

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 13/03/2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Priscila Aparecida Casciadori Frassatto

Formulação de Coquetéis de Enzimas Produzidas por Fungos em Cultivo Sólido
e Aplicação na Hidrólise de Bagaço de Cana-de-Açúcar

São José do Rio Preto
2020

Priscila Aparecida Casciatori Frassatto

Formulação de Coquetéis de Enzimas Produzidas por Fungos em Cultivo Sólido
e Aplicação na Hidrólise de Bagaço de Cana-de-Açúcar

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto
2020

F843f

Frassatto, Priscila Aparecida Casciotori

Formulação de coquetéis de enzimas produzidas por fungos em cultivo sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar / Priscila Aparecida Casciotori Frassatto. -- São José do Rio Preto, 2020
181 f. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Roberto Da Silva

1. Bioquímica. 2. Enzimas de fungos. 3. Etanol celulósico. 4. Fermentação em estado sólido. 5. Bagaço de cana. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Priscila Aparecida Casciadori Frassatto

Formulação de Coquetéis de Enzimas Produzidas por Fungos em Cultivo Sólido
e Aplicação na Hidrólise de Bagaço de Cana-de-Açúcar

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz
UFSCar – São Carlos

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas
Embrapa Instrumentação – São Carlos

Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri
UNESP – Araraquara

São José do Rio Preto
13 de março de 2020

Dedico este trabalho a Deus, o maior orientador da minha vida, e a Nossa Senhora, a fonte da minha perseverança. Sem a força de Deus, que me sustentou em todos os momentos e sem a direção dada por Nossa Senhora, a conquista desta vitória não seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda sabedoria e da felicidade plena; por ser meu amparo nos momentos de dificuldade; por colocar em meu coração a certeza de que “tudo posso naquele que me fortalece” e de que “nada é impossível para Deus”; pela presença constante em minha vida; por sempre conduzir meus passos e iluminar minha estrada.

À Nossa Senhora Desatadora dos Nós, que com suas mãos cheias do amor de Deus, desatou todos os obstáculos do meu caminho e solucionou o que me parecia impossível. Muito obrigada Mãezinha querida, por interceder por mim junto de vosso diletíssimo filho, Nosso Senhor Jesus Cristo, em todos os momentos da minha vida!

Ao meu amado esposo Vinicius Augusto Frassatto, pelo companheirismo, compreensão, admiração, incentivo e paciência; por fazer parte da minha história. Sem você tudo seria mais triste e difícil na minha vida. Obrigada amor, por nunca me deixar desistir e por me dar forças todos os dias para continuar e chegar até o final desta caminhada.

À minha mãe Ana Maria Marques Casciotori, que me ensinou acima de tudo a ter fé e perseverança; por todas as vezes que me disse “Ore, Espere e Confie”. Obrigada mãe, por todas as suas orações, por manter a sua fé inabalável, pelo seu apoio incondicional e por, mais uma vez, acreditar em mim, mesmo quando eu já não acreditava.

Ao meu pai Aparecido Donizetti Casciotori, que sempre me incentivou a continuar, por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida, por todos os ensinamentos e por tudo que sempre me proporcionou. Obrigada pela dedicação e esforço de uma vida inteira à minha educação. Hoje você me deixa a maior riqueza que um pai pode dar ao seu filho: o conhecimento. Muito obrigada!

À minha irmã Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori, por sua colaboração no desenvolvimento deste trabalho com disponibilidade, competência e destreza incomuns, pelas sábias sugestões que contribuíram imensamente para a minha formação acadêmica e pessoal e por toda ajuda nos artigos científicos. Fer, obrigada pela parceria, pelo companheirismo de todos os momentos e pela amizade única e incomparável.

Agradecimentos

Ao meu sogro Walter Brás Frassatto e à minha sogra Maria Aparecida da Cunha Frassatto pela oportunidade de emprego no meu horário de almoço, o que, financeiramente, me ajudou muito ao longo do desenvolvimento deste doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto da Silva, pelo privilégio e oportunidade concedidos, e, sobretudo, pela confiança, por todo empenho, sabedoria, compreensão, motivação e incentivo para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Cláudio Thoméo pela ajuda, carinho, amizade, dedicação e assessoria.

A todas as minhas amigas e amigos do laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores e do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada que sempre estiveram presentes, me ajudando, incentivando ou trabalhando junto comigo com carinho e colaboração.

À minha amiga e madrinha de casamento Giulliana Tornelli Lucas pela paciência e auxílio em todas as etapas deste doutorado e pela presença e apoio constante em minha vida pessoal.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Química, por proporcionarem oportunidade, apoio, suporte e infraestrutura necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química, Prof. Dr. Luis Octávio Regasini, pelo apoio e compreensão em todos os momentos necessários e por conduzir o programa com fiel dedicação.

Ao Departamento de Química e Ciências Ambientais, em especial à Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera, pela oportunidade de ministrar aulas para os cursos de graduação em Química, Engenharia de Alimentos e Ciências Biológicas, na condição de Bolsista Didática, e à Eliani Nobuco Ikeguchi Ohira pelo auxílio técnico nas atividades práticas.

Agradecimentos

Aos membros da Comissão Examinadora do Exame Geral de Qualificação, Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez e Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera, que, por meio de suas sugestões, contribuíram para com o direcionamento das etapas finais deste trabalho.

Aos membros da Comissão Examinadora da Defesa de Tese, Profa. Dra. Vera Aparecida de Oliveira Tiera, Prof. Dr. Antônio José Gonçalves da Cruz, Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas e Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri, que com muita destreza avaliaram esta tese e proporcionaram uma rica discussão do seu conteúdo, tendo em vista o melhor fechamento deste trabalho e a prospecção de trabalhos futuros.

À UNIVESP, pelo apoio financeiro com bolsa e pela oportunidade de atuação como facilitadora na Educação a Distância e aos meus alunos virtuais, por todo o carinho e admiração.

Aos membros do Grupo de Oração São João Batista, da Igreja Santuário das Almas, por todas as orações dedicadas ao término deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, todos que torceram e oraram por mim, e todos que de alguma maneira fazem parte da minha vida acadêmica ou pessoal. Muito obrigada!

Epigrafe

“É justo que muito custe, o que muito vale.”

(Santa Teresa D’Avila, 1995, p. 563)

Priscila Aparecida Casciari Frassatto

RESUMO

Esta tese aborda a produção de enzimas celulolíticas por cultivo sólido (CS) dos fungos termofílicos *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 e do mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414 em substrato composto por bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT); a caracterização dos extratos obtidos quanto a temperatura e pH ótimos e a estabilidade; a formulação de coquetéis enzimáticos para aplicação na hidrólise de bagaço de cana não tratado (BNT), pré-tratado com ozônio, álcali e ultrassom (BOU) e com pré-tratamento hidrotérmico (BHT); e, por fim, as condições e a cinética da reação de sacarificação enzimática. O CS de *M. thermophila* levou à obtenção de extratos com as maiores atividades de endoglucanase (32 U/mL), β -glicosidase (3,5 U/mL) e FPA (0,7 U/mL). Os extratos apresentaram diferentes perfis de atividade e estabilidade em função de variações de pH e temperatura de reação e incubação, características desejáveis para aplicação na hidrólise de biomassa visando a produção de etanol de segunda geração (E2G). Após 24 h de hidrólise, maiores rendimentos em açúcares redutores totais (ART) foram atingidos empregando coquetel 1:1 v/v de extratos enzimáticos provenientes do CS de *T. aurantiacus* (TA) e *T. reesei* (TR) no BOU. Foi possível obter maior teor de ART (464 mg/g BOU vs. 396 mg/g BOU) com menor carga enzimática (9,9 FPA/g BOU com coquetel TA:TR 1:1 v/v vs. 12,6 FPA/g BOU com extrato de TA, respectivamente). Denota-se que há sinergismo entre as enzimas secretadas pelos dois fungos e que o uso de coquetéis é promissor, já que a liberação de ART aumentou 17 % com 78 % da carga enzimática. Para BNT, a maior liberação de ART foi 124 mg/g BC a 65 °C, com carga enzimática 17,9 FPA/g BC. Nas hidrólises de BHT e BOU, foram liberados, respectivamente, 190 e 464 mg/g BC a 55 °C, com carga enzimática 9,9 FPA/g BC, confirmando que o pré-tratamento aumenta a digestibilidade do BC e favorece a conversão de celulose, além de que a temperatura de hidrólise é relevante, sobretudo ao se empregar coquetel de enzimas produzidas por fungos distintos. Na cinética de hidrólise, observou-se que os teores de ART liberados aumentaram rapidamente no início da reação, tendendo a ficar constantes após 8 a 12 h, provavelmente em consequência de depleção da fração amorfa de celulose no substrato, adsorção improdutiva e gradual desativação das enzimas. Os parâmetros do ajuste do modelo hiperbólico à cinética de hidrólise são úteis para dimensionamento da etapa de sacarificação em busca de melhores rendimentos, a fim de tornar a produção de E2G atrativa e competitiva no mercado de biocombustíveis.

Palavras-chave: Celulases. Sacarificação. Pré-tratamento. Fermentação sólida. Bioetanol.

ABSTRACT

*This thesis addresses the production of cellulolytic enzymes by solid cultivation (CS) of the thermophilic fungi *Myceliophthora thermophila* I-1D3b and *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 and of the mesophilic *Trichoderma reesei* QM9414 on a substrate composed of sugarcane bagasse (SCB) and wheat bran (WB); the characterization of the extracts obtained in terms of optimum temperature and pH and stability; the formulation of enzymatic cocktails for application in the hydrolysis of untreated SCB (BNT), pretreated with ozone, alkali and ultrasound (BOU) and with hydrothermal pretreatment (BHT); and, finally, the conditions and kinetics of the enzymatic saccharification reaction. The CS of *M. thermophila* provided extracts with the highest activities of endoglucanase (32 U/mL), β -glucosidase (3.5 U/mL) and FPA (0.7 U/mL). The extracts showed different profiles of activity and stability due to variations in pH and temperature of reaction and incubation, desirable characteristics for application in the hydrolysis of biomass aiming the production of second generation ethanol (E2G). After 24 h of hydrolysis, higher yields of total reducing sugars (TRS) were achieved using cocktail 1:1 v/v of enzymatic extracts from the CS of *T. aurantiacus* (TA) and *T. reesei* (TR) in BOU. It was possible to obtain a higher TRS content (464 mg/g BOU vs. 396 mg/g BOU) with lower enzyme load (9.9 FPA/g BOU with cocktail TA:TR 1:1 v/v vs. 12.6 FPA /g BOU with TA extract, respectively). It denotes there is synergism between the enzymes secreted by both fungi and the use of cocktails is promising, since TRS release increased by 17 % with 78 % of the enzyme load. For BNT, the highest TRS release was 124 mg/g BC at 65 °C, with enzymatic load 17.9 FPA/g BC. In the hydrolysis of BHT and BOU, TRS released were 190 and 464 mg/g BC, respectively, at 55 °C, with enzymatic load 9.9 FPA/g BC, confirming the pretreatment increases the SCB digestibility and favors the conversion of cellulose; additionally, hydrolysis temperature is relevant, especially when using a cocktail of enzymes produced by different fungi. In the hydrolysis kinetics, it was observed that the levels of ART released rapidly increased at the beginning of the reaction, tending to remain constant after 8 to 12 h, probably as a result of depletion of the amorphous fraction of cellulose in the substrate, unproductive adsorption and gradual deactivation of enzymes. The parameters of hyperbolic model fitted to the hydrolysis kinetics are useful for designing the saccharification stage aiming to better yields, in order to make E2G production attractive and competitive in the biofuels market.*

