

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Rafaela Julyana Barboza Devos

**Produção de enzimas e bioetanol a partir de matérias-primas
amiláceas e resíduos de hortifruti**

Passo Fundo

2022

Rafaela Julyana Barboza Devos

Engenheira de Alimentos

**Produção de enzimas e bioetanol a partir de matérias-primas
amiláceas e resíduos de hortifruti**

Dissertação apresentada como um dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Luciane Maria
Colla

Linha de pesquisa: Processos
biotecnológicos e não convencionais na
produção de alimentos e ingredientes

Passo Fundo

2022

CIP – Catalogação na Publicação

- D512p Devos, Rafaela Julyana Barboza
Produção de enzimas e bioetanol a partir de
matérias-primas amiláceas e resíduos de hortifruti
[recurso eletrônico] / Rafaela Julyana Barboza Devos. –
2022.
1.4 MB : il. color. ; PDF.
- Orientadora: Prof. Dra. Luciane Maria Colla.
Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia
de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2022.
1. Biocombustíveis. 2. Resíduos como combustível.
3. Lignocelulose. I. Colla, Luciane Maria, orientadora.
II. Título.

CDU: 620.91

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira - CRB 10/2427

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

“Produção de enzimas e bioetanol a partir de matérias-primas amiláceas e resíduos de hortifrutis”

Elaborada por
Rafaela Julyana Barboza Devos

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

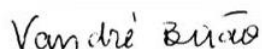
Comissão Examinadora



Prof. Dra. Luciane Maria Colla
Orientador e Presidente – UPF
Coordenadora do PPGCTA



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Comissão examinadora - UPF



Prof. Dr. Vandré Barbosa Brião
Comissão examinadora – UPF



Documento assinado digitalmente
Jaciane Lutz Ienczak
Data: 17/03/2022 08:00:59-0300
CPF: 000.280.630-40
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Profa Dra. Jaciane Lutz Ienczak
Membro externo – UFSC

Passo Fundo, RS, Brasil
2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio, incentivo e carinho em todos os momentos. Em especial aos meus pais, Magda e Valdimir, pois foi com a ajuda deles que alcancei esse sonho!

Agradeço ao Jordan, por tornar esse caminho mais leve e cheio de amor.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Luciane Maria Colla, por todo auxílio, disponibilidade e ensinamentos, que muitas vezes foram além do contexto acadêmico.

Agradeço aos melhores bolsistas de iniciação científica: Vitor, Samuel e Gabriel, por todo empenho e dedicação e por fazerem do meu trabalho, o de vocês.

Agradeço aos colegas de aula, de laboratório e amigos que fiz durante essa trajetória, em especial à Letícia e a Juci, que tornaram os momentos complicados mais fáceis com uma boa conversa.

Agradeço aos meus amigos pela motivação, alegria e momentos de descontração. Ao Biscoito por ser meu cãopanheiro nas madrugadas de escritas.

E por fim, agradeço ao Universo, pela abundância e expansão e demonstrar com seus sinais que estou no caminho certo.

“Mas na profissão, além de amar, tem de saber. E o saber leva tempo pra crescer”. Rubem Alves

RESUMO

Constantemente são avaliadas estratégias para reduzir o uso de produtos fósseis que contribuem com a emissão de gases de efeito estufa e mudanças climáticas. O uso de biocombustíveis, como o bioetanol possibilita uma combustão limpa e sustentável, em comparação aos combustíveis fósseis. Para integrar o conceito de bioeconomia circular, a produção de enzimas sacarificantes produzidas por microrganismos isolados de resíduos é um diferencial na conversão do bioetanol. Duas bactérias (B1 e B2) e dois fungos (F1 e F2) previamente isolados de resíduos de hortifruti capazes de produzir simultaneamente enzimas amilolíticas e celulolíticas foram estudados. O complexo enzimático bacteriano produzido por fermentação submersa, quando comparado às enzimas produzidas pelos fungos via fermentação em estado sólido, apresentou maior eficiência de atividade enzimática. A melhor condição de produção enzimática foi definida pelo meio contendo farinha de triticale de grão inteiro e bagaço de cana-de-açúcar, em pH 5,5. As enzimas bacterianas produzidas nessa condição foram avaliadas em diferentes faixas de pH e temperatura, visando a aplicação na indústria biotecnológica. As enzimas amilolíticas e celulolíticas produzidas por B1 mostraram melhor atuação em pH 5,0 a 5,5 e temperatura de 40 °C. Esses resultados são eficazes pois as enzimas atuam de forma conjunta, reduzindo etapas de ajuste de pH e temperatura durante o processo. O complexo enzimático produzido por B2 demonstrou potencial devido a atuação em pH 5,0-5,5 em temperaturas de 30-50 °C. No entanto, otimizações na produção enzimática são necessárias para obter melhores resultados de atividade amilolítica e celulolítica. Contribuindo para uma economia sustentável e reduzindo o desperdício de resíduos de frutas, estudou-se a produção de bioetanol por resíduo de banana e mamão, associados com triticale. A conversão ocorreu por sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e separada (SHF). Foi calculada a eficiência e a produtividade de bioetanol em cada modo de operação e a SSF conferiu resultados significativamente superiores ($p > 0,05$) nas condições avaliadas. Os substratos demonstraram conter os nutrientes necessários para a conversão, dispensando a necessidade de suplementação adicional, reduzindo os custos de processo. O resíduo de banana apresentou potencial e elevadas concentrações de bioetanol e produtividades (30,70 g/L; 2,56 g/L.h, respectivamente, para SSF e 25,68 g/L; 1,95 g/L.h, respectivamente, para SHF). O desperdício dessa fonte pode ser reduzido com a obtenção de um produto de alto valor agregado. No entanto, a adição das matérias-primas combinadas nos experimentos conferiu uma diluição ao meio, compreendendo um gargalo do processo. Assim, é necessário avaliar soluções que minimizem a produção de água da mistura e permitam maximizar a produção de bioetanol por resíduos de frutas e triticale. Na SSF, as concentrações máximas de bioetanol para todos os experimentos foram identificadas em 12 h, demonstrando que a SSF permite reduzir o tempo, energia e investimentos, otimizando o processo em comparação a SHF. Diante dos resultados, demonstra-se a possibilidade da produção em escala laboratorial associando a primeira e segunda geração de bioetanol, combinando resíduos lignocelulósicos e material amiláceo, podendo reduzir o descarte de resíduos de frutas e os destinando para a biorrefinaria, integrando o conceito de bioeconomia circular.

