EDUARDO HENRIQUE MARTINS

POTENCIAL DE OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS A PARTIR DO FARELO DE CANOLA EMPREGANDO-SE AS β-GLICOSIDASES PRODUZIDAS POR *Penicillium glabrum*

MESTRADO EM BIOENERGIA

GUARAPUAVA-PR

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOENERGIA
ÁREA DE BIOCOMBUSTÍVEIS E ENERGIAS RENOVÁVEIS

POTENCIAL DE OBTENÇÃO DE AÇUCARES FERMENTESCÍVEIS A PARTIR DO FARELO DE CANOLA EMPREGANDO-SE AS β-GLICOSIDASES PRODUZIDAS POR *Penicillium glabrum*

Dissertação IV apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis e Co-produtos, para a obtenção do título de Mestre.

Eduardo Henrique Martins

Profa. Dra. Adriana Knob

Profa. Dra. Gilmara de Oliveira Machado

GUARAPUAVA-PR

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

EDUARDO HENRIQUE MARTINS

"Potencial de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir do farelo de canola empregando-se as β-glicosidases produzidas por Penicillium glabrum "

Dissertação aprovada em 08/03/2019 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioenergia, área de concentração em Biocombustíveis e Energias Renováveis, pela seguinte Banca Examinadora:

Profa. Dra. Adriana Knob, UNICENTRO
(Presidente)

Profa. Dra. Cristiane Alcantara dos Santos, CAMPO REAL
(Membro)

Prof. Dr. Edson Perez Guerra, UNICENTRO
(Membro)

Guarapuava-PR
2019

Impresso com recursos públicos por jpsilva na UNICENTRO

Dedico aos meus pais;

Amaro Martins e Maria Helena de Brito Martins

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo que Ele é, pela minha vida e por todo amparo diante das minhas dificuldades.

À Virgem Maria pelo cuidado materno e por ter sido minha fiel intercessora.

À minha querida família que sempre esteve presente nas minhas lutas e vitórias, apesar da distância. Ainda, por proverem todo o necessário a mim. Amo muito vocês!

À minha querida orientadora, professora Adriana Knob, que confiou no meu trabalho e que soube orientar com destreza, paciência e muita dedicação.

À minha coorientadora, professora Gilmara, que me auxiliou no momento mais difícil do mestrado, me fazendo enxergar o meu potencial e me auxiliando no que eu mais precisava.

À professora Cristiane Alcantara dos Santos e ao professor Edson Guerra por terem aceitado o convite para participarem da banca. Ainda, minha gratidão pelas correções e sugestões apontadas.

À professora Simone Andrea Pozza pelo incentivo, conselhos e por ter me apresentado o edital de mestrado do PPGB.

À técnica Maira Martins e à Aline Ratuchne, por terem tido paciência de ensinarem vários métodos e pelo o auxílio nos meus experimentos. Ainda, quero agradecer à Danieli, Jéssica, Mylena e Gabriela; integrantes do Laboratório de Microbiologia Aplicada, por todo auxílio e companheirismo.

À minha turma de mestrado: Bruna, Gideã, Tatiana, Taís, Leonardo, Maurício, Ana Paula, Letícia. Obrigado pela companhia nos estudos, caronas, lanches, e, principalmente, por aquela festa surpresa. Vocês não imaginam quanto me fez bem!

A todos do *Ministério Universidades Renovadas (MUR)*, em especial aos participantes do *Grupo de Oração Seu Amor é Demais* e *GPP Nova Aliança*. Obrigado por me darem todo apoio necessário e pela amizade. Também, em especial gostaria de agradecer ao Irineo Kelte e Cassiano Barboza por me hospedarem nos meus primeiros dias em Guarapuava e pela Bruna Simeoni por me auxiliar no meu primeiro dia nesta cidade.

Ao Pe. João Rocha por todos os conselhos e por toda formação humana, que refletiu no desempenho do mestrado.

À Camila Kulek e Daniele Bandeira pelas dicas de redação.

Ao professor Erivelton, Camilo, Douglas, Maurício, à Júlia e a todos os funcionários do Aterro Municipal de Guarapuava-PR, que muito me auxiliaram no meu primeiro projeto de mestrado.

À Dona Denize, senhor Alceu, Gabriela, Marina e Isa por me acolherem em Guarapuava e pela forte amizade construída durante estes dois anos.

Ao secretário do PPGB, José Eduardo, por todo auxílio nos assuntos administrativos e burocráticos, contribuindo para o melhor encaminhamento do mestrado.

Aos professores e coordenadores da UNICENTRO e universidades associadas ao PPGB, por todo auxílio. Ainda, o meu agradecimento a Allan Miotto, Adriano Luz, Marcelo Santos, Leonardo P. de Moraes, por me hospedarem quando precisei e por me auxiliarem quando estive na UTFPR, UEL e UEPG, cursando as disciplinas.

Aos professores Adriano Silverio, Paulo Roberto da Silva e Bruna Fagundes pelo auxílio e empréstimo de equipamentos necessários aos meus experimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e ao CNPq pelo projeto financiado (443953/2014-7)

"Coisas que os olhos não viram, nem os ouvidos ouviram, nem o coração humano imaginou (Is 64,4), tais são os bens que Deus tem preparado para aqueles que o amam."

I Coríntios, 2, 9

RESUMO

MARTINS, Eduardo Henrique. **Potencial de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir do farelo de canola empregando-se as β-glicosidases produzidas por *Penicillium glabrum*.** 2019. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava -PR. 2019.

As celulases, incluindo as β-glicosidases, são enzimas utilizadas na produção de bioetanol de segunda geração. Sua produção pode ocorrer a partir de fungos filamentosos, empregando-se uma fonte de carbono (substrato) para sua indução. Nesse sentido, a biomassa lignocelulósica, tal como farelos, bagaços e palhas, pode ser empregada como substratos alternativos. Atualmente, os elevados custos de obtenção dessas enzimas restringem sua utilização. Desta forma, a otimização do processo de produção das β-glicosidases a partir de resíduos agroindustriais pode reduzir os custos de obtenção desse biocombustível. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir do farelo de canola, empregando-se as β-glicosidases produzidas por *Penicillium glabrum.* Inicialmente, as condições ótimas para a produção de β-glicosidases por uma linhagem de *Penicillium glabrum* foram estabelecidas, empregando-se o farelo de canola (*Brassica campestris*) como substrato. Para tal, o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) aplicável à Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizado. Essas mesmas ferramentas estatísticas foram empregadas a fim de se estabelecer as melhores condições de hidrólise do farelo de canola pré-tratado quimicamente, empregando-se as β-glicosidases de *P. glabrum* produzidas sob condições otimizadas. Como resultado, o nível máximo de produção de β-glicosidases foi alcançado quando o fungo foi cultivado em pH ajustado para 6,0, concentração do substrato de 2% e o tempo de cultivo de 6,5 dias, correspondendo a 22,45 ± 1,04 U mL^{-1}. Os maiores níveis de açúcares fermentescíveis foram obtidos quando o processo de hidrólise foi conduzido a 65 ºC, pH 4,0, por 75 horas, empregando-se uma concentração de enzimas correspondente a 13,75 U g^{-1}. Sob essas condições otimizadas, os níveis de glicose corresponderam a 34,54 mg g^{-1} de substrato. Por meio dos resultados obtidos, conclui-se que farelo de canola é uma matéria-prima promissora, tanto para a produção de β-glicosidases a baixo custo, quanto para a obtenção de açúcares fermentescíveis, visando a produção do bioetanol.

Palavras-Chave: Enzimas celulolíticas, Fungos filamentosos, Hidrólise Enzimática, Resíduos Agroindustriais

ABSTRACT

MARTINS, Eduardo Henrique. **Achievement of fermentable sugars from canola meal using the β-glucosidases produced by *Penicillium glabrum*.** 2019. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) – Universidade Estadual do Centro Oeste, UNICENTRO. Guarapuava -PR. 2019.

Cellulases, including β-glucosidases, are used in the production of second-generation bioethanol. Its production can occur from filamentous fungi, using a source of carbon (substrate) for its induction. In this sense, lignocellulosic biomass, such as bran, bagasse and straw, can be used as alternative substrates. Currently, the high costs of obtaining these enzymes make their use unfeasible. Thus, the optimization of the production process of the β-glucosidases from agroindustrial residues can reduce the costs of obtaining this biofuel. The present study had the objective of evaluating the potential of obtaining fermentable sugars from canola meal, using the β-glucosidases produced by *Penicillium glabrum*. Initially, the optimal conditions for the production of β-glucosidases by a *Penicillium glabrum* strain were established, using canola meal (*Brassica campestris*) as substrate. To this end, the Rotational Compound Central Design (DCCR) applicable to the Response Surface Methodology (RSM) was used. These same statistical tools were used in order to establish the best hydrolysis conditions of the chemically pretreated canola meal using the *P. glabrum* β-glucosidases produced under optimized conditions. As a result, the maximum level of β-glucosidases production was reached when the fungus was cultured at pH adjusted to 6.0, substrate concentration of 2% and culture time of 6.5 days, corresponding to 22.45 ± 1.04 U mL^{-1}. Furthermore, the highest levels of fermentable sugars were obtained when the hydrolysis process was conducted at 65 °C, pH 4.0, for 75 hours, using an enzyme concentration corresponding to 13.75 U g^{-1}. Under these optimized conditions, glucose levels corresponded to 34.54 mg g^{-1} substrate. By means of the results obtained, it can be concluded that canola meal is a promising raw material, both for the production of low-cost β-glucosidases and for obtaining fermentable sugars, aiming the production of bioethanol.

Key-words: Cellulolytic enzymes, Filamentous fungi, Enzymatic Hydrolysis Agro-industrial waste

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura química das principais moléculas da parede celular vegetal. 14

Figura 2 Representação esquemática das enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose. .. 20

Figura 3 Representação esquemática da metodologia empregada. 24

Figura 4 Superfície de resposta para a produção de β-glicosidases por *P. glabrum*, quando cultivado em farelo de canola. Os gráficos demonstram a atividade β-glicosidásica (U ml^{-1}) em função do: A) pH x concentração do substrato; B) Tempo de crescimento (dias) x concentração do substrato e C) Tempo de crescimento (dias) x pH. 31

Figura 5 Superfícies de resposta para a produção de glicose após hidrólise enzimática do farelo de canola pelo extrato bruto de *P. glabrum*. Liberação de glicose (mg g^{-1}) em função do: A) pH x tempo;. B) Temperatura x tempo; C) Dosagem enzimática x tempo; D) Dosagem enzimática x Temperatura; E) pH x temperatura; F) pH x dosagem enzimática. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições experimentais e resultados do planejamento experimental referente à produção de β-glicosidase por *P. glabrum*.....28

Tabela 2 Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para β-glicosidase produzida por *P. glabrum* cultivado em farelo de canola, e os valores de R^2 e *F*-valor.....29

Tabela 3 Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de glicose a partir da hidrólise do farelo de canola (*Brassica campestris*). 33

Tabela 4 Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para glicose liberada a partir da hidrólise do farelo de canola (*B. campestris*) utilizando o filtrado bruto de *P. glabrum* rico em β-glicosidases, e os valores de R^2 e *F*-valor. 34

Tabela 5 Níveis de glicose obtidos a partir de diferentes resíduos agroindustriais, empregando-se extratos brutos fúngicos ricos em celulases. 39

SUMÁRIO

RESUMO **7**
ABSTRACT **8**
LISTA DE FIGURAS **9**
LISTA DE TABELAS **10**
1 - INTRODUÇÃO **12**
1.1 Parede Celular Vegetal e Biomassa Lignocelulósica 14
1.2 Matérias-primas empregadas na produção de etanol 15
1.3 Etapas para obtenção de açúcares fermentescíveis para produção de etanol celulósico 17
1.3.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica 18
1.3.2 Hidrólise enzimática dos açúcares redutores 19
1.4 Fungos filamentosos e a produção de enzimas 21
2 - OBJETIVOS **23**
2.1 Objetivo geral 23
2.2 Objetivos específicos 23
3 – METODOLOGIA **24**
3.1 Procedência do farelo de canola 24
3.2 Preparação do Substrato 24
3.3 Protocolo para obtenção dos extratos brutos fúngicos ricos em β-glicosidases 24
3.3.1 Manutenção das linhagens fúngicas 24
3.3.2 Obtenção das preparações enzimáticas 25
3.3.3 Determinação da atividade β-glicosidásica 25
3.3.4 Pré tratamento alcalino 26
3.3.5 Hidrólise enzimática do farelo de canola 26
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO **28**
4.1 Otimização da produção de β-glicosidases por *P. glabrum* utilizando a MSR 28
4.2 Hidrólise do farelo de canola pelo extrato bruto de *P. glabrum* 32
5 - CONCLUSÕES **40**
6 - REFERÊNCIAS **41**

1 - INTRODUÇÃO

No início do século XX, com a descoberta de novos campos de petróleo, a gasolina tornou-se a principal opção de combustível para os automóveis em nível mundial. Em 1970, com a crise do petróleo, a diversificação da matriz energética fora incentivada. Assim, o Brasil, considerado pioneiro no uso do etanol, já em 1975 contava com o Programa Proálcool, em resposta à crise. O programa passou por várias etapas até a inserção no mercado de automóveis modelos *flex*, os quais funcionam tanto com etanol hidratado quanto com gasolina, ou uma mistura dos dois em qualquer proporção. A invenção deste modelo de automóvel favoreceu a substituição de aditivos tóxicos à gasolina, como o tetraetil-chumbo e benzeno, além de reduzir as emissões de dióxido de carbono (LOPES et al., 2016). Dentre outras vantagens obtidas a partir do emprego do etanol combustível, destaca-se também a utilização de fontes renováveis, bem como a compensação das emissões de dióxido de carbono (CO_2) a partir do plantio da biomassa.

