UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

DETERMINAÇÃO DE TEMPERATURA ÓTIMA E PH ÓTIMO DAS CELULASES PRODUZIDAS POR *PENICILLIUM SP*. FSDE 15

HERITIER KABAMBA SUBISSAY

João Pessoa – PB

2022

HERITIER KABAMBA SUBISSAY

DETERMINAÇÃO DE TEMPERATURA ÓTIMA E PH ÓTIMO DAS CELULASES PRODUZIDAS POR PENICILLIUM SP. FSDE 15

Trabalho Final de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Carlos Alberto Bispo de Sousa

João Pessoa
2022

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S941dd Subissay, Heritier Kabamba.
DETERMINAÇÃO DE TEMPERATURA ÓTIMA E pH ÓTIMO DAS CELULASES PRODUZIDAS POR PENICILLIUM SP. FSDE 15 / Heritier Kabamba Subissay. - João Pessoa, 2022.
36 f. : il.

Orientação: CARLOS ALBERTO BISPO DE SOUSA.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Temperatura ótima. 2. pH ótimo. 3. Extrato Bruto. 4. Catálise Enzimática. I. SOUSA, CARLOS ALBERTO BISPO DE. II. Título.

UFPB/CT/BSCT CDU 66.01(043.2)

Elaborado por ONEIDA DIAS DE PONTES - CRB-15/198

HERITIER KABAMBA SUBISSAY

DETERMINAÇÃO DE TEMPERATURA ÓTIMA E PH ÓTIMO DAS CELULASES PRODUZIDAS POR PENICILLIUM SP. FSDE 15

Trabalho Final de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Engenharia Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

APROVADO EM: 25/06/2022

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa – DEQ/CT/UFPB
(Orientador)

Prof. Dr. Genaro Zenaide Clericuzi – DEQ/CT/UFPB
(Avaliador)

Lucas Araújo Trajano Silva – PPGEQ/CT/UFPB
(Avaliador)

Dedico este trabalho a DEUS,
Aos meus filhos,
Aos meus pais.

" L'énergie qui me traverse me vient de l'univers." (autoria própria)
"O maior valor da vida não é o que você conquista, mas o que você se torna ao longo das suas conquistas." (Marcelo Medeiros)

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grato a Deus pelas coisas que fez na minha vida.

Aos meus pais Madeleine Nsea Tshiama e Godefroid Kabemba Betekedi pelo apoio financeiro, moral e espiritual que me proporcionaram durante meus estudos .

Aos meus avós Kabamba Subissay e Mujinga Bisaka por suas forças, proteção, amor, experiências dos trabalhos, foram um grande exemplo de vida para nossa grande família.

Aos meus irmãos, Anies Kabemba, Rebecca Kabemba, Nicoderme Kabemba, Potter Kabemba e Bety Kabemba, por todas as coisas que passamos juntos nessa vida.

Ao Prof. Dr Carlos Alberto Bispo de Sousa, saiba que suas riquezas do conhecimento científico tiveram grande contribuição durante o período do meu curso. Obrigado pela disponibilidade em aceitar ser meu orientador nessa etapa tão decisiva.

À minha companheira Larissa Maria do Nascimento da Silva, pela força, presença, amor e apoio.

Aos professores do curso de Engenharia Química da UFPB: Nagel Alves, Sharline, Bispo , Fabiola, Arioston, Leopoldo, Genaro, Joselene, Flávio, Viviane e Karla.

Aos membros do Laboratório de LPFD, por todo o apoio e auxílio nas atividades e procedimentos experimentais.

Aos colegas do curso de Engenharia Química, Química Industrial e Química: Tássio Max, Carlos Alberto Júnior, Pedro, Jonas, Romário, Fernando, Rodolpho, Agostinho, Luan, Gabriel Costa, Rodrigo e Fagner.

Aos amigo(a)s: Walter Gama, Carlos Alberto Junior, André Sabino, Itamara Cortez, Claudina Tranjano, Bibiana Dutra, Drovot, Serge Katembera, Lieka, Cristal Tshishimbi, Michelle Agnoleti, Diego Kazadi, Luan de Souza, Iolanda Carvalho, Saulo Menezes, Valdete Nascimento, Marta de Oliveira, Cleonise, Douglas, Larissa Perreira, Wallace, Laltone e Felipe.

RESUMO

As celulases são enzimas produzidas a partir de diversos tipos de microrganismos, como fungos e bactérias. São utilizadas na Indústria de alimentos, papel e celulose, gestão de resíduos, detergentes, entre outras. Porém, uma aplicação emergente é na produção de biocombustíveis a partir de resíduos agroindustriais, ricos em lignocelulose, sendo que diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para obtenção de enzimas adequadas para esse processo. Assim, este trabalho teve por objetivo caracterizar as enzimas celulases produzidas pelo fungo *penicillium sp.* FSDE 15 na fermentação em estado sólido em meio composto por sabugo de milho e farelo de trigo, afim de se determinar a temperatura e pH ótimo de atuação das enzimas CMCases, FPases e AVICELases. O processo fermentativo para obtenção das enzimas foi conduzido de acordo com as condições mais adequadas mensionadas na literatura. A temperatura ótima foi determinada a partir da análise de atividade com pH fixo em 4,8 e temperaturas de 40, 50, 60,70,80 e 90°C. Já o pH ótimo foi determinado mantendo-se a temperatura fixa em 50°C e variando-se o pH nos valores de 2,88; 3,84, 4,8 e 6,2. Os resultados mostraram que as enzimas celulases produzidas pelo fungo *Penicillium sp*. FSDE 15 apresentam boa tolerância à temperatura e valores baixos de pH. As enzimas CMCases e FPases apresentaram temperatura ótima em 50 °C. Já as avicelases apresentaram temperatura ótima em 40°C. Além disso, as enzimas ainda apresentavam atividade, embora com valor mais reduzido, na temperatura de 90 °C. O ensaio de determinação do pH ótimo demosntrou que as enzimas têm melhor atuação em pH ácido. Foi encontrado o valor de 3,84 como pH ótimo das atividades de CMCases e AVICELases e 2,88 para as FPases. As celulases presentes no extrato bruto do fungo *Penicillium sp.* FSDE 15 demosntraram características adequadas de pH e temperatura ótima para aplicação em processos de hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

Palavras Chaves: temperatura ótima , pH ótimo, extrato bruto, catálise enzimática.

.

ABSTRACT

Cellulases are enzymes produced from different types of microorganisms, such as fungo and bacteria. They are used in the food, pulp and paper industry, waste management, detergents, among others. However, an emerging application is in the production of biofuels from agro-industrial residues, rich in lignocellulose, and several studies have been developed to obtain suitable enzymes for this process. Thus, this work aimed to characterize the cellulase enzymes produced by the fungus*penicillium sp.* FSDE 15 in solid state fermentation in a medium composed of corn cob and wheat bran, in order to determine the temperature and optimal pH for the performance of the CMCases, FPases and AVICELases enzymes. The fermentation process to obtain the enzymes was carried out according to the most suitable conditions mentioned in the literature. The optimal temperature was determined from the analysis of activity with pH fixed at 4.8 and temperatures of 40, 50, 60, 70, 80 and 90°C. The optimal pH was determined by keeping the temperature fixed at 50°C and varying the pH at values of 2.88; 3.84, 4.8 and 6.2. The results showed that the cellulase enzymes produced by the fungus Penicillium sp. FSDE 15 have good temperature tolerance and low pH values. The CMCases and FPases enzymes showed an optimal temperature at 50 °C. The avicelases had an optimal temperature of 40°C. In addition, the enzymes still showed activity, although with a lower value, at a temperature of 90 °C. The test to determine the optimal pH showed that the enzymes perform better at acidic pH. A value of 3.84 was found as the optimal pH for the activities of CMCases and AVICELases and 2.88 for FPases. The cellulases present in the crude extract of the fungus Penicillium sp. FSDE 15 demonstrated adequate pH and temperature characteristics for application in enzymatic hydrolysis processes of lignocellulosic materials. 84 as the optimal pH for the activities of CMCases and AVICELases and 2.88 for FPases. The cellulases present in the crude extract of the fungus Penicillium sp. FSDE 15 demonstrated adequate pH and temperature characteristics for application in enzymatic hydrolysis processes of lignocellulosic materials. 84 as the optimal pH for the activities of CMCases and AVICELases and 2.88 for FPases. The cellulases present in the crude extract of the fungus Penicillium sp. FSDE 15 demonstrated adequate pH and temperature characteristics for application in enzymatic hydrolysis processes of lignocellulosic materials.