Palavras-chave: Resíduos lignocelulósicos. Sacarificação e Fermentação Simultânea. Enzimas sacarificantes. Triticale. Bagaço de cana-de-açúcar. Banana. Mamão.

ABSTRACT

Strategies to reduce the use of fossil products that contribute to the emission of greenhouse gases and climate change are constantly evaluated. The use of biofuels such as bioethanol enables clean and sustainable combustion compared to fossil fuels. To integrate the concept of circular bioeconomy, the production of saccharifying enzymes produced by microorganisms isolated from waste is a differential for the conversion of bioethanol. Two bacteria (B1 and B2) and two fungi (F1 and F2) previously isolated from fruit and vegetable residues capable of simultaneously producing amylolytic and cellulolytic enzymes were studied. The bacterial enzyme complex produced by submerged fermentation, when compared to the enzymes produced by fungi via solid-state fermentation, showed higher efficiency of enzymatic activity. The best enzyme production condition was defined by the medium containing whole grain triticale flour and sugarcane bagasse, at pH 5.5. The bacterial enzymes produced in this condition were evaluated in different pH and temperature ranges, aiming at the application in the biotechnology industry. The amylolytic and cellulolytic enzymes produced by B1 showed better performance at pH 5.0 to 5.5 and temperatures of 40 °C. These results are effective because the enzymes work together, reducing pH and temperature adjustment steps during the process. The enzyme complex produced by B2 showed potential due to its performance at pH 5.0-5.5 at temperatures of 30-50 °C. However, optimizations in enzyme production are necessary to obtain better results of the amylolytic and cellulolytic activity. Contributing to a sustainable economy and reducing the waste of fruit residues, was studied the production of bioethanol from banana and papaya residue, associated with triticale. The conversion took place with simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and separate saccharification and fermentation (SHF). The efficiency and productivity of bioethanol were calculated in each mode of operation and SSF gave significantly higher results ($p > 0.05$) under the conditions evaluated. The substrates were shown to contain the nutrients necessary for the conversion, eliminating the need for additional supplementation, and reducing process costs. The banana residue showed potential and high concentrations and productivity of bioethanol (30.70 g/L; 2.56 g/Lh, respectively, for SSF and 25.68 g/L; 1.95 g/Lh, respectively, for SHF). Waste from this source can be minimized with the production of a high value-added product. However, the addition of the raw materials combined in the experiments gave a dilution to the medium, comprising a bottleneck of the process. Thus, it is necessary to evaluate solutions that minimize the production of water from the mixture and allow maximizing the production of bioethanol from fruit and triticale residues. In SSF, the maximum concentrations of bioethanol for all experiments were identified at 12 h, demonstrating that SSF allows reducing time, energy, and investments, optimizing the process compared to SHF. Given the results, the possibility of production on a laboratory scale is demonstrated, integrating the first and second generations of bioethanol, combining lignocellulosic residues and starchy material, which can reduce the disposal of fruit residues and send them to the biorefinery, integrating the concept of bioeconomy circular.

Keywords: Lignocellulosic residues. Saccharification and Simultaneous Fermentation. Saccharifying enzymes. Triticale. Sugarcane bagasse. Banana. Papaya.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. CAPÍTULO 2: ARTIGO DE REVISÃO.....	14
3. CAPÍTULO 3: ARTIGO EXPERIMENTAL 1.....	15
3.1. INTRODUÇÃO.....	15
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.2.1. Isolamento de microrganismos e triagem de cepas.....	17
3.2.2. Matérias-primas e caracterização.....	18
3.2.3. Teste de peneiramento.....	19
3.2.4. Produção de enzimas.....	21
3.2.4.1. <i>Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES).....</i>	<i>21</i>
3.2.4.2. <i>Produção de enzimas por fermentação submersa (Fsm).....</i>	<i>23</i>
3.2.5. Determinações analíticas.....	24
3.2.5.1. <i>Atividade enzimática.....</i>	<i>24</i>
3.2.5.2. <i>Atividade específica.....</i>	<i>25</i>
3.2.5.3. <i>Determinação das temperaturas e pH ótimos de atuação.....</i>	<i>26</i>
3.2.6. Análise estatística.....	26
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
3.3.1. Isolamento de microrganismos e triagem de cepas.....	27
3.3.2. Caracterização das matérias-primas.....	30
3.3.3. Tamanho de partícula.....	32
3.3.4. Atividade enzimática.....	33
3.3.5. Atividade específica.....	43
3.3.6. Determinação de temperatura e pH ótimos de atuação.....	44
3.4. CONCLUSÕES.....	47
4. CAPÍTULO 4: ARTIGO EXPERIMENTAL 2.....	49
4.1. INTRODUÇÃO.....	49
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.2.1. Matérias-primas e caracterização.....	52
4.2.2. Enzimas.....	53
4.2.3. Preparo do meio para sacarificação.....	53
4.2.4. Estudo da hidrólise dos meios.....	53
4.2.5. Obtenção de bioetanol.....	54
4.2.5.1. <i>Levedura.....</i>	<i>54</i>
4.2.5.2. <i>Sacarificação.....</i>	<i>55</i>
4.2.5.3. <i>Fermentação.....</i>	<i>55</i>
4.2.5.4. <i>Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF).....</i>	<i>56</i>
4.2.6. Determinações analíticas.....	56
4.2.6.1. <i>Concentração de açúcares redutores (AR).....</i>	<i>56</i>
4.2.6.2. <i>Concentração de bioetanol.....</i>	<i>56</i>
4.2.7. Análise estatística.....	57
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
4.3.1. Caracterização das matérias-primas.....	58
4.3.2. Hidrólise enzimática.....	59
4.3.3. Produção de bioetanol.....	60