As fontes convencionais de matéria-prima para produção de etanol são provenientes das espécies de plantas sacaríneas e amiláceas, porém, faz-se necessário recorrer àquelas que não competem diretamente com os produtos alimentícios (GUPTA; VERMA, 2015). Em locais como os Estados Unidos e União Europeia isto já tem se tornado realidade com o uso de resíduos lignocelulósicos (bagaço da cana, palha de trigo, casca do eucalipto, etc.) para obtenção de etanol de segunda geração (EPA, 2014; EXECUTIVE SUMMARY OF THE IMPACT ASSESSMENT ON INDIRECT LAND USE CHANGE RELATED TO BIOFUELS AND BIOLIQUIDS, 2012).

Em nível mundial, o Brasil é o segundo maior produtor de etanol (RFA, 2018), com uma produção correspondente a 26,5 bilhões de litros entre os anos de 2016 e 2017, a partir da cana-de-açúcar (UNICA, 2017). Ainda, existem esforços governamentais de aumentar tal produção com a inserção de etanol de segunda geração no mercado a partir do bagaço da cana-de-açúcar (ANP, 2015). Desta forma, se faz necessária a busca por inovações na área, visando o desenvolvimento de processos biológicos baseados na produção de biocombustíveis celulósicos (LYND et al., 2017).

O incentivo por inovações tecnológicas relacionadas à produção do etanol de segunda geração no Brasil é interessante, visto que o país se destaca tanto pela produção de etanol, quanto pela produção agrícola. Nesse sentido, o setor agrícola dispõe de toneladas de resíduos agroindustriais, que podem ser empregados na produção de biocombustíveis.

Os resíduos lignocelulósicos são compostos basicamente de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e inorgânicos (SINGLA et al. 2013, SINGLA; IWASA; INUBUSHI, 2014; SINGLA, INUBUSHI, 2014, SINGLA et al. 2014). As proporções de cada um destes componentes químicos variam de acordo com o tipo do resíduo e influenciam a produção de bioetanol. Portanto, várias investigações sobre o potencial de produção de bioetanol já foram feitas com diversos resíduos. Porém, ainda são poucos os estudos com farelo de canola, especialmente em relação ao estabelecimento das melhores condições de hidrólise dessa biomassa. Por meio da utilização do farelo de canola na produção de etanol, consolida-se o fechamento do ciclo produtivo do óleo comestível e do biodiesel, obtidos a partir deste resíduo (GEORGE et al., 2010).

A bioconversão da celulose contida nos materiais lignocelulósicos em etanol de segunda geração passa por um processo que compreende quatro principais etapas: pré-tratamento, sacarificação, fermentação e destilação (REINA et al., 2016). O pré-tratamento pode ser físico, químico, biológico ou combinado (BHATIA et al., 2017). É nesta etapa que ocorre a desagregação da lignina. Assim, dentre os pré-tratamentos existentes estão incluídos a explosão a vapor, líquido-iônico, biológico, por micro-ondas e pré-tratamento alcalino e ácido (MAURYA, SINGLA, NEGI, 2015). A etapa de sacarificação envolve a hidrólise (ácida ou enzimática) dos polímeros (LOHMEIER-VOGEL et al., 1998). Dentre os fatores que influenciam na eficiência desta etapa estão incluídos a porosidade (área superficial de contato) dos resíduos, cristalinidade da celulose, grau de polimerização da celulose e hemicelulose e grau de acetilação da hemicelulose. Finalmente, no processo fermentativo, ocorre a transformação dos monômeros (glicose) em etanol, pela ação de leveduras ou bactérias (KUMAR, WYMAN 2009).

Das etapas de produção de etanol de segunda geração, os maiores desafios estão associados à diminuição dos custos das etapas de pré-tratamento e obtenção de enzimas mais eficientes na hidrólise dos polissacarídeos. Os custos relacionados à obtenção de enzimas podem ser reduzidos por meio da otimização das condições de produção, bem como por isolamento de linhagens hiper-produtoras de fungos. Ainda, gastos adicionais podem ser minimizados pela combinação de enzimas com níveis de atividades específicas superiores aos apresentados pelas enzimas comerciais atuais, bem como pela determinação das condições ótimas de hidrólise (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006).

Dentre as enzimas utilizadas nesta etapa, as β-glicosidases são as enzimas-chave, responsáveis pela catálise da última etapa para liberação da glicose a partir da celulose e, por esta razão, regulam a atividade de outras celulases, como endoglucanases e

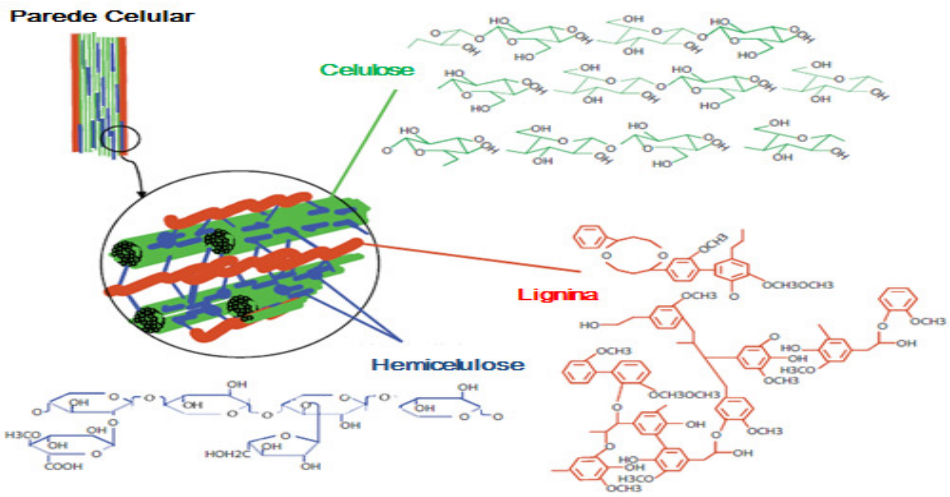
exoglucanases (SINGHANIA et al., 2013). Atualmente, grande parte da produção das β-glicosidases é realizada com o emprego de fungos filamentosos, uma vez que estes são eficientes em secretar as enzimas hidrolíticas diretamente no meio de cultivo, facilitando a sua recuperação (POLIZELI et al., 2005).

Uma vez que estas enzimas estão diretamente envolvidas nos custos de produção do bioetanol, estudos que envolvam a otimização da produção de enzimas e do processo de hidrólise são imprescindíveis para o desenvolvimento de tecnologias de alto valor agregado, capazes de viabilizar a produção do etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

1.1 Parede Celular Vegetal e Biomassa Lignocelulósica

As culturas convencionais utilizadas na produção de bioetanol, como milho e cana-de-açúcar, não são suficientes para suprir a demanda global desse biocombustível, devido à competição com os produtos alimentícios. Assim, para suprir este déficit, é interessante a utilização de materiais lignocelulósicos, devido às suas características renováveis (fontes mais limpas) e por sua abundância (SARKAR et al., 2012). A biomassa lignocelulósica (maior fonte de compostos orgânicos da bioesfera) compõe a fração mais significativa da biomassa vegetal (LEE, 1997). Sua estrutura (Figura 1) é constituída de aproximadamente 40 a 50% de celulose, 20 a 40% de hemicelulose e 20 a 35% de lignina, organizados em uma estrutura complexa (LIAO et al., 2016), variando de acordo com o tipo de resíduo, condições climáticas e estágio do desenvolvimento da planta.

Figura 1 Estrutura química das principais moléculas da parede celular vegetal.



Fonte: Adaptado de Kowsari (2014)

A celulose é um homopolímero linear de alto peso molecular e possui unidades

repetidas de celobiose (dois anéis de glicose anidra ligados através de uma ligação glicosídica β-1,4) (KLEMM et al., 1998). Os polímeros de celulose de cadeia longa são unidos por ligações de hidrogênio e forças de van der Walls, que fazem com que a celulose seja organizada em microfibrilas (HA et al., 1998). Estas, por sua vez, apresentam regiões cristalinas (cerca de 2/3 da celulose total), bem como regiões amorfas, menos ordenadas. Desta forma, as regiões mais ordenadas ou cristalinas da celulose são menos solúveis e mais resistentes à degradação (ZHANG e LYND, 2004; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Já a hemicelulose é um heteropolímero curto e altamente ramificado constituído de D-xilose, D-arabinose, D-glicose, D-galactose, e D–manose, bem como outros componentes como ácido acético, glucurônico, e ácidos ferúlicos. De acordo com o principal resíduo de açúcar presente em sua cadeia principal, a hemicelulose tem diferentes classificações, por exemplo, xilanas, mananas, glucanas, glucuronoxilanos, arabinoxilanos, glucomananos, galactomananos, galactoglucomananos, β-glucanos e xiloglucanos (FENGEL D, WEGENER, 1989).

A lignina é um polímero aromático tridimensional de unidades ρ-hidroxifenilpropanóides conectadas por ligações C – C e C – O – C, constituindo uma grande estrutura tridimensional. Devido à sua configuração molecular, as ligninas são extremamente resistentes a reações químicas e degradações enzimáticas, cumprindo sua função de fornecer rigidez e coesão à parede celular do material, conferir impermeabilidade à água aos vasos do xilema e formar uma barreira físico-química contra ataque microbiano. Além disso, é de natureza hidrofóbica e está fortemente ligada à celulose e à hemicelulose (FENGEL; WEGENER, 1989; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A biomassa é considerada uma fonte sustentável que pode ser utilizada na produção de biocombustíveis, em razão de sua abundância e taxa de regeneração. No entanto, para aproveitar sua energia química e converter a biomassa vegetal em moléculas prontamente aproveitáveis é necessário superar vários desafios, incluindo os usos da terra, água e fertilizantes, a economia de carbono no ciclo de vida e a concorrência com combustíveis não renováveis (LIAO et al., 2016).

1.2 Matérias-primas empregadas na produção de etanol

O bioetanol pode ser de primeira, segunda, terceira ou quarta geração de acordo com a matéria-prima e tecnologias empregadas para sua produção. A primeira geração é aquela produzida a partir de matérias-primas usadas na alimentação humana e animal, como

cereais, tubérculos, plantas de alto teor de açúcar e coprodutos de processamento agroindustrial. O bioetanol de segunda geração é produzido a partir de matéria-prima não alimentar, como: madeira, capim alto, resíduos de culturas, resíduos de papel e outros materiais lignocelulósicos (BRENNAN; OWENDE, 2010; THATOI et al., 2014). Já o etanol de terceira e quarta geração é produzido a partir de biomassa modificada estruturalmente, com menor teor de lignina.

Vários materiais lignocelulósicos já foram testados para produção de bioetanol. Geralmente, estes podem ser divididos em seis grupos principais: resíduos de colheita (bagaço de cana açúcar, palhada de milho, arroz e cevada, casca de arroz, bagaço de sorgo doce, caroço de azeitona e polpa), madeira de lei (álamo alpino, álamo), madeira de conífera (pinheiro, abeto), resíduos de celulose (resíduos de papel, lodo de papel reciclado), biomassa herbácea (feno de alfafa, grama, canário, capim timothy) e resíduos orgânicos (SANCHEZ, CARDONA, 2008; SINGH et al., 2012). Dentre os materiais lignocelulósicos, os resíduos de canola são um atraente recurso renovável, que pode ser empregado para a obtenção do etanol celulósico.

Resíduos de Canola

A canola foi desenvolvida no Canadá, sendo a palavra canola originada da expressão "Canadian Oil Low Acid" (azeite canadense de baixo teor ácido). Pertence ao mesmo gênero que constitui a família botânica da couve-flor e repolho. Sua denominação é restringida a um padrão de regulamentação internacional, no qual dita que as sementes do gênero *Brassica* devem conter óleo com no máximo 2% de ácido erúcico no seu perfil de ácidos graxos e o componente sólido deve conter no máximo 30 µmoles de qualquer uma das misturas de 3-butenil-glucosinolato, 4-pentenil-glucosinolato, 2-hidroxi-3-butenil-glucosinolato e 2-hidroxi-4-pentenil-glucosinolato por grama de sólido seco e isento de óleo (CANADIAN INTERNATIONAL GRAINS INSTITUTE, 2018).

O óleo extraído da semente da canola destinado à alimentação é considerado o mais saudável. Além disso, tais sementes possuem um teor de 44% de óleo, dependendo do cultivar e das condições ambientais (CANADIAN INTERNATIONAL GRAINS INSTITUTE, 2018).

A produção de canola concentra-se longe da linha do equador, em áreas com clima seco (CANADIAN INTERNATIONAL GRAINS INSTITUTE, 2018). Na Europa, Ucrânia, Rússia e partes da China, a canola é plantada entre setembro e novembro, antes do início do inverno. Estas áreas congelam no inverno, mas as temperaturas não ficam baixas

o suficiente a ponto de prejudicá-las. No início da primavera, a canola emerge mais rapidamente nestas áreas do que se fosse plantada na primavera, apresentando rendimentos superiores, os quais variam de 20 a 30%. As variedades de canola da primavera são plantadas principalmente em partes da China, Índia, Canadá e Estados Unidos. As variedades de canola da primavera amadurecem até 85 dias após o plantio, dependendo da variedade e das condições climáticas (USDA, 2018).