Key words:optimal temperature, optimal pH, crude extract, enzymatic catalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Acão sinérgica das celulase.....17

Figura 2- Ação das celulases sobre a celulose.....18

Figura 3 -Planta de Milho.....20

Figura 4 – Farelo de Trigo.....22

Figura 5 -Sabugo de Milho(a), Moinho(b) e substrato formado trigo e milho.....22

Figura 6 – O fungo *penicillium sp.* FDSE 15.....23

Figura 7 – Preparação do meio cultivo.....24

Figura 8- Extrato enzimatica bruto.....25

Figura 9- Temperatura ótima para enzimas CMCase, Fpase e B-glicosidade.....30

Figura 10 - pH ótimo para enzimas CMCase, Fpase e B-glicosidade.....33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Resultados do ensaio de Teperatura ótima para CMCase.....28

TABELA 2- Resultados do ensaio de Temperatura ótima para Fpase.....28

TABELA 3- Resultados do ensaio de Temperatura ótima para AVICELase.....29

TABELA 4 – Resultados do ensaio do pH ótimo para CMCase.....31

TABELA 5- Resultados do ensaio de pH ótimo para Fpase.....32

TABELA 6- Resultados do ensaio de pH ótimo para AVICELase.....32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....13

1.1Objetivos.....15

1.1.1 Objetivo geral.....15

1.1.2 Objetivos específicos.....15

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....16

2.1 Enzimas Celulases.....16

2.2 Processo de obtenção de celulases.....17

2.3 Fermentação em estado Sólido.....18

2.4 Influência da temperatura e pH na atividade enzimática.....19

2.5 Milho.....20

2.6 Farelo de Trigo.....21

3. METODOLOGIA.....21

3.1 Local de Estudos.....21

3.2 Preparação dos Substratos.....21

3.3 Microorganismo e inóculo.....22

3.4 Processo fermentativo.....24

3.4.1 Correção da umidade do substrato.....24

3.4.2 Esterilização e cultivo.....24

3.4.3 Inoculação e cultivo.....25

3.4.4 Obtenção do extrato enzimatico bruto.....25

3.5 Determinação das atividades enzimáticas.....25

3. 6 Determinação da temperatura ótima.....27

3.7 Determinação do pH ótimo.....27

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....27

4. 1 Resultado da melhor Temperatura ótima.....27

4.1.1 CMCase na determinação de temperatura.....27

4.1.2 Fpase na determinação de temperatura.....28

4.1.3 AVICELase na determinação de temperatura.....29

4. 2 Resultado do melhor pHótimo.....31

4.2.1 CMCase na determinação do pH.....31

4.2.2 Fpase na determinação do Ph.....31

4.2.3 AVICELase ns determinação do Ph.....32

5. CONCLUSÃO.....**34**

REFERÊNCIAS.....**35**

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são aplicadas em diversos tipos de processos industriais, por causa de suas características especiais, como a alta especificidade e potencial catalítico. Diferentes áreas do setor produtivo, tais como a indústria de papel e celulose, a indústria têxtil, indústria de alimentos, indústria de ração animal, entre outras, aplicam enzimas de diversos tipos em seus processos (KUHAD *et al.*, 2011).

Apesar de diversos estudos dedicarem-se à pesquisa de novas enzimas, estas só apresentam importância comercial se forem capazes de atender a demanda e as exigências técnicas e econômicas do processo em questão (BRAVO *et al.*, 2000 *apud* SOUSA, 2010, p. 13).

Atualmente, há uma grande demanda por enzimas de uso industrial. Diversos trabalhos acadêmicos e setores industriais de pesquisa e desenvolvimento têm pesquisado a obtenção de diversas enzimas de origem microbiana, buscando enzimas de baixo custo de produção, com alta seletividade, atividade e estabilidade. As celulases são enzimas capazes de hidrolisar a biomassa lignocelulósica em unidades menores de carboidratos, como a glicose, a qual pode ser utilizada na obtenção de biocombustíveis.

Infelizmente, apesar da grande demanda mundial, os custos de produção de celulases ainda são elevados, o que dificulta a viabilidade da tecnologia de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Sua produção dá-se por meio de processos fermentativos utilizando principalmente fungos filamentosos. A etapa de produção pode ter seus custos reduzidos caso se opte por utilizar meios de cultivo complexos, como resíduos agroindustriais em processos de fermentação em estado sólido (SANTOS, 2021).

O processo de Fermentação em Estado Sólido (FES) utilizando resíduos da agroindústria para cultivo de fungos filamentosos tem se mostrado uma alternativa viável para produção de enzimas, uma vez que utiliza resíduos agroindustriais de baixo custo como fonte de carbono, fonte indutora e suporte para os bioprocessos de obtenção de enzimas.

Uma vez obtidas as enzimas, é importante sua caracterização para se determinar as condições mais adequadas de temperatura e pH nas quais elas poderiam ser aplicadas em processos industriais.

Diante do exposto, este trabalho final de curso teve por objetivo avaliar a influência da temperatura e pH na atividade de celulases produzidas por *penicillium sp.* FSDE 15 na fermentação em estado sólido em meio composto por sabugo de milho e farelo de trigo.

Para tanto, foi produzido o extrato enzimático de acordo com as melhores condições apontadas na literatura e, avaliada a atividade enzimática em diferentes valores de temperatura e pH, afim de se determinar a temperatura ótima e o pH ótimo das atividades enzimáticas expressas como carboximetilcelulase (CMCase), FPase (aplicação da atividade enzimatica sobre celulose amorfa) e B-Glicosidase (AVICELase, ou atividade sobre celulose microcristalina).