4.3.3.1. Sacarificação	60
4.3.3.2. Comparação entre os modos de operação	62
4.4. CONCLUSÕES.....	70
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	72
REFERÊNCIAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

A dependência global por insumos energéticos do refino de petróleo representa uma problemática econômica e para a sustentabilidade. Constantemente são avaliadas estratégias para reduzir o uso de produtos fósseis, que contribuem com a emissão de gases de efeito estufa e mudanças climáticas. O uso de recursos energéticos alternativos produzidos por biomassa biodegradável, como o bioetanol, se faz necessário para alterar o cenário ambiental, possibilitando uma combustão menos agressiva, de forma limpa e sustentável, em comparação aos combustíveis fósseis (CHEN et al., 2021; LEONG et al., 2021; ARUWAJOYE et al., 2020).

O bioetanol é classificado de acordo com a fonte de substrato em primeira geração (matérias-primas amiláceas e sacaríneas), segunda geração (resíduos lignocelulósicos), terceira geração (microalgas) e quarta geração (algas geneticamente modificadas). A combinação de matérias-primas (e conseqüentemente gerações) apresenta benefícios, como a biodiversidade e diversificação de matriz energética (DEVOS; COLLA, 2022; MACIEL et al., 2020; KARP et al., 2021; ASTOLFI et al., 2020; SAGGI; DEY, 2019; AYODELE et al., 2020). A produção de bioetanol a partir de resíduos de frutas contribui para uma economia sustentável visto a redução do desperdício (WOBIWO et al., 2019; BONATTO et al., 2021). O uso do triticale como substrato alternativo tem a vantagem de não competir pela produção de alimentos, em comparação com outros cereais como milho e trigo, pois é considerada uma cultura não convencional empregada majoritariamente na alimentação animal (STRAK-GRACZYK et al., 2019; MERGOUM et al., 2009).

A conversão do bioetanol pode ocorrer por diferentes tecnologias de processo, sendo a sacarificação e fermentação simultânea (SSF) uma alternativa com potencial operacional e econômico em comparação com o processo de sacarificação e fermentação em separado (SHF). A SSF confere melhores resultados de concentração de bioetanol, rendimento e produtividade em menor tempo de conversão. No entanto, apresenta dificuldades intrínsecas ao processo relacionadas à adição simultânea de enzimas e leveduras, que atuam em diferentes pHs e temperaturas (DEVOS; COLLA, 2022; ARUWAJOYE et al., 2020; SAGGI; DEY, 2019). A SHF tem um rendimento de hidrólise superior em condições ideais de operação, como temperatura e pH. No entanto, as desvantagens estão relacionadas ao alto custo operacional, pois o processo ocorre em dois biorreatores, exigindo um maior aporte de energia, uma vez que a sacarificação

ocorre antes da fermentação (SIRIWONG et al., 2019; CARRILLO-NIEVES et al., 2019).

A bioeconomia circular está relacionada ao desenvolvimento de bioprocessos baseados em substratos renováveis e a substituição de recursos fósseis, para impulsionar a valorização de resíduos materiais. A gestão eficiente dos resíduos gera produtos de alto valor agregado, melhorando os recursos e a ecoeficiência e promovendo um ambiente sustentável (PYKA et al., 2022; LEONG et al., 2021; LAKNER et al., 2021). O conceito de bioeconomia circular aplicado à produção de bioetanol envolve também a busca por enzimas *homemade* em substituição às comerciais, com vista à redução dos custos de produção.

Nesse contexto, o estudo teve como objetivo a produção de enzimas e bioetanol num conceito integrado de bioeconomia circular. Para alcançar o objetivo principal, os seguintes objetivos específicos foram delineados: (1) selecionar microrganismos para produção de enzimas a partir de resíduos de hortifruti; (2) produzir enzimas a partir dos microrganismos selecionados; (3) analisar a hidrólise de matéria-prima amilácea (triticale) e resíduos de frutas (banana e mamão) de forma isolada e combinada utilizando enzimas; e (4) comparar a sacarificação e fermentação separada e a sacarificação e fermentação simultânea para a produção de bioetanol.

O projeto de pesquisa foi enquadrado na Linha de Pesquisa “Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes”, do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Universidade de Passo Fundo.

A dissertação foi dividida em 5 capítulos. No Capítulo 1 é apresentada a introdução geral, introduzindo e justificando o tema, apresentando os objetivos e a estruturação do trabalho para melhor compreensão. O Capítulo 2 apresenta o artigo de revisão bibliográfica já publicado no periódico *Bioresource Technology Reports*, intitulado “*Simultaneous saccharification and fermentation to obtain bioethanol: a bibliometric and systematic study*”, que aborda a produção de bioetanol a partir do método de SSF, bem como, os principais tópicos de interesse visando a produção de forma viável economicamente.