No mundo. a produção de canola cresceu rapidamente nos últimos 40 anos, ocupando o segundo lugar no ranking de maiores safras dentre os grãos oleaginosos, perdendo somente para a produção de soja (OECD-FAO, 2015). Em 2016/17, a estimativa de produção foi de 67,9 milhões de toneladas (CONAB, 2017), com perspectiva de crescimento de aproximadamente 40% até 2025 (CANOLA COINCIL OF CANADA, 2013). De acordo com as estimativas de 2016/17, os maiores produtores e consumidores de grãos de canola se encontram na União Europeia com produção de 13,3 milhões de toneladas e consumo de 13,2 milhões de toneladas, enquanto que o segundo maior produtor e consumidor é a China, com produção de 9,9 milhões de toneladas e consumo total do que produz (CONAB, 2017).

O Brasil se destaca na produção agrícola e no agronegócio, com o cultivo de grãos, cereais, frutas e principalmente com a cultura da cana-de-açúcar. A estimativa de produtividade referente à safra 2018/2019 é de 237,3 milhões de toneladas de grãos, incluindo a canola com produção de 49,5 mil toneladas (CONAB, 2019). O estado do Rio Grande do Sul é responsável por 87,1% da produção nacional de canola e 86,7% de área plantada. Já o estado do Paraná contribui com 12,9% da produção nacional e 13,3% da área plantada de canola no Brasil (CONAB, 2017). Durante o processamento do óleo de canola, são geradas grandes quantidades de farelo que precisam ser aproveitadas. Neste sentido, pesquisas recentes demonstram o farelo de canola é muito mais do que apenas um subproduto da extração de óleo. É uma fonte valiosa de nutrientes (com percentual de proteína variando de 35 a 43,8%) para os produtores de gado, particularmente para a indústria de laticínios. Recentemente, o farelo de canola tem sido investigado para ser utilizado como matéria-prima nos processos de produção de etanol (GEORGE et al., 2010; AGU; TABIL; DUMONCEAUX, 2017).

1.3 Etapas para obtenção de açúcares fermentescíveis para produção de etanol celulósico

O grande desafio para produção de etanol de segunda geração está em desenvolver

tecnologias que convertam a biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis de forma rentável e eficiente em comparação com outros processos já consolidados. Assim, o pré-tratamento e a hidrólise (enzimática ou ácida) são as duas etapas fundamentais neste processo.

1.3.1 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

A interação da celulose, lignina, hemicelulose e outros componentes da biomassa lignocelulósica confere rigidez à parede celular vegetal. Por esta razão, os processos de pré-tratamento são necessários para quebrar tais interações, levando à deslignificação com aumento da porosidade do material, o que facilita o ataque enzimático (GUILHERME et al., 2017; SILVA-FERNANDES et al. 2015; ALVIRA et al., 2010; SANCHEZ; CARDONA, 2008). A biomassa lignocelulósica suscetível à ação enzimática possibilita rapidez no processo de hidrólise da celulose e hemicelulose, garantindo maior rendimento de açúcares monoméricos (KARLSSON et al., 2014; ALVIRA et al., 2010). Assim, a efetividade desta etapa consiste no controle de produtos inibidores e, consequentemente, no aumento da produção de açúcares e/ou minimização da degradação daqueles que já foram formados. Um pré-tratamento eficaz garante redução no consumo de energia elétrica e minimização dos custos envolvidos no processo (MOSIER et al., 2005) que representam aproximadamente 20% do custo total da produção de etanol celulósico (ADEN, et al., 2002; MUPONDWA et al., 2017), uma das etapas mais onerosas da biorrefinaria (YOO; PU; RAGAUSKAS, 2017).

O desenvolvimento de numerosos métodos de pré-tratamento reflete a tentativa de se estabelecer condições ótimas para converter as diversas fontes de biomassa lignocelulósica em produtos biotecnológicos uniformes, garantindo padronização no processo produtivo. Os pré-tratamentos podem ser agrupados em processos físicos (micro-ondas, explosão a vapor, etc.), químicos (alcalino, ácido, etc.) e biológicos podendo ser empregados individualmente ou de maneira combinada (MUPONDWA et al., 2017).

Dentre os pré-tratamentos, o alcalino já é utilizado há anos em diversos processos biotecnológicos. É considerado um dos métodos mais eficazes para melhorar a biodegradabilidade da celulose, quebrando as ligações éster entre a lignina, hemicelulose e celulose. Neste sentido, o mecanismo da reação alcalina envolve a saponificação de ligações éster intermoleculares. Hidróxido de sódio, potássio, cálcio e amônio são usados neste processo (HAN et al., 2012; BENSAH; MENSAH, 2013)

Os processos de pré-tratamento alcalinos utilizam temperaturas e pressões mais

baixas do que outras tecnologias de pré-tratamento, possibilitando altas taxas de conversão. Como exemplo, uma eficiência de conversão em torno de 74,1% foi verificada na produção de açúcares monoméricos a partir da canola pré-tratada com NaOH (2%), empregando-se celulases comerciais na dosagem de 12,5 FPU (*Filter Paper Activity*) (DHIMAN et al., 2016). Tal percentual foi maior do que o obtido com outros tipos de pré-tratamento (NaCl, explosão a vapor, ácido sulfúrico), bem como em condições nas quais maiores dosagens enzimáticas foram utilizadas (PAL, BANIK, KHOWALA, 2013; CHOI, KIM, OH, 2013; GARMAKHANY et al., 2014; JI, SHEN, WEN, 2014; XIAO, DONG, 2012; KANG et al., 2012; LU, ZHANG, ANGELIDAKI, 2009). Chen et al. (2018) utilizando a colza submetida ao pré-tratamento alcalino obtiveram maiores níveis de açúcares (292,6 g kg^{-1}) em comparação aos níveis alcançados quando esta foi submetida ao pré-tratamento ácido (185,1 g kg^{-1}).

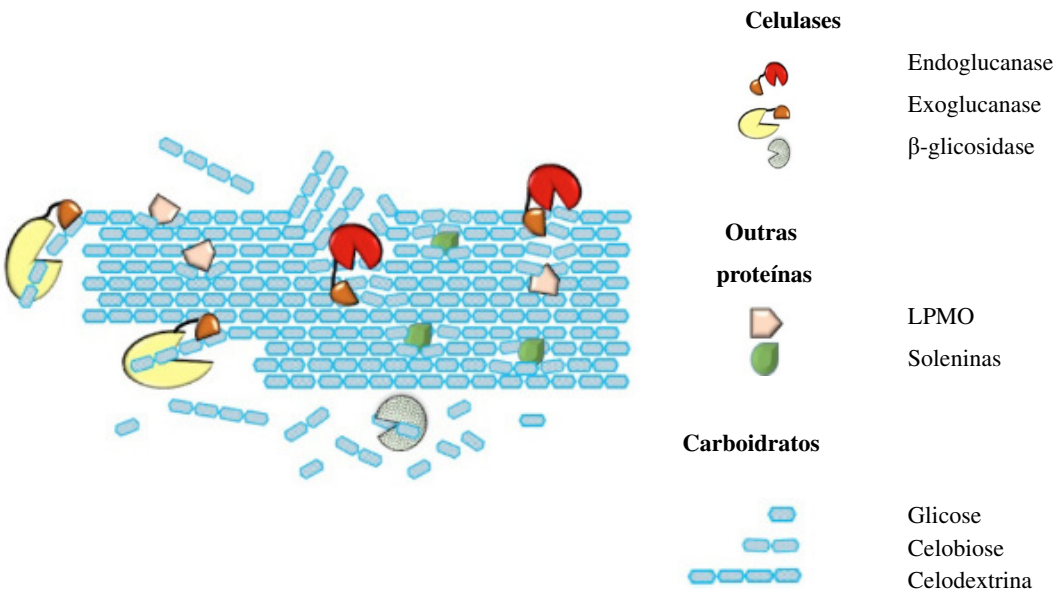
1.3.2 Hidrólise enzimática dos açúcares redutores

A hidrólise é a etapa na qual os carboidratos complexos são convertidos em monômeros simples, como a glicose, os quais serão disponibilizados aos microrganismos na etapa posterior de fermentação. Este processo pode ser de três tipos: hidrólise enzimática, ácida ou alcalina. Na hidrólise enzimática, celulases são adicionadas ao material pré-tratado para converter a celulose em glicose, apresentando maiores vantagens quando comparada aos outros tipos de hidrólises. Dentre as vantagens, as mais importantes incluem a geração de efluentes menos tóxicos, economia no consumo de energia durante o processo, minimização da corrosão de equipamentos e redução de custos.

O processo de hidrólise da celulose (Figura 2) envolve a ação sinérgica de celulases altamente específicas pelo substrato (PINO et al., 2018, RÍOS-FRANQUEZ; ROJAS-REJÓN; ESCAMILLA-ALVORADO, 2019). Endoglucanases ou carboximetilcelulases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (CBHs) ou exoglucanases (EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.74) e β-glicosidases (EC 3.2.1.21) são responsáveis pela hidrólise completa desse polissacarídeo. Inicialmente, as fibras celulósicas são clivadas aleatoriamente pelas endoglucanases, liberando pequenos fragmentos de celulose, com extremidades redutoras e não redutoras livres. Ambos os tipos de extremidades são posteriormente hidrolisados pelas exoglucanases, as quais liberam pequenos oligossacarídeos (celobiose). Finalmente, as β-glicosidases executam o passo final de hidrólise, convertendo a celobiose (um produto intermediário da hidrólise da celulose) em glicose; portanto, esta é a enzima chave do processo (SINGHANIA et al., 2013; QUIROZ-CASTAÑEDA, FOLCH-MALLOL, 2013;

GUPTA, VERMA, 2015)

Figura 2 Representação esquemática das enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose.



Fonte: Adaptado de Ríos-Fránquez; Rojas-Rejón; Escamilla-Alvorado (2019).

Vários fatores influenciam os rendimentos de açúcares fermentescíveis obtidos a partir da hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos. Dentre estes, os principais são temperatura, pH, taxa de mistura, concentração de substrato, concentração da enzima celulase e adição de surfactante. Uma alta concentração de substrato pode levar à inibição enzimática. Normalmente, as condições ideais para a atividade de enzimas celulolíticas são valores de temperatura entre 45 e 55 °C e pH no intervalo de 4 a 5 (MAITAN-ALFENAS, 2015; MICHELIN et al., 2015; TALEBNIA, et al., 2010). Além disso, as condições de mistura e a relação sólido-líquido desempenham um papel essencial na hidrólise do polímero, uma vez que a transferência de massa e calor são necessários para garantir uma boa interação entre enzima e substrato.

Um aumento na concentração de enzimas celulolíticas e no tempo de hidrólise são necessários quando o pré-tratamento é ineficiente. No entanto, quando se utilizam surfactantes, a adsorção de celulases na superfície da lignina é impedida e, consequentemente, se reduz a necessidade destas altas concentrações da enzima no meio reacional. Porém, os custos do processo são substancialmente elevados quando se utiliza este tipo de reagente (MAITAN-ALFENAS, 2015).

1.4 Fungos filamentosos e a produção de enzimas

Os fungos do solo são metabolicamente muito ativos e são capazes de produzir muitas substâncias de valor econômico, incluindo enzimas de interesse industrial (DOS REIS CELESTINO et al., 2014). Uma vez que menos de 1% dos microrganismos observados ao microscópio são cultiváveis e conhecidos (TORSVIK e ØVREAS, 2002), a bioprospecção se faz necessária, tanto para conhecimento da biodiversidade, quanto para aplicações biotecnológicas.

Dos fungos conhecidos, os filamentosos são as principais fontes de produção de enzimas, devido à sua excelente capacidade de produção de proteínas extracelulares. Glucoamilases, celulases, lipases, glicose-oxidases, pectinases, lacases, catalases, fitases e proteases são apenas alguns exemplos de uma ampla gama de enzimas produzidas por estes microrganismos, a partir de várias vias metabólicas. Neste sentido, tais vias geralmente precisam ser otimizadas ou redesenhadas, a fim de aumentar a produção destas enzimas. Ainda, estudos são necessários para investigar a atuação destas enzimas no meio reacional, garantindo aos processos industriais, enzimas robustas capazes de atuar em uma ampla gama de condições (pH extremo, temperatura, osmolaridade, pressão, etc.). Com isto, deve-se notar que as enzimas precisam ter alto rendimento de produção, sendo obtidas a partir de processos fermentativos simples e de baixo custo (CORRÊA et al., 2014).

Ao considerar as dificuldades de consolidação das melhores condições nos bioprocessos, observa-se que o grande entrave na produção de etanol de segunda geração envolvendo o uso de celulases está relacionado com os baixos rendimentos práticos ou teóricos (grama de produto por grama de matéria-prima) e a sua baixa produtividade (taxa de produção por volume), não permitindo uma competitividade com os combustíveis convencionais. No entanto, muitos desses problemas podem ser resolvidos pela engenharia de microrganismos, com sistemas metabólicos redesenhados para melhorar o rendimento e a produtividade de etanol, de tal forma que o requisito de matéria-prima, a escala da fábrica, a intensidade de capital e o custo operacional sejam minimizados (LIAO et al., 2016).

É importante enfatizar a busca por novas linhagens fúngicas que possuam os dois tipos de sistemas enzimáticos extracelulares necessários para degradar a biomassa vegetal: (1) o sistema hidrolítico, responsável pela degradação do polissacarídeo que consiste principalmente em xilanases e celulases; e (2) o sistema ligninolítico oxidativo único, que degrada a lignina e abre anéis fenílicos, dentre estes, as lacases, ligninases e peroxidases. A capacidade dos fungos endofíticos de degradar a estrutura complexa da lignocelulose os

torna úteis na exploração da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol combustível e outros produtos químicos de valor agregado (CORRÊA et al., 2014).