Keywords: Cellulases. Saccharification. Pretreatment. Solid fermentation. Bioethanol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 3.1. Estrutura da parede celular vegetal (POSTEK et al., 2011)..... | 33 |
| Figura 3.2. União das moléculas de glicose por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4) (Adaptado de FARINAS, 2011)..... | 36 |
| Figura 3.3. Estrutura característica da hemicelulose mostrando as diferentes ligações e grupos encontrados nas ramificações (Adaptado de DODD; CANN, 2009)..... | 38 |
| Figura 3.4. Representação esquemática de unidades estruturais precursoras da lignina (Adaptado de FARINAS, 2011)..... | 39 |
| Figura 3.5. Híbridos de ressonância da molécula de ozônio (PERRONE, 2015)..... | 43 |
| Figura 3.6. Exemplos de reações do ozônio com (a) alcenos, (b) alcanos e cadeia lateral do anel aromático e (c) aldeídos (Adaptado de GIERER, 1986)..... | 43 |
| Figura 3.7. Representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005)..... | 54 |
| Figura 3.8. Novo mecanismo proposto de degradação enzimática da celulose (DIMAROGONA; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2012)..... | 59 |
| Figura 4.1. Embalagem de polipropileno utilizada no cultivo sólido..... | 73 |
| Figura 4.2. Crescimento fúngico e produção de β -glicosidase (a) <i>Thermoascus aurantiacus</i> ; (b) <i>Trichoderma reesei</i> (▲ Atividade de β -glicosidase; ---- Ajuste da equação logística para β -glicosidase; ■ Biomassa estimada pelo teor de proteínas totais (mg); — Ajuste da equação logística para biomassa)..... | 84 |

- Figura 4.3.** Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades de (a, c) β -glicosidase e (b, d) FPA do extrato produzido por cultivo sólido do fungo *Myceliophthora thermophila* (*)90
- Figura 4.4.** Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas (a, c) β -glicosidase e (b, d) FPA do extrato produzido por cultivo sólido do fungo *Myceliophthora thermophila*, após 24 horas de incubação (*)93
- Figura 4.5.** Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades de (a, c) β -glicosidase e (b, d) FPA do extrato produzido por cultivo sólido do fungo *Thermoascus aurantiacus* (*)95
- Figura 4.6.** Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas (a, c) β -glicosidase e (b, d) FPA do extrato produzido por cultivo sólido do fungo *Thermoascus aurantiacus*, após 24 horas de incubação (*)97
- Figura 4.7.** Efeito do pH e da temperatura sobre as atividades de (a, c) β -glicosidase e (b, d) FPA do extrato produzido por cultivo sólido do fungo *Trichoderma reesei* (*)99
- Figura 4.8.** Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas (a, c) β -glicosidase e (b, d) FPA do extrato produzido por cultivo sólido do fungo *Trichoderma reesei*, após 24 horas de incubação (*)101
- Figura 5.1.** Teores de ART (mg/g BC) liberados na hidrólise de bagaço de cana não tratado e percentual de conversão de celulose em função da carga enzimática do extrato produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* em diferentes temperaturas após 24 horas (—■— 45 °C; —●— 55 °C; —▲— 65 °C; —▼— 75 °C).....113
- Figura 5.2.** Teores de ART (mg/g BC) liberados na hidrólise de bagaço de cana não tratado e percentual de conversão de celulose em função da carga enzimática do extrato produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* em diferentes temperaturas após 24 horas (—■— 45 °C; —●— 50 °C; —▲— 55 °C; —▼— 60 °C).....116

Figura 5.3. Superfícies de resposta da hidrólise por ação das enzimas produzidas por cultivo sólido do fungo *Myceliophthora thermophila* a 65 °C, dadas por ART (mg/g BC) em função do tempo (h) e da carga enzimática (FPA/g BC) para (a) BNT; (b) BHT; (c) BOU.....120

Figura 5.4. Teor de açúcar quantificado por *HPAEC-PAD* nos hidrolisados de BNT, BHT e BOU por ação das enzimas produzidas por *Myceliophthora thermophila*, aplicando-se 24,5 FPA/g BC por 4 horas a 65 °C e 2 % de sólidos (■) glicose; (□) xilose; (▨) celobiose.....121

Figura 5.5. Superfícies de resposta da hidrólise por ação das enzimas produzidas por cultivo sólido do fungo *Trichoderma reesei* a 45 °C, dadas por ART (mg/g BC) em função do tempo (h) e da carga enzimática (FPA/g BC) para (a) BNT; (b) BHT; (c) BOU.....125

Figura 5.6. Teor de açúcar quantificado por *HPAEC-PAD* nos hidrolisados de BNT, BHT e BOU por ação das enzimas produzidas por *Trichoderma reesei*, aplicando-se 7,2 FPA/g BC por 4 horas a 45 °C e 2 % de sólidos (■) glicose; (□) xilose; (▨) celobiose.....126

Figura 6.1. Cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado empregando o extrato enzimático produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* (24,5 FPA/g BC), expressa em teores de ART (mg/g BC) e percentual de conversão de celulose em função do tempo de hidrólise (h) (—■— 45 °C; —●— 55 °C; —▲— 65 °C; —▼— 75 °C).....136

Figura 6.2. Ajuste do modelo hiperbólico aos dados experimentais dos teores de ART (mg/g BC) liberados na hidrólise de bagaço de cana não tratado em função do tempo (h) aplicando-se o extrato enzimático produzido pelo fungo *Myceliophthora thermophila* (24,5 FPA/g BC) (a) 45 °C; (b) 55 °C; (c) 65 °C; (d) 75 °C.....138

Figura 6.3. Cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado empregando o extrato enzimático produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* (7,2 FPA/g BC), expressa em teores de ART (mg/g BC) e percentual de conversão de celulose em função do tempo de hidrólise (h) (—■— 45 °C; —●— 50 °C; —▲— 55 °C; —▼— 60 °C).....140

Figura 6.4. Ajuste do modelo hiperbólico aos dados experimentais dos teores de ART (mg/g BC) liberados na hidrólise de bagaço de cana não tratado em função do tempo (h) aplicando-se o extrato enzimático produzido pelo fungo *Trichoderma reesei* (7,2 FPA/g BC) (a) 45 °C; (b) 50 °C; (c) 55 °C; (d) 60 °C.....141

Figura 6.5. Cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado (BNT) e pré-tratado (BHT e BOU) empregando o coquetel enzimático (1:1 v/v) de *Thermoascus aurantiacus* e *Trichoderma reesei* (9,9 FPA/g BC) a 55 °C, expressa em teores de ART (mg/g BC) e percentual de conversão de celulose em função do tempo de hidrólise (h) (—■— BNT; —●— BHT; —▲— BOU).....143

Figura 6.6. Ajuste do modelo hiperbólico aos dados experimentais dos teores de ART (mg/g BC) liberados na hidrólise de bagaço de cana não tratado em função do tempo (h) aplicando-se o coquetel enzimático (1:1 v/v) de *Thermoascus aurantiacus* e *Trichoderma reesei* (9,9 FPA/g BC) a 55 °C (a) BNT; (b) BHT; (c) BOU.....145

Figura 6.7. Evolução temporal da liberação de ART (mg/g BC) na hidrólise enzimática de bagaço de cana não tratado a 55 °C (—■— *Trichoderma reesei* (6,3 FPA/g BC); —●— *Thermoascus aurantiacus* (12,6 FPA/g BC); —▲— coquetel enzimático (1:1 v/v) (9,9 FPA/g BC)).....146

Figura 6.8. Teor de açúcar quantificado por *HPAEC-PAD* nos hidrolisados de bagaço de cana não tratado, por ação das enzimas produzidas por *Thermoascus aurantiacus* e *Trichoderma reesei*, isoladamente e combinados (coquetel enzimático 1:1 v/v) a 55 °C. Para *T. aurantiacus*, hidrólise com 12,6 FPA/g BC; para *T. reesei* com 7,2 FPA/g BC; e para coquetel 9,9 FPA/g BC (6,3 FPA/g BC fornecida pelo extrato de *T. aurantiacus* e 3,6 FPA/g BC pelo extrato de *T. reesei*) (■) glicose; (□) xilose; (▨) celobiose.....148

Figura 6.9. Ajuste do modelo hiperbólico aos dados experimentais dos teores de ART (mg/g BC) liberados na hidrólise de bagaço de cana não tratado em função do tempo (h) (a) *Trichoderma reesei* (6,3 FPA/g BC); (b) *Thermoascus aurantiacus* (12,6 FPA/g BC); (c) coquetel enzimático (1:1 v/v) (9,9 FPA/g BC).....149

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1.** Planejamento experimental dos ensaios do efeito da umidade e da composição do substrato na produção de enzimas β -glicosidase e FPA para o cultivo sólido dos fungos *Thermoascus aurantiacus* e *Trichoderma reesei*.....74
- Tabela 4.2.** Atividades de β -glicosidase dos extratos enzimáticos obtidos por cultivo sólido do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* e do fungo mesofílico *Trichoderma reesei* em três combinações de composição do substrato e teor de umidade (*).....80
- Tabela 4.3.** Atividades sobre papel de filtro (FPA) dos extratos enzimáticos obtidos do cultivo sólido do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* e do fungo mesofílico *Trichoderma reesei* em três combinações de composição do substrato e teor de umidade (*)..82
- Tabela 4.4.** Atividades enzimáticas (U/gss) dos extratos obtidos por cultivo sólido dos fungos *Myceliophthora thermophila* (BC:FT 7:3 (m/m) e 75 % (b.u) por 96 horas a 45 °C), *Thermoascus aurantiacus* (BC:FT 9:1 (m/m) e 70 % (b.u) por 120 horas a 50 °C) e *Trichoderma reesei* (BC:FT 9:1 (m/m) e 70 % (b.u) por 168 horas a 28 °C).....87
- Tabela 5.1.** Planejamento experimental central composto dos ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana não tratado e pré-tratado empregando-se os extratos produzidos pelos fungos *Myceliophthora thermophila* e *Trichoderma reesei*.....110
- Tabela 5.2.** Planejamento experimental Box-Behnken dos ensaios de hidrólise enzimática de bagaço de cana não tratado e pré-tratado empregando-se os extratos produzidos pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* (TA) e *Trichoderma reesei* (TR).....111
- Tabela 5.3.** Hidrólise de bagaço de cana não tratado e pré-tratado a 65 °C por ação das enzimas produzidas por cultivo sólido do fungo *Myceliophthora thermophila* de acordo com o delineamento experimental central composto rotacional.....118

- Tabela 5.4.** Hidrólise de bagaço de cana não tratado e pré-tratado a 45 °C por ação das enzimas produzidas por cultivo sólido do fungo *Trichoderma reesei* de acordo com o delineamento experimental central composto rotacional.....123
- Tabela 5.5.** Açúcares redutores totais liberados e percentual de conversão de celulose da hidrólise de bagaço de cana não tratado e pré-tratado por ação das enzimas produzidas por cultivo sólido dos fungos *Thermoascus aurantiacus* (TA) e *Trichoderma reesei* (TR) de acordo com o delineamento experimental Box-Behnken.....127
- Tabela 6.1.** Teores de ART (mg/g BC) e percentual de conversão de celulose da cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado (BNT) e pré-tratado (BHT e BOU) empregando o coquetel enzimático (1:1 v/v) de *Thermoascus aurantiacus* e *Trichoderma reesei* (9,9 FPA/g BC) a 55 °C.....142