1.1 . OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Avaliar a Temperatura ótima e o pH ótimo, das enzimas celulases produzidas por *penicillium sp*. FSDE 15.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Fazer o repique do microrganismo *Penicillium sp* FSDE 15 para obter o inóculo.
- Promover a fermentação em estado sólido do fungo *Penicillium sp* FSDE 15 nas melhores condições apontadas na literatura e obter o extrato enzimático bruto.
- Caracterizar as enzimas celulases presentes no extrato bruto (CMCases, FPases e AVICELases) quanto à temperatura ótima, e pH ótimo

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS CELULASES

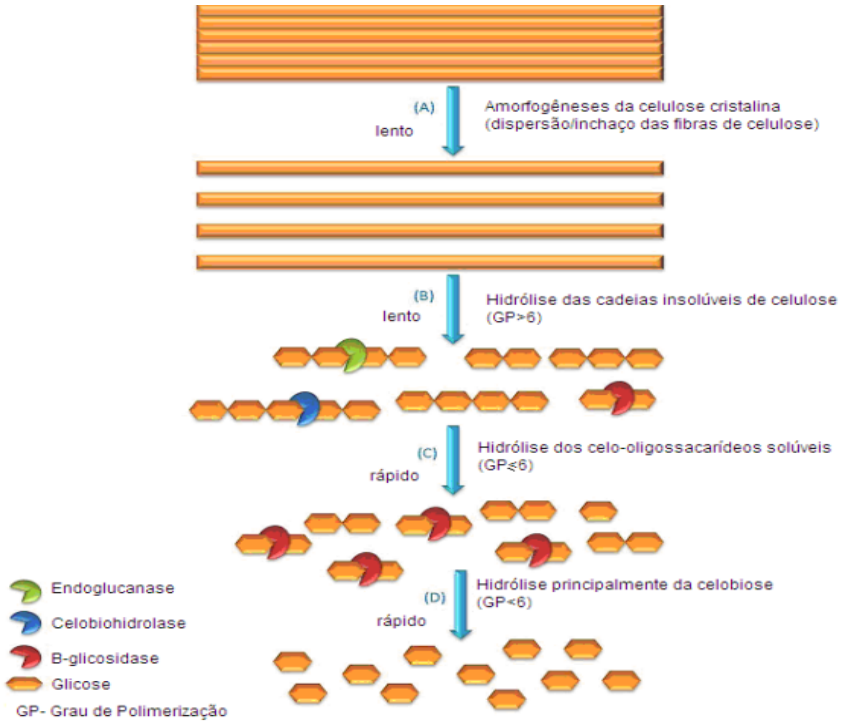
As enzimas do complexo celulolítico ou celulases são responsáveis pela degradação da celulose, principal componente do tecido vegetal. Apresentam aplicação em diversos setores industriais, tais como na produção de detergente, na indústria têxtil, na indústria de papel e celulose e na indústria de alimentos (CERQUEIRA et al., 2022).

É a terceira enzima mais utilizada internacionalmente em escala industrial, sendo que a aplicação que mais tem ganhando destaque atualmente é a conversão de materiais lignocelolúsicos em açúcares fermetascíveis para a obtenção de bioetanol (SANTOS, 2021).

As celulases são classificadas de acordo com seu local de ação no substrato celulósico, dividindo-se em três grandes grupos: a) Endoglucanases (EGases), que clivam ligações internas da fibra celulósica; b) Exoglucanases (ExGases), que atuam na região externa da celulose; e c) β-glicosidases (βGases), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis a glicose (SANTOS, 2021).

A atuação das celulases apresenta melhor rendimento quando as enzimas atuam em sinergia, com vários tipos de celulases agindo ao mesmo tempo, conforme mostra a Figura 3.1. Os processos de hidrólise acontecem simultaneamente. A hidrólise primária que ocorre na superfície de substratos sólidos, libera açúcares solúveis com grau de polimerização até 6. A etapa de despolimerização realizada por EGases e ExGases é o passo limitante para todo o processo de hidrólise da celulose. A hidrólise secundária envolve a hidrólise de celobiose em glicose pelas β-glicosidases, embora algumas β-glicosidases também hidrolisem celodextrinas (FLORENCIO, 2011).

Figura 1-Ação sinérgica das celulases



Fonte: Florencio, 2011.

2.2 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CELULASES

As celulases produzidas por micro - organismos são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente no tecido vegetal. Têm-se a celulase como a principal enzima responsável pela decomposição prévia do resíduo celulolítico. O pré-tratamento da celulose é um elemento chave para sua conversão biológica, tornando o processo mais ecológico e econômico, pois diminui o gasto com máquinas e diminui os custos com aterros.

A obtenção de celulases ainda é um processo que envolve muitos custos, encarecendo o preço final das enzimas. Por esse motivo, é indispensável o desenvolvimento das realizações dos processos fermentativos que produzam extratos enzimático de preço baixo.

As celulases encontram-se fácil na matéria vegetal e nos seus processos no solo realizando a degradação. (SANDGREN et al, 2005). E entres esses microrganismos, alguns

dele tem a eficiência celulósicos de realizar a degradação com a celulose natural (REGGER et al, 2004)

As celulases são enzimas que possuem o papel importante, responsáveis pela degradação da celulose, componete principal e presente nas células vegetais. Celulose é um polissacarídeo que é formado por diversos componetes de glicose ligadas entre si a partir de ligações químicas.

As celulases realizem a quebra das ligações químicas existentes entre os componetes de glicose que realizem a celulose. As celulases formam três enzimas que fazem parte desse grupo e tem os nomes de endoglucanases, exoglucanases e beta-glicosidases. (WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. , 1988). A ação das celulases é mostrada na Figura 3.2

Figura 2- Ação das celulases sobre a molecula de celulose

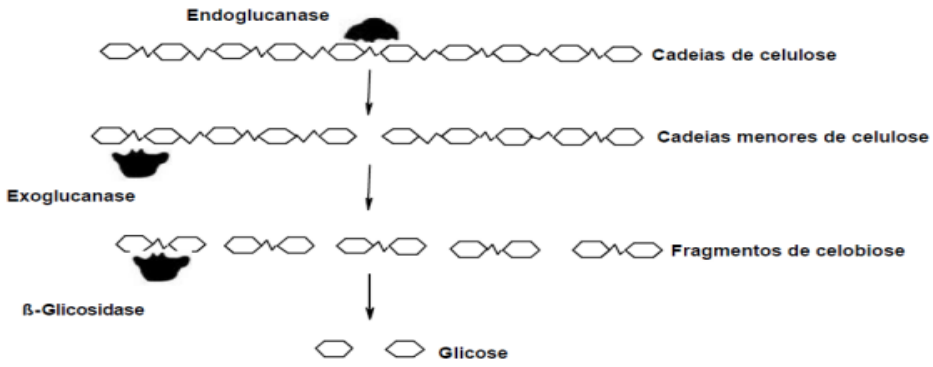


Figura 1: Ação das celulases sobre a molécula de celulose (modificado de WRIGHT et al., 1988)

2.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

A fermentação é um dos métodos mais antigos para elaboração, transformação e conservação de alimentos utilizados pelo homem. Na produção de enzimas por meio de microrganismos, especialmente por fungos, são utilizadas duas técnicas distintas, a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido. A única diferença entre esses dois meios é que a presença da água ligada com o substrato. Na Fermentação Submersa, os microrganismos desenvolvem no meio líquido e na Fermentação do Estado Solido, não há presença da fase aquosa no meio de cultivo, estando este apenas úmido (SOCCOL *et al.*, 2017 *apud* SANTOS *et al,* 2021).

A Fermentação do Estado Sólido proporciona benefícios em comparação à

Fermentação Submersa, em especial quando o cultivo é feito com fungos filamentosos. Apresentam maior rendimento, produtividade e menor gasto de energia. Além disso, proporciona uma melhor adaptação ao fungo, uma vez que pode se utilizar de fontes de carbono naturais e de baixo custo, como resíduos agroindustriais. (RAMOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2021).

2.4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O pH e a temperatura são fatores importantes para diversos tipos de reações químicas. No caso das enzimas, são parâmetros que podem ser utilizados para se obter o máximo de rendimento, controlando a atividade das enzimas ou definindo limites para sua utilização.

O aumento da temperatura proporciona um aumento na velocidade da reação catalítica. Porém, o aumento da temperatura também favorece a reação de desativação enzimática por meio de desnaturação irreversível. Existe, portanto, um valor de temperatura ótima, no qual a atividade enzimática é máxima e a partir do qual a atividade tenderá a diminuir por desnaturação da enzima, que se dá a partir da modificação na conformação da estrutura enzimática em altas temperaturas e se aplica na ligação enzima- substrato, impossibilitando a enzima de poder realizar sua função catalítica (BORZANI,2001; SANGUINE, FERNANDES, 2014).