O *Penicillium glabrum* é um fungo filamentoso distribuído mundialmente. É capaz de dispersar um grande número de esporos no ambiente, e, por isto, é frequentemente encontrado na indústria alimentícia. Apesar de sua grande implicação como contaminante de alimentos, poucos estudos foram realizados para investigar a produção de enzimas por este fungo, envolvendo apenas a produção de tanases e xilanases (VAN DE LAGEMAAT; PYLE, 2005; KNOB et al., 2013).

Em geral, os estudos sobre as espécies de *Penicillium* são escassos, comparando com espécies fúngicas amplamente caracterizadas como boa produtora de celulases, tais como *Trichoderma reesei*, que produz altos níveis de endoglucanases e exoglucanases, porém baixos níveis de β-glicosidases e *Aspergillus niger*, que produz altos níveis de β-glicosidases (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005, CHEN et al., 2010).

De acordo com Gusakov e Sinitsyn (2011), muitas espécies de *Penicillium* tiveram melhores rendimentos enzimáticos quando comparados aos exibidos por *T. reesei*. De fato, muitos estudos relataram que várias espécies de *Penicillium* secretam altos níveis de β-glicosidases (SINGH et al., 2009; DILLON et al., 2011; LIU et al., 2011; SINGHVI et al., 2011; CASTRO et al., 2010; DUTTA et al., 2008; KIM et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

2 - OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de obtenção de açúcares fermentescíveis a partir do farelo de canola visando a produção de bioetanol, empregando-se as β-glicosidases produzidas por *Penicillium glabrum.*

2.2 Objetivos específicos

1 Estabelecer as condições ótimas para a produção de β-glicosidases por uma linhagem de *Penicillium glabrum*.

2 Realizar o pré-tratamento alcalino do farelo de canola;

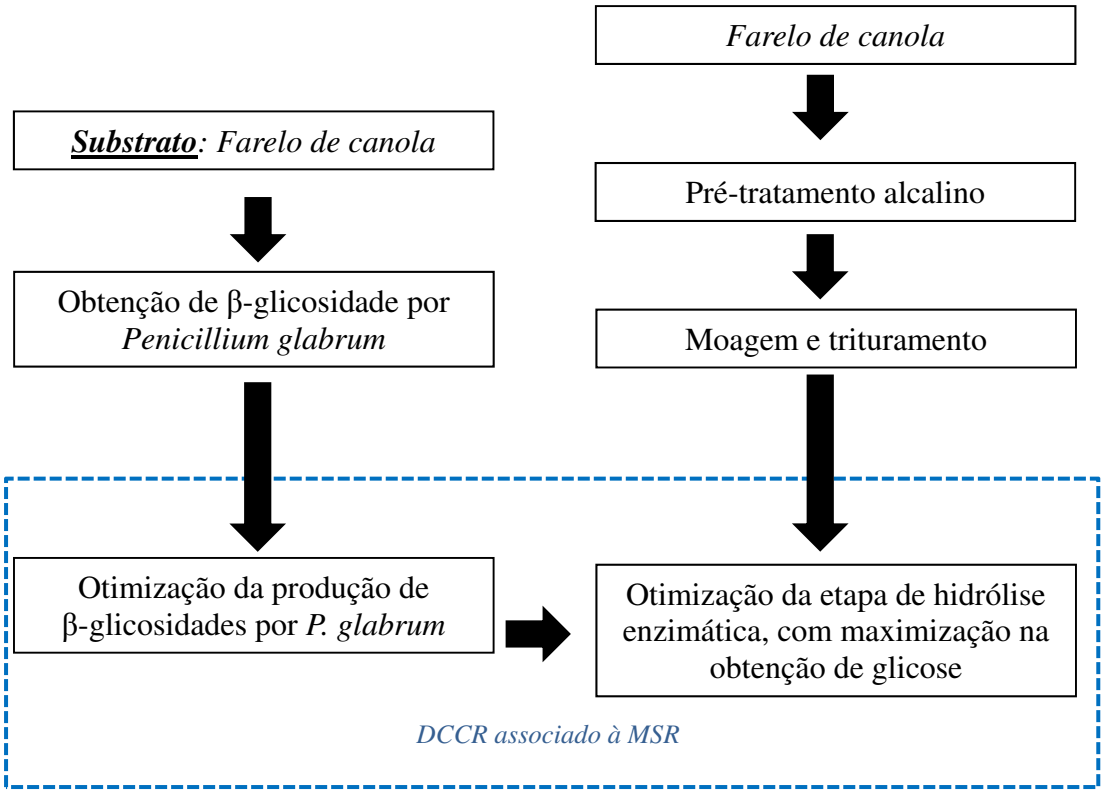
3 Avaliar o processo de hidrólise enzimática do farelo de canola pré-tratada, empregando-se os extratos brutos de *Penicillium glabrum* ricos em β-glicosidases, obtidos a baixo custo;

4 Maximizar a liberação de carboidratos fermentescíveis a partir do processo de hidrólise do farelo de canola pelo extrato bruto fúngico obtido.

3 – METODOLOGIA

A metodologia (Figura 3) consistiu nas etapas empregadas a fim de promover a obtenção dos filtrados brutos fúngicos ricos em β-glicosidases e a otimização do processo de hidrólise do resíduo de canola pelas enzimas fúngicas obtidas.

Figura 3 Representação esquemática da metodologia empregada.



Fonte: O autor (2019).

3.1 Procedência do farelo de canola

O resíduo da canola (*Brassica campestris*) foi cedido pela Cooperativa Agrária, localizada no município de Guarapuava-PR.

3.2 Preparação do Substrato

O farelo de canola utilizado neste estudo foi seco em estufa a 60 ºC, por 48 h, sendo posteriormente triturado e peneirado (35 *mesh*).

3.3 Protocolo para obtenção dos extratos brutos fúngicos ricos em β-glicosidases

3.3.1 Manutenção das linhagens fúngicas

Neste estudo, uma linhagem de *Penicillium glabrum* foi utilizada, a qual é

proveniente da coleção do Centro de Estudos Ambientais (CEA/UNESP). O referido fungo foi cultivado em laboratório em meio sólido de Vogel (1956), suplementado com 1% de glicose como fonte de carbono. Os repiques foram realizados periodicamente, sendo mantidos à temperatura de 28 ºC, durante 7 dias. Posteriormente, estes cultivos foram utilizados como fonte de esporos ou então armazenados à temperatura de 4 ºC.

3.3.2 Obtenção das preparações enzimáticas

Conídios foram suspensos em água destilada esterilizada, filtrados para remoção de fragmentos de hifas e as suspensões obtidas foram ajustadas para 10^7 esporos mL^{-1}. Um volume de 1,0 mL dessa suspensão foi inoculado em 25 mL de meio líquido de Vogel contidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, suplementado com o farelo de canola como única fonte de carbono. Após o crescimento em meio líquido, a cultura foi filtrada a vácuo. Desta forma, o filtrado do meio de cultivo foi obtido, livre de células e micélio, o qual foi utilizado como uma preparação de enzimas extracelulares.

A fim de se otimizar a produção de β-glicosidases por *P. glabrum*, empregou-se um Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) 2^3, incluindo seis pontos axiais e três repetições no ponto central, totalizando 17 condições experimentais, enquanto que a 18ª foi atribuída à validação externa do modelo.

Os dados apresentados foram ajustados de acordo com a equação polinomial de segunda ordem (Equação 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \varepsilon \quad (1)$$

Onde Y é a resposta prevista; β_0 representa a interseção; β_1, β_2 e β_3 são os coeficientes lineares; β_{11}, β_{22} e β_{33} são os coeficientes quadráticos; β_{12}, β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação e x_1, x_2 e x_3, são as variáveis independentes concentração do resíduo [S], tempo de incubação (T) e pH, respectivamente; o termo ε representa o erro experimental.

Os dados obtidos foram analisados pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), empregando-se o programa Statistica 8.0 (StatSoft, USA).

3.3.3 Determinação da atividade β-glicosidásica

A determinação da atividade da enzima β-glicosidase foi realizada por meio da

incubação de 0,2 mL de p-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (PNPG) 5 mM em tampão McIlvane pH 5,0 e 0,3 mL do filtrado enzimático diluído em tampão McIlvane pH 5,0, a 50 °C. Após períodos de incubação específicos, a reação foi paralisada pela adição de 2,0 mL de solução de Na_2CO_3 2 M, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um micromol de p-nitrofenol por mL, por minuto de reação, nas condições de ensaio.

3.3.4 Pré tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino foi conduzido de acordo com o procedimento descrito por Muthuvelayudham e Viruthagiri (2006). O resíduo foi colocado em frascos Erlenmeyer e uma solução de hidróxido de sódio comercial a 4% foi adicionada. Na sequência, o material foi autoclavado a 121 ºC, por 30 minutos. Os resíduos recuperados foram posteriormente lavados com água corrente, neutralizados com ácido fosfórico concentrado e secos em estufa a 65 °C.

3.3.5 Hidrólise enzimática do farelo de canola

A hidrólise enzimática do farelo de canola foi realizada conforme o método proposto por Ghose (1987). Para tal, no presente estudo foram empregados os extratos brutos do *P. glabrum*, ricos em β-glicosidases produzidas sob condições otimizadas.

A fim de iniciar o processo de hidrólise, 300 mg de farelo de canola pré-tratado foram incubados em 5,0 mL de tampão McIlvaine em diferentes valores de pH e em presença de diferentes concentrações de β-glicosidases, de acordo com o planejamento experimental. Após os intervalos de tempo definidos no planejamento, as amostras foram retiradas e centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante obtido utilizado para determinação da glicose liberada, empregando-se o *kit* de determinação glicose oxidase (REINA et al., 2016). Assim, o rendimento de glicose da hidrólise enzimática foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$Produção\ de\ glicose\ (g\ Kg^{-1}) = c\ \times \frac{V}{m} \qquad (\mathbf{2})$$

Onde c (mg mL^{-1}) é a concentração de glicose na solução enzimática, V é o volume da solução enzimática e m (g) é o peso da amostra de farelo de canola utilizado na hidrólise

enzimática (base seca).

Com o objetivo de otimizar a etapa de hidrólise enzimática empregou-se o DCCR 2^4 fatorial, incluindo oito pontos axiais e três repetições no ponto central, resultando em 27 combinações de tratamentos, sendo a corrida número 28 utilizada como validação externa para os modelos quadráticos gerados. As variáveis independentes (fatores) foram tempo, pH, temperatura e concentração da enzima.

Para o sistema com quatro fatores, o modelo é dado pela seguinte equação polinomial de segunda ordem (Equação 3):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{44} x_4^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{14} x_1 x_4 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{24} x_2 x_4 + \beta_{34} x_3 x_4 + \varepsilon \quad \textbf{(3)}$$

Onde Y é a resposta prevista; β_0 representa a interseção; β_1, β_2, β_3 e β_4 são os coeficientes lineares, β_{11}, β_{22}, β_{33} e β_{44} são os coeficientes quadráticos; β_{12}, β_{13}, β_{14} β_{23} β_{24} e β_{34} são os coeficientes de interação e x_1, x_2, x_3 e x_4, são as variáveis independentes de Tempo (T), pH, Temperatura (Temp) e concentração da enzima (E), respectivamente. O termo ε representa o erro experimental.

Os valores codificados dos planejamentos de otimização e hidrólise foram calculados de acordo com a equação 4.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad \textbf{(4)}$$

Onde x_i é o valor codificado, X_i é o valor real, X_0 é o valor real no ponto central e ΔXi é o valor de mudança de passo.

A análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta para os experimentos de otimização da hidrólise enzimática foram gerados pelo programa Statistica versão 8.0 (StatSoft, USA).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização da produção de β-glicosidases por *P. glabrum* utilizando a MSR

As condições ótimas para a produção enzimática de *P. glabrum* a partir do farelo de canola foram estabelecidas e as interações entre os fatores concentração do substrato, tempo e pH de cultivo foram verificadas, utilizando a MSR gerada a partir de um DCCR 2^3 fatorial.

Os valores reais e codificados, bem como os resultados obtidos no planejamento experimental estão apresentados na Tabela 1, onde os tratamentos de 1 a 17 fazem parte do delineamento experimental, enquanto a corrida 18 refere-se à validação externa dos modelos. Foram feitas interações dentre as condições experimentais. Os valores (Tabela 1) foram plotados em gráficos a partir da MRS e posteriormente analisados e discutidos.

Tabela 1 Condições experimentais e resultados do planejamento experimental referente à produção de β-glicosidase por *P. glabrum*.