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| a | Coefficiente linear da curva padrão na Equação (4.4) |
| Abs | Absorbância na Equação (4.4) |
| ANOVA | Análise de variância |
| AR | Açúcares redutores |
| ART | Açúcares redutores totais |
| ASD | Agar Sabouraud Dextrose |
| a_w | Atividade de água |
| b | Coefficiente de extinção em $\mu\text{mol/mL}$ na Equação (4.4) |
| BC | Bagaço de cana-de-açúcar |
| BDA | Agar Batata Dextrose |
| BGL | β -glicosidases |
| BHT | Bagaço de cana com pré-tratamento hidrotérmico |
| BNT | Bagaço de cana não tratado |
| BOU | Bagaço de cana pré-tratado com ozônio, álcali e ultrassom |
| b.u | Base úmida (%) |
| C1 | Componente responsável pelo inchaço e ruptura da celulose |
| C5 | Carboidratos de cinco carbonos |
| C6 | Carboidratos de seis carbonos |
| C_{glicose} | Concentração de ART expressa em glicose (g/L) nas Equações (5.1) e (6.1) |
| CBH | Celobiohidrolase |
| CBM33 | Enzimas da família de enzimas com módulos de ligação ao carboidrato 33 |
| CDH | Celobiose desidrogenase |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CMCase | Carboximetilcelulase |
| CS | Cultivo sólido |
| CSm | Cultivo submerso |
| CTBE | Laboratório Nacional de Ciências e Tecnologia do Bioetanol |
| Cx | Componente que representa atividade endoglucanase |
| D | Diluição do extrato enzimático na Equação (4.4) |

| | |
|---------------------------|---|
| DNS | Ácido 3,5-dinitrosalicílico |
| EG | Endoglucanases |
| E1G | Etanol de primeira geração |
| E2G | Etanol de segunda geração |
| F | Razão entre o volume de extração e a massa de substrato sólido na Equação (4.4) |
| f | Fração mássica de celulose (g) no material hidrolisado nas Equações (5.1) e (6.1) |
| FE | Fator estequiométrico da razão entre os pesos moleculares (g/mol) do anidro glucano e da glicose nas Equações (5.1) e (6.1) |
| FPA | Atividade sobre papel de filtro |
| FT | Farelo de Trigo |
| G | Porcentagem de celulose convertida nas Equações (5.1) e (6.1) |
| GH | Glicosil hidrolase |
| GH61 | Monoxigenase polimérica da família 61 das glicosil hidrolases |
| gss | Grama de substrato sólido seco |
| HMF | Hidroximetilfurfural |
| HPAEC-PAD | <i>High performance anionic exchange chromatography – Pulsed amperometric detection</i> |
| IUBMB | International Union of Biochemistry and Molecular Biology |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| k | Constante cinética específica da produção de β -glicosidase máxima (h^{-1}) na Equação (4.5) |
| $m_{\text{hidrolisável}}$ | Massa seca de material (g) utilizado na hidrólise nas Equações (5.1) e (6.1) |
| $m_{\text{H}_2\text{O}}$ | Massa de água (g) na Equação (4.1) |
| ML | Lamela média |
| m/m | massa por massa |
| mss | Massa de sólido seco (g) na Equação (4.1) |
| <i>M. thermophila</i> | <i>Myceliophthora thermophila</i> |
| m/v | massa por volume |
| NREL | National Renewable Energy Laboratory |
| P | Produção de β -glicosidase (U/gss) na Equação (4.5) |
| P_1 | Concentração máxima de ART (mg/g BC) na Equação (6.2) |
| P_2 | Tempo no qual a concentração de ART é metade da máxima na Equação (6.2) |
| P_0 | Produção inicial de β -glicosidase (U/gss) na Equação (4.5) |
| $P_{\text{máx}}$ | Máxima produção de β -glicosidase (U/gss) na Equação (4.5) |

| | |
|-----------------------|--|
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| pK _a | Constante de acidez |
| POA | Processo oxidativo avançado |
| PMOs | Polissacarídeos mono-oxigenases |
| PNPG | 4-nitrofenol-β-D-glicopiranosídeo |
| PVC | Policlorato de vinila |
| S ₁ | Camada da parede secundária da parede celular vegetal |
| S ₂ | Camada dominante da parede secundária da parede celular vegetal |
| S ₃ | Camada da parede secundária da parede celular vegetal |
| t | Tempo |
| t/ha | Toneladas por hectare |
| TA | <i>Thermoascus aurantiacus</i> |
| <i>T. aurantiacus</i> | <i>Thermoascus aurantiacus</i> |
| TR | <i>Trichoderma reesei</i> |
| <i>T. reesei</i> | <i>Trichoderma reesei</i> |
| TU | Teor de umidade (%) |
| μ | Constante da taxa de crescimento específico máxima (h ⁻¹) na Equação (4.2) |
| U | Unidade internacional para atividade enzimática |
| UV | Irradiação ultravioleta |
| UNICA | União da Indústria de cana-de-açúcar |
| V | Volume da alíquota de enzima (mL) na Equação (4.4) |
| v | Volume total (L) da solução adicionada na hidrólise nas Equações (5.1) e (6.1) |
| v/v | Volume por volume |
| X | Concentração de biomassa (mg/gss) na Equação (4.2) |
| X _m | Máxima concentração de biomassa (mg/gss) possível na Equação (4.2) |
| X ₀ | Concentração inicial de biomassa (mg/gss) no sistema na Equação (4.3) |

SUMÁRIO

ORGANIZAÇÃO DA TESE

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 26 |
| CAPÍTULO 2. OBJETIVOS..... | 29 |
| CAPÍTULO 3. REVISÃO DA LITERATURA..... | 30 |
| 3.1 Etanol celulósico..... | 30 |
| 3.2 Biomassa como fonte de energia..... | 31 |
| 3.3 Biomassa e parede celular vegetal..... | 33 |
| 3.4 Bagaço de cana-de-açúcar..... | 35 |
| 3.4.1 Celulose..... | 36 |
| 3.4.2 Hemicelulose..... | 37 |
| 3.4.3 Lignina..... | 38 |
| 3.5 Pré-tratamento do material lignocelulósico..... | 40 |
| 3.5.1 Processos oxidativos avançados..... | 41 |
| 3.5.1.1 Ozonólise associada à irradiação de ultrassom em meio alcalino..... | 42 |
| 3.5.2 Pré-tratamento hidrotérmico..... | 45 |
| 3.6 Enzimas..... | 47 |
| 3.6.1 Atividade enzimática..... | 49 |
| 3.6.1.1 Fatores que afetam a atividade enzimática..... | 50 |
| 3.7 Enzimas lignocelulolíticas..... | 52 |
| 3.7.1 Enzimas hidrolíticas na degradação da celulose..... | 53 |
| 3.7.1.1 Celulases..... | 54 |
| 3.7.1.1.1 Endoglucanases..... | 55 |
| 3.7.1.1.2 Exoglucanases..... | 55 |
| 3.7.1.1.3 β -glicosidases..... | 56 |
| 3.7.1.2 Hemicelulases..... | 56 |
| 3.7.2 Enzimas oxidativas na degradação da celulose..... | 57 |
| 3.8 Sinergismo e coquetéis enzimáticos..... | 59 |
| 3.9 Produção de enzimas fúngicas por cultivo sólido..... | 61 |
| 3.10 Hidrólise enzimática..... | 64 |

| | | |
|--|---|----|
| 3.10.1 | Fatores que afetam a hidrólise enzimática | 65 |
| CAPÍTULO 4. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS..69 | | |
| RESUMO..... | | 69 |
| 4.1 | INTRODUÇÃO..... | 70 |
| 4.2 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 72 |
| 4.2.1 | Microrganismos e substratos | 72 |
| 4.2.2 | Cultivo sólido em embalagens de polipropileno..... | 73 |
| 4.2.3 | Efeito do teor de umidade e da composição do substrato na produção de enzimas por cultivo sólido dos fungos <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> | 74 |
| 4.2.4 | Produção de β -glicosidase associada ao crescimento fúngico de <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> | 75 |
| 4.2.5 | Produção das enzimas para os ensaios de caracterização..... | 76 |
| 4.2.6 | Extração das enzimas | 76 |
| 4.2.7 | Determinação das atividades enzimáticas | 76 |
| 4.2.7.1 | Endoglucanase | 77 |
| 4.2.7.2 | Atividade sobre papel de filtro | 77 |
| 4.2.7.3 | β -glicosidase..... | 77 |
| 4.2.8 | Caracterização das enzimas | 78 |
| 4.2.8.1 | Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas | 78 |
| 4.2.8.2 | Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas..... | 78 |
| 4.3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 79 |
| 4.3.1 | Efeito do teor de umidade e da composição do substrato sobre a atividade β -glicosidase do extrato produzido por <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> | 79 |
| 4.3.2 | Efeito do teor de umidade e da composição do substrato sobre FPA do extrato produzido por <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> | 81 |
| 4.3.3 | Correlação entre atividade de β -glicosidase e cinética de crescimento fúngico de <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> | 83 |
| 4.3.4 | Atividades enzimáticas dos extratos celulolíticos obtidos por cultivo sólido dos fungos <i>M. thermophila</i> , <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> | 87 |

| | | |
|---|---|-----|
| 4.3.5 | Caracterização das enzimas | 89 |
| 4.3.5.1 | Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas β -glicosidase e FPA produzidas pelo fungo <i>M. thermophila</i> | 89 |
| 4.3.5.2 | Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas β -glicosidase e FPA produzidas pelo fungo <i>M. thermophila</i> | 92 |
| 4.3.5.3 | Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas β -glicosidase e FPA produzidas pelo fungo <i>T. aurantiacus</i> | 94 |
| 4.3.5.4 | Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas β -glicosidase e FPA produzidas pelo fungo <i>T. aurantiacus</i> | 96 |
| 4.3.5.5 | Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas β -glicosidase e FPA produzidas pelo fungo <i>T. reesei</i> | 98 |
| 4.3.5.6 | Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas β -glicosidase e FPA produzidas pelo fungo <i>T. reesei</i> | 100 |
| 4.4 | CONCLUSÃO..... | 103 |
| CAPÍTULO 5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR | | 104 |
| RESUMO..... | | 104 |
| 5.1 | INTRODUÇÃO..... | 105 |
| 5.2 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 107 |
| 5.2.1 | Bagaço de cana-de-açúcar | 107 |
| 5.2.2 | Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar | 107 |
| 5.2.3 | Ensaio de hidrólise enzimática | 108 |
| 5.2.3.1 | Efeito da temperatura e da carga enzimática dos extratos produzidos por <i>M. thermophila</i> e <i>T. reesei</i> na hidrólise de bagaço de cana não tratado | 108 |
| 5.2.3.2 | Planejamento experimental para aplicação das enzimas produzidas por <i>M. thermophila</i> e <i>T. reesei</i> na hidrólise de bagaço de cana não tratado e pré-tratado | 109 |
| 5.2.3.3 | Planejamento experimental para aplicação das enzimas produzidas por <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> na hidrólise de bagaço de cana não tratado e pré-tratado..... | 110 |
| 5.2.4 | Quantificação de açúcares redutores totais liberados na hidrólise..... | 111 |
| 5.2.5 | Cálculo de conversão de celulose | 112 |

