barry Callebaut (município de Itabuna, Bahia, Brasil).

A casca da amêndoa do cacau foi submetida a moagem em um moinho Wiley para um tamanho de grão de aproximadamente 2 mm. A umidade da biomassa foi determinada em um equipamento de infravermelho (ID200, MARTE, São Paulo, Brasil).

2.2 Pré-tratamento biológico

2.2.2 Microrganismo

A cepa de *Aspergillus niger* ATCC 1004 utilizada neste estudo foi adquirida do INCQS/Fiocruz (município de Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) e pode ser consultado sob o código 40018. A cepa foi mantida a 4 °C em meio ágar-dextrose-batata (PDA). A suspensão de esporos foi preparada utilizando o microrganismo cultivado em meio PDA por 7 dias a 26 °C. Após a incubação, a cultura esporulada foi suspensa em solução de Tween 80 (0,01%, v/v) e a contagem do número de esporos foi realizada com o auxílio de um microscópio binocular (modelo BA-210, Motic) e uma câmara de Neubauer.

2.2.1 Fermentação em estado sólido

O processo de fermentação será realizado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g da biomassa lignocelulósica. A inoculação foi realizada com 10^7 de esporos/grama de biomassa e a umidade desejada com adição de água destilada autoclavada (Silva et al., 2018). As culturas foram conduzidas em uma incubadora BOD (TE-371, Tecnal, Piracicaba, Brasil) com temperatura controlada de 28 °C por 96 h.

Após o tempo de incubação, a biomassa fermentada foi submetida a esterilização em autoclave a 121 °C e posterior processo de secagem a 50 °C por 24 h. As amostras pré-tratadas e sem pré-tratamento foram submetidas a análise de composição de lignina, celulose e hemicelulose (Detmann et al., 2012). Os valores foram expressos em porcentagem de matéria seca.

2.3 Blend enzimático

O blend enzimático foi obtido após a fermentação em estado sólido da mistura de casca da amêndoa do cacau (80%) e palma forrageira (20%) com *Aspergillus niger*

ATCC 1004. A inoculação foi realizada com 10^7 de esporos/grama nas condições otimizadas de fermentação (28 °C, 60 % de umidade e 96 h de incubação). Após a fermentação, 50 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol. L⁻¹ (pH 5) foram adicionados ao substrato fermentado e a mistura foi agitada em uma incubadora (QUIMIS, São Paulo, Brasil) a 30 °C e 200 rpm por 30 min. A fase líquida foi separada por prensagem mecânica, obtendo-se a permeação da gaze seguida de centrifugação (modelo CT-6000R, Cientec, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) por 10 minutos a 4000 rpm para remoção das impurezas (Silva *et al.*, 2018) com modificações.

2.4 Determinação da atividade da endoglucanase

Para determinação da enzima endoglucanase presente no blend enzimático, foi aplicado o método baseado na medição dos açúcares redutores produzidos pela degradação de 2% (p/v) de carboximetilcelulose (CMC) (Cromoline, Diadema, Brasil) diluído em 0,1 mol. L⁻¹ de tampão acetato de sódio em pH 5,0 (Miller, 1959). O método do ácido dinitrosalicílico – DNS – (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado para a quantificação de açúcares redutores de acordo com (Silva *et al.*, 2018) com modificações. Os ensaios de reação foram conduzidos pela adição de 100 µL da solução de CMC em 100 µL do blend enzimático. Os blends foram diluídos na proporção de 1/5. O ensaio em branco continha 100 µL de CMC (Cromoline, Diadema, Brasil) e 100 µL de água destilada.

As amostras foram incubadas em banho maria (TE-054; Tecnal) a 50 °C durante 10 min, seguidas da adição de 200 µL de DNS (Sigma-Aldrich). Posteriormente, os tubos foram submetidos a banho maria a 100°C por 5 min seguida da adição de 2 mL de água destilada para medição de absorbância em 540 nm em um espectrofotômetro (UV-M51 UV/Vis; Spectrophotometer). Uma unidade internacional de atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de redução de açúcares por minuto a 50°C.