	Valores reais (codificados)			
Corrida	Substrato (%)	pH	Tempo (dias)	**Atividade β-glicosidásica ($U\ mL^{-1}$)**
1	1,1(-1)	4,2(-1)	4,4(-1)	4,97 ± 0,20
2	2,9(1)	4,2(-1)	4,4(-1)	8,01 ± 0,18
3	1,1(-1)	4,2(-1)	8,6(1)	10,76 ± 0,48
4	2,9(1)	4,2(-1)	8,6(1)	13,63 ± 0,53
5	1,1(-1)	7,8(1)	4,4(-1)	5,87 ± 0,34
6	2,9(1)	7,8(1)	4,4(-1)	8,29 ± 0,43
7	1,1(-1)	7,8(1)	8,6(1)	11,98 ± 054
8	2,9(1)	7,8(1)	8,6(1)	14,75 ± 062
9	0,5(-1,68)	6,0(0)	6,5(0)	9,11 ± 0,36
10	3,5(1,68)	6,0(0)	6,5(0)	10,38 ± 0,31
11	2(0)	6,0(0)	3(-1,68)	4,91 ± 0,20
12	2(0)	6,0(0)	10(1,68)	15,09 ± 0,71
13	2(0)	3,0(-1,68)	6,5(0)	14,50 ± 0,83
14	2(0)	9,0(1,68)	6,5(0)	11,73 ± 0,63
15	**2(0)**	**6,0(0)**	**6,5(0)**	**20,88 ± 0,95**
16	**2(0)**	**6,0(0)**	**6,5(0)**	**22,45 ± 1,04**
17	**2(0)**	**6,0(0)**	**6,5(0)**	**21,33 ± 0,88**
18[a]	2(0)	6,0(0)	6,5(0)	22,02 ± 0,61

Fonte: O autor (2019)

Valores em negrito se referem às condições estabelecidas como ótimas para a produção de β- glicosidases
[a] Valor referente à validação do modelo

A análise de variância (ANOVA) para os modelos gerados está resumida na Tabela 2. O coeficiente do modelo para a atividade β-glicosidásica (Equação 1) foi significativo ($p<0,05$) e preditivo, visto que o valor de *F* calculado foi 66,93 vezes superior ao *F* tabelado. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) de 0,9688 indica que 96,88% da variabilidade dos dados pode ser explicada por este modelo; valor considerado alto em experimentos biológicos. O alto valor para o coeficiente de determinação indica boa adequação dos dados experimentais, permitindo a utilização do modelo para prever o desempenho do processo, bem como utilizá-lo como ferramenta para otimização de processos (GASPAROTTO et al., 2015).

A recuperação dos valores de atividade β-glicosidásica obtidos experimentalmente (22,02 U mL^{-1}) correspondeu a 98% do valor predito pelo modelo (21,58 U mL^{-1}), de forma a validá-lo.

Tabela 2 Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para β-glicosidase produzida por *P. glabrum* cultivado em farelo de canola, e os valores de R² e *F*-valor.

Produção de β-glucosidases							
Termos	**SQ**	**Gl**	**MQ**	***F***	***F tab***	***F/F*tab**	***R²***
M	1405,82	9	156,20	141,71	2,117	66,93	0,9688
R	45,19	41	1,10				
T	1451,02	50					
Termos			**Coeficientes**			***p*-valor**	
Média/Interceptor			**21,588**			**0,000000**	
[S]			**1,9397**			**0,000001**	
$[S]^2$			**-8,5929**			**0,000000**	
pH			-0,1681			0,611192	
pH^2			**-6,2049**			**0,000000**	
Tempo			**6,0213**			**0,000000**	
$Tempo^2$			**-8,4122**			**0,000000**	
[S] x pH			0,1775			0,680942	
[S] x tempo			0,0441			0,918430	
pH x tempo			0,2891			0,503683	

Fonte: O autor (2019)

Onde: M = modelo; R = resíduo; T = Total; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; gl: grau de liberdade; *F: F* calculado; *F* tab: *F* tabelado 5%; [S]: concentração do substrato; T: tempo; pH: potencial hidrogeniônico. Os valores em negrito são estatisticamente significativos.

Os dados experimentais obtidos por meio da condução do DCCR foram analisados por regressão linear múltipla e o modelo matemático que representa a atividade da β-

glicosidase foi expresso pela Equação 5, levando-se em conta apenas os termos que influenciaram significativamente a resposta.

$$\beta gli = 21{,}588 + 1{,}9397\ \mathrm{S} - 8{,}5929\ \mathrm{S}^2 + 6{,}0213\ \mathrm{T} - 8{,}4122\ \mathrm{T}^2 - 6{,}2049[\mathrm{pH}]^2 \quad (\mathbf{5})$$

Onde: βgli é atividade β-glicosidase; S é concentração do substrato; T é o tempo de cultivo e pH é o potencial hidrogeniônico do meio

Na Tabela 2, observa-se que os termos lineares das variáveis independentes concentração do substrato [S] e tempo (T) foram significativos para a produção de β-glicosidases, enquanto que os termos quadráticos de todas as variáveis investigadas também exercem influência sobre a produção dessas enzimas. Nota-se, ainda, que não houve interação significativa entre os fatores avaliados ($p>0{,}05$). A interação entre fatores é a medida de como os efeitos de um fator depende dos níveis de um ou mais outros fatores. No presente estudo, a ausência de interação entre os fatores significa que o efeito combinado destes fatores são apenas a soma do efeito individual de cada um sobre a variável dependente, no caso a atividade β-glicosidásica. Quando existente, a interação entre fatores revela um efeito sinergístico ou mesmo antagônico sobre a variável dependente (QUINN e KEOUGH, 2002).

Por meio da análise dos coeficientes, verifica-se que os termos lineares substrato e tempo apresentaram seus coeficientes positivos; logo, uma maior disponibilidade da fonte de carbono no meio e um tempo de cultivo mais prolongado resultam em maiores níveis enzimáticos.

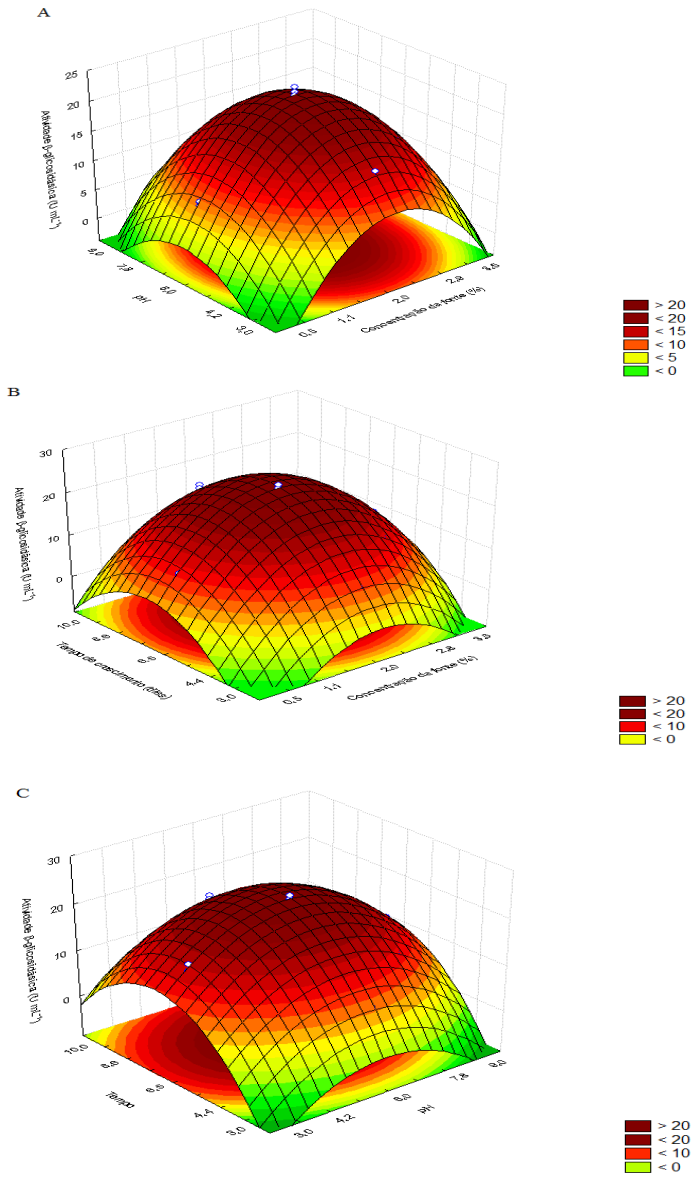
De acordo com Amin et al. (2011), à medida que a concentração de substrato aumenta, a produção enzimática se eleva proporcionalmente, até o ponto em que o meio esteja saturado com o substrato. No meio saturado, a adição extra de substrato pode comprometer a produção enzimática, devido ao aumento de viscosidade ocasionado, o qual, por sua vez, dificulta a transferência de oxigênio.

Por outro lado, o termo linear pH apresentou coeficiente negativo. Assim, um meio de cultivo levemente ácido propicia a obtenção dos maiores valores de β-glicosidases. Sabe-se que o pH do meio de cultura influencia o transporte de componentes através da membrana celular, bem como os processos enzimáticos, os quais, por sua vez, afetam o

crescimento celular e a formação de produtos. Em adição, sugere-se que o tempo de cultivo de 6,5 dias corresponda à fase de crescimento exponencial do fungo, observando-se as maiores taxas de crescimento e consequente produção enzimática.

Os níveis de produção enzimática variaram entre 4,91 a 22,45 U mL^{-1}. Os maiores níveis de produção enzimática foram as repetições no ponto central, correspondendo a uma concentração de 2% de farelo de canola, pH de cultivo 6,0 e tempo de incubação de 6,5 dias (Figura 4). Os níveis de produção de β-glicosidases obtidos neste estudo foram superiores aos produzidos por *P. verruculosum* (4,32 U mL^{-1}) (ALMEIDA et al., 2014).

Figura 4 Superfície de resposta para a produção de β-glicosidases por *P. glabrum*, quando cultivado em farelo de canola. Os gráficos demonstram a atividade β-glicosidásica (U ml^{-1}) em função do: A) pH x concentração do substrato; B) Tempo de crescimento (dias) x concentração do substrato e C) Tempo de crescimento (dias) x pH.



Fonte: O autor (2019)

Na produção de celulases fúngicas, valores de pH reconhecidos ótimos estão compreendidos na faixa de 3,0 a 6,0 (GARG e NEELAKANTAN, 1981; NIRANJANE et al., 2007). Previamente, autores observaram que o pH ótimo de crescimento do *P. glabrum* foi em torno de 5±0,5 (PITT e HOCKING, 1997; NEVAREZ et al., 2009), sendo seu crescimento detectado em uma faixa de pH de 3 a 8 (WHEELER et al., 1991). Portanto, o pH de cultivo 6,0 está dentro dos valores indicados pela literatura.

Comparativamente, os níveis de β-glicosidases obtidos no presente estudo foram superiores aos valores obtidos por outras espécies de fungos, a partir de diferentes substratos. Dentre estes, quando foram utilizados os resíduos de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados, níveis de β-glicosidades de 1,83 U mL^{-1} foram secretados por *Penicillium funiculosum* (CASTRO et al., 2010). Já o uso da casca de abacaxi por *Penicillium miczynskii* resultou em uma produção equivalente a 1,99 U mL^{-1} (BEITEL; KNOB, 2013). Já quando *Trichoderma viride* foi cultivado em casca de maracujá, uma produção correspondente a e 2,40 U mL^{-1} foi observada (ALMEIDA et al., 2016).

Do ponto de vista econômico e ambiental, a utilização do farelo de canola como substrato na produção de celulases é uma alternativa, em razão da sua alta geração pela indústria alimentícia e de biodiesel. Embora o farelo de canola já seja utilizado como ração animal, ainda se enfrenta alguns entraves quanto a seu uso, uma vez que este contém baixo teor energético disponível e fatores antinutricionais (BELL, 1984; CHEN et al., 2011; KHAJALI; SLOMINSKI, 2012). Além disso, tal resíduo não é facilmente digerível pelos animais, quando comparado ao farelo de soja, por exemplo (UÇKUN et al., 2012).

4.2 Hidrólise do farelo de canola pelo extrato bruto de *P. glabrum*

Os efeitos de interação entre os fatores e as condições ótimas para a hidrólise do farelo de canola empregando-se o extrato bruto de *P. glabrum* foram determinados a partir de gráficos de superfície de resposta (Figura 4), que mostraram o comportamento da resposta (liberação de glicose) como resultado da mudança simultânea em duas variáveis. Os valores reais e codificados, bem como os resultados obtidos no planejamento experimental estão apresentados na Tabela 3. Além disso, os valores (Tabela 3) foram plotados em gráficos a partir da MRS e posteriormente analisados e discutidos.

Tabela 3 Condições experimentais e resultados do planejamento experimental para produção de glicose a partir da hidrólise do farelo de canola (*Brassica campestris*).