| | | |
|--|---|-----|
| 5.2.6 | Quantificação, por <i>HPAEC-PAD</i> , do teor de glicose, xilose e celobiose liberados na hidrólise | 112 |
| 5.3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 113 |
| 5.3.1 | Efeito da temperatura e da carga enzimática do extrato produzido por <i>M. thermophila</i> na hidrólise de bagaço de cana não tratado | 113 |
| 5.3.2 | Efeito da temperatura e da carga enzimática do extrato produzido por <i>T. reesei</i> na hidrólise de bagaço de cana não tratado | 115 |
| 5.3.3 | Aplicação das enzimas produzidas por <i>M. thermophila</i> na hidrólise bagaço de cana não tratado e pré-tratado de acordo com o planejamento experimental..... | 117 |
| 5.3.4 | Aplicação das enzimas produzidas por <i>T. reesei</i> na hidrólise bagaço de cana não tratado e pré-tratado de acordo com o planejamento experimental | 122 |
| 5.3.5 | Aplicação das enzimas produzidas por <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> na hidrólise bagaço de cana não tratado e pré-tratado | 126 |
| 5.4 | CONCLUSÃO..... | 129 |
| CAPÍTULO 6. CINÉTICA DE HIDRÓLISE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR | | 131 |
| RESUMO..... | | 131 |
| 6.1 | INTRODUÇÃO..... | 132 |
| 6.2 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 133 |
| 6.2.1 | Preparo do bagaço de cana para hidrólise | 133 |
| 6.2.2 | Ensaio de cinética de hidrólise de bagaço de cana | 134 |
| 6.2.2.1 | Cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado empregando os extratos enzimáticos produzidos pelos fungos <i>M. thermophila</i> e <i>T. reesei</i> | 134 |
| 6.2.2.2 | Cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado e pré-tratado empregando coquetel enzimático de <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> | 135 |
| 6.2.2.3 | Avaliação do sinergismo das enzimas produzidas por <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> na cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado | 135 |
| 6.2.3 | Ajuste da cinética de hidrólise de bagaço de cana | 135 |
| 6.2.4 | Quantificação de açúcares por cromatografia de troca aniônica (<i>HPAEC-PAD</i>) | 135 |

| | |
|---|-----|
| 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 136 |
| 6.3.1 Cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado empregando o extrato enzimático produzido pelo fungo <i>M. thermophila</i> | 136 |
| 6.3.2 Cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado empregando o extrato enzimático produzido pelo fungo <i>T. reesei</i> | 139 |
| 6.3.3 Cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado e pré-tratado empregando coquetel enzimático proveniente da mistura das enzimas de <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> ... | 142 |
| 6.3.4 Avaliação do sinergismo entre as enzimas produzidas por <i>T. aurantiacus</i> e <i>T. reesei</i> na cinética de hidrólise de bagaço de cana não tratado..... | 145 |
| 6.4 CONCLUSÃO..... | 150 |
| CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES FINAIS | 151 |
| CAPÍTULO 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 153 |
| REFERÊNCIAS..... | 154 |

ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese está organizada em sete capítulos visando uma melhor distribuição e entendimento dos assuntos abordados.

O capítulo 1 apresenta a introdução e justificativa do trabalho, no qual se descreve o contexto da pesquisa realizada, assim como a sua relevância e importância para a área de conhecimento, com foco na produção de enzimas fúngicas por cultivo sólido, pré-tratamento da biomassa, sacarificação enzimática e formulação de coquetéis enzimáticos.

O capítulo 2 é composto pelos objetivos gerais e específicos do presente trabalho.

O capítulo 3 refere-se à revisão da literatura, abordando informações a respeito das características dos materiais lignocelulósicos, do uso de resíduos agroindustriais na produção de enzimas por cultivo sólido de fungos filamentosos, dos tipos de pré-tratamento da biomassa, da degradação enzimática da celulose, dos fatores que afetam a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, da formulação de coquetéis enzimáticos e do efeito sinérgico entre as enzimas.

O capítulo 4 é dedicado aos dados de produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 e *Trichoderma reesei* QM9414 obtidas por cultivo sólido e caracterização dos extratos obtidos quanto a temperatura e pH ótimos e a estabilidade, bem como avaliação das condições de cultivo e estimativa indireta da cinética de crescimento fúngico associada à produção de β -glicosidase. Este capítulo é composto pela introdução, descrição da metodologia empregada nesta etapa do projeto, além da apresentação e discussão dos resultados obtidos, assim como a conclusão referente a esta parte do trabalho.

O capítulo 5 contempla os resultados da aplicação das enzimas produzidas por cultivo sólido na hidrólise de bagaço de cana não tratado, com pré-tratamento hidrotérmico e pré-tratado com ozônio, álcali e ultrassom, bem como das condições da reação de sacarificação enzimática. Para avaliar o efeito da carga enzimática, da composição do coquetel enzimático, da temperatura e do tempo de reação no processo hidrolítico foram adotados planejamentos experimentais do tipo Central Composto Rotacional, com análise por superfície de resposta, e Box-Behnken. O capítulo compreende introdução do tema, metodologia experimental, resultados e discussões e conclusão.

O capítulo 6 aborda a cinética de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratados, os quais são relevantes para o aperfeiçoamento da etapa de sacarificação, bem como a determinação de parâmetros cinéticos úteis para o projeto e aprimoração do processo hidrolítico. Neste capítulo também foi avaliado o sinergismo entre as enzimas secretadas por

fungos distintos, por meio da formulação de coquetéis enzimáticos. O capítulo é composto pela introdução, descrição da metodologia empregada nos ensaios de cinética, ajuste do modelo hiperbólico, apresentação e discussão dos resultados obtidos e conclusão.

Os resultados do capítulo 6, complementados com dados de produção de enzimas, cinética de crescimento fúngico e avaliação das condições reacionais do processo de hidrólise enzimática, apresentados nos capítulos 4 e 5, culminaram em um artigo intitulado “ β -glucosidase production by *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* by solid state cultivation and application of enzymatic cocktail for saccharification of sugarcane bagasse” publicado no periódico *Biomass Conversion and Biorefinery*.

O capítulo 7 é composto pelas conclusões finais, no qual são retomados os principais aspectos observados nos capítulos 4, 5 e 6 da presente tese. No capítulo 8 são apresentadas as sugestões para trabalhos futuros. Por fim, são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas para a elaboração desta tese.

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Diante da iminente escassez das reservas de petróleo, principal fonte energética mundial, em áreas de mais fácil acesso à exploração (que são as reservas de petróleo acima da camada de sal, denominadas pós-sal), as companhias petrolíferas buscam fontes de acesso mais complexas (a camada pré-sal). Tal prática resulta em elevação de custos e possibilidades de desastres ambientais. Além disso, a preocupação mundial com o efeito estufa e com o desenvolvimento sustentável requer redução do consumo de combustíveis fósseis e incentivam os governos a buscarem técnicas para aumentar a produção e o consumo de combustíveis renováveis e fontes alternativas de energia.

Neste contexto, pesquisas visando a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos mostram-se relevantes, pois permitem empregar a biomassa residual da produção agroindustrial, tornando o processo economicamente e ambientalmente amigável. A produção de combustíveis menos poluentes, como o etanol celulósico, também denominado etanol de segunda geração (E2G), em larga escala é atrativa e o mercado é promissor. O desenvolvimento tecnológico de uma matriz energética limpa e renovável é estratégico para o Brasil e os coquetéis enzimáticos chamam atenção da comunidade científica e industrial, tendo em vista sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos, resíduos da agroindústria, na cadeia de produção do etanol celulósico.

O processo envolvendo a conversão dos materiais lignocelulósicos a etanol celulósico consiste basicamente em quatro etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação do produto. O pré-tratamento é essencial para desestruturar o material lignocelulósico tornando as fibras de celulose e hemicelulose mais acessíveis às enzimas. Por sua vez, as enzimas são responsáveis por hidrolisar as fibras em açúcares fermentescíveis, utilizados pelas leveduras na etapa de fermentação e produção do etanol.

Várias tecnologias de pré-tratamento, sozinhas ou combinadas, têm sido propostas na literatura. A ozonólise é um tipo de processo oxidativo avançado (POA), que pode ser empregado no pré-tratamento químico da biomassa lignocelulósica e sua ação se deve à exposição do material a ozônio, um poderoso agente oxidante. O principal efeito deste pré-tratamento é a remoção da lignina e parte das hemiceluloses, favorecendo o aumento da digestibilidade enzimática da celulose presente no material pré-tratado. Devido às diferenças nas cargas eletrônicas entre lignina e carboidratos, o emprego de POAs seletivos, tais como os baseados em ozônio, apresenta grandes possibilidades de sucesso. O tratamento hidrotérmico é um dos métodos mais comuns de pré-tratamento da biomassa, o qual pode ser descrito como

um processo termoquímico. Nesse processo a água, sob temperaturas e pressões elevadas, é usada para fracionar a biomassa vegetal em seus constituintes através da clivagem dos complexos lignina-carboidrato, além de romper as ligações glicosídicas dos polissacarídeos.

A etapa seguinte ao pré-tratamento, de despolimerização dos carboidratos a açúcares fermentescíveis, pode ocorrer por duas vias, enzimática ou química. A via química, embora eficiente e rápida, gera resíduos tóxicos que devem ser tratados, aumentando o número de operações, consumindo energia e tornando o processo pouco competitivo. A hidrólise enzimática apresenta diversas vantagens sobre a química, dentre as quais se destacam menor gasto energético e alta especificidade pelo substrato, evitando a produção de compostos indesejáveis. No entanto, a via enzimática é mais lenta e tem como uma das principais barreiras processos eficientes e viáveis de produção de enzimas a custo que não inviabilize seu uso. Uma alternativa que vem sendo estudada para a produção dessas enzimas é o cultivo sólido, uma vez que este processo permite obter tais enzimas a partir de rejeitos agroindustriais, o que pode ser tanto econômica quanto ambientalmente interessante.

Os fatores que afetam a hidrólise enzimática incluem o tipo de substrato, a atividade celulolítica e as condições de reação (temperatura, pH, tempo, entre outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, as pesquisas focam na otimização do processo hidrolítico e no aumento da atividade celulolítica, bem como na formulação de coquetéis enzimáticos. A degradação enzimática completa de moléculas complexas como hemiceluloses e celulosas, além de pectinas e proteínas presentes na biomassa nativa, como é o caso do bagaço de cana-de-açúcar (BC), requer a ação de várias enzimas atuando conjuntamente. Além das enzimas hidrolíticas que atuam diretamente sobre os polissacarídeos da parede celular de plantas, enzimas que atuam indiretamente, chamadas de enzimas auxiliares, podem também ser importantes na degradação da celulose.

Coquetéis enzimáticos obtidos a partir da mistura de extratos produzidos por diferentes métodos e microrganismos são alternativas para elevar a eficiência do processo de hidrólise enzimática, uma vez que as diferentes enzimas poderiam trabalhar em consorciação, atuando de forma sinérgica sobre a biomassa. Neste sistema, dificuldades e barreiras que uma enzima não vencesse seriam contornadas ou complementadas pela ação de outra enzima não sujeita às mesmas restrições, o que pode vir a aumentar a eficiência global do processo de hidrólise. Desta forma, a formulação de coquetéis balanceados constituídos por enzimas hidrolíticas e auxiliares produzidas por fungos em cultivo sólido e a determinação das condições operacionais do processo de hidrólise enzimática, avaliando-se o efeito da temperatura, da carga enzimática e do tempo na eficiência de sacarificação, bem como o

estudo cinético da hidrólise de bagaço de cana, são alternativas promissoras para reduzir os custos e aumentar a eficiência de conversão de celulose, viabilizando a produção de etanol celulósico comercialmente competitivo, um objetivo almejado da indústria de biocombustíveis.

Dado os resultados promissores com as cepas de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 e *Trichoderma reesei* QM9414 obtidos pelo grupo de pesquisa de Bioenergia do IBILCE/UNESP, integrante do Centro Paulista de Pesquisa em Bioenergia, justifica-se a pesquisa para formulação de coquetéis enzimáticos, bem como a aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado, avaliando-se as condições reacionais do processo de hidrólise enzimática e o efeito sinérgico das enzimas na degradação do material lignocelulósico, visando o aumento da eficiência de sacarificação.

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES FINAIS

Os objetivos da presente Tese de Doutorado, focados na obtenção de enzimas pelo processo de cultivo sólido e na formulação de coquetéis enzimáticos para aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, foram atingidos com sucesso. De maneira geral, a utilização de bagaço de cana e farelo de trigo para a produção de enzimas por cultivo sólido e a aplicação de coquetéis enzimáticos na hidrólise de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol de segunda geração são alternativas promissoras para reduzir os custos e aumentar a eficiência de conversão de celulose, viabilizando a produção de etanol celulósico comercialmente competitivo, um propósito muito almejado da indústria de biocombustíveis.