O Capítulo 3 apresenta o primeiro artigo experimental, intitulado “*Produção de enzimas por microrganismos isolados de resíduos de hortifruti*”. Este artigo aborda a produção de enzimas a partir de resíduos de hortifruti via dois processos fermentativos (fermentação em estado sólido e submersa) e empregando matérias-primas alternativas

como substrato (triticale e bagaço de cana-de-açúcar). Também foi realizada a caracterização das enzimas produzidas frente à diferentes temperaturas e pHs, visando a possível aplicação destas na produção de bioetanol. No Capítulo 4, apresenta-se o segundo artigo experimental intitulado “*Integração de primeira e segunda geração de bioetanol de resíduos de frutas e triticale por sacarificação e fermentação separada e simultânea*”, resultante da produção do bioetanol a partir de resíduos de banana e mamão, em diferentes proporções com triticale, que compara a conversão entre os métodos de SSF e SHF visando contextualizar a melhor operação. Por fim, o Capítulo 5 traz as conclusões gerais do trabalho e as sugestões para trabalhos futuros.

2. CAPÍTULO 2: ARTIGO DE REVISÃO

SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION TO OBTAIN BIOETHANOL: A BIBLIOMETRIC AND SYSTEMATIC STUDY

Artigo publicado no periódico *Bioresource Technology Reports*, v. 17, 100924, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100924>

Rafaela Julyana Barboza Devos, Luciane Maria Colla*

Graduate Program in Food Science and Technology, University of Passo Fundo,
Campus I, L1 Building, BR 285, Bairro São José, 611, Passo Fundo RS CEP: 99052-
900, Brazil

*Corresponding author: lmcolla@upf.br

ABSTRACT

Bioethanol is a biofuel that enables less aggressive combustion, cleanly and sustainably compared to fossil fuels. Its production can be done using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) or separately, when using starchy raw material. The growing application of SSF in the production of bioethanol has revitalized the need to explore the information associated with laboratory and pilot-scale studies, through the analysis of the available literature. Thus, the aim of this work was to perform a bibliographic review by exploring the factors that influence the production of bioethanol by SSF and others methods, with a focus on the reduction of process costs. The study disclosed the main efficiencies and limitations of SSF, identifying the process points that can be optimized to reduce costs. The main factors identified include use of appropriate raw materials and extrinsic factors such as yeast, enzymes, and pH.

Keywords: Biofuel. Promising raw materials. Yeast. Enzymes. pH.

3. CAPÍTULO 3: ARTIGO EXPERIMENTAL 1

PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE RESÍDUOS DE HORTIFRUTI

RESUMO

Diferentes estratégias para alcançar uma economia nos processos biotecnológicos são constantemente estudadas. A conversão de resíduos para a produção enzimática foi verificada em nosso estudo. Duas bactérias (B1 e B2) e dois fungos (F1 e F2) previamente isolados de resíduos de hortifruti capazes de produzir simultaneamente enzimas amilolíticas e celulolíticas foram rastreados e selecionados com base nas zonas claras ao redor das colônias, formadas devido a capacidade amilolítica e celulolítica. A atividade enzimática foi realizada para selecionar os meios de substratos alternativos com potencial para produzir o complexo enzimático desejado. O complexo enzimático produzido pelos fungos via fermentação em estado sólido demonstrou elevada atividade amilolítica (AA) e celulolítica (AC) para o experimento contendo farinha de tritcale de grão inteiro (FT) devido às características do meio (homogeneidade e granulometria reduzida) serem suscetíveis ao desenvolvimento fúngico, favorecendo o crescimento filamentosos aglomerado. Na fermentação submersa por bactérias, o experimento contendo a combinação de FT e bagaço de cana-de-açúcar (BC) em pH 5,5 se sobressai nos resultados de AA para a enzima produzida por B1 (3,43 U/mL) e por B2 (3,54 U/mL), e nos resultados de AC (enzima produzida por B1: 4,03 U/mL e enzima produzida por B2: 5,23 U/mL). Os complexos enzimáticos nas condições selecionadas foram submetidos a caracterização frente à atividade específica, pH e temperatura ótimos de atuação. A enzima produzida pela bactéria B1 demonstrou atividade máxima de produção amilolítica (2,20 U/mL) e celulolítica (1,61 U/mL) nas condições de pH entre 5,0 e 5,5 e temperatura de 40 °C. Esses resultados são importantes na aplicação industrial, pois as enzimas são capazes de atuar de forma conjunta dispensando etapas de ajustes de pH e temperatura. O complexo enzimático produzido por B2 demonstrou capacidade para uso devido sua atuação em pH 5,0 a 5,5 na faixa de 30 °C a 50 °C. No entanto, visando a aplicação na produção de bioetanol faz-se necessário uma otimização na produção enzimática, para obter melhores resultados de atividade amilolítica e celulolítica. Assim, mais estudos devem ser conduzidos sobre a produção enzimática pela conversão de resíduos de hortifruti, a fim de tornar a conversão uma estratégia de redução de custos do processo.

Palavras-chave: Enzimas sacarificantes. Bioeconomia circular. Caracterização enzimática.

3.1. INTRODUÇÃO

A aplicação de enzimas capazes de atuar de forma efetiva na produção de bioetanol compreende um gargalo do processo, pois a diversidade de matérias-primas, tecnologias de produção e disparidade entre as temperaturas operacionais das enzimas de liquefação e sacarificação são um fator limitante (CRIPWELL et al., 2015; LI et al., 2018; ARUWAJOYE et al., 2020). Na conversão de bioetanol amiláceo, a α -amilase (comercial

e bacteriana) atua em temperaturas elevadas (em torno de 90 °C), enquanto enzimas sacarificantes (amiloglucosidases) apresentam atividade ótima entre 50-60 °C. O mesmo é observado na produção de bioetanol lignocelulósico (enzimas celulasas atuam em torno de 50 °C e as hemicelulasas são otimizadas na faixa de temperatura de 30-35 °C) (CRIPWELL et al., 2015; KAUR et al., 2012; LI et al., 2018; ARUWAJOYE et al., 2020; DEVOS; COLLA, 2022).