	Valores reais (codificados)				Resposta
Corrida	**Tempo (h)**	**pH**	**Temperatura (°C)**	**β-glicosidase (U g^{-1})**	**Glicose (mg g^{-1} de substrato)**
1	33 (-1)	4.0 (-1)	55 (-1)	13,75 (-1)	12,14 ± 0,68
2	33 (-1)	4,0 (-1)	55 (-1)	31,25 (1)	6,40 ± 0,37
3	33 (-1)	4,0 (-1)	65 (1)	13,75 (-1)	26,42 ± 1,57
4	33 (-1)	4,0 (-1)	65 (1)	31,25 (1)	11,27 ± 0,42
5	33 (-1)	6,0 (1)	55 (-1)	13,75 (-1)	0,57 ± 0,02
6	33 (-1)	6,0 (1)	55 (-1)	31,25 (1)	3,01 ± 0,11
7	33 (-1)	6,0 (1)	65 (1)	13,75 (-1)	0,03 ± 0,00
8	33 (-1)	6,0 (1)	65 (1)	31,25 (1)	3,12 ± 0,08
9	75 (1)	4,0 (-1)	55 (-1)	13,75 (-1)	24,43 ± 0,25
10	75 (1)	4,0 (-1)	55 (-1)	31,25 (1)	5,02 ± 0,16
11	**75 (1)**	**4,0 (-1)**	**65 (1)**	**13,75 (-1)**	**34,54 ± 0,87**
12	75 (1)	4,0 (-1)	65 (1)	31,25 (1)	9,59 ± 0,19
13	75 (1)	6,0 (1)	55 (-1)	13,75 (-1)	0,02 ± 0,00
14	75 (1)	6,0 (1)	55 (-1)	31,25 (1)	2,20 ± 0,11
15	75 (1)	6,0 (1)	65 (1)	13,75 (-1)	0,05 ± 0,00
16	75 (1)	6,0 (1)	65 (1)	31,25 (1)	3,21 ± 0,10
17	12 (-2)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	4,83 ± 0,19
18	96 (+2)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	17,63 ± 0,70
19	54 (0)	3,0 (-2)	60 (0)	22,50 (0)	3,05 ± 0,14
20	54 (0)	7,0 (2)	60 (0)	22,50 (0)	0,04 ± 0,00
21	54 (0)	5,0 (0)	50 (-2)	22,50 (0)	10,04 ± 0,24
22	54 (0)	5,0 (0)	70 (2)	22,50 (0)	29,30 ± 0,44
23	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	5,00 (-2)	16,72 ± 0,32
24	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	40,00 (2)	4,70 ± 0,19
25	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	29,32 ± 1,31
26	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	29,39 ± 0,92
27	54 (0)	5,0 (0)	60 (0)	22,50 (0)	28,83 ± 0,88
28*	75 (1)	4,0 (-1)	65 (1)	13,75 (-1)	33,18 ± 0,75

Fonte: O autor (2019)
Valores em negrito se referem às condições estabelecidas como ótimas para a produção de β-glicosidases.
* Valores se referem à validação do modelo

A análise de variância (ANOVA) para o modelo gerado está resumida na Tabela 4. O coeficiente do modelo que corresponde à liberação de glicose a partir da hidrólise do farelo de canola foi significativo ($p<0,05$) e preditivo, uma vez que o valor de *F* calculado foi 20,71 vezes superior ao valor de *F* tabelado. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) de 0,8899 indica que 88,99% da variabilidade dos dados pode ser explicada por este modelo. A recuperação dos valores de glicose obtidos experimentalmente (33,18 mg g^{-1}) correspondeu a 101,06% do valor predito pelo modelo (32,83 mg g^{-1}), validando-o de forma satisfatória.

Tabela 4 Análise de variância (ANOVA), coeficientes de regressão para glicose liberada a partir da hidrólise do farelo de canola (*B. campestris*) utilizando o filtrado bruto de *P. glabrum* rico em β-glicosidases, e os valores de R² e *F*-valor.

Glicose						
Termos	**SQ**	**GL**	**QM**	***F***	***F tab***	***F*/*F*tab**
M	9141,07	14	652,93	38,12	1,84	20,71
R	1130,26	66	17,12	-	-	-
T	10271,33	80				
R²	0,889					
Termos	**Coeficiente**				***p*-valor**	
Média/Interc	**29,181**				**0,000**	
T	**3,476**				**0,000**	
T^2	**-9,612**				**0,000**	
pH	**-10,300**				**0,000**	
pH^2	**-14,454**				**0,000**	
Temp	**6,080**				**0,000**	
$Temp^2$	**-5,390**				**0,000**	
E	**-6,536**				**0,000**	
E^2	**-9,870**				**0,000**	
T x pH	-2,322				0,056	
T x Temp	-0,375				0,754	
T x E	**-2,955**				**0,015**	
pH x Temp	**-4,153**				**0,000**	
pH x E	**9,515**				**0,000**	
Temp x E	-1,663				0,168	

Fonte: O autor (2019)

Onde: M = modelo; R = resíduo; T = Total; SQ: soma dos quadrados; MQ: média dos quadrados; GL: grau de liberdade; *F: F* calculado; *F* tab: *F* tabelado 5%; T: tempo; Temp: temperatura; pH: potencial hidrogeniônico; E: concentração de β-glicosidases. Os valores em negrito foram estatisticamente significativos.

Os dados experimentais obtidos por meio da condução do DCCR foram analisados por regressão linear múltipla e o modelo matemático que representa a quantidade de glicose liberada foi expresso pela Equação 6, levando em consideração apenas os termos significativos.

$$Glu = 29{,}18 + 3{,}47T - 9{,}61T^2 - 10{,}30pH - 14.45\,pH^2 + 6{,}08\,Temp - 5{,}39\,Temp^2 - 6{,}53E - 9{,}87\,E^2 - 2{,}95TE - 4{,}15pHTemp + 9{,}51\,pHE \quad (6)$$

Onde: Glu é glicose, T é tempo de reação, Temp é temperatura, pH é o potencial hidrogeniônico e E é a concentração de β-glicosidases.

Análises de superfície e coeficientes de regressão revelam que todos os termos lineares e quadráticos foram críticos para a liberação de glicose a partir do farelo de canola. Com

relação à interação entre as variáveis investigadas, apenas as interações entre tempo e dosagem enzimática, pH e temperatura, bem como pH e dosagem enzimática foram significativas (Tabela 4), ou seja, influenciaram a produção de glicose.

Ao analisar os coeficientes apresentados na Tabela 4, constata-se que os termos lineares tempo e temperatura apresentaram seus coeficientes positivos; logo, um maior tempo de hidrólise associado a temperaturas mais elevadas resultam em maiores níveis de glicose.

Em relação ao tempo, a sacarificação enzimática da biomassa é um processo que requer longos períodos de reação. Geralmente, utiliza-se um tempo reacional entre 24 e 72 h (JIANG et al., 2010, SANTOS et al., 2010). Portanto, o período de reação do processo enzimático conduzido neste estudo corresponde próximo aos valores reportados na literatura. Quanto à temperatura, é essencial que celulases e hemicelulases apresentem propriedades térmicas adequadas para aplicação nos processos biotecnológicos.

Neste sentido, quando as etapas de hidrólise e fermentação são separadas, a temperatura empregada assegura uma máxima taxa de hidrólise enzimática. A temperatura mais adequada está entre 50 a 60 ºC para a maioria dos extratos celulolíticos produzidos por fungos filamentosos, incluindo espécies dos gêneros *Trichoderma, Penicillium* e *Aspergillus* (SINGHANIA et al., 2010). A principal vantagem de os processos serem conduzidos separadamente é um tempo de reação mais curto para a hidrólise, uma vez que o processo é conduzido em condições ótimas de operação. Todavia, este processo é limitado porque é aceito que durante a hidrólise enzimática as atividades de celulase (principalmente endoglucanases e celobiohidrolases) são severamente inibidas por seus produtos finais de reação, como a celobiose e a glicose, respectivamente (GOTTSCHALK et al., 2010).

Nos processos conjugados (hidrólise e fermentação), a glicose liberada é facilmente fermentada em etanol, diminuindo assim a inibição do sistema celulolítico pela acumulação de produtos. Porém, as condições ótimas para a atuação das enzimas e microrganismos fermentadores geralmente não são as mesmas. Como mencionado anteriormente, os melhores níveis de produção de celulases estão associados a valores de temperatura do meio reacional entre 50 e 60 °C, enquanto que as leveduras geralmente apresentam um crescimento ideal em torno de 32 a 37 ºC. Desta forma, no presente estudo, a temperatura estabelecida como ótima para a hidrólise enzimática não permite sua operação de forma conjugada (hidrólise e fermentação) (FALKOSKI et al., 2013).

Por outro lado, os termos lineares pH e concentração enzimática apresentaram seus coeficientes negativos. Assim, um meio reacional levemente ácido, bem como o emprego de

menores concentrações de β-glicosidases propiciam a obtenção de quantidades mais elevadas de açúcares fermentescíveis.

Verificou-se que o pH 4,0 propiciou a obtenção dos maiores níveis de glicose a partir da hidrólise do farelo de canola. Segundo Whitaker (1994), uma mudança do pH em uma reação enzimática pode afetar a estabilidade da enzima, resultando em uma desnaturação irreversível em sua estrutura conformacional e, consequentemente, em perda contínua de sua atividade.

Sob um meio reacional mais ácido, uma alteração no estado iônico dos resíduos de aminoácido da enzima pode ter resultado em uma conformação tridimensional mais eficaz em promover a hidrólise da celulose sob temperaturas mais elevadas, justificando-se, assim, o efeito significativo da interação entre pH e temperatura observado. Esse meio reacional mais ácido pode também ter proporcionado a obtenção de um estado conformacional da enzima mais estável, sendo, desta forma, requeridas menores concentrações enzimáticas para se alcançar os maiores índices de glicose. Desta forma, justifica-se a interação existente entre concentração de β-glicosidases e pH.

Teores reduzidos de β-glicosidase foram empregados no meio reacional a fim de hidrolisar o resíduo lignocelulósico. As concentrações enzimáticas empregadas foram inferiores, quando comparadas aos teores empregados por Almeida et al. (2015a) e Almeida et al. (2015b).

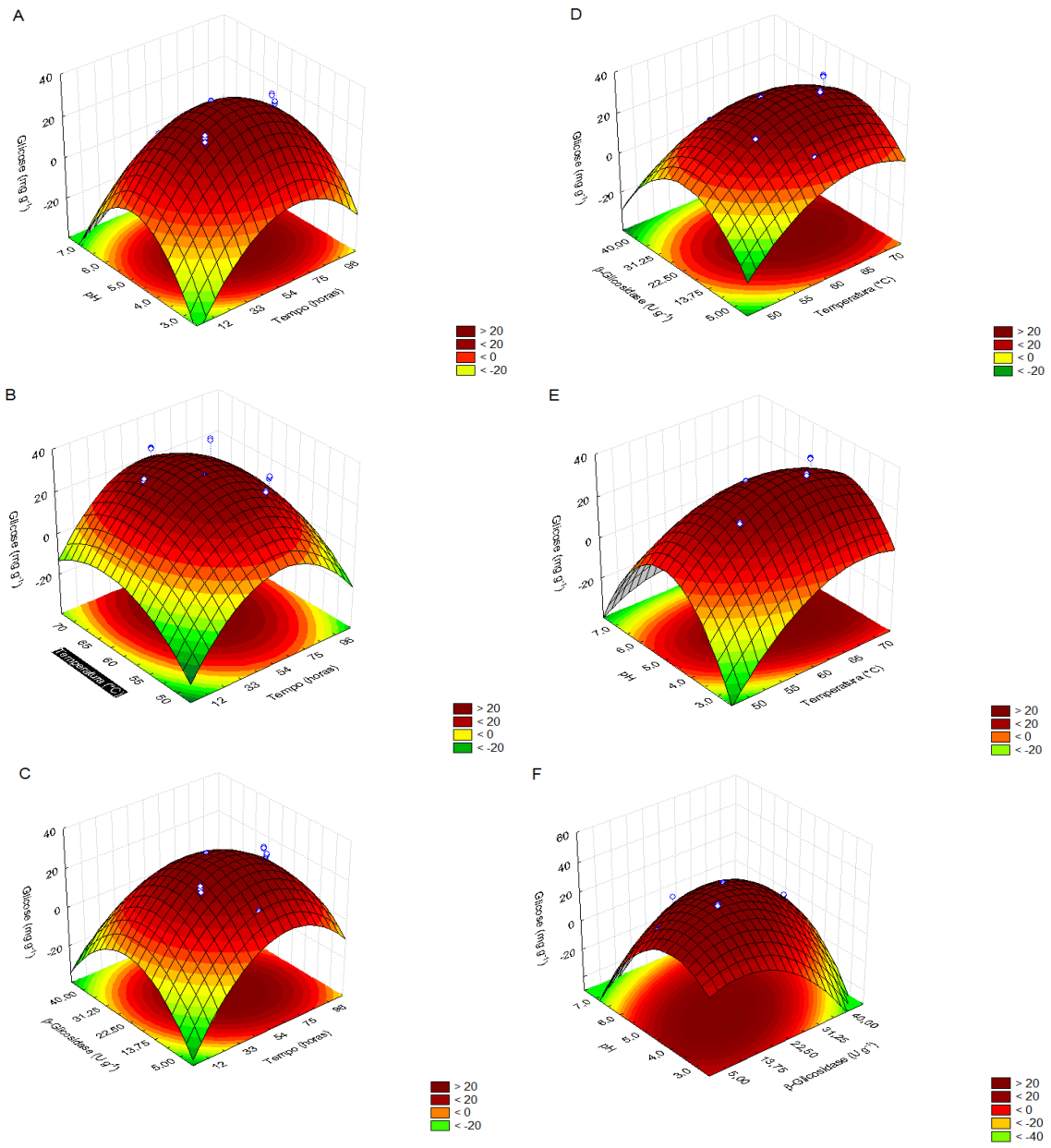
Ao avaliar a interação estabelecida entre tempo e concentração enzimática, verifica-se que a obtenção de maiores níveis de glicose ao longo do tempo é favorecida quando uma menor concentração de enzimas é empregada. Sabe-se que as preparações enzimáticas geralmente perdem sua atividade ao longo do tempo, à medida que as moléculas proteicas que a constituem vão sofrendo alterações que gradualmente diminuem o teor de enzima ativa (VIEIRA, 2013). No entanto, sugere-se, neste caso, que o aporte de enzima utilizado, mesmo envolvendo concentrações mais baixas, tenha mantido grande parte de sua ação catalítica ao longo do tempo investigado, de forma a não comprometer os níveis de glicose obtidos.

Baseando-se no modelo experimental utilizado, os valores codificados permitiram a simulação de dados do processo de hidrólise do farelo de canola pelas β-glicosidases de *P. glabrum*, como evidenciado na Figura 5.

As condições de hidrólise do farelo de canola que proporcionaram a obtenção dos maiores níveis de glicose foram pH 4,0, temperatura de 65 °C, concentração de β-glicosidases de 13,75 U g^{-1} de resíduo e tempo de reação de 75 h (corrida 11, Tabela 3).

Nestas condições, a quantidade de glicose obtida correspondeu a 34,54 mg g^{-1} de resíduo, ou 2,08 g l^{-1}.