2.5 Sacarificação enzimática

A sacarificação enzimática com os sólidos pré-tratados foi realizada seguindo a metodologia proposta por (Ruiz; Vicente; Teixeira, 2012) com modificações. Nessa etapa, a reação foi composta por 5g dos sólidos bruto e pré-tratados em frascos contendo 60 mL do blend enzimático. A amostra controle consistiu na ausência do blend enzimático. As

amostras foram submetidas a temperatura de 50 °C com agitação (150 rpm) e alíquotas foram coletadas em intervalos de 12 h até um tempo total de 72 h.

2.6 Microscopia eletrônica de varredura

As diferenças estruturais na superfície da casca da amêndoa do cacau após 7h horas de sacarificação enzimática foram observadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os sólidos sacarificados (com e sem pré-tratamento) foram depositadas sobre um “Stub”, e as leituras foram realizadas em modo ambiental. As imagens MEV foram obtidas usando um Quanta 250 (FEI Company) na voltagem de 15 kV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2 Composição química dos matérias-primas

A Tabela 1 detalha a composição química da casca da amêndoa do cacau antes e após o pré-tratamento biológico com *Aspergillus niger* ATCC 1004. Observa-se uma redução no teor de hemicelulose (de 19,41% para 16,44%) durante o processo, o que pode ser explicado pela degradação preferencial desse componente por enzimas hemicelulolíticas secretadas pelo fungo. Essa degradação, por sua vez, resulta no aumento relativo do teor de celulose (de 29,76% para 37,01%) ao longo das 96 horas de incubação (Li et al., 2023). Em princípio, a hemicelulose forma uma matriz que envolve as microfibrilas de celulose, e sua remoção prévia facilita a conversão da celulose em açúcares, o que pode aumentar o rendimento final do processo (Wang et al., 2017).

Tabela 1. Composição química, expressa em % da matéria seca, da casca da amêndoa do cacau não tratada e dos resíduos sólidos após o pré-tratamento biológico

Casca da amêndoa do cacau	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Lignina (%)
Sem pré-tratamento	19,41 ± 1,45	29,76 ± 0,14	15,55 ± 1,83
Após pré-tratamento biológico	16,44 ± 0,11	37,01 ± 1,16	14,42 ± 3.52

Esses resultados obtidos com a casca da amêndoa do cacau se assemelham ao observado por Li et al. (2023) em estudo do *Pinus massoniana* pré-tratado durante 60 dias por *Laetiporus sulphureus*. Em seus trabalhos, os autores verificaram que a secreção de hemicelulase por *Laetiporus sulphureus* foi alta no início do processo, visando a degradação da hemicelulose, enquanto a degradação da celulose se concentrou em um estágio posterior. Embora o baixo consumo de celulose possa parecer contraintuitivo, ele pode levar a um maior rendimento total de açúcares. Isso ocorre porque os fungos secretam enzimas que quebram os carboidratos em unidades menores, como a celulose, que são mais facilmente convertidas em açúcares (Wang et al., 2017). De fato, hemiceluloses possuem estruturas amorfas e são mais facilmente hidrolisadas que a celulose (Carrere et al., 2016).

Em um estudo que visava potencializar a produção de biogás, a palha de milho foi pré-tratada com o fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Os resultados revelaram uma eficiente degradação da celulose e hemicelulose durante o pré-tratamento, evidenciando a produção de celulasas pelo fungo. Essa ação enzimática foi crucial para atacar a baixa cristalinidade das fibras desses polímeros, tornando-os mais suscetíveis à digestão anaeróbica e, conseqüentemente, aumentando a produção de biogás (Liu et al., 2014).

O pré-tratamento apresentou uma leve redução no teor de lignina (de 15,55% para 14,42%) (Tabela 1), essa discreta modificação pode estar relacionada à escolha do fungo utilizado (Rouches et al., 2016) e ao tempo de incubação aplicado. O tempo de pré-tratamento biológico é crucial para maximizar a produção de açúcares. A degradação da lignina e hemicelulose facilita a hidrólise enzimática, mas a perda de celulose diminui o rendimento. O tempo ideal equilibra esses fatores para otimizar a conversão de biomassa em açúcares (Wang et al., 2017).