Microrganismos como bactérias, fungos e leveduras podem ser utilizados para produzir enzimas amilolíticas e celulolíticas. Essa produção enzimática, com condições operacionais adequadas, pode ser uma alternativa viável economicamente (CRIPWELL et al., 2015). A obtenção de enzimas *homemade* contribui para a redução de custos de processo, visto que o uso de enzimas comerciais representa um elevado impacto econômico, cerca de 15,7% do custo do processo (BOAKYE-BOATEN et al., 2017).

Buscando uma completa bioconversão na produção de bioetanol faz-se necessário a produção e aplicação de complexos enzimáticos que apresentem características como eficiente atividade específica, termoestabilidade, baixa suscetibilidade à inibição enzimática pela celobiose e glicose, suportar o estresse do processo, ser econômico e ter capacidade de operação sob pH levemente ácido, visando evitar uma possível contaminação microbiana (MENON; RAO, 2012; CRIPWELL et al., 2015; ARUWAJOYE et al., 2020; AFRISHAM et al., 2016).

A eficiência da produção enzimática depende da composição química da matéria-prima e sua acessibilidade (GAO et al., 2008). Os resíduos de hortifruti são excelentes meios de crescimento para a produção de enzimas devido suas elevadas biodegradabilidades e disponibilidade, além de apresentarem fontes de carbono em sua composição e proporcionarem redução econômica ao processo (AMADI et al., 2020; AFRISHAM et al., 2016).

A literatura apresenta relatos de produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais. Por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar foi empregado na produção de enzimas amilases por *Bacillus* sp. (QURESHI et al., 2016), enquanto enzimas celulasas foram produzidas a partir de *Aspergillus terreus* (GAO et al., 2008) e por uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* SCPW 17 (AMADI et al., 2020). Além do bagaço de cana-de-açúcar, diversos resíduos de frutas são mencionados na produção enzimática. *Bacillus licheniformis* foi utilizado para produção de alfa-amilase em meios de cultivo com cascas de banana, cascas de batata, cascas de laranja, farelo de trigo e farelo de arroz (AFRISHAM et al., 2016), enquanto a produção de pectinases e celulasas foi realizada

pelo uso de raízes e polpa de mandioca e farelo de soja como substrato para a produção fúngica por *Aspergillus aculeatus* (POONSRISAWAT et al., 2014).

A produção de enzimas para hidrólise de polissacarídeos através de resíduos de hortifruti pode ser considerada uma alternativa eficiente, barata e sustentável de aplicação biotecnológica. Além disso, a elevada atividade amilolítica do triticales o torna uma excelente fonte de substrato para a produção enzimática (PEJIN et al., 2015), visto que o cereal é majoritariamente empregado na alimentação animal (MERGOUM et al., 2009) e o uso na produção enzimática pode ser uma alternativa com potencial, visto que quando comparado ao milho, o triticales apresenta um teor proteico cerca de 3-4% superior (BAIER et al., 1994).

Objetivou-se a produção e caracterização de enzimas obtidas por bactérias e fungos isolados de resíduos de hortifruti via fermentação em estado sólido e fermentação submersa, empregando como meios de cultivo o bagaço de cana-de-açúcar e o triticales.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Isolamento de microrganismos e triagem de cepas

Foram utilizados resíduos de hortifruti cedidos pela feira agroindustrial da cidade de Passo Fundo/RS que apresentavam condições de descarte (elevado grau de maturação, cortes e partes amassadas). Os resíduos selecionados foram os seguintes: cascas de abacaxi, cascas de cenoura, bagaço de cana-de-açúcar e mix de frutas composto por morango, manga e pêsego em elevado grau de maturação. As matérias-primas foram armazenadas em sacos plásticos individuais sob condições anaeróbicas em temperatura ambiente durante 7 dias, a fim de promover o crescimento de microrganismos. O isolamento das cepas dos microrganismos seguiu a metodologia proposta por Ribeiro e Soares (2000), a qual indica a realização de diluições seriadas até 10^{-7} , seguido de inoculação (1 mL) na superfície de meios sólidos apropriados para o isolamento de fungos (Plate Dextrose Agar: PDA) e bactérias (Plate Count Agar: PCA). Os meios foram incubados em estufa durante o período de 48 h, a 25 °C (PDA) e 35 °C (PCA). As colônias individuais obtidas foram repicadas até a obtenção de colônias puras.

Para triagem das cepas amilolíticas, os microrganismos isolados foram semeados em meio amido-ágar (2,0% de ágar, 1,0% de amido solúvel, 0,2% de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 0,1% de NaCl, 0,1% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,02% de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$) e incubados em estufa durante 75 h por 35 °C. A determinação da atividade amilolítica foi

avaliada pela presença de halos de cor clara nas placas, através da adição de 2% (v/v) de solução de KI e 1% (v/v) de I₂ nas placas (AFRISHAM et al., 2016).

A triagem de cepas celulolíticas foi avaliada utilizando um meio composto por: 3,6 g de carboximetilcelulose (CMC), 3,6 g de K₂HPO₄, 3,6 g de MgSO₄, 3% de NaCl, 0,72 g de (NH₄)₂SO₄, 0,00036 g de MnCl₂, 0,00036 g de ZnSO₄, 0,00036 g de FeSO₄ e 7,2 g de ágar. As placas foram incubadas em estufa (3 dias a 45 °C) e adicionadas de 5 mL de solução de iodo (1%) e 1 mL de iodeto de mercúrio. A atividade enzimática foi detectada pela presença de halos de cor amarelo claro na placa (DEEPTHI et al., 2012).

