

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/04/2018.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**LUANA ZANCHETTA TESCHE**

**Estudo comparativo das características e da eficácia de celulases de  
fungos endofíticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado**

**Araraquara**

**2017**

**LUANA ZANCHETTA TESCHE**

**Estudo comparativo das características e da eficácia de celulases de  
fungos endofíticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado**

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Química, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini

**Araraquara**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

T337e Tesche, Luana Zanchetta  
Estudo comparativo das características e da eficácia de  
celulases de fungos endofíticos na sacarificação do bagaço  
de cana-de-açúcar pré-tratado / Luana Zanchetta Tesche. –  
Araraquara : [s.n.], 2017  
128 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: Daniela Alonso Bocchini

1. Fungos endofíticos. 2. Celulase. 3. Bagaço de cana.  
4. Hidrólise. 5. Biomassa. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** "Estudo comparativo das características e da eficácia de celulasas de fungos endofíticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado"

**AUTORA:** LUANA ZANCHETTA TESCHE

**ORIENTADORA:** DANIELA ALONSO BOCCHINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. DANIELA ALONSO BOCCHINI

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. KELLY JOHANA DUSSAN MEDINA

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Prof. Dr. JONAS CONTIERO

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

Araraquara, 10 de outubro de 2017

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho  
aos meus pais Ângela e  
Valdir,  
que por todo este  
tempo me apoiaram e  
me ensinaram o  
verdadeiro valor da vida.  
É por vocês e para vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela força, luz e proteção em minha caminhada, pois sem Ele jamais teria conseguido.

Aos meus pais, Ângela e Valdir, que sempre me ensinaram o verdadeiro valor da vida e que sempre lutaram pelos meus estudos. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pela força e principalmente por ser quem vocês são. A vocês minha eterna gratidão!

Ao meu irmão Lucas, que junto aos meus pais me ensinou muito e sempre me incentivou a seguir os estudos. Em você que me espelho!

Ao meu namorado Vinícius, por todo apoio e colaboração durante todo mestrado. Seu incentivo foi essencial. Muito obrigada!

À Prof<sup>a</sup> Dra Daniela Alonso Bocchini, pela oportunidade, confiança depositada, pelos ensinamentos e orientação. Muito obrigada!

À Prof<sup>a</sup> Dra Kelly Johana Dussán Medina por sempre estar de portas abertas para ajudar. Seus ensinamentos foram fundamentais, muito obrigada!

Às amigas e companheiras de laboratório Natália Paganini Marques e Naiani Tartarine obrigada por todo auxílio, pela amizade e momentos compartilhados. Vocês são parte desse trabalho!

À Josiani Pereira por toda colaboração para o desenvolvimento desse trabalho, meu muito obrigada!

À Profa. Dra. Ângela Regina Araújo que gentilmente forneceu sua coleção de fungos ao nosso grupo de pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista e ao Instituto de Química pela oportunidade e excelente oferecimento de seus serviços prestados ao longo deste mestrado.

À Maria Isabel por todo suporte dado para o desenvolvimento da dissertação, sua ajuda foi fundamental.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial aos funcionários da seção de pós-graduação pela atenção e toda ajuda prestada.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, me apoiaram e colaboraram para realização deste trabalho. Muito obrigada!

*Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os  
únicos benfeitores do mundo.*

-Walter S. Landor

## RESUMO

Os principais desafios para a produção de etanol celulósico se relacionam aos custos de obtenção das celulases, à disponibilização da celulose presente nos materiais lignocelulósicos (para maior rendimento da sacarificação enzimática), bem como à eficiente conversão da glicose liberada em etanol. As celulases microbianas têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos, visando a sua aplicação no bagaço de cana-de-açúcar para liberação de açúcares fermentescíveis e posteriormente a produção de etanol celulósico. O presente trabalho teve como objetivo o estudo da produção de celulases por oito fungos endofíticos, por fermentação em estado sólido (FES) e a utilização dos extratos enzimáticos na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Os fungos foram cultivados utilizando-se quatro misturas (1:1 p/p) de diferentes substratos lignocelulósicos, sendo selecionada para cada fungo, a mistura que proporcionou as maiores atividades de celulases nos extratos enzimáticos obtidos. Tais enzimas foram utilizadas na sacarificação do bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino (NaOH 5% p/v), o qual apresentou a vantagem de gerar uma baixa concentração de inibidores, seguindo três diferentes protocolos de sacarificação. Nesta etapa, foram selecionados os fungos *Phomopsis stipata* SC 04 (concentrações de glicose de 3,82 e 4,72 mg/mL nos hidrolisados obtidos pelos Protocolos 1 e 2 de sacarificação respectivamente) e *Botryosphaeria* sp. AM 01 (concentração de glicose de 4,01 mg/mL no hidrolisado obtido pelo Protocolo 2 de sacarificação). Foram realizados delineamentos experimentais visando a avaliação da influência das variáveis envolvidas na sacarificação. Para *P. stipata* SC 04 Protocolo 1, foram otimizadas as cargas de bagaço, endoglucanase e concentração de Tween 80 (15,364% e 288,07 U totais, 0,095% respectivamente), obtendo-se glicose em concentração 2,42 vezes superior, quando comparado com a sacarificação prévia. Quando se empregou o Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se *P. stipata* SC 04 ou *Botryosphaeria* sp. AM 01, foi possível otimizar as condições carga de bagaço pré-tratado e concentração de Tween 80 (9,27% e 0,283%, respectivamente, para o primeiro fungo; 7,17% e 0,8345%, respectivamente, para o segundo fungo). Assim, o uso de enzimas microbianas na sacarificação do bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico com NaOH levou a obtenção de hidrolisado com características adequadas para a utilização como fonte de glicose para produção de etanol celulósico, o que permitiu que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* consumisse 85,8% da glicose presente em 24 horas de fermentação, produzindo 5,22 g/L de etanol celulósico.

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos, Celulase, Bagaço de cana, Hidrólise, Biomassa.