O uso de fungos em pré-tratamentos biológicos emerge como uma solução sustentável e econômica, viabilizada pela fermentação em estado sólido, que se destaca pela sua eficiência no uso de recursos. Fungos da podridão branca, mole e marrom., como *Aspergillus*, são capazes de desconstruir a complexa estrutura lignocelulósica, liberando açúcares que podem ser usados na produção de biocombustíveis, produtos farmacêuticos e têxteis (Carrere et al., 2016). Embora o pré-tratamento fúngico apresente um grande potencial, ainda há obstáculos a serem superados. É necessário aprimorar a estabilidade e tolerância das cepas fúngicas, selecionar as cepas mais adequadas para cada aplicação e aumentar a eficiência do processo de degradação (Wu et al., 2022). Uma das principais desvantagens do pré-tratamento fúngico é o tempo de incubação prolongado, que pode

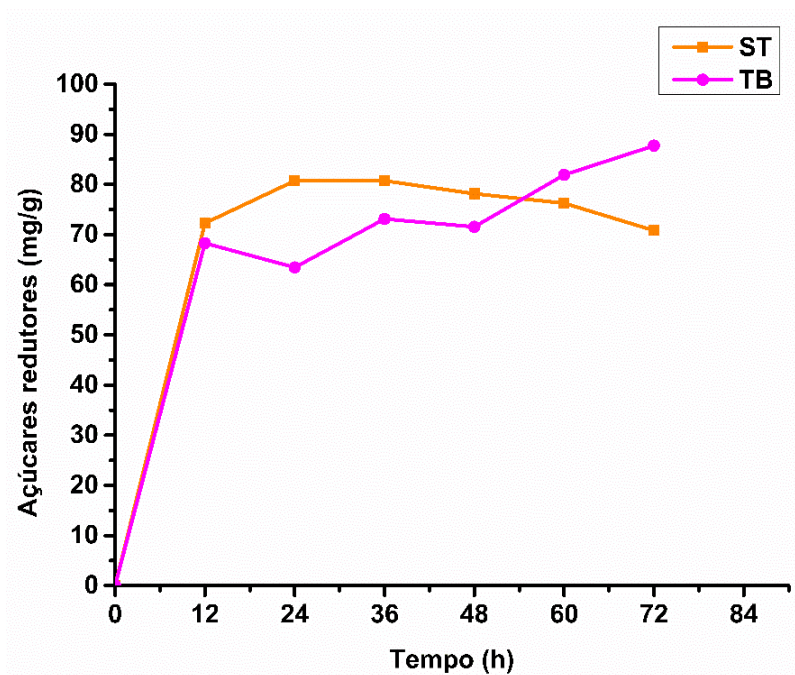
variando de 4 a 8 semanas, necessário para tornar os substratos facilmente digeríveis (Baramee et al., 2020).

3.3 Sacarificação enzimática

A sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais para a produção de bioetanol é de grande interesse para a indústria biotecnológica atual. As vantagens da hidrólise enzimática, como alto rendimento, condições de reação mais suaves, menor gasto energético e menor formação de produtos indesejáveis, a tornam uma alternativa atraente aos métodos tradicionais de produção de bioetanol (Ferraz et al., 2018).

A casca da amêndoa do cacau foi exitosamente sacarificada pelo blend enzimático contendo endoglucanase (0,435 U/mL), como demonstra a Figura 1. A quantificação de açúcares redutores revelou 70,83 mg/g no sólido não tratado (ST) e 87,88 mg/g no resíduo pré-tratado com *Aspergillus niger* ATCC 1004 (TB) após 72 horas de sacarificação. O pré-tratamento biológico da casca da amêndoa do cacau por *Aspergillus niger* ATCC 1004 durante 96 horas, utilizando a técnica de FES, elevou a conversão em 24%, confirmando sua eficácia em aumentar o acesso das enzimas às estruturas da celulose e, consequentemente, sua conversão.