O emprego de resíduos agroindustriais como substratos e fungos filamentosos como agentes fermentativos no cultivo sólido proporciona boa produção de enzimas celulolíticas, com elevadas atividades enzimáticas e com características desejáveis para aplicação industrial. Para *T. aurantiacus* a maior produção de β -glicosidase foi obtida com BC:FT 9:1 (m/m) e 70 % (b.u) e de FPA com BC:FT 9:1 (m/m) e 80 % (b.u). Para *T. reesei* obteve-se maior produção de β -glicosidase com BC:FT 1:1 (m/m) e 80 % (b.u) e de FPA com BC:FT 9:1 e 70 % (b.u). A condição ótima adotada para o cultivo sólido destes fungos foi 9:1 BC:FT m/m e teor de umidade de 70 % (b.u). A quantificação de proteínas totais, pelo método de Kjeldahl, possibilitou estimar os parâmetros cinéticos de crescimento, com bom ajuste ao modelo logístico ($R^2 = 0,95$), e observar associação entre a produção de enzimas β -glicosidase e o crescimento fúngico. As enzimas produzidas pelos três fungos apresentaram atividades de β -glicosidase e FPA ótimas numa faixa de pH entre 4,0 e 5,0 e temperatura entre 45 e 75 °C e mantiveram-se estáveis, após 24 horas, entre pH 4 e 5,5 e 45 e 60 °C, dependendo das características termofílicas e mesofílica dos fungos. As atividades enzimáticas dos extratos produzidos pelos fungos termofílicos foram muito maiores do que as obtidas para o extrato produzido pelo fungo mesofílico, indicando que os termofílicos tenham se adaptado melhor ao processo de cultivo sólido. Portanto, o cultivo sólido apresenta-se como uma técnica apropriada para obtenção de enzimas celulolíticas, as quais apresentam potencial para aplicação na hidrólise da biomassa lignocelulósica para obtenção de E2G.

As enzimas obtidas por cultivo sólido apresentam resultados promissores quando aplicadas na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado. Os maiores teores de ART liberados na hidrólise de BNT foram obtidos empregando-se 24,5 FPA/g BC a 45 °C para *M. thermophila* e 7,2 FPA/g BC a 55 °C para *T. reesei* com tempo total de 24 horas. Para a aplicação das enzimas de *M. thermophila* e *T. reesei* na hidrólise de BNT, BHT

e BOU de acordo com o planejamento central composto rotacional, os resultados indicaram como ótimos 24,5 FPA/g BC para *M. thermophila* a 65 °C e 10,1 FPA/g BC para *T. reesei* a 45 °C, com 6 horas de hidrólise, respectivamente. As melhores conversões de celulose foram obtidas para BOU, atingindo 32 % para *M. thermophila* e 20 % para *T. reesei*. As condições ótimas na hidrólise de BNT pela aplicação das enzimas secretadas por *T. aurantiacus* e *T. reesei* foram 9 mL, 65 °C e 1:1 v/v e na hidrólise de BHT e BOU foram 5 mL, 55 °C e 1:1 v/v, levando, portanto, à conclusão de que houve efeito sinérgico entre as enzimas, melhorando a eficiência do processo de hidrólise quando aplicado o coquetel enzimático proveniente da mistura dos extratos produzidos por fungos distintos.

Nos ensaios de cinética de hidrólise de bagaço de cana a quantidade de ART liberados aumenta com o aumento do tempo de reação. Para aplicação das enzimas produzidas por *M. thermophila*, os maiores teores de ART foram obtidos em 45 e 55 °C após 12 e 8 horas, respectivamente. Para *T. reesei*, foram obtidos a 50 °C após 18 horas de reação. Para aplicação do coquetel enzimático proveniente dos extratos produzidos por *T. aurantiacus* e *T. reesei* os maiores teores de ART foram obtidos na hidrólise de BOU, evidenciando que este é um tratamento eficiente da biomassa, o qual apresentou 100 % de conversão de celulose. Em todos os ensaios cinéticos, a partir de certo tempo, a liberação de ART estabiliza, o que se deve à redução gradual da concentração de substrato, diminuindo-se a probabilidade de ataque efetivo da enzima ao substrato, adsorção improdutiva das enzimas, bem como à redução da atividade enzimática por desnaturação. Para todos os tempos da cinética de hidrólise de BNT maiores teores de ART foram obtidos para o coquetel (1:1 v/v), corroborando com o efeito sinérgico das enzimas. Os parâmetros do ajuste do modelo hiperbólico à cinética de hidrólise são úteis para a concepção e otimização dos processos de sacarificação enzimática.

Diante do exposto e considerando o elevado custo das enzimas comerciais disponíveis no mercado, esse trabalho, ao apresentar conhecimento sobre obtenção de enzimas por cultivo sólido e formulação de coquetéis enzimáticos, aliando isto aos planejamentos experimentais e às análises das condições operacionais, constitui uma importante ferramenta para a obtenção de coquetéis aprimorados para o processo de hidrólise enzimática.

REFERÊNCIAS

- ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food protein**. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1985.
- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A. J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 62, n. 1, p. 6-10, 2005.
- AFONSO, L. C. **Produção de celulasas por cultivo sólido e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2012.
- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 5, n. 26, p. 52-55, 2002.
- ALIYU, M.; HEPHER, M. J. Effects of ultrasound energy on degradation of cellulose material. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 265-268, 2000.
- ALLEN, S. G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J.; LASER, M.; LYND, R. A. Comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 40, n. 13, p. 2934-2941, 2001.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp.* for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.
- AMEN-CHEN, C.; PAKDEL, H.; ROY, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 79, n. 3, p. 277-299, 2001.
- ANDRIC, P.; MEYER, A. S.; JENSEN, P. A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design minimizing production inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, New York, v. 28, n. 3, p. 308-324, 2010.
- ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 48, n. 9, p. 1293-1302, 2013.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2010.
- ARAÚJO, C. R.; GARRIDO, C. V. S.; SANTOS, J. M. G. M.; LEAL, S. C. S.; CAMPOS, L. M. A. Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. **SEPA: Seminário Estudantil de Produção Acadêmica**, Salvador, v. 12, 2013.

- ARIAS, J. M.; MODESTO, L. F. A.; POLIKARPOV, I.; PEREIRA JUNIOR, N. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies. **Biotechnology Progress**, New York, v. 32, n. 5, p. 1222-1229, 2016.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **Fems Microbiology Review**, Amsterdam, v. 29, p. 719-739, 2005.
- AWAFO, V. A. **Biosynthesis of cellulase-system from *Trichoderma reesei* and its characteristics**. 1997. 255f. Tese (Doutorado) – McGill University, Montreal – Quebec, 1997.
- BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.* IMI 387099. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 3, p. 504-510, 2007.
- BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Optimization of endoglucanase production from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 by central composite design under response surface methodology. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, p. 305-316, 2018.
- BALAT, M. Mechanisms of thermochemical biomass conversion processes. Part 1: reactions of pyrolysis. **Energy Sources**, New York, v. 30, n. 7, p. 620-635, 2008.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.
- BALAT, M.; BALAT, M.; KIRTAY, E.; BALAT, H. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 50, n. 12, p. 3147-3157, 2009.
- BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V. Degradation of cellulose by *basidiomycetous* fungi. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 501-521, 2008.
- BANERJEE, G., SCOTT-CRAIG, J. S.; WALTON, J. D. Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective. **Bioenergy Research**, v. 3, p. 82-92, 2010.
- BARAKAT, A.; MONLAU, F.; SOLHY, A.; CARRERE, H. Mechanical dissociation and fragmentation of lignocellulosic biomass: Effect of initial moisture, biochemical and structural proprieties on energy requirement. **Applied Energy**, London, v. 142, p. 240-246, 2015.
- BARUAH, J.; NATH, B. K.; SHARMA, R.; KUMAR, S.; DEKA, R. C.; BARUAH, D. C.; KALITA, E. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. **Frontiers in Energy Research**, v. 6, p. 1-19, 2018.
- BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2010.

- BAURHOO, B.; RUIZ-FERIA, C. A.; ZHAO, X. Purified lignin: Nutritional and health impacts on farm animals – A review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 144, n. 3-4, p.175-184, 2008.
- BEG, Q. K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.
- BÉGUIN, P. Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 219-248, 1990.
- BERLIN, A.; MAXIMENKO, V.; GILKES, N.; SADDLER, J. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 97, n. 2, p. 287-296, 2007.
- BHAT, M. K. Cellulase and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, n. 3-4, p. 583–620, 1997.
- BHIKHABHAI, R.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G. Isolation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Journal of Applied Biochemistry**, San Diego, v. 6, n. 5-6, p. 336-345, 1984.
- BI, S.; PENG, L.; CHEN, K.; ZHU, Z. Enhanced enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by combining O₂ and NaOH. **Bioresource Technology**, Essex, v. 214, p. 692-699, 2016.
- BIELY, P. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: COUGHLAN, M. P. (Ed.). **Hemicellulose and Hemicellulases**. London: Hazlewood GP, 1993. p. 29-51.
- BIELY, P. Microbial xylanolytic system. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, n. 11, p. 286-290, 1985.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Química do Processamento de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003.
- BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: BON, E. P. S.; et al. (Orgs.). **Enzimas em Biotecnologia: Produções, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência Brasil, 2008. p. 241-271.
- BRAGA, C. M. P.; DELABONA, P. D. S.; LIMA, D. J. D. S.; PAIXÃO, D. A. A.; PRADELLA, J. G. D. C.; FARINAS, C. S. Addition of feruloyl esterase and xylanase produced onsite improves sugarcane bagasse hydrolysis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 170, p. 316-324, 2014.
- BRIDGEWATER, A. V. Principles and practice of biomass fast pyrolysis processes for liquids. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 51, n. 1-2, p. 3-22, 1999.

BRIENZO, M.; MONTE, J. R.; MILAGRES, A. M. F. Induction of cellulase and hemicellulase activities of *Thermoascus aurantiacus* by xylan hydrolyzed products. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 1, p.113-119, 2012.

BURGERT, I. Exploring the micromechanical design of plant cell walls. **American Journal of Botany**, Lancaster, v. 93, n. 10, p. 1391-1401, 2006.

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

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2012.

CANTWELL, B. A.; SHARP, P. M.; GORMLEY, E.; MCCONNELL, D. J. Molecular cloning of bacillus b-glucanases. In: AUBERT, J. P.; BEGUIN, P.; MILLET, J. (Eds.). **Biochemistry and genetics of cellulose degradation**. San Diego: Academic Press, 1988. p. 181-201.

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, 2002.

CASCIATORI, F. P.; BÜCK, A.; THOMÉO, J. C.; TSOTSAS, E. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 287, p. 103-116, 2016.

CASCIATORI, F. P.; FRASSATTO-CASCIATORI, P. A. Enzymes for the biochemical route of second-generation ethanol: production by solid-state cultivation as a feasible and sustainable alternative. In: BRIENZO, M. (Ed.). **Bioethanol and Beyond: Advances in Production Process and Future Directions**, New York: Nova Science Publishers, 2018. p. 285-313.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; TABOGA, S. R.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 255, p. 214-224, 2014.

CASTRO GOMEZ, R. J. H. **Sacarificação de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

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

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 84, p. 5-37, 2000.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 74, p. 135-159, 1998.

CHANLIAUD, E.; BURROWS, K. M.; JERONIMIDIS, G.; GIDLEY, M. J. Mechanical properties of primary plant cell wall analogues. **Planta**, Berlin, v. 215, n. 6, p. 989-996, 2002.

CHAUDHARY, G.; SINGH, L. K.; GHOSH, S. Alkaline pretreatment methods followed by acid hydrolysis of *Saccharum spontaneum* for bioethanol production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 124, p. 111-118, 2012.