Já o pH, influência diretamente na carga superficial das enzimas. Modificações no pH do meio reacional causará interferência no estado de ionização da enzima e também na velocidade de reação. Geralmente, as enzimas possuem grupos químicos ionizáveis nas cadeias laterais de seus aminoácidos e, conforme varia o pH do meio, estes grupos podem apresentar carga elétrica negativa, positiva ou neutra, influenciando na quantidade de sítios ativos disponíveis ou na estrutura da enzima, já que estes grupos são responsáveis pela manutenção da estrutura da molécula.

Assim, uma vez que a atividade catalítica da enzima decorre de seu estado de ionização, e sua eficiência depende da compatibilidade da interação enzima e substrato. (BORZANI, 2001; DOMEMANN, 2016 TORRES, 2001).

Portanto haverá um valor de pH ou faixa de valores nos quais a atividade será máxima, sendo que em alguns valores, não será observada atividade enzimática.

As enzimas produzidas por diferentes tipos de microrganismos, apresentam características diferentes e diferentes condições operacionais e exigências de processo. Por isso,

é importante avaliar como a atividade de diferentes enzimas varia em função da temperatura e pH para se determinar as condições de processos nos quais as enzimas deverão atuar (Sousa, 2010)

2.5 MILHO

As primeiras culturas de milho surgiram na América, em pequenas ilhas próximas ao litoral do México, no continente Americano. Desde então, vem acompanhando a evolução do homem e de suas técnicas produtivas (SILVA, *et al.*, 2019).

O milho (Figura 3.3) é um dos principais cereais cultivados no mundo, fornecendo produtos para a alimentação humana, animal e matérias-primas para a indústria, principalmente em função da quantidade e da natureza das reservas acumuladas nos grãos (COUTO, *et al.*, 2017).

Figura 3 – Pé de Milho

Fonte: CONAB 2021/22-SAFRAS

O Brasil é o terceiro colocado em produção mundial de milho (SILVA *et al.*, 2019, COUTO *et al.*, 2017) estando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, que respondem por metade do mercado internacional (TANKLEVSKA et al., 2020). A produção de milho está entre os segmentos econômicos de maior relevância para o agronegócio brasileiro. Em 2016, produziu 97 milhões de toneladas e ocupou uma área de 17 milhões de hectares. A cultura do milho concentra-se principalmente na Região Centro-Sul, especialmente nos estados de Mato Grosso, Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul, responsáveis por cerca de 68% do total na safra nacional (Companhia Nacional de Abastecimento, 2017), (SOARES, SPOLADOR, 2019).

O sabugo de milho é um resíduo agroindustrial resultante do processamento do milho

e é produzido em grandes quantidades. Corresponde a cerca de 13% do peso bruto da espiga. O sabugo é rico em material lignocelulósico, e algumas estratégias de aproveitamento incluem sua utilização como fertilizante, adsorvente, carvão ativado, produção de biomoléculas e bioetanol (SALES et al, 2021).

2.6 FARELO DE TRIGO

O farelo de trigo é um subproduto gerado pela moagem do trigo (SAFARIPOUR *et al.*, 2021). Apesar de ter uma produção mundial estimada em cerca de 150 milhões de toneladas, somente uma pequena fração dessa quantidade é aproveitada, principalmente para elaboração de ração animal (DAYONG *et al.*, 2020).

Em sua composição, o farelo de trigo apresenta diversos nutrientes, tais como carboidratos, proteínas, gorduras, fibras e fósforo, sendo o teor médio de cada um desses correspondente a 65%, 16,4%, 4.5%, 6% e 1.29%, respectivamente (GUPTA AND NAGAR, 2020). Assim, o farelo de trigo é considerado uma fonte importante de minerais para a alimentação animal (DAYONG *et al.*, 2020).

Além disso, o farelo de trigo apresenta um grande potencial de aplicação como substrato a obtenção de enzimas, proteínas celulares, probióticos de origem microbiana, ácidos orgânicos, e outras biomoléculas via processo fermentativo (BISWAS *et al.*, 2019).

3 METODOLOGIA

3.1 LOCAL DO ESTUDO

As atividades do presente estudo foram realizadas no Laboratório de Produtos Fermento-destilados (LPFD) que fica situado no Centro de Tecnologia (CT) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB) *Campus* I.

3.2 PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS

Para a realização deste trabalho foram adquiridos, no mercado público municipal de João Pessoa - PB, farelo de trigo e milho para a obtenção do sabugo e arroz (utilizado na etapa de repique). O farelo de trigo foi adquirido já moído (Figura 4).

Figura 4 - Farelo de Trigo

Fonte: Própria

O sabugo de milho foi proveniente de milho adquirido no mercado central. Após debulhado e seco, o sabugo foi cortado em pedaços menores e triturado em moinho de facas com peneira ajustada para 10 mesh. e depois a farinha do bagaço foram guardado hermeticamento fechado em vasilha junto com farelo de trigo.

Figura 5- (a) Sabugo de milho; (b) Moinho e (c) Substrato formado por farelo de trigo e sabugo de milho (a) (b) (c)

Fonte:Própria

Fonte: Própria

Fonte: Própria

3.3 MICRORGANISMO E INÓCULO

O microrganismo utilizado na obtenção de celulase foi o fungo *penicillium sp*. FSDE 15 (Figura 3). Este microrganismo foi isolado no solo de descanso da Usina Japungu Agroindustrial S.A, situada na cidade de Santa Rita, Estado da Paraíba por Gonsalves e colaboradores (2017). O mesmo foi conservado sob refrigeração em meio agra-batata-dextrose-(BDA) e foi disponibilizado pelo LABIO (Laboratório de Bioengenharia) do Centro de Tecnologia da UFPB Campus I.

Figura 6- O fungo *penicillium sp* FDSE 15

Fonte: Própria

A obtenção do inóculo consistiu no repique do microrganismo com a finalidade de se obter um grande número de conídeos. Seguiu o procedimento adotado por Sousa (2010), que

consiste no cultivo dos microrganismos em meio de arroz. Para tanto, cerca de 300g de arroz branco foram colocados em água destilada até total imersão e deixados por 30 minutos. Passado esse tempo, o arroz foi recolhido com uma peneira e transferiu-se 15g para um Erlenmeyers de 250 mL de capacidade. Os erlenmeyers foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

Após resfriamento dos Erlenmeyers, adicionou-se 10 mL de Tween 80 à 0,3% na placa de Petri que continha o microrganismo. Agitou-se a área cultivada da placa com uma alça de platina afim de liberar os conídios do meio de cultura, produzindo assim uma suspensão de esporos. Cerca de 1 ml da suspensão obtida foi transferida para cada Erlenmeyer contendo arroz. Os Erlenmeyers foram incubados à temperatura ambiente (30 °C) durante 7 dias.