Figura 1. Perfil de sacarificação da casca da amêndoa do cacau antes e após pré-tratamento biológico com *Aspergillus niger* ATCC 1004.



A casca da amêndoa do cacau, rica em lignocelulose, possui estrutura complexa que dificulta sua decomposição em subprodutos de interesse. O pré-tratamento biológico surge como uma solução promissora para superar essa barreira, aumentando a acessibilidade das enzimas à celulose e, conseqüentemente, o rendimento de conversão em bioprodutos (Lessa et al., 2022).

Embora estudos na literatura utilizem tempos de incubação de 4 a 8 semanas para tornar os substratos facilmente digeríveis (Baramée et al., 2020), este estudo demonstra que, mesmo com um tempo de pré-tratamento de apenas 4 dias, foi possível observar um efeito na hidrólise enzimática da casca da amêndoa do cacau. Isso indica o potencial do pré-tratamento biológico como uma técnica eficiente e viável para o processamento dessa biomassa.

Vale destacar que a capacidade de conversão neste estudo, além do pré-tratamento, também se deve ao uso de um blend enzimático bruto. Este blend contém diversas enzimas hidrolíticas essenciais para a degradação eficaz da biomassa, como descrito por Ferraz et al. (2018). Estudos como o de (Wang et al., 2019) corroboram essa importância, demonstrando que a sacarificação de agave com um blend enzimático foi eficiente e de baixo custo.

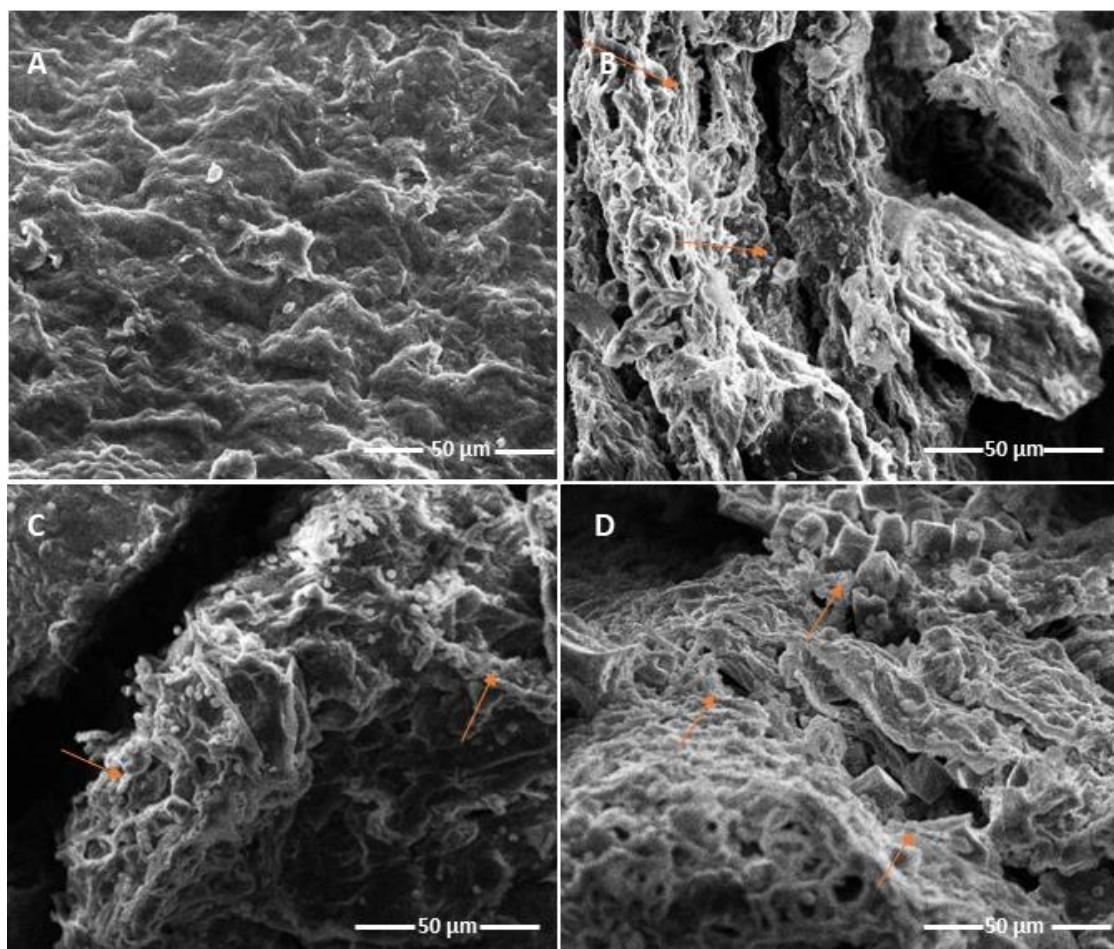
Várias biomassas lignocelulósicas, como palha de trigo, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de agave, são amplamente utilizadas para a produção de bioetanol (Punia; Singh, 2024). No entanto, outras matérias-primas potenciais, como a casca da amêndoa do cacau, ainda são pouco exploradas. Este estudo, em escala laboratorial, contribui para a diversificação de fontes de biomassa para a produção de bioetanol, demonstrando o potencial da casca da amêndoa do cacau como uma alternativa promissora.