## ABSTRACT

The main challenges for cellulosic ethanol production have been related to cellulases costs, to the availability of cellulose in lignocellulosic materials (for higher yield of enzymatic saccharification), as well as to the efficient conversion of glucose in ethanol. Microbial cellulases have been extensively studied in the last years, aiming its application on sugarcane bagasse to release of fermentable sugars and later the cellulosic ethanol production. The present work had as objective the study of cellulase production by eight endophytic fungi by solid-state fermentation (SSF), and the use of the enzymatic extracts in saccharification of pre-treated sugarcane bagasse. The fungi were cultivated using four mixtures (1:1 w/w) of different lignocellulosic substrates, has being selected for each fungus, the mixture that provided the highest cellulases activities in the enzymatic extracts obtained. These enzymes were used in the saccharification of sugarcane bagasse submitted to alkaline hydrothermal pre-treatment (NaOH 5% w/v), which had the advantage of generates a low inhibitors concentration, following three different saccharification protocols. In this step, the fungi selected were *Phomopsis stipata* SC 04 (glucose concentration of 3.82 and 4.72 mg/mL in the hydrolysates obtained from saccharification Protocols 1 and 2, respectively), and *Botryosphaeria* sp. AM 01 (glucose concentration of 4.01 mg/mL in the hydrolysate obtained from saccharification Protocol 2). Experimental designs were performed aiming the evaluation of the influence of variables involved in saccharification. For *P. stipata* SC 04, using Protocol 1, the charges of bagasse, endoglucanase and Tween 80 were optimized (15.364% e 288.07 U totais, 0.095% respectively), obtaining glucose in concentration 2.42 times higher when compared to previous saccharification. When saccharification Protocol 2 was employed, using *P. stipata* SC 04 or *Botryosphaeria* sp. AM 01, it was possible to optimize the conditions of pre-treated bagasse charge and Tween 80 concentration (9.27% and 0.283%, respectively, for the first fungus; 7.17% and 0.8345%, respectively, for the second fungus). Therefore, the use of microbial enzymes in saccharification of sugarcane bagasse submitted to hydrothermal pre-treatment with NaOH led to achievement of hydrolysate with suitable characteristics for using as glucose source to cellulosic ethanol production, allowing the *Saccharomyces cerevisiae* to consume 85.8% of contained glucose in 24 hours of fermentation, producing 5.22 g/L of cellulosic ethanol.

**Keywords:** Endophytic fungi, Cellulase, Sugarcane bagasse, Hydrolysis, Biomass.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> – Estrutura do material lignocelulósico e seus principais constituintes.....                                                                                                                                                                                                                                | 28 |
| <b>Figura 2</b> – Esquema da estrutura molecular da celulose.....                                                                                                                                                                                                                                                           | 29 |
| <b>Figura 3</b> – Demonstração do arranjo paralelo das cadeias do polímero da celulose.<br>.....                                                                                                                                                                                                                            | 30 |
| <b>Figura 4</b> – Organização estrutural da fibra de celulose. ....                                                                                                                                                                                                                                                         | 31 |
| <b>Figura 5</b> – Estrutura molecular da hemicelulose (A); Estrutura da xilana (B). ....                                                                                                                                                                                                                                    | 32 |
| <b>Figura 6</b> – Estrutura esquemática da lignina de madeira macia. ....                                                                                                                                                                                                                                                   | 33 |
| <b>Figura 7</b> – Monômeros fenilpropanóides constituintes da lignina. ....                                                                                                                                                                                                                                                 | 33 |
| <b>Figura 8</b> – Representação esquemática do sistema celulolítico microbiano.....                                                                                                                                                                                                                                         | 37 |
| <b>Figura 9</b> – Esquema do pré-tratamento de biomassa lignocelulósica. ....                                                                                                                                                                                                                                               | 38 |
| <b>Figura 10</b> – FES em sacos de polipropileno. ....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 44 |
| <b>Figura 11</b> – Produção de celulasas pelo fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.....                                                                                                                                                                                                                                    | 60 |
| <b>Figura 12</b> – Produção de celulasas pelo fungo <i>Ustilaginoidea</i> sp. XYA 04. ....                                                                                                                                                                                                                                  | 60 |
| <b>Figura 13</b> – Produção de celulasas pelo fungo <i>P. stipata</i> SC 04.....                                                                                                                                                                                                                                            | 61 |
| <b>Figura 14</b> – Produção de celulasas pelo fungo <i>T. viridae</i> PAJ 01. ....                                                                                                                                                                                                                                          | 62 |
| <b>Figura 15</b> – Produção de celulasas pelo fungo <i>C. cladosporioides</i> PAJ 03.....                                                                                                                                                                                                                                   | 62 |
| <b>Figura 16</b> – Produção de celulasas pelo fungo <i>Ustilaginoidea</i> sp. CV 04.....                                                                                                                                                                                                                                    | 63 |
| <b>Figura 17</b> – Produção de celulasas pelo fungo <i>Saccharicola</i> sp. EJC 04.....                                                                                                                                                                                                                                     | 64 |
| <b>Figura 18</b> – Produção de celulasas pelo fungo <i>Paecilomyces</i> sp. SF 021. ....                                                                                                                                                                                                                                    | 64 |
| <b>Figura 19</b> – Concentrações de glicose e xilose nos hidrolisados obtidos a partir dos<br>experimentos iniciais de sacarificação do bagaço de cana de açúcar pré-tratado. (A):<br>Protocolo 1; (B): Protocolo 2; (C): Protocolo 3. ....                                                                                 | 69 |
| <b>Figura 20</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade de<br>endoglucanase (A) e $\beta$ -glicosidase (B) obtidas pelo fungo <i>P. stipata</i> SC 04.....                                                                                                                                   | 73 |
| <b>Figura 21</b> – Superfícies de resposta para as atividades de endoglucanase (A) e $\beta$ -<br>glicosidase (B), presentes no extrato enzimático de <i>P. stipata</i> SC 04, em função das<br>variáveis pH e temperatura, empregando-se delineamento fatorial do tipo face<br>centrada $2^3$ . ....                       | 75 |
| <b>Figura 22</b> – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das<br>variáveis pH e Temperatura no delineamento fatorial do tipo face centrada $2^3$<br>empregado na caracterização da endoglucanase (A) e $\beta$ -glicosidase (B), utilizando-se<br>o extrato enzimático de <i>P. stipata</i> SC 04..... | 76 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 23</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na atividade de endoglucanase (A) e $\beta$ -glicosidase (B) obtidas pelo fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.                                                                                                                                                   | 79 |
| <b>Figura 24</b> – Superfícies de resposta para as atividades de endoglucanase (A) e $\beta$ -glicosidase (B), presentes no extrato enzimático de fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01, em função das variáveis pH e temperatura, empregando-se delineamento fatorial do tipo face centrada $2^3$ .                                         | 81 |
| <b>Figura 25</b> – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis pH e Temperatura sobre as atividades de endoglucanase (A) e $\beta$ -glicosidase (B) presentes no extrato enzimático de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.                                                                                        | 82 |
| <b>Figura 26</b> – Efeito do pH sobre a estabilidade das atividades de endoglucanase e $\beta$ -glicosidase presentes nos extratos enzimáticos dos fungos <i>P. stipata</i> SC 04 (A) e <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 (B) (-■- Endoglucanase; -●- $\beta$ -glicosidase).                                                                   | 83 |
| <b>Figura 27</b> – Efeito da temperatura sobre a estabilidade das atividades de endoglucanase e $\beta$ -glicosidase obtidas pelos fungos <i>P. stipata</i> SC 04 (A) e <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 (B)                                                                                                                                  | 84 |
| <b>Figura 28</b> – Efeito de glicose (A) e etanol (B) sobre as atividades das $\beta$ -glicosidases presentes nos extratos enzimáticos dos fungos <i>P. stipata</i> SC 04 e <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01.                                                                                                                                 | 86 |
| <b>Figura 29</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis carga de bagaço, carga de endoglucanase e carga de Tween 80 na concentração de glicose obtida a partir dos experimentos de sacarificação empregando o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo1.                                                                 | 89 |
| <b>Figura 30</b> – Superfícies de resposta para concentração de glicose empregando-se o extrato enzimático produzido pelo fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04 – Protocolo 1, em função das variáveis carga de bagaço e carga de enzima endoglucanase (A), Tween 80 e carga de bagaço (B), Tween 80 e carga de enzima endoglucanase (C). | 91 |
| <b>Figura 31</b> – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de bagaço, carga de Endoglucanase e surfactante Tween 80 no planejamento composto central rotacional para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o extrato enzimático do fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1. | 92 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 32</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis temperatura, tempo e agitação na concentração de glicose obtida a partir dos experimentos de sacarificação empregando o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1.....                                                                     | 94  |
| <b>Figura 33</b> – Superfícies de resposta da concentração de glicose obtida nos experimentos de sacarificação empregando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1, em função das variáveis Agitação e Temperatura (A), Tempo e Temperatura (B), Tempo e Agitação (C). .....                        | 96  |
| <b>Figura 34</b> – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis Temperatura, Agitação e Tempo no delineamento fatorial do tipo face centrada para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o extrato enzimático do fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1. ....     | 97  |
| <b>Figura 35</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis sobre a concentração de glicose empregando-se delineamento composto central rotacional na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04. ....                                                 | 100 |
| <b>Figura 36</b> – Superfície de resposta para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço e Tween 80, empregando-se delineamento composto central rotacional na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04.....                                 | 101 |
| <b>Figura 37</b> – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de bagaço e carga de Tween 80 no DCCR para a otimização das condições de sacarificação utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 2.....                                                             | 102 |
| <b>Figura 38</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis físicas na concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04 – Protocolo 2.....                                                                                                             | 104 |
| <b>Figura 39</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis na concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico ..                                                                                                                                                             | 107 |
| <b>Figura 40</b> – Superfície de resposta para concentração de glicose em função das variáveis carga de bagaço pré-tratado e Tween 80, empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 <sup>2</sup> na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01. .... | 108 |
| <b>Figura 41</b> – Perfis dos valores previstos/otimizados e de desejabilidade das variáveis carga de bagaço e carga de Tween 80 no DCCR 2 <sup>2</sup> para a otimização das                                                                                                                                           |     |