Após o desenvolvimento dos microrganismos, adicionou-se 40 mL de uma solução de Tween 80 a 0,3% (v/v) nos Erlenmeyers contendo o arroz com esporos. A suspensão obtida foi filtrada com auxílio de gaze e algodão. A concentração de conídeos foi determinada por meio de contagem em Câmara de Neubauer melhorada. De posse da concentração, foi calculado o volume da suspensão que deveria ser transferido para Erlenmeyers contendo o meio preparado com farelo de trigo e sabugo já hidratado, para serem inoculados 10^6 esporos para cada grama de substrato (Santos, 2021):

As equações utilizadas para o cálculo do volume de inóculo foram as seguintes:

$$\text{Concentração (esporo/mL)} = \sum /5 * 10^4 * \text{fator de diluição} \quad (1)$$

Onde: $\sum$ = número de esporos na câmara de Neubauer (quatro extremidades e o centro)

$$\text{Volume inóculo (mL)} = \frac{\text{concentração (esporo/grama)} * \text{massa do meio (g)}}{\text{concentração (esporo/mL)}} \quad (1)$$

3.4 PROCESSO FERMENTATIVO

Uma vez preparados os substrato e o inóculo, conduziu-se o processo fermentativo segundo as melhores condições apontadas por Santos (2021), que foram: substrato formado por 50% de farelo de trigo e 50% de sabugo triturado, umidade de 60%, adição de fonte de nitrogênia a 1%, temperatura ambiente e tempo de cultivo de de 7 dias.

3.4.1 Correção da umidade do substrato

Inicialmente foi realizada a umidade do meio formado por farelo de trigo e sabugo de milho. A umidade deste material foi determinada por perda de água em estufa a 105 °C (ZENEBOM et al., 2008). Em seguida, por meio de um balanço de massa, calculou-se a quantidade de água que deveria ser adicionada a uma determinada massa de substrato para se obter uma umidade de 60 % em base úmida (Equação 1). Para suplementação de nitrogênio, a hidratação não foi realizada com água pura, e sim com uma solução de $(NH_4)_2SO_4$ a 1%.

3.4.2 Esterilização do meio de cultivo

Após correção da umidade, 50 gramas do meio de cultivo foram transferidos para erlenmeyers de 500mL de capacidade e foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos . Após o processo de esterilização, os Erlenmeyer com os meios de cultivo foram deixados em temperatura ambiente para resfriar.

Figura 7 – Preparação do meio de cultivo

Fonte: Própria

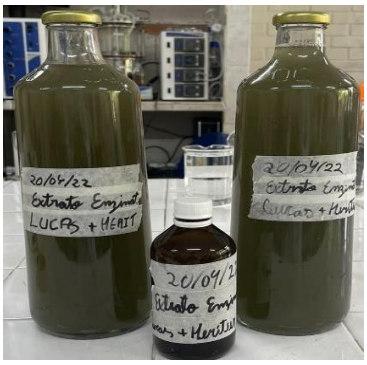
3.4.3 Inoculação e cultivo

Após resfriamento dos meios de cultivo, foi calculada a quantidade de inóculo (descrito anteriormente no ítem 3.3) a ser adicionada em cada Enlenmeyer para obter uma concentração inicial de 10^6 esporos por grama de meio. Em seguida, os recipientes foram agitados, tampados com rolha de algodão e colocados em um Shaker contendo um recipiente com água. O equipamento estava desligado, funcionando apenas como uma estufa, para isolar os cultivos do ambiente externo. Os microrganismos começaram a se desenvolverem em poucos dias. O processo foi parado após 7 dias, com o recolhimento do extrato enzimático bruto.

3.4.4. Obtenção do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático foi obtido adicionando-se 15 mL de tampão citrato 50mMol, pH 4,8 para cada 1 g de meio fermentado (Sousa, 2010). Após homogeneização e repouso de 30 min em temperatura ambiente, as amostras foram filtradas, usando funil e algodão. O extrato enzimático foi estocado em frasco de vidro em geladeira (8°C) para posterior análise de atividade das enzimas celulases (Figura 5).

Figura 8 – Extratos enzimáticos bruto



Fonte:Própria

3.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A atividade enzimática do complexo celulolítico foi determinada de acordo com o protocolo de GHOSE (2007), com adaptações. Foram analisadas as atividades de celulases expressas em carboximetilcelulases (CMCase), exoglucanases (avicelase) e celulase total (FPase).

Tal metodologia consistiu na reação enzimática em condições controlada entre o extrato bruto e substratos específicos (CMC, papel de filtro e celulose microcristalina) determinando-se em seguida a quantidade de açúcares redutores produzidos durante o tempo em que a reação ocorreu.

A determinação da atividade de carboximetilcelulases foi determinada adicionando-se em um tubo de ensaio 1 ml do extrato enzimático com 1, ml de carboximetilcelulose a 1% (w/w), preparada em tampão citrato de sódio 50 m Mol, de pH 4,8. Os tubos foram mantidos em banho termostático a 50°C por 30 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 0,5ml de DNS (ácido 3,5 dinitrosalissílico) em cada tubo, dando início a quantificação dos açúcares redutores, conforme método descrito Vasconcelos et al (2013). Uma amostra em

branco foi realizada para cada análise, substituindo-se a carboximetilcelulose por 1 mL do tampão citrato.

A atividade de exoglucanase (Avicelase) foi realizada de modo semelhante à anterior, sendo que ao invés de se utilizar carboximetilcelulose, foi utilizada uma suspensão de celulose microcristalina 1% (w/w).

A atividade de FPase foi determinada por meio da dosagem de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma fita de papel de filtro qualitativo medindo 1,0 x 6,0cm. Inicialmente, 1mL de tampão citrato de sódio 0,05 M pH 4,8 foi transferido para um tubo de ensaio, no qual foi adicionado 1 mL do extrato enzimático. O tubo foi transferido para um banho termostático a 50°C. Em seguida, adicionou-se a tira de papel no tubo, dando início à reação das enzimas com a celulose do papel. O ensaio em branco não continha o papel. O processo foi conduzido por 30 minutos. Em seguida, os açúcares redutores foram quantificados conforme Vasconcelos et al (2013).

Para todas as atividades enzimáticas testadas, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima (CMCase, FPase ou AVICELase) capaz de liberar 1 micromol de glicose por minuto nas condições do ensaio.

Os cálculos foram realizados com base na Equação 3 (Santos, 2021):

$$\text{Atividade } (\text{U/g}) = \frac{(\text{A}-\text{B})*\text{f}*\text{r}*0{,}5}{0{,}18*10*0{,}25} \qquad (3)$$

Onde: A = Absorbância da amostra;

B = Absorbância do controle da amostra (branco);

f = Fator de conversão da curva de calibração da solução de DNS (mg/mL);

r = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

0,5 = Volume total do meio de reação (mL);

0,18 = Fator de conversão de mg para µmol de glicose;

10 Tempo de reação (min);

0,25 = Volume da enzima no meio de reação (mL).

3. 6 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA

Para a determinar a melhor temperatura na utilização da celulase presentes no extrato, foram conduzidos ensaios nos quais a atividade enzimática foi determinada semelhante ao que foi descrito no ítem 4, porém em diferentes temperaturas: 40, 50, 60,70,80

e 90°C. Mantendo-se o pH fixo em 4,8. A temperatura que resultou em máxima atividade foi atribuída o valor de 100% de atividade. As demais temperaturas tiveram seus valores de atividade expressos como porcentagem destas, denominadas de atividade residual. Elaborou-se um gráfico da atividade residual como função da temperatura para avaliar o efeito da temperatura na atividade enzimática das celulales produzidas.