3.3 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) com aumento de 800 vezes revela a transformação da morfologia da casca da amêndoa do cacau após o pré-tratamento e a sacarificação (Figura 1). A micrografia da casca da amêndoa do cacau bruta (Figura 1A) mostra uma estrutura rígida, rugosa e pouco porosa, indicando que estava firmemente envolvida por hemicelulose e lignina. Já a casca pré-tratada com *Aspergillus niger* ATCC 1004 (Figura 1C) apresenta superfície acidentada, porosa e com cavidades após 4 dias de degradação. Essa ruptura das fibras comprova a ação do ataque microbiano, alterando as fibrilas em nível molecular. Essa modificação intrínseca da estrutura aumenta a

reatividade da biomassa, facilitando o acesso da celulose à hidrólise enzimática (Tiwari et al., 2013).

Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura da casca da amêndoa do cacau antes e após o pré-tratamento biológico e processo de sacarificação.



Legenda: A: Casca da amêndoa do cacau bruta (sem pré-tratamento). B: Casca da amêndoa do cacau bruta (sem pré-tratamento) após a sacarificação de 96 h. C: Casca da amêndoa do cacau pré-tratada com *Aspergillus niger* ATCC 1004. D: Casca da amêndoa do cacau pré-tratada com *Aspergillus niger* ATCC 1004 após sacarificação de 96 h.

Estudos semelhantes (Silva et al., 2017) obtiveram microfotografias comparáveis ao analisar a estrutura da casca da amêndoa do cacau após a FES com *Penicillium roqueforti* para produção de lipase (Silva et al., 2017). Corroborando esses achados, outro estudo com casca da amêndoa do cacau submetida a FES com fungo filamentoso observou a presença de orifícios de tamanhos variados distribuídos ao redor das hifas do fungo. Essa observação evidencia a capacidade do fungo de degradar macromoléculas e polímeros naturais durante e após sua "adesão" ao substrato (Lessa et al., 2022).

Outro estudo, utilizando espigas de milho, revelou que a estrutura inicialmente plana, contínua e lisa se tornou robusta, menos compacta e com furos após o pré-tratamento com fungos da podridão branca. A análise de MEV confirmou que o pré-tratamento fúngico causou destruição estrutural, o que levaria à melhor digestibilidade enzimática das espigas de milho pré-tratadas (Wang et al., 2017).

Em síntese, fungos do gênero *Aspergillus* são eficientes na produção de enzimas que degradam a parede celular vegetal. O fungo libera enzimas hidrolíticas específicas que quebram as paredes celulares, enquanto o micélio fúngico penetra na biomassa pré-tratada, aumentando o tamanho dos poros e a área de superfície. Isso facilita o acesso das enzimas aos seus alvos, otimizando a degradação da biomassa (Yahmed et al., 2017).