A avaliação da formação dos halos foi realizada visualmente e os diâmetros foram medidos após sete dias com régua, obtendo médias de quatro repetições ± desvio padrão. Baseado no diâmetro do halo empregou-se um sistema de pontuação que varia entre satisfatório (3,5 cm a 5,0 cm de diâmetro), regular (2,0 cm a 3,0 cm de diâmetro) e fraco (0,0 cm a 1,9 cm de diâmetro) (MARCHI et al., 2006).

3.2.2. Matérias-primas e caracterização

Foram utilizados grãos de triticale (cedidos pela Embrapa Trigo, localizada na cidade de Passo Fundo/RS) e bagaço de cana-de-açúcar (obtido na feira agroindustrial da cidade de Passo Fundo/RS). O bagaço de cana-de-açúcar foi cortado e submetido à secagem em estufa com circulação de ar sob temperatura de 50 °C até peso constante. Após secagem, o mesmo foi triturado em liquidificador industrial (WOBIWO et al., 2019; ABDULLA et al., 2018). Os grãos de triticale foram higienizados para retirada de impurezas e moídos em moinho refrigerado para redução das partículas (PEJIN et al., 2015; WANG et al., 2008).

As amostras foram caracterizadas físico-quimicamente através das determinações de umidade em estufa a 105 °C, proteínas por Kjeldahl (fator de conversão 6,21) e lipídios por Soxhlet (AOAC, 2005). A fibra bruta foi determinada pela medida do resíduo após digestão in vitro com ácido e álcali (IAL, 1985) e as cinzas através da carbonização das amostras em bico de Bunsen seguidas de mufla (550 °C). As amostras foram pesadas até o peso constante (IAL, 1985). O teor de carboidratos foi determinado pelo cálculo de diferença conforme Equação 1.

$$CHO = 100 - (\% U + \% P + \% L + \% F + \% C) \quad \text{Eq. (1)}$$

Sendo:

CHO: carboidratos;

U: umidade;

P: proteínas;

L: lipídios;

F: fibras;

C: cinzas.

3.2.3. Teste de peneiramento

Os grãos de triticale destinados à produção de enzimas foram triturados em liquidificador industrial (potência 1) e o tempo de trituração foi variado entre 30 s (FT30) e 60 s (FT60) para obter duas amostras com tamanhos de partículas diferentes, que foram classificadas quanto à granulometria pelo teste de peneiramento. Esse método é empregado para determinar o tamanho de partícula e fornece condições para obter o diâmetro de Sauter (DS). O peneiramento das amostras foi realizado em um agitador de peneiras contendo um conjunto de peneiras da série Tyler (Tabela 1). Cerca de 500 g de amostra foram peneiradas durante 10 min. A frequência de vibração empregada foi correspondente à posição 8 do potenciômetro da máquina vibratória. As frações das amostras retidas em cada peneira foram medidas em balança analítica (JORDAN et al., 2016).

Tabela 1 - Peneiras utilizadas e aberturas da malha.

Tratamento	Peneira (mesh)	Abertura (mm)	Tratamento	Peneira (mesh)	Abertura (mm)
	7	2,8		8	2,36
	8	2,36		10	2,00
	14	1,18		14	1,18
FT30	20	0,84	FT60	20	0,84
	25	0,71		25	0,71
	32	0,50		32	0,50
	Fundo	-		Fundo	-

*FT30: grãos de triticale submetidos a 30 s de trituração em liquidificador industrial; FT60: grãos de triticale submetidos a 60 s de trituração em liquidificador industrial.

Após a obtenção do percentual de massa retido em cada peneira, calculou-se o DS de cada tratamento, com o emprego das equações apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Equações dos parâmetros analisados para determinar o diâmetro de Sauter.

D (mm)	M_{pesada} (g)	F_{mássica} (Δx_i)*	F_{peneirada} (xi)	F_{retida} (yi)	D_{pi} (mm)	$\Delta x_i/D_{pi}$
D1	m1	m1/mT	1- Δx_1	1-x1	D1	$\Delta x_1/D_{p1}$
D2	m2	m2/mT	x1- Δx_2	1-x2	(D2+D1)/2	$\Delta x_2/D_{p2}$
D3	m3	m3/mT	x2- Δx_3	1-x3	(D3+D2)/2	$\Delta x_3/D_{p3}$
D4	m4	m4/mT	x3- Δx_4	1-x4	(D4+D3)/2	$\Delta x_4/D_{p4}$
D5	m5	m5/mT	x4- Δx_5	1-x5	(D5+D4)/2	$\Delta x_5/D_{p5}$
D6	m6	m6/mT	x5- Δx_6	1-x6	(D6+D5)/2	$\Delta x_6/D_{p6}$
D7	m7	m7/mT	x6- Δx_7	1-x7	(D7+D6)/2	$\Delta x_7/D_{p7}$

* $\Sigma \Delta x_i = 1$; mT= Σm_i

Onde:

D: diâmetro de abertura da peneira;

M_{pesada}: fração da amostra retida em cada peneira ao término do peneiramento;

F_{mássica}: fração entre a massa retida na peneira e a massa total da amostra;

F_{peneirada}: fração da amostra que passou pela peneira;

F_{retida}: fração da amostra que ficou retida na peneira;

D_{pi}: média aritmética entre a abertura de duas peneiras consecutivas;

Σ : somatório;

mT: massa total pesada.