3.7 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO

Para a determinação do melhor pH na atuação das enzimas a temperatura foi fixada no valor de 50 °C, porém os valores de pH do extrato e das soluções a serem utilizadas na leitura de atividade foram ajustados para pHs próximos a 3,0; 4,0 e 6,0 com adição de gotas de HCl 1 M ou NaOH 1M. Após ajuste, as atividades enzimáticas foram determinadas em cada faixa de pH. Não foi realizado o ensaio em pH 5,0; pois já se tinham os valores para pH 4,8 durante a determinação das atividades a 50 °C. Ao ensaio que apresentou maior valor de atividade foi atribuído o valor de 100% de atividade, sendo os demais expressos como percentagens deste valor, ou seja, atividades residuais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS DOS ENSAIOS DE TEMPERATURA ÓTIMA

4.1.1. CMCases

Os resultados de atividade para as CMCases encontram-se na Tabela 1:

TABELA 1– Resultados do ensaio de teperatura ótima para atividade de CMCase

Temperatura (C°)	Atividade CMCase (U/g)	Atividade residual (%)
40°C	1,606 ± 0,075	75,67
50°C	2,118 ± 0,018	100
60°C	1,709 ± 0,033	80,81
70°C	1,424 ± 0,190	67,03
80°C	1,432 ± 0,052	67,57
90°C	0,987 ± 0,106	46,76

Observa-se na Tabela 1 que a temperatura ótima da atividade expressa como CMCase foi em 50 °C, temperatura à qual foi atribuída 100% da atividade. Esta observação está de acordo com o protocolo de Ghose (1987) que indica que a temperatura de 50°C é a temperatura padrão para os ensaios de atividade celulase, por ser nessa temperatura que a maioria das celulases microbianas apresentam atividade máxima.

É importante notar que as enzimas exibiram atividade CMCase em todas as temperaturas testadas, mantendo ainda 46,76% de sua atividade residual em um valor de temperatura elevado, como 90°C, temperatura na qual muitas enzimas microbianas perdem totalmente a atividade.

4.1.2 – FPases

Os resultados para atividade FPases estão na Tabela 8.2. Como pode ser observado, os valores de atividade foram menores do que os da atividade em CMCases. Isso porque trata-se de uma avaliação da atividade enzimática sobre celulose amorfa, levando em consideração todas as atividades enzimáticas envolvidas no processo de conversão da celulose amorfa em açúcares.

TABELA 2 – Resultados do ensaio de temperatura ótima para atividade de Fpase

Temperatura (C°)	Atividade Fpase (U/g)	Atividade residual (%)
40°C	0,584 ± 0,055	97,14
50°C	0,604± 0,043	100
60°C	0,372± 0,039	61,90
70°C	0,366± 0,044	60,95
80°C	0,275 ± 0,051	45,71
90°C	0,148 ± 0,014	24,76

Observa-se pelos valores presentes na Tabela 2, que a temperatura ótima para as FPases também foi de 50 °C, coerente com o protocolo de Ghose (1987). Mais uma vez, ainda havia atividade enzimática na temperatura de 90 °C, o que indicam que as enzimas envolvidas na degradação da celulose amorfa podem apresentar boa estabilidade térmica.

4.1.3 – Avicelases

Os resultados de temperatura ótima para a atividade das celulases obtidas no extrato bruto e atuantes sobre celulose microcristalina estão na Tabela 3.

TABELA 3 - Resultados do ensaio de temperatura ótima para atividade de AVICELases

Temperatura (C°)	Atividade AVICELases. (U/g)	Atividade residual (%)
40°C	0,521 ± 0,067	100
50°C	0,366 ± 0,054	70,32
60°C	0,126 ± 0,040	24,17
70°C	0,275 ± 0,085	52,74
80°C	0,160 ± 0,012	30,76
90°C	0,131 ± 0,012	25,27

Observe-se que os resultados da atividade de AVICELases apresentaram um comportamento um pouco diferentes dos observados nas Tabelas 1 e 2. A atividade ótima foi observada na temperatura de 40 °C e os valores de atividade residual não decresceram uniformemente com o aumento da temperatura.

É possível que isto tenha ocorrido devido às características próprias do ensaio, como a utilização de uma suspensão de celulose microcristalina, a qual permanece em suspensão durante as leituras de absorbância, podendo causar flutuações nos resultados.

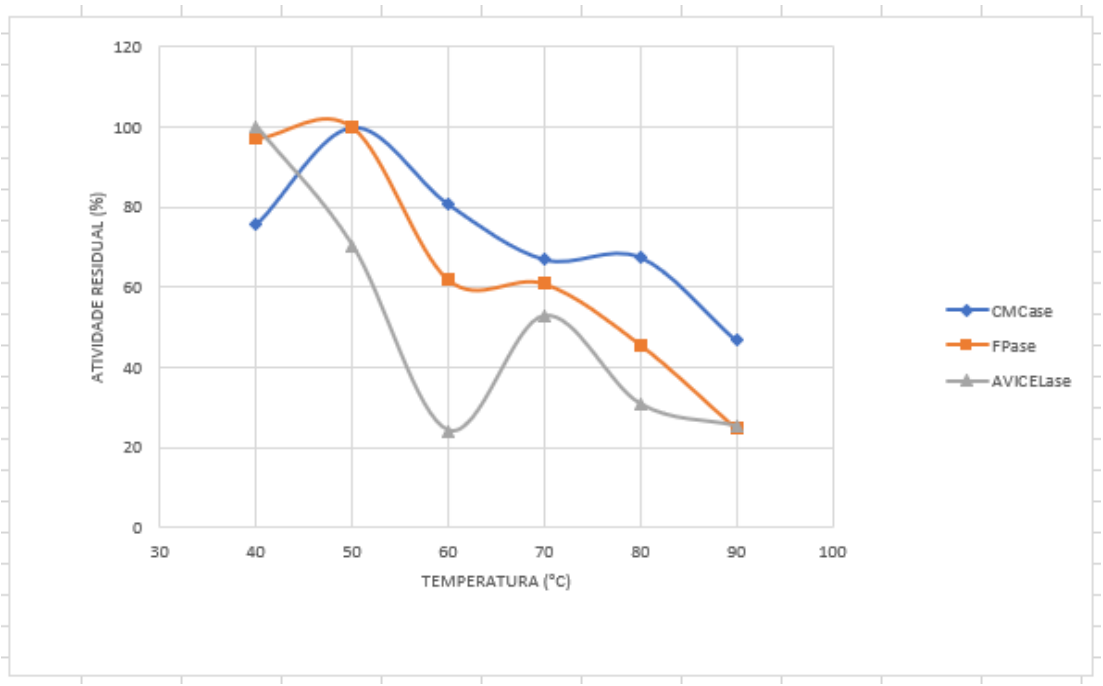
Apesar disso, o fato do extrato enzimático ter apresentado atividade de AVICELase é importante, pois revela que o fungo *Penicillium sp*. FSDE 15 é capaz de produzir celulases que

atuam sobre celulose cristalina, a mais difícil de se degradar enzimaticamente.

Assim como as demais atividades, esta ainda apresentava 25,27% de sua atividade residual a 90 °C, indicando boa tolerância à temperatura.

Para melhor comparação, os resultados de determinação da temperatura ótima para as três enzimas estão plotados no gráfico da Figura 9:

Figura 9 – Temperatura ótima para as enzimas CMCase, Fpase e AVICELases



Fonte: própria

Na Figura 9, observa-se que o aumento de temperatura de 40°C para 50°C favoreceu a atividade das CMCases, sendo que a partir de 50°C, a atividade começou a decair com o aumento da temperatura. A FPase apresentou uma faixa de temperatura satisfatória, de 40°C a 50°C, decaindo com o aumento de temperatura. Já a atividade de AVICELases começos a diminuir já a partir de 40°C.

De acordo com Tortora *et al* (2017), o aumento da temperatura favorece a catálise enzimática, assim como favorece as reações químicas em geral. Porém, a partir de certo ponto, o comportamento de temperatura ótima demostra o aumento da temperatura causa a redução na velocidade da reação enzimática. A velocidade da reação diminui acima da temperatura ótima devido à desnaturação enzimática, que resulta da perda da estrutura tridimensional característica da enzima . A desnaturação envolve a quebra de ligações de hidrogênio e de outras ligações não covalentes e modifica o arranjo dos aminoácidos no sítio ativo, alterando sua forma

e causando a perda da atividade catalítica da enzima.