Figura 5 Superfícies de resposta para a produção de glicose após hidrólise enzimática do farelo de canola pelo extrato bruto de *P. glabrum*. Liberação de glicose (mg g^{-1}) em função do: A) pH x tempo;. B) Temperatura x tempo; C) Dosagem enzimática x tempo; D) Dosagem enzimática x Temperatura; E) pH x temperatura; F) pH x dosagem enzimática.



Fonte: O autor (2019)

A hidrólise da canola foi investigada por George et al. (2010), empregando-se celulases comercial. Concentrações máximas de glicose foram obtidas a partir das síliquas (144 mg g^{-1}) e do caule (159 mg g^{-1}) de canola pré-tratados com NaOH (0,5%), utilizando

30 FPU g^{-1} de celulases. Ótimos rendimentos também foram obtidos a partir da hidrólise da palha da canola (110,05 mg g^{-1}) pré-tratada com NaOH (1,5%), empregando-se preparações comerciais de celulases (AGU; TABIL; DUMONCEAUX, 2017). A hidrólise das fibras de canola também foi conduzida por meio de enzimas comerciais, resultando em rendimentos equivalentes a 109 mg g^{-1} e 110 mg g^{-1} de resíduo sem pré-tratamento e pré-tratados, respectivamente (BALAN et al., 2009).

Considerando os estudos acima reportados que investigaram a hidrólise enzimática da canola e de alguns de seus resíduos, verifica-se que os níveis de glicose obtidos foram superiores aos alcançados no presente estudo. No entanto, estes estudos empregaram preparações enzimáticas comerciais, ao contrário da presente investigação, em que as enzimas foram aplicadas em sua forma bruta. O uso de enzimas comerciais purificadas resultam em maiores rendimentos, mas tornam o processo mais oneroso.

Nesse sentido, alguns estudos (Tabela 5) foram conduzidos utilizando tais extratos brutos, a fim de estabelecer as melhores condições de hidrólise. Porém, em relação ao farelo de canola, estes estudos são inexistentes. Os níveis de glicose obtidos na presente investigação foram similares ao observado no estudo de Almeida et al. (2015b) ao empregar a casca de maracujá e o filtrado bruto de *P. verruculosum* rico em β-glicosidases para obtenção da glicose. No entanto, níveis inferiores foram alcançados quando comparados aos teores de glicose obtidos por meio da hidrólise das cascas de maracujá (ALMEIDA et al., 2015a) e de abacaxi (ALMEIDA et al., 2016), empregando-se os extratos brutos de *T. viride*. Os menores rendimentos observados podem ser justificados em razão do maior teor de celulose contido nas cascas dessas frutas. Além disso, nos estudos de Almeida et al. (2015, 2016), *T. viride* demonstrou ser eficiente na secreção de um alto nível de enzimas extracelulares, incluindo xilanases e outras celulases. No caso, a presença dessas enzimas no extrato bruto rico em β-glicosidases propiciou a obtenção de elevados níveis de açúcares fermentescíveis. Uma vez que a presença da hemicelulose dificulta o acesso à celulose, um aumento da eficiência da hidrólise pode ser obtido buscando-se o sinergismo entre as enzimas celulolíticas e xilanolíticas (DELABONA et al., 2013).

A atividade das demais celulases e de enzimas xilanolíticas não foi analisada no extrato bruto de *P. glabrum*. No entanto, infere-se que tais enzimas também tenham sido secretadas por este microrganismo durante o processo de produção enzimática, a fim de degradar uma fonte de carbono tão complexa como o farelo de canola, contribuindo para os níveis de glicose recuperados.

Tabela 5 Níveis de glicose obtidos a partir de diferentes resíduos agroindustriais, empregando-se extratos brutos fúngicos ricos em celulases.

Obtenção de celulases		***Hidrólise enzimática***					
Substrato/Fungo	**Concentração enzimática (U g^{-1})**	**pH**	**Temp (º C)**	**T (h)**	**Matéria-prima**	**Glicose (mg g^{-1})**	**Referência**
Canola *P. glabrum*	13,75[1]	4	65	70	Farelo de canola	34,54	**Presente estudo**
Canola *T. viride*	67,50[2]	5	60	96	Casca de maracujá	47,13	Almeida et al. (2015a)
Casca de maracujá *P. verruculosum*	22,50[1]	5	60	96	Casca de maracujá	32,02	Almeida et al. (2015b)
Casca de maracujá *T. viride*	31,25[1]	4	55	75	Casca de abacaxi	59,37	Almeida et al. (2016)

Onde: [1] β-glicosidase; [2] Dosagem total de celulases; Temp: temperatura; T: tempo

Fonte: O autor (2019)

Em relação às vantagens econômicas e ambientais do emprego do farelo de canola na obtenção de açúcares fermentescíveis, verifica-se a grande oportunidade de aproveitamento dos resíduos gerados após a extração do óleo de canola. Para cada 2.000 kg de sementes da oleaginosa, há um rendimento entre 600 e 700 kg de óleo, com um adicional de 3.000 a 4.000 kg de resíduo de planta seca que permanecem após a extração das sementes (BROWN et al., 2008; TAHIR et al., 2019). Assim, o teor de óleo compõe menos da metade da planta de canola. O óleo produzido é destinado à alimentação (CARLSSON, 2009) ou como matéria-prima na produção de biodiesel (CARLSSON, 2009; BORGES, DÍAS, 2012). Já a alta parcela residual normalmente é utilizada para ração animal devido seu alto valor proteico (WANASUNDARA et al., 2016). Esta opção não é muito viável, em decorrência do baixo valor energético e da presença de fatores antinutricionais neste subproduto industrial, além de sua menor digestibilidade animal quando comparado a outras fontes proteicas (BELL, 1984; CHEN et al., 2011; KHAJALI; SLOMINSKI, 2012; UÇKUN et al., 2012).

5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam que esta matéria-prima pode ser utilizada como substrato alternativo para a obtenção de β-glicosidases. Por meio do uso de ferramentas estatísticas, as melhores condições de produção foram estabelecidas, sendo elas: 2,0% de substrato, pH 6,0 e 6,5 dias de cultivo. Essas condições resultaram em significativo índice de produção enzimática (22,45 U mL^{-1}), sendo esta superior ao atingido por meio do uso de outros tipos de substratos já empregados (cascas de frutas, bagaço de cana-de-açúcar, etc).

Os resultados demonstram a viabilidade de empregar esse resíduo no processo de obtenção de açúcares fermentescíveis. Por meio do emprego do DCCR, as melhores condições de hidrólise foram determinadas, correspondendo a uma dosagem enzimática de 13,75 U g^{-1} de resíduo, pH 4,0, 65 ºC e 75 horas de reação. Sob essas condições, os níveis de glicose obtidos (34,54 mg g^{-1} de farelo de canola) foram inferiores aos atingidos por meio do uso de enzimas purificadas. No entanto, o emprego de enzimas no estado bruto se mostra vantajoso, pela possibilidade da redução no custo de obtenção dessas enzimas.

Por fim, o emprego desse subproduto industrial nos bioprocessos investigados é promissor, em razão dos benefícios econômicos que podem ser gerados, aliados às vantagens ambientais que podem ser resultantes de sua reinserção no processo produtivo, destacando-se a redução de seu descarte irregular na natureza.

6 - REFERÊNCIAS

ADEN, A.; RUTH, M.; IBSEN, K.; JECHURA, J.; NEEVES, K.; SHEEHAN, J.; WALLACE, B.; MONTAGUE, L.; SLAYTON, A.; LUKAS, J. **Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover.** National renewable energy lab golden co, 2002.

ANP – Agência Nacional de Petróleo. **Os desafios para o etanol de segunda geração no brasil.** Boletim ANP. Petróleo e P&D. Boletim sobre aplicação dos recursos proveniente da Cláusula de P D & I e do PRH-ANP.. 20 ed. 2015.

AGU, O. S.; TABIL, L. G.; DUMONCEAUX, T. Microwave-assisted alkali pre-treatment, densification and enzymatic saccharification of canola straw and oat hull. **Bioengineering**, v. 4, n. 2, p. 25, 2017.

ALMEIDA, J.M. **Seleção de Fungos Filamentosos Produtores de β-glicosidases: produção, caracterização bioquímica e sua aplicação da hidrólise da biomassa.** 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) – Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná (UNICENTRO), Guarapuava-PR, 2009.

ALMEIDA, J. M.; DE LIMA, V. A.; DE LIMA, P. C. G.; KNOB, A. Effective and low-cost saccharification of pineapple peel by *Trichoderma viride* crude extract with enhanced β-glucosidase activity. **BioEnergy Research**, v. 9, n. 3, p. 701-710, 2016.

ALMEIDA, J. M.; LIMA, V. A.; GILONI-LIMA, P. C.; KNOB, A. Canola meal as a novel substrate for β-glucosidase production by *Trichoderma viride*: application of the crude extract to biomass saccharification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 10, p. 1889-1902, 2015a.

ALMEIDA, J. M.; LIMA, V. A.; GILONI-LIMA, P. C.; KNOB. Passion fruit peel as novel substrate for enhanced β-glucosidases production by *Penicillium verruculosum*: Potential of the crude extract for biomass hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 72, p. 216-226, 2015b.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M. J.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; REHMAN, S. Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 28, p. 5514–5523, 2011.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

BALAN, V.; ROGERS, C. A.; CHUNDAWAT, S. P.; DA COSTA SOUSA, L.; SLININGER, P. J.; GUPTA, R.; DALE, B. E. Conversion of extracted oil cake fibers into bioethanol including DDGS, canola, sunflower, sesame, soy, and peanut for integrated biodiesel processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 2, p. 157-165, 2009.

BEITEL, S. M.; KNOB, A. *Penicillium miczynskii* β-glucosidase: a glucose-tolerant enzyme produced using pineapple peel as substrate. **Industrial Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 293-300, 2013.

BELL, J. M. Nutrients and toxicants in rapeseed meal: a review. **Journal of Animal Science.** v. 58, p. 996–1010, 1984.

BENSAH, E. C.; MENSAH, M. Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: technologies and innovations. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2013, 2013.

BHATIA, S. K.; KIM, S. H.; YOON, J. J.; YANG, Y. H. Current status and strategies for second generation biofuel production using microbial systems. **Energy Conversion and Management**, v. 148, p. 1142-1156, 2017.

BORGES, M. E.; DÍAZ, L. Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2839-2849, 2012.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

BROWN, J.; DAVIS, J.B.; LAUVER, M.; WYSOCKI, D. USCA Canola Growers' Manual U.S. Canola Association Canola Growers'. **Manual USCA Canola Growers**' Manual. 2008.

CANADIAN INTERNATIONAL GRAINS INSTITUTE. Institut international du Canada pour le grain. **Canola Meal. Feed Industry Guide**. 4. ed. Manitoba, 2018.

CANOLA COUNCIL OF CANADA. Above and beyond, 2013 **Annual report. Canola Coincil of Canada, Winnipeg**, 2013.

CARLSSON, A.S. Plant oils as feedstock alternatives to petroleum—a short survey of potential oil crop platforms. **Biochimie**. v. 91, p. 665–70. 2009.

CASTRO, A. M.; CARVALHO, M.L.A; LEITE, S.G.F.; PEREIRA, N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.** v. 37. p. 151-158. 2010.

CHEN, K.; HAN, Z.; YELIAN, M.; PINGWEI , J. C. Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated rapeseed meal for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 4-5, p. 339-344, 2011.

CHEN, M.; QIN, Y.; LIU, Z.; LIU, K.; WANG, F.; QU, Y. Isolation and characterization of a β-glucosidase from Penicillium decumbens and improving hydrolysis of corncob

residue by using it as cellulase supplementation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 444-449, 2010.

CHEN X.; WANG X.; XUE Y.; ZHANG T-A; HU, J; TSANG Y-F; GAO M-T. Tapping the bioactivity potential of residual stream from its pretreatments may be a green strategy for low-cost bioconversion of rice straw. **Applied Biochemistry and biotechnology**. v. 186; p. 507–524, 2018.

CHOI, C. H.; KIM, J. S.; OH, K. K. Evaluation the efficacy of extrusion pretreatment via enzymatic digestibility and simultaneous saccharification & fermentation with rapeseed straw. **Biomass Bioenergy**. v. 54, p. 211–8, 2013.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos.** Safra 2018/2019. v. 6. n. 4. 2019.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura mensal. Canola. Período: Janeiro de 2017.** 2017.

CORRÊA, R. C. G.; RHODEN, S. A.; MOTA, T. R.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A.; DE SOUZA, C. G. M.; POLIZELI, M. L.T. M.; BRACHT, A; PERALTA, R. M. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

DELABONA, P. S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z. B.; PAIXAO, D. A.; FARINAS, C. S.; CAIRO, J. P.; LIMA, D. J.; SQUINA, F. M.; RULLER, R.; PRADELLA, J.G. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α-L-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 500-507, 2013.

DHIMAN, S. S.; SELVARAJ, C.; LI, J.; SINGH, R.; ZHAO, R.; KIM, D. ; KIM, J. Y.; KANG, Y. C.; LEE J-K. Phytoremediation of metal-contaminated soils by the hyperaccumulator canola (*Brassica napus* L.) and the use of its biomass for ethanol production. **Fuel**. v. 183; p. 107-114, 2016.

DILLON, A.J.P.; BETTIO, M.; POZZAN, F. G.; ANDRIGHETTI, T.; CAMASSOLA, M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose **Journal of Applied Microbiology**. 111:48-53, 2011.

DOS REIS CELESTINO, J.; DE CARVALHO, L. E.; DA PAZ LIMA, M.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; DE SOUZA, J. V. B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569-575, 2014.