O DS foi determinado através da Equação 2.

$$DS = \frac{1}{\Sigma(\Delta X_i/D_{pi})} \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde:

DS: diâmetro de Sauter;

ΔX_i : fração mássica;

D_{pi}: diâmetro médio.

3.2.4. Produção de enzimas

3.2.4.1. *Produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES)*

Os fungos F1 e F2 foram previamente isolados de resíduo de abacaxi e bagaço de cana-de-açúcar (respectivamente) e foram utilizados para produção de enzimas via FES, seguindo a metodologia proposta por Rodrigues (2016) com adaptações.

O preparo do inóculo foi realizado através da adição de 10 mL de solução Tween 80 (0,1%) na cepa isolada, seguido de inoculação de 2,5 mL da solução de esporos em 100 mL de meio PDA contido em erlenmeyer de 1 L. O pré-inóculo foi incubado em estufa (30 °C, por 7 dias) seguido de adição de 50 mL de solução Tween 80 (0,1%) e filtração com gaze para obtenção do extrato fúngico.

O meio de cultivo foi preparado pela adição de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farinha de tritcale de grão inteiro (FT) em diferentes proporções (Tabela 3). O pH do meio foi ajustado conforme delineamento experimental (2k + 3 pontos centrais) com adição de NaOH (1 mol/L) e CH₃COOH (1 mol/L). A determinação foi realizada através da homogeneização de 1 g de amostra em 10 mL de água destilada, seguido de repouso durante 30 min e medido diretamente no potenciômetro digital, previamente calibrado (IAL, 1985).

Tabela 3 - Delineamento experimental proposto para a avaliação da produção enzimática via fermentação em estado sólido.

	Experimento	Proporção Substrato (%)	pH
	FT+BC	80/20	7
	FT	100	7
	FT+BC	80/20	5,5
	FT	100	5,5
Pontos Centrais	FT+BC	90/10	6,25
	FT+BC	90/10	6,25
	FT+BC	90/10	6,25

*As condições foram aplicadas ao fungo 1 (F1) e fungo 2 (F2). A proporção de substrato (v/v) refere-se à quantidade de farinha de tritcale de grão inteiro (FT)/bagaço de cana-de-açúcar (BC).

O meio de cultivo teve sua umidade ajustada a 60% (Equação 3) com adição de solução de nutrientes (2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ de MgSO₄, 0,225 g de CaCl₂ e 10 mL.L⁻¹ de solução traço (0,63 mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg.L⁻¹ de MnSO₄, 0,62 mg.L⁻¹ de ZnSO₄ e água destilada até completar o volume de 1 L)).

$$Umidade [\%] = \frac{Msol\ nutrientes}{Mtotal} \quad Eq. (3)$$

Onde:

Umidade: 0,60;

$$Msol\ nutrientes\ (mL) = (meio\ inicial) * (umidade\ amostra) + (M\ add) \quad Eq. (4)$$

$$Mtotal\ (mL) = (meio\ inicial) + (Msol\ nutrientes\ add) \quad Eq. (5)$$

O meio foi esterilizado em autoclave (103 kPa por 20 min) e foi realizada a inoculação de 10⁶ esporos/g_{meio} (COLLA et al., 2010). A contagem dos esporos foi

realizada na câmara de Neubauer. A FES foi conduzida em estufa a 30 °C durante 7 dias. Os processos foram realizados em duplicata, em béqueres de 250 mL com 50 g de meio inicial. Foram realizadas amostragens nos dias 0 (0h), 3 (72h), 5 (120h) e 7 (168h) do processo. A partir das amostragens realizou-se a extração do coquetel de enzimas produzido através o uso de 1 g de substrato fermentado adicionado de 17 mL de solução tampão fosfato 0,2 M (pH 7,0) e submetidos à incubação em banho termostatizado com agitação (Marconi, modelo MA 093) (30 °C, 1.12 G, 60 min) (PARIS et al., 2012). Em seguida foi realizada uma filtração em algodão para remoção dos sólidos particulados. Os extratos enzimáticos obtidos na filtração foram empregados para as determinações analíticas do item 3.2.5.

3.2.4.2. *Produção de enzimas por fermentação submersa (Fsm)*

As bactérias B1 e B2 foram previamente isoladas do mix de frutas e do bagaço de cana-de-açúcar (respectivamente) e foram utilizadas para produção de enzimas via FSm, seguindo a metodologia proposta por Rodrigues (2016) com adaptações.

O preparo do inóculo foi realizado em meio PC (Plate Count) composto por: 5 g/L de triptona, 2,5 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de glicose, a partir da cepa isolada em meio PCA. 50 mL do meio PC foram adicionados em erlenmeyer de 250 mL, seguido por inoculação de duas alçadas de colônia com posterior incubação em mesa agitadora refrigerada (Oxylab, modelo Oxy 305) por 48 h a 30 °C e 2.53 G.

O meio de cultivo foi preparado a partir da adição de substrato em diferentes proporções (Tabela 4) em 1 L de água destilada e deixado em repouso por 2 h, seguido de cozimento durante 30 min a 100 °C. Em seguida, o meio foi filtrado para remoção dos sólidos e adicionado 10% de solução de nutrientes composta por: 2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ de MgSO₄, 0,225 g de CaCl₂ e 10 mL.L⁻¹ de solução traço (0,63 mg.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O, 0,01 mg.L⁻¹ de MnSO₄, 0,62 mg.L⁻¹ de ZnSO₄ e água destilada até completar o volume de 1 L). Foi realizado um experimento controle sem adição de solução de nutrientes. O pH do meio foi ajustado conforme delineamento experimental com adição de NaOH (1 mol/L) e CH₃COOH (1 mol/L) e foi medido diretamente no potenciômetro digital, previamente calibrado (IAL, 1985). O meio foi esterilizado com as seguintes condições: 121 °C, 101 kPa durante 20 min. Em seguida, realizou-se a inoculação de 10% da suspensão de microrganismos com absorbância entre 0,8 e 1,0 a 610 nm.