A boa capacidade do fungo *penicillium sp*. FSDE em produzir enzimas com boa resistência à temperatura já foi demonstrada por Santos (2021) e também por Simões (2021), que caracterizou as enzimas amilases produzidas por este fungo, concluindo que elas eram ativas em uma faixa de temperatura de 30 a 90 °C.

Enzimas ativas em alta temperatura favorecem a sua utilização em processos industriais.

Os resultados de temperatura ótima obtidos neste trabalho são semelhantes aos observados em outros estudos, com enzimas produzidas por outros microrganismos. Aleixo Júnior (2014), estudou a obtenção de celulases produzidas no bagaço do pedúnculo do caju pelo fungo *Trichoderma Reesei* LCB 48 e encontrou os mesmos valores de atividade ótima que este trabalho para CMCases e FPases.

Também AKCAPINAR *et al*. (2012), estudando o efeito da temperatura sobre a atividade de endoglucanases produzidas por *Trichoderma Reesei* e *Pichia pastoris* encontraram que a temperatura ótima para CMCase entre 45°C e 55°C. Para a enzima FPase, a temperatura ótima foi de 50°C. Ambas as enzimas mantinham ainda parte da atividade na temperatura de 70°C.

4.2 **RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO**

4.2.1 pH ótimo das CMCases

A Tabela 4 exibe os valores de atividade enzimática do extrato obtido em função da variação do pH.

TABELA 4 – Resultados do ensaio do pH ótimo para atividade de CMCase

pH	Atividade CMCase (U/g)	Atividade residual (%)
2,88	2,349 ± 0,032	94,03
3,84	2,498 ± 0,015	100
4,8	2,119 ± 0,018	84,86
6,2	0,819 ± 0,056	37,79

Fonte: própria

Como pode ser obsevado na Tabela 4, as CMCases apresentaram atividade em pH ácido, sendo bastante ativa em valores de pH entre 2,88 e 4,8, decaindo a atividade a partir desta faixa.

O pH ótimo foi observado em 3,84.

Este resultado difere do protocolo de Ghose, que considera como valor de pH ótimo para CMCases o valor de 4,8. Isso significa que as CMCases produzidas por *Penicillium sp.* FSDE 15 são adequadas para uso em valores baixos de pH.

4.2.2 pH ótimo das FPases

A tabela 5 mostra os valores encontrados durante o ensaio de pH ótimo de FPases. Assim como as CMCases, as FPases apresentaram maior valor de atividade em pH ácido, tendo sido o pH ótimo em 2,88. Porém há uma faixa de boa aplicabilidade da enzima em pHs entre 2,88 e 4,8, sendo que a atividade começa a declinar a partir desta faixa. Conforme Ghose (1987), era de se esperar que o pH ótimo fosse em 4,8. O comportamento observado aqui indica que as enzimas FPases têm boa aplicabilidade em processos com baixo valor de pH.

TABELA 5 - Resultados do ensaio de pH ótimo para atividade de Fpase.

pH	Atividade Fpase (U/g)	Atividade residual (%)
2,88	0,836 ± 0,222	100
3,84	0,676 ± 0,069	80,82
4,8	0,601 ± 0,043	71,91
6,2	0,217 ± 0,012	26,02

Fonte: própria

5.2.3 pH ótimo das AVICELases

A tabela 6 mostra os valores de atividade encontrados para os ensaios de pH ótimo das enzimas AVICELases produzidas por *Penicillium sp*. FSDE 15.

TABELA 6 – Resultados do ensaio de pH ótimo para atividade de Microcristalina.

pH	Atividade AVICELace (U/g)	Atividade residual (%)
2,88	1,283+ 0,018	88,53
3,84	1,449 ± 0,146	100
4,8	0,366 ± 0,054	25,29
6,2	0,045 ± 0,012	3,16

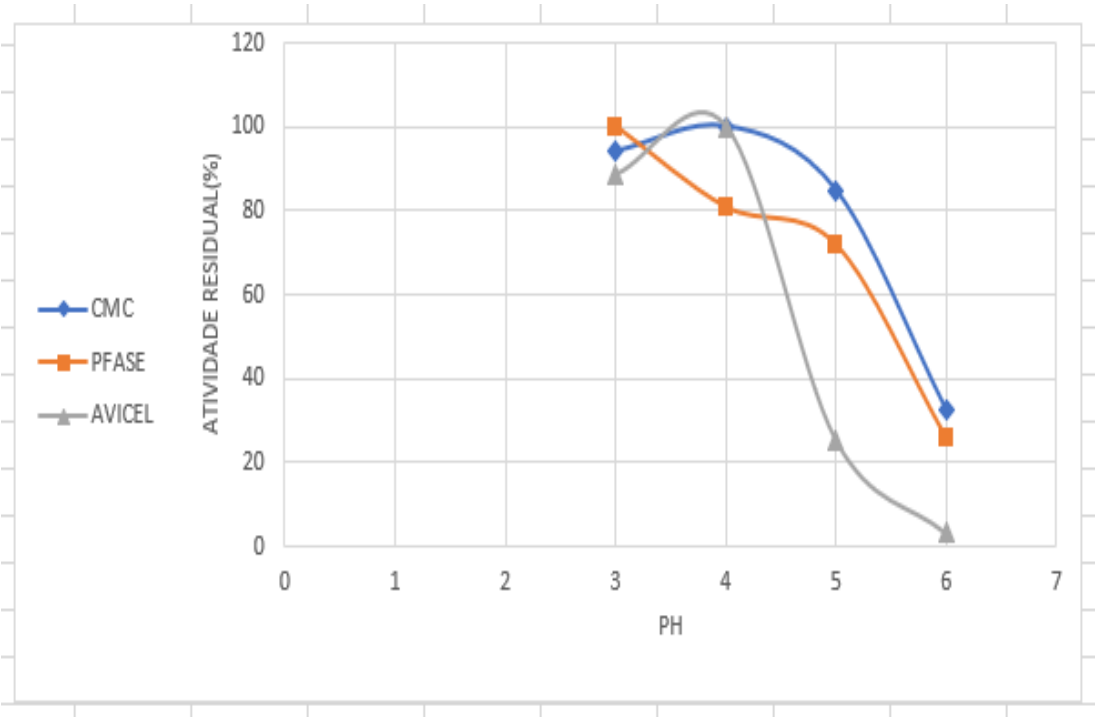
Fonte: própria

Os resultados apresentados na Tabela 6 para atividade enzimática sobre celulose microcristalina demostrou que o pH ótimo foi de 3,8. As enzimas avicelases mostraram ter boa

atuação em pH ácido, sendo que perde atividade já em pH próximo a 5,0, quase anulando-se em pH 6,0.

Para melhor comparação entre os valores de pH ótimo das atividades testadas, elaborou-se o gráfico da Figura 10:

Figura 10 – pH Ótimo para as enzimas CMCase, FPase e AVICELase



Fonte: pópria

Conforme pode ser observado nos gráficos da Figura 10, as três atividades testadas apresentaram valores de pH ótimo em faixas de pH ácido. Tal comportamento é esperado para celulases de origem fúngica, que apresentam pH ótimo em região ácida.