|                                                                                                                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| condições de sacarificação utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 no Protocolo 2. ....                                                                                                                | 109 |
| <b>Figura 42</b> – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados das variáveis físicas na concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 – Protocolo 2. .... | 112 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> – Fungos endofíticos utilizados e plantas hospedeiras a partir das quais foram obtidos.....                                                                                                                             | 43 |
| <b>Tabela 2</b> – Misturas de substratos utilizadas para o cultivo dos fungos, por FES, a 28 °C, por 8 dias.....                                                                                                                        | 45 |
| <b>Tabela 3</b> – Valores codificados e reais utilizados no planejamento fatorial fracionado do tipo face centrada 2 <sup>2</sup> , para estudo do efeito do pH e temperatura sobre a atividade de endoglucanases e β-glicosidasas..... | 51 |
| <b>Tabela 4</b> – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2 <sup>3</sup> empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC 04.....                                  | 53 |
| <b>Tabela 5</b> – Delineamento fatorial do tipo face centrada 2 <sup>3</sup> empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC04.....                                       | 54 |
| <b>Tabela 6</b> – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 <sup>2</sup> empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC04.....                                   | 54 |
| <b>Tabela 7</b> - Delineamento fatorial do tipo face centrada 2 <sup>3</sup> empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC04.....                                       | 55 |
| <b>Tabela 8</b> – Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 <sup>2</sup> empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01. ....                         | 55 |
| <b>Tabela 9</b> - Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 <sup>3</sup> empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01. ....                         | 56 |
| <b>Tabela 10</b> – Composição (%) de celulose, hemicelulose (com base em xilana) e lignina dos substratos utilizados.....                                                                                                               | 59 |
| <b>Tabela 11</b> – Substratos selecionados para cada fungo e respectivas atividades enzimáticas obtidas pelos cultivos por FES, a 28°C, por 8 dias.....                                                                                 | 65 |
| <b>Tabela 12</b> – Composição (%) de celulose, hemicelulose (com base em xilana) e lignina do bagaço de cana-de-açúcar. ....                                                                                                            | 67 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 13</b> – Ensaios do delineamento fatorial do tipo face centrada 2 <sup>3</sup> , em níveis codificados e reais das variáveis pH e temperatura, obtendo-se como resposta as atividades de endoglucanase e β-glicosidase do extrato enzimático de <i>P. stipata</i> SC 04. ....         | 72 |
| <b>Tabela 14</b> – Análise de variância (ANOVA) para a atividade da endoglucanase de <i>P. stipata</i> SC 04.....                                                                                                                                                                               | 73 |
| <b>Tabela 15</b> – Análise de variância (ANOVA) para a atividade da β-glicosidase de <i>P. stipata</i> SC 04.....                                                                                                                                                                               | 74 |
| <b>Tabela 16</b> – Ensaios do delineamento fatorial do tipo face centrada 2 <sup>3</sup> , em níveis codificados e reais das variáveis pH e temperatura, obtendo-se como resposta as atividades de endoglucanase e β-glicosidase do extrato enzimático de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01. .... | 78 |
| <b>Tabela 17</b> – Análise de variância (ANOVA) para a atividade de endoglucanase de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01. ....                                                                                                                                                                      | 79 |
| <b>Tabela 18</b> – Análise de variância (ANOVA) para a atividade da β-glicosidase de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01. ....                                                                                                                                                                      | 80 |
| <b>Tabela 19</b> – Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2 <sup>3</sup> , em níveis codificados e reais, empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo <i>P. stipata</i> SC 04. ....                                                       | 88 |
| <b>Tabela 20</b> – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose obtida nos experimentos de sacarificação empregando o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1. ....                                                                                                         | 90 |
| <b>Tabela 21</b> – Delineamento fatorial do tipo face centrada 2 <sup>3</sup> , em níveis codificados e reais, empregado nos experimentos de sacarificação segundo o Protocolo 1, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04. ....                                                | 93 |
| <b>Tabela 22</b> – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose obtida nos experimentos de sacarificação empregando o fungo <i>P. stipata</i> SC 04 no Protocolo 1. ....                                                                                                         | 95 |
| <b>Tabela 23</b> – Ensaios do delineamento composto central rotacional, em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados. ....    | 99 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 24</b> – Análise de variância (ANOVA) para a liberação de glicose empregando-se delineamento composto central rotacional na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04. ....                                                                        | 100 |
| <b>Tabela 25</b> – Ensaios do delineamento fatorial do tipo face centrada 2 <sup>3</sup> , em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados. ....  | 103 |
| <b>Tabela 26</b> – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>P. stipata</i> SC 04 – Protocolo 2. ....                                                                                                                                   | 105 |
| <b>Tabela 27</b> – Ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 <sup>2</sup> , em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados. .... | 106 |
| <b>Tabela 28</b> – Análise de variância (ANOVA) para a liberação de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 – Protocolo 2. ....                                                                                                                              | 107 |
| <b>Tabela 29</b> – Ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2 <sup>3</sup> , em níveis codificados e reais, empregado na sacarificação segundo o Protocolo 2, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01, obtendo-se como resposta a concentração de glicose nos hidrolisados. .... | 111 |
| <b>Tabela 30</b> – Análise de variância (ANOVA) para a concentração de glicose empregando enzimas produzidas pelo fungo endofítico <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01 – Protocolo 2. ....                                                                                                                           | 112 |
| <b>Tabela 31</b> – Comparação da concentração de glicose nos hidrolisados obtidos pela sacarificação enzimática do bagaço de cana pré-tratado.....                                                                                                                                                               | 114 |
| <b>Tabela 32</b> – Açúcares presentes antes e após o experimento de fermentação alcoólica. ....                                                                                                                                                                                                                  | 115 |