CHEN, H.; HAYN, M.; ESTERBAUER, H. Purification and characterization of two extracellular β -glucosidases from *Trichoderma reesei*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v. 1121, n. 1-2, p. 54-60, 1992.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – Aspectos enzimático e potencial biocontrolador. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, p. 1-306, 2002.

COSTA, J. R. C.; HOMEM, C. L. G.; PINHEIRO, I. R. Estudo Cinético Enzimático da Hidrólise de Bagaço de Laranja. In: **V SEQUFES – SEMANA DA ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**, 1., 2017, Alegre. **Anais...** Alegre: Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2017. v. 4, n. 1, p. 68-71.

DA SILVA, R. **Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola sp.* 179-5 e aplicação destas enzimas**. 1992. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 1992.

DA SILVA, R.; GOMES, E.; FRANCO, C. M. L. Pectinases, hemicelulases e celulases: substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 249-250, 1997.

DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K. Production of xylanase and CMCCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 235-241, 2005.

DE CASSIA PEREIRA, J. C.; TRAVAINI, R.; MARQUES, N. P.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S.; MARTINS, D. A. B. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 204, p. 122-129, 2016.

DE CASSIA PEREIRA, J. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos/termotolerantes produtores de celulases e xilanases e aplicação dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2013.

DE CASSIA PEREIRA, J.; PAGANINI, N. M.; RODRIGUES, A.; BRITO, T. O.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. A. B. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 118, n. 4, p. 928-939, 2015.

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 2, p. 89-94, 2002.

DE OLIVEIRA RODRIGUES, P.; DE CASSIA PEREIRA, J.; QUEIROZ, D.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Synergistic action of an *Aspergillus* (hemi-) cellulolytic consortium on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 109, n. 1, p. 173-181, 2017.

DEMIRBAS A. The importance of bioethanol and biodiesel from biomass. **Energy Source**, New York, v. 3, n. 2, p. 177-185, 2008.

DEMIRBAS, A. Influence of gas and detrimental metal emissions from biomass firing and co-firing on environmental impact. **Energy Source**, New York, v. 27, n. 15, p. 1419-1428, 2005b.

DEMIRBAS, A. Potential applications of renewable energy sources, biomass combustion problems in boiler power systems and combustion related environmental issues. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 171-192, 2005a.

DESHPANDE, S. K.; BHOTMANGE, M. G.; CHAKRABART, T.; SHASTRI, P. N. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by SSF of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 15, n. 5, p. 449-456, 2008.

DIENES, D.; BORJESSON, J.; HAGGLUND, P.; TJERNELD, F.; LIDEN, G.; RECZEY, K.; STALBRAND, H. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 40, n. 5, p. 1087-1094, 2007.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 20, n. 1, p. 11-21, 2004.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Cellulose degradation by oxidative enzymes. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, e201209015, 2012.

DINI, C. M. **Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado**. 2010. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **Global Change Biology Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2009.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**. London: Academic Press, 1980.

DOS SANTOS CASTRO, L.; PEDERSOLI, W. R.; AMANDA CRISTINA CAMPOS ANTONIÊTO, A. C. C.; STEINDORFF, A. S.; SILVA-ROCHA, R.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A.; BROWN, N. A.; GOLDMAN, G. H.; FAÇA, V. M.; PERSINOTI, G. F.; SILVA, R. N. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 41, p. 1-17, 2014.

DOS SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; MARTÍN, C. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalysts for food processes. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 78-85, 1991.

ELIAS, A. M.; MOREIRA NETO, S. L.; CARVALHO, W.; MILAGRES, A. M. F. Produção de enzimas oxidativas em substratos lignocelulósicos e aplicação na deslignificação de polpas celulósicas. In: RESENDE, R. R. (Org.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blucher, 2017. p. 569-600.

ERIKSSON, K. E.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. **Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components**. Berlin: Springer-Verlag, 1990.

EZEILO, U. R.; ZAKARIA, I. I.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. Enzymatic breakdown of lignocellulosic biomass: the role of glycosyl hydrolases and lytic polysaccharide monooxygenases. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 4, p. 647-662, 2017.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y.H. **Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs**. Berlin: Springer-Verlag, 1987.

FARINAS, C. S. **A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação**, São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2011.

FELDMAN, D.; BANU, D.; NATANSOHN, A.; WANG, J. Structure-properties relations of thermally cured epoxy-lignin polyblends. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v. 42, n. 6, p. 1537-1550, 1991.

FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos: Principios e prácticas**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994. p. 172-177.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, V. **Produção de β -glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração.** 2010. 132f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2010.

FERRER, A.; BYERS, F. M.; SULBARÁN-DE-FERRER, B.; DALE B. E.; AIELLO, C. Optimizing ammonia processing conditions to enhance susceptibility of legumes to fiber hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98-100, p. 123-133, 2002.

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

FRASSATTO, P. A. C.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R. β -glucosidase production by *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* by solid state cultivation and application of enzymatic cocktail for saccharification of sugarcane bagasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020.

GALBE, M.; WALLBERG, O.; ZACCHI, G. Cellulosic Bioethanol Production. In: RAMASWAMY, S.; HUANG, H.; RAMARAO, B. V. (Eds.). **Separation and Purification Technologies in Biorefineries**. New York: John Wiley & Sons, 2013. p. 487-501.

GAO, L.; GAO, F.; JIANG, X.; ZHANG, C.; ZHANG, D.; WANG, L.; WU, G.; CHEN, S. Biochemical characterization of a new β -glucosidase (Cel3E) from *Penicillium piceum* and its application in boosting lignocelluloses bioconversion and forming disaccharide inducers: New insights into the role of β -glucosidase. **Process Biochemistry**, London, v. 49, n. 5, p. 768-774, 2014.

GARCÍA-CUBERO, M. T.; COCA, M.; BOLADO, S.; GONZALEZ-BENITO, G. Chemical oxidation with ozone as pre-treatment of lignocellulosic materials for bioethanol production. **Chemical Engineering Transactions**, v. 21, p. 1273-1278, 2010.

GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLES-BENITO, G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO, S. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 4, p. 1608-1613, 2009.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **European Journal of Wood and Wood Products**, Berlin, v. 57, n. 3, p. 191-202, 1999.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; GONZÁLEZ, M.; AGOSIN, E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. **Process Biochemistry**, London, v. 35, p. 1227-1233, 2000.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of protease from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 32, n. 2, p. 246-251, 2003.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 85-101, 2003.

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

GIERER, J. Chemistry of delignification. **Wood Science and Technology**, New York, v. 20, n. 1, p. 1-33, 1986.

GLAZE, W.H.; KANG, J. W.; CHAPIN, D. H. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide, and ultraviolet radiation. **Ozone: Science and Engineering**, v. 9, n. 4, p. 335-352, 1987.

GODFREY, T.; WEST, S. Introduction to industrial enzymology. In: GODFREY, W. (Ed.). **Industrial Enzymology**. 2. ed. London: Macmillan Press, 1996. p. 1-8.

GOLDEMBERG, J. Atualidade e perspectivas no uso de biomassa para geração de energia. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 15-28, 2016.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTINS, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOTTSCHALK, L. M.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. S. Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 51, n. 1-2, p. 72-78, 2010.

GOWDHAMAN, D.; MANASWINI, V. S.; JAYANTHI, V.; DHANASRI, M.; JEYALAKSHMI, G.; GUNASEKER, V.; SUGUMARAN, K. R.; PONNUSAMI, V. Xylanase production from *Bacillus aerophilus* KGJ2 and its application in xylooligosaccharides preparation. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 64, p. 90-98, 2014.

GRABBER, J. H.; RALPHA, J.; LAPIERRE, C.; BARRIÈRE, Y. Genetic and molecular basis of grass cell wall degradability. I. Lignin-cell wall matrix interactions. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 327, n. 5, p. 455-465, 2004.

GRAJEK, W. Comparative Studies on the Production of Cellulases by Thermophilic Fungi in Submerged and Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 26, p. 126-129, 1987a.

GRAJEK, W. Production of D-xylanases by Thermophilic Fungi Using Different Methods of Culture. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 9, p. 353-356, 1987b.

GRAJEK, W. Temperature and pH Optimum of Enzyme Activities Produced by Cellulolytic Thermophilic Fungi in Batch and Solid-State Cellulases. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 8, n. 8, p. 587-590, 1986.

GROUS, W. R.; CONVERSE, A. O.; GRETHLEIN, H. E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 8, n. 5, p. 274-280, 1986.

GUILHERME, A. A.; DANTAS, P. V. F.; SOARES, J. C. J.; DOS SANTOS, E. S.; FERNANDES, F. A. N.; DE MACEDO, G. R. Pretreatments and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse aiming at the enhancement of the yield of glucose and xylose. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 34, n. 04, p. 937-947, 2017.

GUSAKOV, A. V. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 29, n. 9, p. 419-425, 2011.

GUTIERREZ-CORREA, M.; TENDERDY, R. P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugarcane bagasse. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 1, p. 45-47, 1998.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HAMDAN, N. T.; JASIM, H. M. Purification and Characterization of Cellulase enzyme from *Trichoderma longibrachiatum* isolated in Iraqi soil. **Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 4, n. 1, p. 32-41, 2018.

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 384- 410, 2005.

HAUNG, C.; XIONG, L.; PENG, W.; TANG, L.; YANG, X.; CHEN, X.; CHEN, Y. Efficient cellulase production from low-cost substrates by *Trichoderma reesei* and its application on the enzymatic hydrolysis of corncob. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 43, p. 5018-5024, 2013.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; ANNA RAFAELA CAVALCANTE BRAGA, A. R. C.; KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 41-49, 2012.

HOLTZAPPLE, M.; COGNATA, M.; SHU, Y.; HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 36, n. 3, p. 275-287, 1990.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; JANSEN VAN RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 602-619, 2003.

HU, J.; CHANDRA, R.; ARANTES, V.; GOURLAY, K.; VAN DYK, J. S.; SADDLER, J. N. The addition of accessory enzymes enhances the hydrolytic performance of cellulase enzymes at high solid loadings. **Bioresource Technology**, Essex, v. 186, p. 149-153, 2015.

HUGOT, E. **Manual da Engenharia Açucareira**. São Paulo: Mestre Jou, v. 2, 1977.

IMMAN, S.; ARNTHONG, J.; BURAPATANA, V.; LAOSIRIPOJANA, N.; CHAMPREDA V. Autohydrolysis of tropical agricultural residues by compressed liquid hot water pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 170, n. 8, p. 1982-1995, 2013.

JEON, Y. J.; XUN, Z.; ROGERS, P. L. Comparative evaluations of cellulosic raw materials for second generation bioethanol production. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 51, n. 5, p. 518-524, 2010.

JIANG, B.; TSAO, R.; LI, Y.; MIAO, M. Food Safety: Food Analysis Technologies/Techniques. In: VAN ALFEN, N. K. (Ed.). **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. 2. ed. London: Academic Press, 2014. p. 273-288.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.

JORGENSEN, H.; KUTTER, J. P.; OLSSON, L. Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 317, n. 1, p. 85-93, 2003.

JOURDIER, E.; COHEN, C.; POUGHON, L.; LARROCHE, C.; MONOT, F.; CHAABANE, F. B. Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 79, 2013.

JUHÁSZ, T.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.; SIIKA-AHO, M.; VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 11, p. 3519-3525, 2005.

JUNG, S.; SONG, Y.; KIM, H. M.; BAE, H. J. Enhanced lignocellulosic biomass hydrolysis by oxidative lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) GH61 from *Gloeophyllum trabeum*. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 77, p. 38-45, 2015.

KABEL, M. A.; BOS, G.; ZEEVALKING, J.; VORAGEN, A. G. J.; SCHOLS, H. A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 10, p. 2034-2042, 2007.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 7, p. 1099-1104, 2003a.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 86, n. 3, p. 207-213, 2003b.

KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. **Clinical chemistry: theory, analysis and correlations**. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1996.

KASCHUK, J. J.; SANTOS, D. A.; FROLLINI, E.; CANDURI, F.; PORTO, A. L. M. Influence of pH, temperature, and sisal pulp on the production of cellulases from *Aspergillus sp.* CBMAI 1198 and hydrolysis of cellulosic materials with diferente hemicelluloses content, crystallinity, and average molar mass. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-12, 2019.

KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOU, V.; CHRISTAKOPOULOU, P. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 501-506, 2006.

KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading *Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 44, n. 2, p. 77-87, 2007.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 59, n. 1, p. 63-67, 1997.

KING, B. C.; DONNELLY, M. K.; BERGSTROM, G. C.; WALKER, L. P.; GIBSON, D. M. An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 102, n. 4, p. 1033-1044, 2009.

KIRK T. K.; CULLEN, D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: YOUNG, R. A.; AKHTAR, M. (Eds.). **Enviromentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 273-308.

KIRK, O.; BORCHER, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KO, J. K.; XIMENES, E.; KIM, Y.; LADISCH, M. R. Adsorption of Enzyme Onto Lignins of Liquid Hot Water Pretreated Hardwoods. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 112, n. 3, p. 252, 2015.

KOROTKOVA, O. G.; SEMENOVA, M. V.; MOROZOVA, V. V.; ZOROV, I. N.; SOKOLOVA, L. M.; BUBNOVA, T. M.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P. Isolation and properties of fungal β -glucosidases. **Biochemistry**, Moscow, v. 74, n. 5, p. 569-577, 2009.

KOSTYLEV, M.; WILSON, D. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. **Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 61-70, 2012.

KOVÁCS, K.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G. Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, n. 3, p. 1350-1357, 2009.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, n. 11, p. 1-10, 2009.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K. E. L. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. In: ERIKSSON, K. E. L.; et al. (Eds.). **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlin: Springer Verlag, v. 57, 1997. p. 45-125.

KUMAR, L.; ARANTES, V.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource Technology**, Essex, v. 103, n. 1, p. 201-208, 2012.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KURABI, A.; BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; ROBINSON, J.; MARKOV, A.; SADDLER, J. N Enzymatic hydrolysis of steam exploded and ethanol organosolv-pretreated douglas-fir by novel and commercial fungal cellulases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 121-124, p. 219-230, 2005.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 557-566, 2009.

LARSEN, J.; PETERSEN, M. O.; THIRUP, L.; LI, H. W.; IVERSEN, F. K. The IBUS process: Lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. **Chemical Engineering and Technology**, Weinheim, v. 31, n. 5, p. 765-772, 2008.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR., M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, Essex, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 18, p. 3634-3637, 2007.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 121, p. 1081-1099, 2005.

LEGLIMI, H.; MERAIHI, Z.; BOUKHALFA-LEZZAR, H.; COPINET, E. Production and characterization of cellulolytic activities produced by *Trichoderma longibrachiatum* (GHL). **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 465-475, 2013.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1997.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 43, n. 6, p. 391-395, 2008.

LEITE, R.S.R.; BOCCHINI, D.A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 136-140, n. 1-12, p. 281-288, 2007.

LEU, S. Y.; ZHU, J. Y. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: Our recent understanding. **Bioenergy Research**, v. 6, n. 2, p. 405-415, 2013.

LI, C., WANG, L., CHEN, Z., LI, Y., WANG, R., LUO, X., CAI, G., LI, Y., YU, Q., LU, J. Ozonolysis pretreatment of maize stover: the interactive effect of sample particle size and moisture on ozonolysis process. **Bioresource Technology**, Essex, v. 183, p. 240-247, 2015.

LI, C.; LIN, F.; LI, Y.; WEI, W.; WANG, H.; QIN, L.; ZHOU, Z.; LI, B.; WU, F.; CHEN, Z. A β -glucosidase hyper-production *Trichoderma reesei* mutant reveals a potential role of cel3D in cellulase production. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 151, 2016.

LIU, C.; SUNA, R.; QIN, M.; ZHANG, A.; RENA, J.; XUB, F.; YE, J.; WU, S. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. **Industrial Crops and Products**, v. 26, n. 2, p. 212-219, 2007.

LOPES, A. M.; FERREIRA FILHO, E. X.; MOREIRA, L. R. S. An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 125, n. 3, p. 632-645, 2018.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 77, n. 4, p. 467-475, 2002.

MACHADO, R. C. **Caracterização da atividade celulolítica dos extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Myceliophthora sp.* e *Thermoascus aurantiacus* em cultivo no estado sólido.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Ambiental) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.

MACHUCA, A. ***Thermoascus aurantiacus* (cepa brasileira): aspectos de crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos.** 1991. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**, New York: Prentice Hall International Inc., 2004.
- MAEDA, R. N.; BARCELOS, C. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; PEREIRA, N. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 38-44, 2013.
- MAEDA, R. N.; SERPA, V. I.; ROCHA, V. A. L.; MESQUITA, R. A. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; CASTRO, A. M.; DRIEMEIER, C. E.; PEREIRA JUNIOR, N.; POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 5, p. 1196-1201, 2011.
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.
- MAIS, U.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N. Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98-100, p. 463-471, 2002.
- MAIS, U.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, D. Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98-100, p. 815-831, 2002.
- MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, New York, v. 15, n. 5, p.804-816, 1999.
- MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 372-380, 2009.
- MARTÍNEZ, A. T.; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M. J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J. C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 195-204, 2005.
- MARTINEZ, D.; BERKA, R. M.; HENRISSAT, B.; SALOHEIMO, M.; et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 5, p. 553-560, 2008.
- MARTINS, M. E. M.; MARTINS, E. S.; MARTINS, H. L. Production and characterization of a thermostable β -glucosidase from *Myceliophthora heterothallica*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 36, n. 1, p. 212-222, 2020.
- MASTEN, S. J.; DAVIS, S. H. R. Advances in Water Treatment Technologies – The use of ozonation to degrade organic contaminants in wastewaters. **Environmental Science Technology**, Easton, v. 28, n. 4, p. 180-185, 1994.

- MASUI, D. C.; ZIMBARDI, A. L. R. L.; SOUZA, F. H. M.; GUIMARÃES, L. H. S.; FURIEL, R. P. M.; JORGE, J. A. Production of a xylose-stimulated β -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Humicola brevis* var. *thermoidea* under solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 2689-2701, 2012.
- MCCLENDON, S. D.; BATH, T.; PETZOLD, C. J.; ADAMS, P. D.; SIMMONS, B. A.; SINGER, S. W. *Thermoascus aurantiacus* is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 54, 2012.
- MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 53, p. 625-663, 1984.
- MEDEIROS, D. R. **Tratamento de efluentes do branqueamento da polpa celulósica por processos oxidativos avançados baseados em ozônio**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- MEIGHAN, B. N. **Fracionamento de bagaço de cana-de-açúcar por processo hidrotérmico e organossolve no contexto da biorrefinaria lignocelulósica**. 2016. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2016.
- MENDES, F. B.; ATALA, D. I. P.; THOMÉO, J. C. Is cellulase production by solid-state fermentation economically attractive for the second generation ethanol production?. **Renewable Energy**, Oxford, v. 114, p. 525-533, 2017.
- MERINO, S. T.; CHERRY, J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlin, v. 108, p. 95-120, 2007.
- MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 324-329, 2001.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MIN, D.; XU, R.; HOU, Z.; LV, J.; HUANG, C.; JIN, Y.; YONG, Q. Minimizing inhibitors during pretreatment while maximizing sugar production in enzymatic hydrolysis through a two-stage hydrothermal pretreatment. **Cellulose**, v. 22, n. 2, p. 1253-1261, 2015.
- MISHIMA, D.; TATEDA, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 16, p. 2166-2172, 2006.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlin, v. 68, p. 61-138, 2000.

- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals, design and operation**. Berlin: Springer-Verlag, 2006.
- MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review. **Energy and Fuels**, Washington, v. 20, n. 3, p. 848-889, 2006.
- MOHR, H.; SCHOPPER, P. **Plant Physiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995.
- MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, London, v. 40, n. 4, p. 3941-3994, 2011.
- MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; DA SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 1062-1071, 2012.
- MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; NUNES, C. D. C. C.; VILLENA, M. A.; PERRONE, O. M.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, London, v. 122, p. 189-195, 2014.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Cellulose**, v. 15, p. 711-721, 2008.
- NAKASHIMA, G. T.; ADHMANN, I. C. S.; HANSTED, A. L. S.; BELINI, G. B.; WALDMAN, W. R.; YAMAJI, F. M. Materiais lignocelulósicos: Caracterização e produção de briquetes. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, 150-162, 2017.
- NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. Growth and Enzyme Production in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 60, n. 4, p. 311 – 319, 1982.
- NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; PILÓ-VELOSO, D. Ozonólise das ligninas organossolve e Kraft eucalipto. Parte II: Cinética nos meios ácido e básico. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 578-583, 1998.
- NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- NEELY, W. C. Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 26, n. 1, p. 59-65, 1984.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIDETZKY, B.; STEINER, W.; HAYN, M.; CLAEYSSSENST, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. **Biochemical Journal**, London, v. 298, n. 3, p. 705-710, 1994.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-state substrate fermentation system and their applications in biotechnology. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 34, n. 6, p. 405-423, 1994.

OECD/IEA. Sustainable production of second-generation biofuels, 2010. Disponível em: <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second_generation_biofuels.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2017.

OGIER, J. C.; BALLERINI, D.; LEYGUE, J. P.; RIGAL, L.; POURQUIE, J. Ethanol production from lignocellulosic biomass. **Oil and Gas Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 67-94, 1999.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicelluloses and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 13, p. 2503-2510. 2007.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRARE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. L. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbio nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

OLIVEIRA, A. P. A.; SILVESTRE, M. A.; ALVES-PRADO, H. F.; RODRIGUES, A.; PAZ, M. F.; FONSECA, G. G.; LEITE, R. S. R. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 14, p. 1215-1223, 2015.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera L.*) para produção de celulases**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2010.

OLSSON, L.; JØRGENSEN, H.; KROGH, K. B. R.; ROCA, C. Bioethanol Production from Lignocellulosic Material. In: S. Dumitriu (Ed.); **Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**. 2 ed., New York: Marcel Dekker, 2005, p. 957-993.

OZBAY, N.; PUTUN, A. E.; UZUN, B. B.; PUTUN E. Biocrude from biomass: pyrolysis of cotton seed cake. **Renewable Energy**, Oxford, v. 24, n. 3-4, p. 615-625, 2001.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PALONEN, H.; THOMSEN, A. B.; TENKANEN, M.; SCHMIDT, A. S.; VIKARI, L. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 117, n. 1, p. 1-17, 2004.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I. Sugarcane bagasse, **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n.1, p. 69-80, 2000.

PATEL, R. N. Microbial enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 31, n. 6, p. 804-826, 2002.

PEREIRA, S. C.; MAEHARA, L.; MACHADO, C. M. M.; FARINAS, C. S. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. **Biotechnology for Biofuels** v. 8, n. 44, p. 1-16, 2015.

PERRONE, O. M. **Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com ozônio, ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática**. 2015. 65f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

PERRONE, O. M.; COLOMBARI, F. M.; ROSSI, J. S.; MORETTI, M. M. S.; BORDIGNON, S. E.; NUNES, C. C. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; DA SILVA, R. Ozonolysis combined with ultrasound as a pretreatment of sugarcane bagasse: Effect on the enzymatic saccharification and the physical and chemical characteristics of the substrate. **Bioresource Technology**, Essex, v. 218, p. 69-76, 2016.