De acordo com Tortora et al (2016), a maioria das enzimas apresentam um valor de pH ótimo no qual sua atividade é máxima. Acima ou abaixo desse valor de pH, a atividade enzimática, e portanto a velocidade da reação, diminui. Quando a concentração de H^+ (pH) no meio é modificada, a estrutura tridimensional da enzima é alterada. Mudanças extremas no valor do pH, distantes do valor ótimo, podem causar desnaturação. Ácidos e bases alteram a estrutura tridimensional da proteína porque o H^+ (e o OH^-) compete com o hidrogênio e as ligações iônicas em uma enzima, o que resulta na desnaturação enzimática e consequentemente, perda de atividade enzimática.

Os resultados aqui obtidos são semelhantes aos observados por Aleixo Junior (2014), que determinou o pH ótimo de 4,8 para a as celulases produzidas por Thichoderma resei LCB

48 e Silva (2008), que caracterizando as enzimas celulases produzidas por *Aspergillus phoenicis* determinou como pH adequado para utilização das enzimas a faixa ácida entre 3,0 e 5,0. Também Medina *et al* (2010), semelhantemente a este trabalho, observaram como valores ótimos a temperatura de 50°C e o pH de 5,3 para o complexo celulolítico produzidos pelos fungos *Pleurotus ostreatus, Pleurotus pulmonarius* e *Lentinula edodes*, na fermentação semissólida da biomassa da bananeira.

Os valores de atividade ótima e pH ótimo determinados para as enzimas produzidas pelo fungo *penicillium sp*. FSDE 15 mostraram que tais enzimas apresentam potencial aplicação em processos industriais, especialmente para a conversão de materiais lignocelulósicos e açúcares fermentescíveis, conforme Santos (2021) e Simões (2021) haviam observado.

5. CONCLUSÃO

- Os valores encontrados para temperatura ótima e pH ótimo para as enzimas produzidas pelo fungo *penicillium sp*. FSDE 15 mostraram que tais enzimas apresentam boa tolerância à temperatura e valores baixos de pH, o é interessante para sua aplicação em processos industriais, especialmente para a conversão de materiais lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis.

- As enzimas CMCases e FPases apresentaram temperatura ótima em 50 °C. Já as avicelases apresentaram temperatura ótima em 40°C. Além disso, as enzimas ainda apresentavam atividade, embora com valor mais reduzido, na temperatura de 90 °C.

- O ensaio de determinação do pH ótimo demosntrou que as enzimas têm melhor atuação em pH ácido, tendo sido encontrado o valor de 3,84 para atividade de CMCases e AVICELases e 2,88 para as FPases.

- Para complementar estes resultados seria interessante no futuro realizar as caracterizações de termoestabilidade e estabilidade ao pH para se determinar com segurança as condições de pH e temperatura a serem usados no processo de hidrólise de materiais lignocelulósicos, para se ter um melhor aproveitamento das enzimas e um melhor rendimento no processo.

REFERÊNCIAS

AKCAPINAR, G. B.; GUL, O.; SEZERMAN, U. O. From in silico to in vitro: Modelling and production of Trichoderma reesei endoglucanase 1 and its mutant in Pichia pastoris. **Journal of Biotechnology**, n.159, p.61– 68, 2012.

ALEIXO Júnior, M. E. **Obtenção de Celulases por Fermentação Semissólida do Resíduo Agroindustrial do Caju Lavado Usando Carboximetilcelulose como Fonte Indutora**. TCC (Graduação em Química Industrial). Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2014, p. 20 - 21.

BISWAS, Pallavi et al. **Wheat Bran as Substrate for Enzyme Production and its Application in the Bio-deinking of Mixed Office Waste (MOW) Paper**. *Bioresources* '**Solid State Fermentation of Wheat Bran for Production of Glucoamylase by Aspergillus,** v. 14, n. 3, pp. 5788-5806, 2019.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial, Volume 1, Fundamentos**, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 254 p. Il

CERQUEIRA, KEILLA SANTOS et al., Isolamento e seleção de microorganismos produtos de enzimas celulotícas. **Braziliam Jornal of Development**, Curitiba,v. 8, n°4, p. 28693-28699, april, 2022.

COUTO, Charlismilã Amorim do *et al*. Desempenho de Cultivares de Milho Destinados para Produção de Milho Verde e Silagem. **Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v. 6, n. 1, pp. 232-251, 2017.

DAYONG, Si et al. **Production and characterization of functional wheat bran hydrolysate rich in reducing sugras, xylooligosaccharides and phenolic acids**. *Biotechnology Reports*, n. 27, 2020.

DOMEMANN, G.M. **Comparação de Métodos para Determinação de Açúcares Redutores e não- redutores. 2016. 47p.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

FLORENCIO, CAMILA. **Microorganismo produtos de celulases**: seleção de isolados de trichoderme spp. 2011. Dissertação, Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
GHOSE, T.K**.** Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl**. Chem., v. 59, p. 257-268, 1987.

GUPTAR, Khushboo; NAGAR, S.J. **Solid State Fermentation of Wheat Bran for Production of Glucoamylase by Aspergillus niger**. *SSR Inst. Int. J. Life Sci.*, v. 6, n. 4, pp. 2640-2645, 2020.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; Singh, A. **Microbial Cellulases and Their Industrial Applications.** Enzyme Research, vol. 2011, p. 1-11, 2011

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, van W.H; PRETORIUS**,** Utilização da celulose microbiana: Fundamentos e biotecnologia**. Revisões de Microbiologia e Biologia Molecular**.

v. 66, n. 3, p. 506-577. 2002.

RUEGGER, M. J. S.; TAUK-TORNISIELO, S. M.; Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil. Bot**., v.27, n.2, p.205-211, abr.-jun. 2004

SAFARIPOUR, M.; HOSSAIN, K.G.; ULVEN, C.A. *et al*. **Environmental impact tradeoff considerations for wheat bran-based bio composite.** *Science of the Total Environment*, n. 781, 2021.

SALES, P. F.; BERTOLI, A. C.; PINTO, F. M.; MAGRIOTIS, Z. M. Caracterização e Aplicação do Carvão Ativado Obtido a partir do Sabugo de Milho: A Busca pelo Reaproveitamento de um Resíduo Agroindustrial**. Rev. Virtual de Química**, 2015,7 (4), 1174-1188, 21 de janeiro de 2015.

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

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases pós fermentação em estados sólidos utilizado pedúnculo de caju como substrato 2007.148p**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal 2007.

SILVA, D. S. dá et al. Análise da dinâmica e dependência espaciais da produção de milho no território rural "Sertão Ocidental" sergipano. **Scientia Plena**, v. 15, n. 8, 2019.
TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L**. Microbiologia, 12ª Ed**. Artmed, 2016.

SIMÕES. **Produção de Amilases por Cultivo em Estado Sólido e Hidrólise Enzimática de Resíduos de Mandioca**. Universidade Federal da Paraíba; Centro de Tecnologia (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química), João Pessoa – PB, 2021.

SOARES, Pedro; SPOLADOR, Humberto Francisco Silva. Eficiência técnica da produção de milho no estado de São Paulo: uma abordagem por meta fronteira estocástica. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 57, n. 4, pp. 545-558, 2019.

SOUSA, Carlos Alberto Bispo de. **Recuperação de poligalacturonases produzidas pela fermentação semi-solida do resíduo agrícola do maracujá amarelo empregando sistema aquoso bifásico**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Quimica) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

TANKLEVSKA, Natalia; PETRENKO, Viktoriia; KARNAUSHENKO, Alla; MELNYKOVA, Kateryna. WORLD CORN MARKET: ANALYSIS, TRENDS AND PROSPECTS OF ITS DEEP PROCESSING. **Agricultural and Resource Economics:** International Scientific E-Journal, v. 6, n. 3, pp. 96-111, 2020.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROCHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 75-90, 1988.