O processo de sacarificação alterou drasticamente a estrutura da biomassa bruta, mostrando uma estrutura irregular, danificada e com presença de buracos e trincas (Figura 1B). Com relação a amostra pré-tratada, a hidrólise enzimática provocou uma estrutura ainda mais esponjosa, com buracos, trincas e com formação de blocos em grande parte da superfície (Figura 1D). Essas alterações observadas na biomassa indica que a fibra da estrutura foi destruída, explicando a concentração de açúcares obtida na sacarificação (Ruiz et al., 2012).

Ao estudarem as morfologia da palha de trigo, verificaram, claramente, uma destruição das fibras após 12 h de sacarificação, explicando os 56% do rendimento de sacarificação e 0,47 g/(Lh) de taxa de sacarificação inicial (Ruiz et al., 2012). Um estudo verificou que a hidrólise enzimática de resíduo de sorgo sacarino pré-tratado com NaOH dissociou e expandiu as estruturas de celulose e hemicelulose. Após o pré-tratamento, a celulose persistiu como aglomerados cristalizados, indicando que sua maior parte foi degradada pela hidrólise enzimática (Punia; Singh, 2024).

CONCLUSÃO

O estudo demonstra a viabilidade da sacarificação enzimática para a produção de açúcares de alto valor agregado a partir da casca da amêndoa do cacau. Os resultados comprovam a eficácia do pré-tratamento biológico com *Aspergillus niger* e do blend enzimático contendo endoglucanase na conversão da biomassa em açúcares redutores. Foi verificada uma redução dos teores de hemicelulose e aumento da celulose no material pré-tratado, além do aumento de 24% na conversão em açúcares redutores na sacarificação da casca de cacau com pré-tratamento. As modificações na estrutura da casca pelo pré-tratamento e pela sacarificação foram evidenciadas pela microscopia eletrônica de varredura.

Dessa forma, a sacarificação da casca da amêndoa do cacau é uma alternativa viável e sustentável para o reaproveitamento de um subproduto agroindustrial. A aplicação do pré-tratamento biológico com *Aspergillus niger* é uma opção eficiente e de baixo custo para aumentar a conversão em açúcares. O estudo abre portas para a produção de bioprodutos de alto valor agregado a partir da casca da amêndoa do cacau, impulsionando a bioeconomia circular na indústria do cacau.

REFERÊNCIAS

- AFEDZI, A. E. K.; OBENG-BOATENG, F.; ADUAMA-LARBI, M. S.; ZHOU, X.; XU, Y. Valorization of Ghanaian cocoa processing residues as extractives for value-added functional food and animal feed additives – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 52, p. 102835, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102835>
- ALMEIDA LESSA, O. *et al.* Structural alteration of cocoa bean shell fibers through biological treatment using *Penicillium roqueforti*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 53, n. 9, p. 1154–1163, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2177866>
- ARAUJO, S. C.; RAMOS, M. R. M. F.; DO ESPÍRITO SANTO, E. L.; DE MENEZES, L. H. S.; DE CARVALHO, M. S.; TAVARES, I. M. de C.; FRANCO, M.; DE OLIVEIRA, J. R. Optimization of lipase production by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 through solid-state fermentation using agro-industrial residue based on a univariate analysis. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 325–330, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1944203>
- BARAMEE, S.; SIRIATCHARANON, A.; KETBOT, P.; TEERAVIVATTANAKIT, T.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAIKOON, C.; RATANAKHANOKCHAI, K.; PHITSUWAN, P. Biological pretreatment of rice straw with cellulase-free xylanolytic enzyme-producing *Bacillus firmus* K-1: Structural modification and biomass digestibility. **Renewable Energy**, v. 160, p. 555–563, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.06.061>
- BELWAL, T.; CRAVOTTO, C.; RAMOLA, S.; THAKUR, M.; CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G. Bioactive Compounds from Cocoa Husk: Extraction, Analysis and Applications in Food Production Chain. **Foods**, v. 11, n. 6, p. 798, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11060798>
- BEN YAHMED, N.; CARRERE, H.; MARZOUKI, M. N.; SMAALI, I. Enhancement of biogas production from *Ulva* sp. by using solid-state fermentation as biological pretreatment. **Algal Research**, v. 27, p. 206–214, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.005>
- CARRERE, H.; ANTONOPOULOU, G.; AFFES, R.; PASSOS, F.; BATTIMELLI, A.; LYBERATOS, G.; FERRER, I. Review of feedstock pretreatment strategies for improved anaerobic digestion: From lab-scale research to full-scale application. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 386–397, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.09.007>