## SUMÁRIO

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                        | <b>21</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                          | <b>24</b> |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                             | <b>26</b> |
| <b>3.1 Cana-de-açúcar e produção de etanol.....</b>                              | <b>26</b> |
| <b>3.2 Biomassa lignocelulósica.....</b>                                         | <b>27</b> |
| 3.2.1 Celulose .....                                                             | 29        |
| 3.2.2 Hemicelulose .....                                                         | 31        |
| 3.2.3 Lignina .....                                                              | 32        |
| <b>3.3 Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos .....</b>       | <b>34</b> |
| <b>3.4 Produção de enzimas de degradação de material vegetal .....</b>           | <b>35</b> |
| 3.4.1 Enzimas do complexo celulolítico .....                                     | 36        |
| <b>3.5 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos .....</b>                    | <b>37</b> |
| 3.5.1 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino .....                                 | 39        |
| <b>3.6 Sacarificação enzimática de resíduos lignocelulósicos .....</b>           | <b>39</b> |
| 3.6.1 Fatores que afetam a sacarificação enzimática .....                        | 40        |
| <b>3.7 Fermentação alcoólica de hidrolisado celulósico .....</b>                 | <b>41</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                | <b>43</b> |
| <b>4.1 Microrganismos.....</b>                                                   | <b>43</b> |
| <b>4.2 Produção das celulasas por fermentação em estado sólido (FES) .....</b>   | <b>43</b> |
| <b>4.3 Determinação das atividades enzimáticas .....</b>                         | <b>45</b> |
| 4.3.1 Endoglucanase .....                                                        | 45        |
| 4.3.2 Exoglucanase .....                                                         | 46        |
| 4.3.3 $\beta$ -glicosidase .....                                                 | 46        |
| 4.3.4 Fpase .....                                                                | 47        |
| 4.3.5 Xilanase .....                                                             | 47        |
| 4.3.6 $\beta$ -xilosidase .....                                                  | 48        |
| <b>4.4 Pré-tratamento hidrotérmico alcalino do bagaço de cana-de-açúcar.....</b> | <b>48</b> |