DUTTA, T.; SAHOO, R.; SENGUPTA, R.; RAY, S.S.; BHATTACHARJEE, A.; GHOSH, S. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. J. Ind. Microbiol. Biotechnol, v. 35, p. 275-282. 2008.

EPA, **Regulation of fuels and fuel additives: cellulosic biofuel standard**, Fed. Regist, v. 79, n. 85, 2014.

EXECUTIVE SUMMARY OF THE IMPACT ASSESSMENT ON INDIRECT LAND-USE CHANGE RELATED TO BIOFUELS AND BIOLIQUIDS, **European Commission,** Brussels, 2012. SWD n 344.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; DE ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; DE REZENDE, S. T. *Chrysoporthe cubensis*: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 296-305, 2013.

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

GARG, S. K.; NEELAKANTAN, S. Effect of cultural factors on cellulase activity and protein production by *Aspergillus terreus*. **Biotechnology and Bioengineering.** v. 23, p. 1653-1659.1981.

GARMAKHANY, A. D.; KASHANINEJAD, M.; AALAMI, M.; MAGHSOUDLOU, Y.; KHOMIERI, M., TABIL, L. G. Enhanced biomass delignification and enzymatic saccharification of canola straw by steam-explosion pretreatment. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v. 94, n. 8, p. 1607–13, 2014.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; FOLETTO, E. L.; KUHN, R. C.; JAHN, S. L.; MAZUTTI, M. A. Production of cellulolytic enzymes and application of crude enzymatic extract for saccharification of lignocellulosic biomass. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 560-572, 2015.

GEORGE, N.; YANG, Y.; WANG, Z.; SHARMA-SHIVAPPA, R.; TUNGATE, K. Suitability of canola residue for cellulosic ethanol production. **Energy e Fuels**, v. 24, n. 8, p. 4454-4458, 2010.

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

GOTTSCHALK, L.M.F.; OLIVEIRA, R.A.; BON, E.P.D.S. Cellulases, xylanases, bglucosidase 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.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current opinion in chemical biology**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

GUILHERME, A. D. 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**, v. 34, n. 4, p. 937-947, 2017.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.

GUSAKOV, A. V.; SINITSYN, A. P. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. **Biofuels**, v. 3, n. 4, p. 463-477, 2012.

HA, M-A; APPERLE, D. C.; EVANS, B.W.; HUXHAM, I.M.; JARDINE, W.G.; VIETOR, R.J.; REIS, D.; VIAN, B.; JARVIS, M.C. Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. **The Plant Journal**.v.16, p.183-190, 1998.

HAN, L.; FENG, J.; ZHANG, S.; MA, Z.; WANG, Y.; ZHANG, X. Alkali pretreated of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 53-61, 2012.

JI, W.; SHEN, Z.; WEN, Y. A continuous hydrothermal saccharification approach of rape straw using dilute sulfuric acid. **BioEnergy Research**. v. 4; p. 1392–401, 2014.

JIANG, X.; GENG, A.; HE, N.; LI, Q. New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. **Journal of Bioscience and Bioengineering** v. 111, p. 121–127. 2010.

KANG, K. E.; JEONG, G. T.; SUNWOO, C.; PARK, D. H. Pretreatment of rapeseed straw by. soaking in aqueous ammonia. **Bioprocess and Biosystems Engineering.** v. 35, n. 1–2; p.77–84, 2012.

KARLSSON, H.; BÖRJESSON, P.; HANSSON, P. A.; AHLGREN, S. Ethanol production in biorefineries using lignocellulosic feedstock–GHG performance, energy balance and implications of life cycle calculation methodology. **Journal of cleaner production**, v. 83, p. 420-427, 2014.

KHAJALI, F.; SLOMINSKI, B. A. Factors that affect the nutritive value of canola meal for poultry. **Poultry Science.** v. 91, p. 2564–2575. 2012.

KIM, D.; CHO, J. E.; KIM, J. W.; LEE, Y. W; CHUNG H. Production of cellulases by

Penicillium sp. in a solid- state fermentation of oil palm empty fruit bunch. **African Journal of Biotechnology**. v. 13. n.1; p. 145-155, 2014.

KLEMM, D.; PHILIPP, B; HEINZE, T.; HEINZE, U.; WAGENKNECHT, W. **Comprehensive cellulose chemistry**. Chichester: Wiley VCH; 1998.

KNOB, A.; BEITEL, S.M.; FORTKAMP, D.; TERRASAN, C.R.F.; ALMEIDA, A.F. Production, purification and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

KOWSARI, M. **Pictures for Lignocellulose structure**. Disponível em: < http://biofuel.webgarden.com/>. Acesso em 10 de dezembro de 2018.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 302-314, 2009.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.

LIAO, J. C.; MI, L.; PONTRELLI, S.; LUO, S. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 288-304, 2016.

LIU, Y.T.; LUO, Z.Y.; LONG, C.N.; WANG, H.D.; LONG, M.N.; HU, Z. Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid-state fermentation with rice bran. **New Biotechnol**. v. 28; p. 733-737, 2011.

LOHMEIER-VOGEL, E. M.; LEUNG, K. T.; LEE, H.; TREVORS, J. T.; VOGEL, H. J. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of the effect of pentachlorophenol (PCP) on the physiologies of PCP-degrading microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 3549–3556. 1998.

LOPES, M. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; DE AMORIM NETO, H. B.; DE AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.

LYND, L. R.; LIANG, X.; BIDDY, M. J.; ALLEE, A.; CAI, H.; FOUST, T.; HIMMEL, M. E.; LASER, M. S; WANG, M.; WYMAN, C. E. Cellulosic ethanol: status and innovation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 45, p. 202-211, 2017.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; GUIMARAES, V. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 44-49, 2015.

MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. 3 **Biotech**, v. 5, n. 5, p. 597-609, 2015.

MICHELIN, M.; RUIZ, H. A.; SILVA, D. P.; RUZENE, D. S.; TEIXEIRA, J. A.; POLIZELI, M. L. T. Cellulose from lignocellulosic waste. **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**, p. 475-511, 2015.

MORALES, M.; QUINTERO, J.; CONEJEROS, R.; AROCA, G. Life cycle assessment of lignocellulosic bioethanol: environmental impacts and energy balance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 1349-1361, 2015.

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**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MUPONDWA, E.; LI, X.; TABIL, L.; SOKHANSANJ, S.; ADAPA, P. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part I: Pretreatment technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 178-190, 2017.

MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 20, 2006.

NEVAREZ, L.; VASSEUR, V.; LE MADEC, A.; LE BRAS, M. A.; COROLLER, L.; LEGUÉRINEL, I.; BARBIER, G. Physiological traits of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 166-171, 2009.

NIRANJANE, A. P.; MADHOU, P.; STEVENSON, T. W. The effest of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantean*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1464-1468, 2007.

OECD-FAO. 2015. **Agricultural outlook 2015-2024.** Disponível em: www.Fao.Org/3/a-i4738e.Pdf. Acesso em 30 de janeiro de 2019.

PAL, S.; BANIK, S. P.; KHOWALA, S. Mustard stalk and straw: a new source for production of lignocellulolytic enzymes by the fungus *Termitomyces clypeatus* and as a substrate for saccharification. **Industrial Crops and Products.** v. 41, p. 283–8, 2013.

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

PINO, M. S; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; MICHELIN, M., FLORES-GALLEGOS, A. C.; MORALES-RODRIGUEZ, R.; TEIXEIRA, J. A.; RUIZ, H. A. Bioreactor design for enzymatic hydrolysis of biomass under the biorefinery concept. **Chemical Engineering Journal**, v. 347, p. 119-136, 2018.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**, Second ed. Blackie Academic and Professional, 1997.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATI, A.C.S.; MONTI, R.; TERENZI, H.F.; JORGE, J.A.; AMORIN, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

QUINN, G.P.; KEOUGH, M.J. **Experimental design and data analysis for biologists**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 557p.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. In: CHANDEL, A.K; SILVÉRIO DA SILVA, S (ed). **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass-techniques, applications and commercialization**. IntechOpen, 2013.

REINA, L.; BOTTO, E., MANTERO, C., MOYNA, P., MENÉNDEZ, P. Production of second generation ethanol using *Eucalyptus dunnii* bark residues and ionic liquid pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 116-121, 2016.

RFA - Renewable Fuel Association, 2018. **World Fuel Ethanol Production.** Disponível em: https://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/world/ Acesso em 5 de janeiro de 2019.

RÍOS-FRÁNQUEZ, F. J.; ROJAS-REJÓN, O. A.; ESCAMILLA-ALVARADO, C. Microbial enzyme applications in bioethanol producing biorefineries: overview. In: RAY, R. C.; RAMACHANDRAN, S (ed.). **Bioethanol Production from Food Crops.** Sustainable Sources, Interventions, and Challenges. Academic Press. cap. 13. p. 249-266, 2019.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANTOS, V. T. O.; ESTEVES, P. J.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. Characterization of commercial cellulases and their use in the saccharification of a sugarcane bagasse sample pretreated with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1089-1090. 2010.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable energy**, v. 37, n. 1, p. 19-27, 2012.

SILVA-FERNANDES, T.; DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F.; MARQUES, S.; LOUREIRO-DIAS, M. C.; FONSECA, C.; GÍRIO, F. Biorefining strategy for maximal monosaccharide recovery from three different feedstocks: eucalyptus residues, wheat straw and olive tree pruning. **Bioresource Technology**, v. 183, p. 203-212, 2015.

SINGH, R.; VARMA, A.J.; LAXMAN R.S.; RAO, M. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases; Comparison with commercial cellulase. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 6679-6681, 2009.

SINGH, G.; JOYCE, E. M.; BEDDOW, J.; MASON, T. J. Evaluation of antibacterial activity of ZnO nanoparticles coated sonochemically onto textile fabrics. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2, n. 1, p. 106-120, 2012.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SUKUMARAN, R.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 500–507, 2013.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 46, p. 541–549, 2010.

SINGHVI, M.S.; ADSUL, M.G.; GOKHALE D.V. Comparative production of cellulase by mutant of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of Avicel and cellulose. **Bioresour. Technol.** v. 102; p. 6569-6572. 2011.

SINGLA, A.; DUBEY, S. K., IWASA, H.; INUBUSHI, K. Nitrous oxide flux from Komatsuna (*Brassica rapa*) vegetated soil: a comparison between biogas digested liquid and chemical fertilizer. **Biology and fertility of soils**, v. 49, n. 7, p. 971-976, 2013.

SINGLA, A.; DUBEY, S. K.; SINGH, A.; INUBUSHI, K. Effect of biogas digested slurry-based biochar on methane flux and methanogenic archaeal diversity in paddy soil. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 197, p. 278-287, 2014.

SINGLA, A.; IWASA, H.; INUBUSHI, K. Effect of biogas digested slurry based-biochar and digested liquid on N_2O, CO_2 flux and crop yield for three continuous cropping cycles of komatsuna (*Brassica rapa var. perviridis*). **Biology and fertility of soils**, v. 50, n. 8, p. 1201-1209, 2014.

SINGLA, A.; INUBUSHI, K. Effect of biochar on CH_4 and N_2O emission from soils vegetated with paddy. **Paddy and water environment**, v. 12, n. 1, p. 239-243, 2014.

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

TAHIR, M. H.; ÇAKMAN, G., GOLDFARB, J. L., TOPCU, Y., NAQVI, S. R., CEYLAN, S. Demonstrating the suitability of canola residue biomass to biofuel conversion via pyrolysis through reaction kinetics, thermodynamics and evolved gas analyses. **Bioresource Technology**, v. 279, p. 67-73, 2019.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010.

THATOI, H.; DAS, S.; MISHRA, J., RATH, B. P.; DAS, N. Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 146, p. 383-399, 2014.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

UÇKUN, K. E.; SALAKKAM, A.; TRZCINSKI, A.P; BAKIR, U.; WEBB, C. Enhancing the value of nitrogen from rapeseed meal for microbial oil production. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 50. p. 337–342. 2012.

UNICA-União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Relatório Final da Safra 2016/2017**, Departamento de Economia e Estatística. Região Centro-Sul, 2017.

USDA-United States Department of Agriculture Economic Research Service. **Canola**. Disponível em: https://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/canola.aspx . Acesso em 10 de janeiro de 2019

VAN DE LAGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Modelling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid-containing solid-state fermentation for tannase production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1773-1782, 2005.

VIEIRA, E.S.F. **Caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha.** 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) – Instituto Superior de Agronomia - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p. 42-43, 1956.

WANASUNDARA, J. P.; MCINTOSH, T. C.; PERERA, S. P.; WITHANA-GAMAGE, T. S.; MITRA, P. Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition. **OCL**, v. 23, n. 4, p. D407, 2016.

WHEELER, K.A., HURDMAN, B.F., PITT, J.I. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 12, n. 141–149, 1991.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. 2 ed. New York, Basel & Hong Kong: Marcel Dekker, 1994.

XIAO, M-Z SH-J; DONG, Q-H. Reducing sugars production from pretreated rapeseed straw. **Journal of Chongqing University**. v.11, n. 4; p.183–194, 2012.

YOO, C. G.; PU, Y.; RAGAUSKAS, A. J. Ionic liquids: Promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 5-11, 2017.

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

ZHANG, Z.; LIU J-L; LAN, J. Y, DUAN, C-J; MA Q-S; FENG J-X. Predominance of *Trichoderma* and *Penicillium* in cellulolytic aerobic filamentous fungi from subtropical and tropical forests in China, and their use in finding highly efficient β-glucosidase. **Biotechnology for Biofuels** v. 7; n.107 p. 2-14, 2014.