DE ALMEIDA ANTUNES FERRAZ, J. L.; SOUZA, L. O.; SOARES, G. A.; COUTINHO, J. P.; DE 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, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.048>

DETMANN, E.; SILVA L. F. C.; ROCHA, G. C.; PALMA, M. N. N.; RODRIGUES, J. P. P. Métodos para análise de alimentos. 2. ed. Visconde do Rio Branco, MG: 2012, 2012.

Dowe, N., McMillan, J. SSF Experimental Protocols-Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation. NERL/TP-510-42630. National Renewable Energy Laboratory Golden, CO, 2001.

GRILLO, G.; BOFFA, L.; BINELLO, A.; MANTEGNA, S.; CRAVOTTO, G.; CHEMAT, F.; DIZHBITE, T.; LAUBERTE, L.; TELYSHEVA, G. Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Research International*, v. 115, p. 200–208, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.057>

LI, F.; LIU, Y.; JIA, J.; YU, H. Combination of biological pretreatment with deep eutectic solvent pretreatment for enhanced enzymatic saccharification of *Pinus massoniana*. **Bioresource Technology**, v. 380, p. 129110, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129110>

LIU, S.; LI, X.; WU, S.; HE, J.; PANG, C.; DENG, Y.; DONG, R. Fungal Pretreatment by *Phanerochaete chrysosporium* for Enhancement of Biogas Production from Corn Stover Silage. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 5, p. 1907–1918, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1185-7>

MARRAIKI, N.; VIJAYARAGHAVAN, P.; ELGORBAN, A. M.; DEEPA DHAS, D. S.; AL-RASHED, S.; YASSIN, M. T. Low cost feedstock for the production of endoglucanase in solid state fermentation by *Trichoderma hamatum* NGL1 using response surface methodology and saccharification efficacy. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 2, p. 1718–1724, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.01.008>

ORDEÑANA MANSO, J.; NIELSEN, M. B.; BALAGUER MOYA, E.; SANDRI, J. P.; YAMAKAWA, C. K.; MUSSATTO, S. I. Intensification of corn fiber saccharification using a tailor made enzymatic cocktail. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 172, p. 110347, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2023.110347>

PUNIA, P.; SINGH, L. Optimization of lignin pre-treatment of ligni sorghum [Sorghum bicolor (L.) Moench] residue to improve enzymatic hydrolysis for fermentable sugars. **Waste Management Bulletin**, v. 2, n. 1, p. 131–141, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2023.12.007>

RAMACHANDRAN, V.; ISMAIL, F. S.; NOOR, M. J. M. M.; AKHIR, F. N. M. D.; OTHMAN, N.; ZAKARIA, Z.; HARA, H. Extraction and intensive conversion of lignocellulose from oil palm solid waste into lignina monomer by the combination of hydrothermal pretreatment and biological treatment. *Bioresource Technology Reports*, v. 11, p. 100456, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100456>

RAMOS, M. D. N.; MILESSI, T. S.; CANDIDO, R. G.; MENDES, A. A.; AGUIAR, A. Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: Current status and perspectives. **Energy for Sustainable Development**, v. 68, p. 103–119, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.esd.2022.03.007>

ROJAS, M.; RUANO, D.; ORREGO-RESTREPO, E.; CHEJNE, F. Non-isothermal kinetics of cellulose, hemicellulose, and lignin degradation during cocoa bean shell pyrolysis. *Biomass and Bioenergy*, v. 177, p. 106932, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106932>

ROUCHES, E.; HERPOËL-GIMBERT, I.; STEYER, J. P.; CARRERE, H. Improvement of anaerobic degradation by white-rot fungi pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 59, p. 179–198, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.12.317>