|                                                                                                                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.5 Caracterização química dos bagaços <i>in natura</i> e pré-tratado por NaOH</b>                                                                                           | <b>48</b> |
| <b>4.6 Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado</b>                                                                                                     | <b>48</b> |
| 4.6.1 Protocolo 1 de sacarificação                                                                                                                                              | 49        |
| 4.6.2 Protocolo 2 de sacarificação                                                                                                                                              | 49        |
| 4.6.3 Protocolo 3 de sacarificação                                                                                                                                              | 49        |
| <b>4.7 Análise açúcares, etanol e inibidores por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b>                                                                            | <b>50</b> |
| <b>4.8 Caracterização físico-química de endoglucanases e <math>\beta</math>-glicosidases presentes nos extratos de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM01 e <i>P. stipata</i> SC 04</b> | <b>51</b> |
| 4.8.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática                                                                                                                | 51        |
| 4.8.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas                                                                                                            | 52        |
| 4.8.3 Efeito de glicose e etanol sobre as atividades de $\beta$ -glicosidases                                                                                                   | 52        |
| <b>4.9 Delineamentos experimentais empregados visando a otimização da sacarificação do bagaço pré-tratado</b>                                                                   | <b>52</b> |
| 4.9.1 Protocolo 1 de sacarificação utilizando o extrato de <i>Phomopsis stipata</i> SC 04                                                                                       | 53        |
| 4.9.2 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o fungo de <i>Phomopsis stipata</i> SC 04                                                                                     | 54        |
| 4.9.3 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o extrato de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01                                                                                  | 55        |
| <b>4.10 Fermentação alcoólica</b>                                                                                                                                               | <b>56</b> |
| <b>4.11 Análise estatística</b>                                                                                                                                                 | <b>57</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                                                                 | <b>58</b> |
| <b>5.1 Avaliação da produção das enzimas pelo cultivo dos fungos por FES</b>                                                                                                    | <b>58</b> |
| <b>5.2 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratado</b>                                                                                            | <b>66</b> |
| <b>5.3 Sacarificação enzimática do bagaço de cana-açúcar</b>                                                                                                                    | <b>68</b> |
| <b>5.4 Caracterização físico-química das celulasas</b>                                                                                                                          | <b>71</b> |
| 5.4.1 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas de <i>P. stipata</i> SC 04                                                                                    | 71        |
| 5.4.2 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas de <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01                                                                            | 77        |
| 5.4.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade das enzimas dos fungos <i>P. stipata</i> SC 04 e <i>Botryosphaeria</i> sp. AM 01                                       | 83        |

|                                                                                                                      |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.4.4 Efeito de glicose e etanol sobre as atividades das $\beta$ -glicosidasas.....                                  | 85         |
| <b>5.5 Delineamentos experimentais empregados para a otimização da<br/>sacarificação do bagaço pré-tratado .....</b> | <b>87</b>  |
| 5.5.1 Protocolo 1 de sacarificação utilizando-se o extrato de <i>Phomopsis stipata</i><br>SC 04.....                 | 87         |
| 5.5.2 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o fungo <i>Phomopsis stipata</i> SC<br>04.....                     | 98         |
| 5.5.3 Protocolo 2 de sacarificação, utilizando-se o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp. AM<br>01.....                    | 105        |
| 5.5.4 Seleção do hidrolisado a ser utilizado na fermentação alcoólica .....                                          | 114        |
| <b>5.6 Análise de inibidores e ensaios de fermentação alcoólica .....</b>                                            | <b>114</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES .....</b>                                                                                            | <b>117</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                              | <b>118</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica tem sido reconhecida mundialmente como fonte sustentável de açúcares com grande potencial para a utilização na produção de biocombustíveis (HIMMEL et al., 2007), entre os quais o etanol celulósico ou de segunda geração, representando assim uma importante alternativa para a obtenção de energia renovável (KUHAD et al., 2016).

O bagaço de cana é um subproduto lignocelulósico gerado na indústria sucroalcooleira durante a extração do caldo de cana (DIAS et al., 2012), sendo considerado uma importante e eficaz biomassa para produção de etanol de segunda geração. É composto por aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Apresenta pequenas quantidades de pectina, proteínas, minerais e compostos de baixo peso molecular, além de apresentar baixo teor de cinzas (em torno de 2,4%), o que representa uma grande vantagem para sua bioconversão por microrganismos quando comparado com outros resíduos lignocelulósicos (PANDEY et al., 2000).

Os açúcares fermentescíveis podem ser obtidos a partir do bagaço de cana por hidrólise química ou enzimática de seus principais polissacarídeos constituintes, celulose e hemicelulose. Especialmente em relação à celulose, alguns fatores restringem a eficácia da hidrólise enzimática, como a recalcitrância do bagaço, representada principalmente pela presença da lignina, a qual dificulta o acesso das celulasas aos seus substratos. Além disso, a cristalinidade da celulose também é um fator limitante à ação das celulasas. Assim, uma etapa de pré-tratamento faz-se necessária para modificar a estrutura da lignina ou removê-la, bem como diminuir a cristalinidade da celulose, aumentando a eficiência da de hidrólise enzimática (FERNANDES et al., 2009; HOANG et al., 2015; WANG et al., 2016).

Vários pré-tratamentos tem sido empregados para esta finalidade. O pré-tratamento hidrotérmico, também chamado de auto-hidrólise, utiliza água sob temperaturas elevadas (120-260°C) como meio de reação (CARVALHO et al., 2015). A eficácia deste método pode ser aumentada com o emprego de agentes deslignificantes, como NaOH, que contribuem para variações de pH favorecendo a desestruturação da fibra vegetal (CARVALHO et al., 2015; GAO et al., 2013; MARYANA et al., 2014). O pré-tratamento hidrotérmico tem sido relatado por facilitar

a posterior hidrólise enzimática da celulose, pois não há elevada geração de produtos inibidores da fermentação (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Além da escolha de um método de pré-tratamento que não leve à perda de celulose, não seja oneroso e que não comprometa a fermentação alcoólica pela geração de inibidores, a obtenção de celulasas eficientes e a baixo custo é essencial para tornar o processo de obtenção de etanol de segunda geração economicamente viável (SIMS et al., 2010). A obtenção de celulasas pelo cultivo de microrganismos por fermentação em estado sólido (FES) tem sido uma importante alternativa para produção dessas enzimas a baixo custo, uma vez que há possibilidade de se utilizar como substratos resíduos agrícolas e agroindustriais abundantes, amplamente disponíveis e baratos (AMANDE et al., 2013; CHILIVERI; KOTI; LINGA, 2016; VASANTHI; MEENAKSHISUNDARAM, 2012).

As celulasas podem ser produzidas por muitos microrganismos, especialmente pelos fungos filamentosos quando cultivados por FES em substratos lignocelulósicos (MAEDA et al., 2013). Dentre os fungos filamentosos, tem se destacado os endofíticos, por possuírem potencial de produção de enzimas de degradação de material vegetal, entre as quais as celulasas (ZHENG et al., 2015). Constituem um grupo de organismos muito diversificado e estão presentes na maioria (se não em todas) das plantas de ecossistemas naturais, sem provocar sintomas externos (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006). Desta forma, fungos endofíticos tem despertado interesse como novas fontes de celulasas pois, uma vez que colonizam os tecidos vegetais, podem produzir enzimas com características peculiares e interessantes do ponto de vista do ataque à celulose. Estudos envolvendo prospecção de celulasas pelo cultivo dos fungos endofíticos por fermentação em estado sólido (FES) são pouco frequentes e abordam a produção por alguns gêneros mais estudados. Desta forma, é importante a busca por gêneros não comumente citados na literatura (KAPOOR et al., 2010).