PERRONE, O. M.; ROSSI, J. S.; MORETTI, M. M. S.; NUNES, C. C. C.; BORDIGNON, S. E.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; BOSCOLO, M. Influence of ozonolysis time during sugarcane pretreatment: Effects on the fiber and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, Essex, v. 224, p. 733-737, 2017.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, p. 2104-2111, 2002.

PINTO, T. O. P. **Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lypase-catalyze production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 7, p. 1077-1082, 2003.

- PLÁCIDO, J.; CAPAREDA, S. Analysis of alkali ultrasonication pretreatment in bioethanol production from cotton gin trash using FT-IR spectroscopy and principal component analysis. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 1, n. 23, p. 1-9, 2014.
- POLIZELI, M. L. T.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, H. F.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.
- POSTEK, M. T.; VLADÁR, A.; DAGATA, J.; FARKAS, N.; MING, B.; WAGNER, R.; RAMAN, A.; MOON, R. J.; SABO, R.; WEGNER, T. H.; BEECHER, J. Development of the metrology and imaging of cellulose nanocrystals. **Measurement Science and Technology**, Bristol, v. 22, n. 2, p. 024005, 2011.
- POUTEAU, C.; DOLE, P.; CATHALA, B.; AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Antioxidant properties of lignin in polypropylene. **Polymer Degradation and Stability**, Essex, v. 81, n. 1, p. 9-18, 2003.
- PRICE, N. C.; STEVENS, L. **Fundamentals of Enzymology**. 2. ed. Oxford: Science Publications, 1989.
- PURÍ, V. P. Ozone pretreatment to increase digestibility of lignocelluloses. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 5, n. 11, p. 773-776, 1983.
- QUESADA, M.; RUBIO, M.; GOMEZ, D. Ozonation of lignin rich solid fractions from corn stalks. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 19, n. 1-2, p. 115 – 137, 1999.
- RABELO S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- RAHNAMA, N.; SHAH, U. K. M.; FOO, H. L.; RAHMAN, N. A. A.; ARIFF, A. B. Production and characterisation of cellulase from solid state fermentation of rice straw by *Trichoderma harzianum* SNRS3. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v. 399, n. 4, p. 507-531, 2016.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.
- REESE, E. T.; SIU, R. G. H.; LEVINSON, H. S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 59, n. 4, p. 485-497, 1950.
- ROCHA, V. A. L.; MAEDA, R. N.; SANTA-ANNA, L. M. M.; PEREIRA, N. Sugarcane bagasse as feedstock for cellulase production by *Trichoderma harzianum* in optimized culture medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 1-1, 2013.

RODRIGUES, C.; SOCCOL, C. R. **Tecnologia Enzimática**. Curitiba: SENAI, 2009.

ROMERO, E.; BAUTISTA, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, A. M.; CREMADES, O.; PARRADO, J. Bioconversion of corn distiller's dried grains with solubles (CDDGS) to extracellular proteases and peptones. **Process Biochemistry**, London, v. 42, n. 11, p. 1492-1497, 2007.

ROY, S. K.; RAHA, S. K.; SADHUKHAN, R. K.; CHAKRABARTY, S. L. Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Myceliophthora thermophila*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 613-618, 1991.

SACON, V.; WEISSHEIMER, C. A. **Metodologia de lignina simplificada**. Nota Técnica: Riocell, n. 1481, p. 6, 1996.

SAHA, B. C.; YOSHIDA, T.; COTTA, M. A.; SONOMOTO, K. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 367-372, 2013.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, New York, v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 8, p. 2689- 2694, 2005.

SANJUÁN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibers from mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff**, Berlin, v. 59, 447-450, 2001.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Eds.). **Biotechnologia Industrial**, v. 3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362.

SANTA TERESA D'AVILA. **Obras completas: Teresa de Jesus**. São Paulo: Edições Loyola, 1995, p. 563.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CALDAS, C. S.; SOARES, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

SANTOS, F. R. S. **Produção e caracterização de celulases e hemicelulases por linhagens fúngicas mesófilas isoladas do cerrado sul-mato-grossense**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.

SATTLER W.; ESTERBAUER, H.; GLATTER, O.; STEINER, W. The effect enzyme concentration on the rate of the hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 33, n. 10, p. 1221–1234, 1989.

SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 1, p. 167-178, 2009.

SCALABRINI, R. P. **Caracterização de xilanase produzida por linhagem de *Thermoascus aurantiacus* recentemente isolada na região de Dourados – MS**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2016.

SEN, S.; ABRAHAM, T. K.; CHAKRABARTY, S. L. Characteristics of the cellulase produced by *Myceliophthora thermophila* D-14. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, n. 3, p. 271-277, 1982.

SILVA, C. A. A.; LACERDA, M. P. F.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G. Production of enzymes from *Lichtheimia ramosa* using Brazilian savannah fruit wastes as substrate on solid state bioprocesses. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 1-9, 2013.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, 661-671, 2009.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SIVERS, M. V.; ZACCHI, G. Ethanol from lignocellulosics: A review of the economy. **Bioresource Technology**, Essex, v. 56, n. 2-3, p. 134-140, 1996.

SMITS, J. P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; VAN SONSBEK, H.M.; KNOL, W. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 46, p. 489-498, 1996.

SÖDERSTRÖM, J.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Effect of washing on yield in one- and two-step steam pretreatment of softwood for production of ethanol. **Biotechnology Progress**, New York, v. 20, n. 3, p. 744–749, 2004.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA B. S.; SAINI, H. S. Novel sources of fungal cellulases for efficient deinking of composite paper wast. **Bioresources**, v. 3, n. 1, p. 234-246, 2008.

SØRENSEN, H. R., PEDERSEN, S., JØRGENSEN, C. T., MEYER, A. S. Enzymatic hydrolysis of wheat arabinoxylan by a recombinant "minimal" enzyme cocktail containing beta-xylosidase and novel endo-1, 4-beta-xylanase and alpha-l-arabinofuranosidase activities. **Biotechnology Progress**, New York, v. 23, n. 1, p. 100-107, 2007.

SOUZA, R. B. A. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar**. 2016. 106f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

SOUZA-CORRÊA, J. A.; OLIVEIRA, C.; NASCIMENTO, V. M.; WOLF, L. D.; GÓMEZ, E. O.; ROCHA, G. J. M.; AMORIM, J. Atmospheric pressure plasma pretreatment of sugarcane bagasse: the influence of biomass particle size in the ozonation process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 172, n. 3, p. 1663-1672, 2014.

SOUZA-CORRÊA, J. A.; RIDENTI, M. A.; OLIVEIRA, C.; ARAÚJO, S. R.; AMORIM, J. (2013). Decomposition of lignin from sugar cane bagasse during ozonation process monitored by optical and mass spectrometries. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 117, n. 11, p. 3110-3119, 2013.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas α -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 178f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

SUGAMA, S.; OKAZAKI, N. Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. **Journal of Fermentation Technology**, Osaka, v. 57, n. 5, p. 408 – 412, 1979.

SUN, J. X.; SUN, R.; SUN, X. F.; SU, Y. Fractional and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 339, n. 2, p. 291-300, 2004.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

TAHERZADEH, M. J.; EKLUND, R.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 36, n. 11, p. 4659-4665, 1997.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAO, Y. M.; ZHU, X. Z.; HUANG, J. Z.; MA, S. J.; WU, B.; LONG, M. N.; CHEN, Q. X. Purification and properties of endoglucanase from a sugar cane bagasse hydrolyzing strain, *Aspergillus glaucus* XC9. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 10, p. 6126-6130, 2010.

TEERI, T. T.; BRUMER, H.; DANIEL, G.; GATENHOLM, P. Biomimetic engineering of cellulose-based materials. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 25, n. 7, p. 299-306, 2007.

TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnology Progress**, New York, v. 17, n. 1, p. 110-117, 2001.

TEZCANLI-GÜYER, G.; INCE, N. H. Individual and combined effects of ultrasound, ozone and UV irradiation: a case study with textile dyes. **Ultrasonics**, Surrey, v. 42, n. 1-9, p. 603-9, 2004.

THOMPSON, D. N.; CHEN, H. C.; GRETHLEIN, H. E. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. **Bioresource Technology**, Essex, v. 39, n. 2, p. 155-163, 1992.

TRAVAINI, R. **Utilização de processos oxidativos avançados baseados em ozônio como pré-tratamento para bagaço de cana-de-açúcar, e hidrólise do bagaço pré-tratado com combinado enzimático dos fungos *Penicillium viridicatum* RFC3 e *Trichoderma reesei* QM9414**. 2011. 62f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

TRAVAINI, R.; BARRADO, E.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Effect of ozonolysis pretreatment parameters on the sugar release, ozone consumption and ethanol production from sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Essex, v. 214, p. 150-158, 2016.

TRAVAINI, R.; MARTÍN-JUÁREZ, J.; LORENZO-HERNANDO, A.; BOLADO-RODRÍGUEZ, S. Ozonolysis: an advantageous pretreatment for lignocellulosic biomass revisited. **Bioresource Technology**, Essex, v. 199, p. 2-12, 2016.

TRAVAINI, R.; OTERO, M. D. M.; COCA, M.; DA-SILVA, R.; BOLADO, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 133, p. 332-229, 2013.

TSUJINO, J.; KAWAMOTO, H.; SAKA, S. Reactivity of lignin in supercritical methanol studied with various lignin model compounds. **Wood Science and Technology**, New York, v. 37, p. 299-307, 2003.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 72, n. 2, p. 169-183, 2000.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white – rot – fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 1-17, 1995.

UNICA. Relatório final da safra 2018/2019. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em: 02 fev. 2020.

VALLANDER, L.; ERILSSON, K. E. Enzymic saccharification of pretreated wheat straw. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 27, n. 5, p. 650-659, 1985.

VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAR, K. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production: optimization through response surface methodology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 112, p. 293-299, 2012.

- VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAR, K. Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: sono-assisted acid hydrolysis approach. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 14, p. 7119-7123, 2011.
- VICINI, G.; MITCHELL, D. A.; BOIT, S. D.; GERN, J. C.; ROSA, A. S. da; COSTA, R. M.; DALSENTER, F. D. H.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 271-294, 2001.
- VIDAL, P. F.; MOLINIER, J. Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass**, London, v. 16, n. 1, p. 1-17, 1988.
- VLASENKO, E. Y.; DING, H.; LABAVITCH, J. M.; SHOEMAKER, S. P. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. **Bioresource Technology**, Essex, v. 59, n. 2-3, p. 109-119, 1997.
- WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-Economic Evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnology Progress**, New York, v. 19, n. 4, p. 1109-1117, 2003.
- XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 115, p. 1115-1126, 2004.
- XIN, F.; GENG, A. Horticultural waste as the substrate for cellulase and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, n. 1, p. 295-306, 2010.
- YAMAN, S. Pyrolysis of biomass to produce fuels and chemical feedstocks. **Energy Conversion and Management**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 651-671, 2004.
- YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, London, v. 86, n. 12-13, p. 1781-1788, 2007.
- YEOMAN, C. J.; HAN, Y.; DODD, D.; SCHROEDER, C. M.; MACKIE, R. I.; CANN, K. O. Thermostable enzymes as biocatalysts in the biofuel industry. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 70, p. 1-55, 2010.
- YUAN, W.J.; CHANG, B.L.; REN, J.G.; LIU, J.P.; BAI, F.W.; LI, Y.Y. Consolidated bioprocessing strategy for ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces marxianus* under high gravity conditions. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 112, n. 1, p. 38-44, 2011.
- ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; THOMÉO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora sp.* I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1536-1544, 2012.

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 11, p. 2137-2143, 2011.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y. H.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHANG, Y. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Chichester, v. 6, n. 4, p. 465-482, 2012.

ZHAO, X.; ZHOU, Y.; ZHENG, G. Microwave pretreatment of substrates for cellulose production by solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 5, p. 1557-1571, 2010.