RUIZ, H. A., CONRADO, M., SOL, S., SÁNCHEZ, A., ROCHA, J. J.M., ROMANÍ, A., CASTRO, E., TORRES, A., ROSA, M. R., ANDRADE, L. P., SMIRNOVA, I., SOL, R., MEYER, A.S. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122685, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122685>

RUIZ, H. A. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresource Technology*, v. 299, p. 122685, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122685>

RUIZ, H. A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 100–107, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.08.014>

RUIZ, H. A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A. Kinetic modeling of enzymatic saccharification using wheat straw pretreated under autohydrolysis and organosolv process. *Industrial Crops and Products*, v. 36, n. 1, p. 100–107, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.08.014>

MENEZES, S. L. H.; CARNEIRO, L. L.; TAVARES, M. C. I.; SANTOS, P. H.; DAS CHAGAS, P.T.; MENDES, A. A.; SILVA, P. E. G.; FRANCO, M.; RANGEL, O. J. 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**, v. 31, p. 101885, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101885>

GOMES, S. M. M. O. dos; NICODEMOS, I. S.; COSTA SILVA, M. da; SANTOS, D. M. R. C. dos; SANTOS COSTA, F.; FRANCO, M.; PEREIRA, H. J. V. Optimization of enzymatic saccharification of industrial wastes using a thermostable and halotolerant endoglucanase through Box-Behnken experimental design. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 54, n. 1, p. 1–11, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2201936>

SHIVA; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; LÓPEZ-SANDIN, I.; AGUILAR, M. A.; LÓPEZ-BADILLO, C. M.; RUIZ, H. A. Intensification of enzymatic saccharification at high solid loading of pretreated agave bagasse at bioreactor scale. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 1, p. 109257, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.109257>

SILVA, T. P.; DE ALBUQUERQUE, F. S.; DOS SANTOS, C. W. V.; FRANCO, M.; CAETANO, L. C.; PEREIRA, H. J. V. Production, purification, characterization and application of a new halotolerant and thermostable endoglucanase of *Botrytis ricini* URM 5627. *Bioresource Technology*, v. 270, p. 263–269, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.022>

SILVA, T.P., SOUZA, L.O., REIS, N.S., ASSIS, S. A., FERREIRA, M.L.O., OLIVEIRA, J.R., AGUIAR-OLIVEIRA, FRANCO, M. Cultivation of *Penicillium roqueforti* in cocoa shell to produce and characterize its lipase extract. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, n. 3, 2017.

SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 76–82, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.030>

SÓTI, V.; LENAERTS, S.; CORNET, I. Of enzyme use in cost-effective high solid simultaneous saccharification and fermentation processes. **Journal of Biotechnology**, v. 270, p. 70–76, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.020>

TIWARI, R.; RANA, S.; SINGH, S.; ARORA, A.; KAUSHIK, R.; AGRAWAL, V. V.; SAXENA, A. K.; NAIN, L. Biological delignification of paddy straw and *Parthenium* sp. using a novel micromycete *Myrothecium roridum* LG7 for enhanced saccharification. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 7–11, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.079>

WANG, J.; CHIO, C.; CHEN, X.; SU, E.; CAO, F.; JIN, Y.; QIN, W. Efficient saccharification of agave biomass using *Aspergillus niger* produced low-cost enzyme cocktail with hyperactive pectinase activity. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 26–33, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.069>

WANG, R.; YOU, T.; YANG, G.; XU, F. Efficient Short Time White Rot–Brown Rot Fungal Pretreatments for the Enhancement of Enzymatic Saccharification of Corn Cobs. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 11, p. 10849–10857, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02786>

WU, Z.; PENG, K.; ZHANG, Y.; WANG, M.; YONG, C.; CHEN, L.; QU, P.; HUANG, H.; SUN, E.; PAN, M. Lignocellulose dissociation with biological pretreatment towards the biochemical platform: A review. **Materials Today Bio**, v. 16, p. 100445, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2022.100445>

YOO, C. G.; MENG, X.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. J. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 301, p. 122784, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122784>