O complexo celulolítico microbiano é composto pelas enzimas endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases. Endoglucanases ou carboximetilcelulasas (CMCases) (EG, endo-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4) atuam sobre a celulose liberando glicooligossacarídeos, diminuindo o grau de polimerização da celulose, facilitando a ação das exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4- $\beta$ -D-glucan cellobiodehydrolase, EC 3.2.1.91). Estas, por sua vez, hidrolisam as ligações glicosídicas a partir das extremidades redutoras

(CBH I) e não redutoras (CBH II) das cadeias de celulose, liberando unidades de celobiose. As  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21) então hidrolisam celobiose e pequenos oligossacarídeos, liberando glicose (LYND et al., 2002).

Em busca da melhoria dos processos, tem sido citado em vários trabalhos o uso de ferramentas de planejamento experimental para otimizar a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar utilizando-se extratos enzimáticos com atividade de celulasas, além de outras enzimas de degradação de lignocelulose (MAURYA et al., 2013; MORANDO et al., 2014; MYAT; RYU, 2014). Esta metodologia é interessante, pois permite avaliar a interação entre as variáveis estudadas e, na maioria das vezes, otimizar o processo, gerando uma superfície de resposta a partir de um número reduzido de experimentos ( RODRIGUES; IEMMA, 2014; SINDHU et al., 2014). As principais variáveis estudadas são carga de enzima, carga de substrato, agitação, surfactantes como Tween 80, temperatura e tempo (ARIAS et al., 2016; MORANDO et al., 2014; MORETTI et al., 2014a; QING; WYMAN, 2010) .

Considerando-se o exposto, no presente trabalho foi avaliada a influência de diferentes substratos na produção de celulasas por 8 fungos endofíticos, por FES, bem como foram realizados experimentos de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar submetido a pré-tratamento hidrotérmico alcalino. Os experimentos de sacarificação envolveram o uso dos extratos enzimáticos obtidos bem como o emprego de todo o material fermentado (substratos + crescimento fúngico), excluindo-se a etapa de extração das enzimas. Foram ainda realizados experimentos de otimização da sacarificação do bagaço pré-tratado, utilizando-se metodologias de planejamento experimental e superfície de resposta.

Nigam (2001) ao estudar a produção de etanol a partir de hidrolisado de palha de trigo por *Pichia stipitis* observou um consumo de 20,5 % de açúcares redutores, considerado baixo devido principalmente à presença de componentes tóxicos que inibem o crescimento e a atividade de fermentação da levedura.

Pereira et al. (2016) também realizou a fermentação de hidrolisado obtido através de enzimas produzidas pelo fungo *M. thermophila* JCP 1-4, onde utilizou-se 10% de carga de bagaço pré-tratado e obteve-se 3,15 g/L de etanol a partir de 10,19 g/L de glicose, que são semelhantes as proporções do presente trabalho.

## 6 CONCLUSÕES

Destaca-se primeiramente a importância dos resultados obtidos como pesquisa básica como o estudo da produção de celulases pelos gêneros estudados bem como a hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos que são pouco apresentados na literatura.

Pelos dados apresentados, conclui-se que todos fungos avaliados são potenciais produtores de ao menos uma das enzimas do complexo celulolítico. A exploração de diferentes materiais lignocelulósicos como substratos para o cultivo dos fungos mostrou que alguns deles são capazes de induzir significativamente a produção das enzimas por alguns fungos, permitindo a escolha do melhor substrato. Observou-se também que grandes quantidades de enzimas (celulases) não necessariamente levam a melhor sacarificação enzimática.

Os resultados dos experimentos de sacarificação indicaram que as enzimas de *Phomopsis stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01 levaram aos melhores resultados em termos de concentração de glicose a partir do bagaço pré-tratado. As enzimas de *Phomopsis stipata* SC 04 se mostraram eficientes nos dois Protocolos de sacarificação durante o delineamento experimental, aumentando significativamente a concentração de glicose liberada o que se conclui que a avaliação dos parâmetros de sacarificação se mostrou uma importante ferramenta para esse processo.

Cabe ressaltar que os fungos *P. stipata* SC 04 e *Botryosphaeria* sp. AM 01 obtiveram significativas concentrações de glicose ao utilizar-se o Protocolo 2 de sacarificação que não envolve a etapa de extração das enzimas, indicando que a escolha desse Protocolo foi importante.

As  $\beta$ -glicosidases dos mesmos apresentaram relativamente uma boa estabilidade quanto à presença de glicose e etanol, características desejáveis quando se visa aplicações industriais;

Assim o uso de enzimas microbianas na sacarificação do bagaço de cana submetido a pré-tratamento hidrotérmico com NaOH levou a obtenção de hidrolisado com características adequadas para a utilização como fonte de glicose para produção de etanol celulósico, o que permitiu que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* realizasse o consumo da glicose bem como a produção de etanol durante a fermentação.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, S. et al. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 1411-1419, 2009.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- AMANDE, T. et al. Production and partial characterization of pectinases from mango peels by *Aspergillus tamarii*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 3, n. 1, p. 59-62, 2013.
- ANDRIĆ, P. et al. Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 280-297, 2009.
- ARIAS, J. M. et al. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies. **Biotechnology Progress**, v. 32, n. 5, p. 1222-1229, 2016.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.
- BARBAGALLO, R. N. et al. Selection, characterization and comparison of  $\beta$ -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 58-66, 2004.
- BHATIA, Y.; MISHRA, S.; BISARIA, V. S. Microbial  $\beta$ -glucosidases: cloning, properties, and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 375-407, 2002.
- BINOD, P. et al. Industrial enzymes - present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, p. 271-286, 2013.
- BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.
- BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. da. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 173-181, 2015.
- CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.

CARVALHO, D. M. de. et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118-126, 2015.

CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 3, p. 225-226, 1939.

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

CHILIVERI, S. R.; KOTI, S.; LINGA, V. R. Retting and degumming of natural fibers by pectinolytic enzymes produced from *Bacillus tequilensis* SV11-UV37 using solid state fermentation. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 559-576, 2016.

COUGHLAN, M. P. .; LJUNGDAHL, L. G. Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme systems. **FEMS Symposium-Federation of European Microbiological Societies**, n. 43, p. 11-30, 1988.

COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2005.

DAROIT, D. J. **Caracterização de uma beta-glicosidase de *Monascus purpureus***. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DAS, A.; GHOSH, U. Solid-state fermentation of waste cabbage by *Penicillium notatum* NCIM NO-923 for production and characterization of cellulases. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 68, n. 8, p. 714-718, 2009.

DASHTBAN, M. et al. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 302-309, 2010.

DIAS, M. O. S. et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 152-161, 2012.

EK, M.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. Pulp and paper chemistry and Technology. In:\_\_\_\_\_. **Pulping chemistry and technology**. Berlim: Walter de Gruyter GmbH & Co, 2009. p. 297-333.

ELISASHVILI, V. et al. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot *Basidiomycetes* isolated from the forests of Georgia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 331-339, 2009.

ESPIRITO SANTO, M. C. do. **Otimização de estratégias de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

- FASANELLA, C. C. **Ação das enzimas ligninolíticas produzidas por *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. em bagaço de cana-de-açúcar tratado quimicamente.** 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- FELBY, C. et al. Cellulose - water interactions during enzymatic hydrolysis as studied by time domain NMR. **Cellulose**, v. 15, p. 703-710, 2008.
- FENG, Y.; JIANG, J. X.; ZHU, L. W. Recent developments in activities, utilization and sources of cellulase. **Forestry Studies in China**, v. 11, n. 3, p. 202-207, 2009.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions.** 2nd ed. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDES, T. V. et al. Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 9, p. 2575-2579, 2009.
- GANESH, K.; JOSHI, J. B.; SAWANT, S. B. Cellulase deactivation in a stirred reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 2, p. 137-141, 2000.
- GAO, Y. et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396-400, 2013.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GIESE, E. C. et al. Enzymatic saccharification of acid-alkali pretreated sugarcane bagasse using commercial enzyme preparations. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 7, p. 1266-1272, 2013.
- GOTTSCHALK, L. M. F.; OLIVEIRA, R. A.; BON, E. P. da S. Cellulases, xylanases, b-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. **Biochemical Engineering Journal**, v. 51, p. 72-78, 2010.
- GUPTA, V. K. et al. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.
- GURGEL, L. V. A. **Mercerização e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: preparação de novos materiais quelantes para a adsorção de Pb (II), Cd (II), Cr (VI) e Cu (II).** 2007. 179 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Instituto de Ciências exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.
- 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**, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.

HAMES, B. et al. **Preparation of samples for compositional analysis**. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008. 12 p. Technical Report NREL/TP-510-42620.

HARMSSEN, P. F. H. et al. **Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass**. Wageningen: Wageningen UR Food & Biobased Research, 2010.

HASSUANI, S. J.; LEAL, M. R. L. V.; MACEDO, I. de C. **Biomass power generation sugar cane bagasse and trash**. Piracicaba: PNUD-CTC, 2005.

HELLE, S. S.; DUFF, S. J. B.; COOPES, D. G. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 611-617, 1993.

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras**. 2010. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental e Agrícola) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HOANG, N. V. et al. Potential for genetic improvement of sugarcane as a source of biomass for biofuels. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 2015. doi:10.3389/fbioe.2015.00182.

J. RETTENMAIER & SÖHNE GMBH + CO KG. **Innovative features of JRS products**. Figure: Fibrillar structure of a cellulose fiber. Rosenberg. Disponível em: <[http://www.jrs.eu/jrs\\_en/innovative-functionality/functions-jrs-products/](http://www.jrs.eu/jrs_en/innovative-functionality/functions-jrs-products/)>. Acesso em: 04 set. 2017.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1-5, 2000.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, n. 3, p. 119-134, 2007.

KAPOOR, N. et al. Production of cellulase enzyme by chaetomium sp. using wheat straw in solid state fermentation. **Research Journal of Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 1199-1206, 2010.

KIM, J.; YUN, S. Discovery of cellulose as a smart material. **Macromolecules**, v. 39, p. 4202-4206, 2006.

KIRALLY, C., LEIMER, K. H. E, ROSSELL, C. E. V. *Fermentability of hydrolyzate from sugarcane bagasse*. Report on Semester Project, March-August, 2003.

KLEMM, D. et al. **Comprehensive cellulose chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 1998.

KLEMM, D. et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. **International sugar journal**, v. 106, p. 147-150, 2004.

KOGEL, K.-H.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.

KOPPRAM, R. et al. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 46-53, 2014.

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

KRISTENSEN, J. B. et al. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 888-895, 2007.

KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249-272, 2016.

KURASHIMA, K. et al. Enzymatic  $\beta$ -glycosidation of primary alcohols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, n. 1/2, p. 87-98, 2003.

LEITE, R. S. R. et al. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 391-395, 2008.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

LIU, W.-J.; JIANG, H.; YU, H.-Q. Thermochemical conversion of lignin to functional materials: a review and future directions. **Green Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 4888-4907, 2015.

LOTONG, N.; SUWANARIT, P. Production of soy sauce koji mold spore inoculum in plastic bags. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1224-1226, 1983.

LUCAS, R. et al.  $\beta$ -glucosidase from *chalaria p aradoxa* CH32: purification and properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3698-3703, 2000.

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/58, p. 741-761, 1996.

LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 777-793, 1999.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. New York: Prentice Hall International, 2004.

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

MAEDA, R. N. et al. 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**, v. 163, n. 1, p. 38-44, 2013.

MAITAN-ALFENAS, G. P. et al. The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: a comparative study. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 670-676, 2015.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, v. 54, p. 267-286, 1976.

MARQUES, N. P. **Prospecção de enzimas de degradação de material vegetal em fungos endofíticos**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

MARYANA, R. et al. Alkaline pretreatment on sugarcane bagasse for bioethanol production. **Energy Procedia**, v. 47, p. 250-254, 2014.

MAURYA, D. P. et al. Optimization of enzymatic saccharification of microwave pretreated sugarcane tops through response surface methodology for biofuel. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 992-996, 2013.

MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 150-158, 2014.

MERHEB-DINI, C. et al. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 87-93, 2010.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 324-329, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosaiicyic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORANDO, L. E. N. et al. Statistical optimization of alkaline hydrogen peroxide pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic saccharification with Tween 80 using response surface methodology. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 4, n. 1, p. 15-23, 2014.

MORETTI, M. M. de S. et al. Fibrolytic enzyme production of *Myceliophthora thermophila* M.7.7. using inexpensive carbon sources and mineral nutrients. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 52, p. 4013-4019, 2014a.

MORETTI, M. M. de S. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, v. 122, p. 189-195, 2014b.

MORETTI, M. M. de S. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1062-1071, 2012.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MYAT, L.; RYU, G. Optimization of enzyme dosages for hydrolysis of destarched corn fiber subjected to acid and alkaline pretreatments for improved fermentable sugar yield. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 50, p. 791-802, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2014.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 17-27, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PARK, Y. C.; KIM, J. S. Comparison of various alkaline pretreatment methods of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 47, p. 31-35, 2012.

PEREIRA, J. de C. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos/termotolerantes produtores de celulases e xilanases e aplicação dos extratos enzimáticos na sacarificação**. 2013. 121 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

PEREIRA, J. de C. et al. Thermophilic fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939, 2015.

PEREIRA, J. de C. et al. Saccharification of ozonated sugarcane bagasse using enzymes from *Myceliophthora thermophila* JCP 1-4 for sugars release and ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 122-129, 2016.

PIROTA, R. D. P. B.; BALEEIRO, F. C. F.; FARINAS, C. S. Saccharification of biomass using whole solid-state fermentation medium to avoid additional separation steps. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 6, p. 1430-1440, 2013.

QING, B. Y. Q.; WYMAN, C. E. Impact of surfactants on pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5941-5951, 2010.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Quimica Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 92-102, 2016.

RIBEIRO, R. D. X. et al. Capim-tanzânia ensilado com níveis de farelo de trigo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 631-640, 2008.

RODRIGUEZ-DELGADO, M. A. et al. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and uorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 2, p. 249-257, 2001.

ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S. V.; ROTHMAN, H. **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Ed. Unicamp, 2005.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quimica nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SARRY, J. E.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 509-521, 2004.

SCHEUFELE, F. B. et al. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engevista**, v. 14, n. 3, p. 310-321, 2012.

SCHWARTZ, S. A commonwealth within itself. the early brazilian sugar industry, 1550-1670. **Revista de Indias**, v. 65, n. 233, p. 79-116, 2005.

SILVA, V. de C. T. da et al. Effect of pH, temperature, and chemicals on the endoglucanases and  $\beta$ -glucosidases from the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F.2.1.4. obtained by solid-state and submerged cultivation. **Biochemistry Research International**, v. 2016, 2016. doi:10.1155/2016/9781216.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1570-1580, 2010.

SINDHU, R. et al. Physicochemical characterization of alkali pretreated sugarcane tops and optimization of enzymatic saccharification using response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 62, p. 362-368, 2014.

SINGH, R. et al. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p. 713-728, 2014.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SLUITER, A. et al. **Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples**. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008a. 11 p. Technical report NREL/TP-510-42623.

SLUITER, A. et al. **Determination of ash in biomass**. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2008b. 5 p. Technical report NREL/TP-510-42622.

SLUITER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2012. 15 p. Technical report NREL/TP-510-42618.

SOARES, I. B. et al. Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 3, p. 670-675, 2011.

SOCOL, C. R. et al. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SUHAS et al. Cellulose: a review as natural, modified and activated carbon adsorbent. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 1066-1076, 2016.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421-424, 2009.

SUN, S. et al. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49-58, 2016.

SUN, X. et al. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1/3, p. 119-128, 2008.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. **Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol**. *Biomass and Bioenergy*, 10(5/6):367-375, 1996.

SZENGYEL, ZSOLT. **Ethanol from wood cellulose enzyme production**. Sweden: Dept. of Chemical Engineering, Lund University, 2000. Doctoral dissertation.

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

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 2013.

TOMÁS-PEJÓ, E. et al. Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversion. In: \_\_\_\_\_. **Biofuels**: alternative feedstocks and conversion processes. Amsterdam: Elsevier, 2011. Chap. 7, p. 149-176.

TRAN, D.-T.; I, Y.-P.; LIN, C.-W. Developing co-culture system of dominant cellulolytic *Bacillus* sp. THLA0409 and dominant ethanolic *Klebsiella oxytoca* THLC0409 for enhancing ethanol production from lignocellulosic materials. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 762-769, 2013.

TRIANA, C. A. R. Energetics of Brazilian ethanol: comparison between assessment approaches. **Energy Policy**, v. 39, n. 8, p. 4605-4613, 2011.

VASANTHI, N. S.; MEENAKSHISUNDARAM, P. Optimization of pectinase enzyme production by using sour orange peel as substrate in solid state fermentation. **Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 3, p. 8-13, 2012.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol - safra 2016/2017**. 2016. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=1884&safra=2016%2F2017&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CR>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

WANDERLEY, M. C. de A. et al. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 448-453, 2013.

WANG, X. et al. Hydrolyzability of xylan after adsorption on cellulose: exploration of xylan limitation on enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 148, p. 362-370, 2016.

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**, v. 19, p. 1109-1117, 2003.

WOODWARD, J. Fungal and other beta-D-glucosidases their properties and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, p. 73-79, 1982.

XIAOBO, Z. et al. Medium optimization of carbon and nitrogen sources for the production of eucalyptene A and xyloketal A from *Xylaria* sp. 2508 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 293-298, 2006.

XIMENES, E. et al. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 170-176, 2010.

XU, H.; LI, B.; MU, X. Review of alkali-based pretreatment to enhance enzymatic saccharification for lignocellulosic biomass conversion. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 32, p. 8691-8705, 2016.

XU, J. et al. An ionic liquid tolerant cellulase derived from chemically polluted microhabitats and its application in in situ saccharification of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 166-173, 2014.

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751-774, 2016.

ZANOELO, F. F. et al. Beta-glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 2, p. 137-143, 2004.

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

ZHANG, Z.; SONG, J.; HAN, B. Catalytic transformation of lignocellulose into chemicals and fuel products in ionic liquids. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 10, p. 6834-6880, 2017.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 815-827, 2009.

ZHENG, Y.-K. et al. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 529-542, 2015.

ZHUANG, X. et al. Kinetic study of hydrolysis of xylan and agricultural wastes with hot liquid water. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 5, p. 578-582, 2009.