Tabela 4 - Delineamento experimental proposto para a avaliação da produção enzimática via fermentação submersa.

	Experimento	Proporção Substrato (%)	pH
	FT+BC	80/20	7
	FT	100	7
	FT+BC	80/20	5,5
	FT	100	5,5
Pontos Centrais	FT+BC	90/10	6,25
	FT+BC	90/10	6,25
	FT+BC	90/10	6,25
	Controle	90/10	6,25

*As condições foram aplicadas às bactérias 1 (B1) e bactéria 2 (B2). A proporção de substrato (v/v) refere-se à quantidade de farinha de triticale de grão inteiro (FT)/bagaço de cana-de-açúcar (BC).

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyer de 250 mL com 100 g de meio inicial em mesa agitadora refrigerada (Oxylab, modelo Oxy 305) a 30 °C, 2.53 G, durante 168 h. Foi realizada uma filtração em algodão para separação das células dos meios de fermentação. Foram realizadas amostragens nos tempos T0 (0h), T3 (72h), T5 (120h) e T7 (168h) e os extratos enzimáticos foram empregados para as determinações analíticas do item 3.2.5.

3.2.5. Determinações analíticas

3.2.5.1. Atividade enzimática

A atividade amilolítica das enzimas produzidas foi determinada a partir da liberação de açúcares redutores (AR) em condições padronizadas de ensaio: 1 mL dos extratos enzimáticos provenientes das fermentações submersa ou em estado sólido foram adicionados em tubos de ensaio, acrescidos de 4 mL de solução padrão de amido (1%

preparado em tampão fosfato 0,2 M e pH 7) e incubados em banho termostático por 30 min a 37 °C.

A atividade celulolítica foi determinada a partir do método de Amadi et al. (2020) com adaptações, pela adição de 1 mL dos extratos enzimáticos à 1 mL de CMC (carboximetilcelulose: 1% preparado em tampão citrato 50 mM e pH 4,8) e 2 mL de água destilada, seguidos de banho termostático por 50 °C durante 10 min.

A interrupção da reação foi realizada pela adição de 1 mL de NaOH (1 M), seguida de banho termostático (100 °C durante 10 min) (REMPEL, 2018). Após, a concentração de AR liberados foi determinada pelo método 3,5-dinitrossalicílico (DNS), pelo emprego de uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959). Para ambos os métodos, uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de AR (glicose) por minuto nas condições do método proposto. As atividades amilolíticas e celulolíticas foram calculadas através das Equações 6 e 7, respectivamente (ALVA et al., 2007).

$$[AA] = \frac{[AR]}{t} \times \frac{1000}{180} \quad \text{Eq. (6)}$$

$$[AC] = \frac{[AR]}{t} \times \frac{1000}{180} \quad \text{Eq. (7)}$$

Onde:

AA: atividade enzimática amilolítica (U/mL_{enzima});

AC: atividade enzimática celulolítica (U/mL_{enzima});

AR: concentração de açúcares redutores (mg/mL);

t: tempo de reação (min);

180: fator de conversão para 1 mmol de glicose;

1000: fator de conversão para 1 µmol de glicose.

3.2.5.2. Atividade específica

A atividade específica das enzimas foi determinada dividindo-se os valores de atividade enzimática do item anterior pela concentração de proteínas presente nos extratos. A determinação de proteínas totais dos extratos enzimáticos foi realizada através do método de Lowry et al. (1951). Para tanto, 5 mL de extrato enzimático e 0,5 mL de solução NaOH (1 mol/L) foram aquecidos em banho termostático (100 °C durante 5 min). Em seguida, adicionou-se 2,5 mL de solução previamente preparada (5% de carbonato de

sódio (p/v), 1% de sulfato de cobre (p/v) e 1% de tartarato de sódio e potássio (p/v)), seguido de banho termostático (100 °C, 10 min) e 0,5 mL de Folin Ciocalteau. Após 30 min de reação, a absorbância foi lida em espectrofotômetro (Pro-tools, modelo UV 1600) no comprimento de onda de 750 nm. A atividade específica foi calculada através da Equação 8.

$$[AE] = \frac{AA \text{ ou } AC}{[proteína]} \quad \text{Eq. (8)}$$

Onde:

AE: atividade específica enzimática (U/mg_{proteína});

AA: atividade enzimática amilolítica (U/mL_{enzima});

AC: atividade enzimática celulolítica (U/mL_{enzima});

proteína: concentração de proteína na enzima (mg_{proteína}/mL_{enzima}).

3.2.5.3. Determinação das temperaturas e pH ótimos de atuação

A caracterização enzimática quanto aos valores de pH e temperatura ótimos de foi realizada conforme Rempel (2018) com adaptações. Os extratos enzimáticos previamente selecionados após triagem (item 3.2.1) foram analisados em valores de pH variados (4,5; 5,0 e 5,5) e temperatura (30 °C, 40 °C e 50 °C). A atividade enzimática sobre o amido foi determinada a partir da adição de 2 mL do extrato enzimático e 4 mL de solução de amido (1% em tampão fosfato de sódio 0,2 M nos pHs desejados) em tubos de ensaio. A atividade celulolítica foi determinada a partir da adição de 2 mL de extrato enzimático, 1 mL de água destilada e 2 mL de CMC (1% em tampão citrato 50 mM nos pHs desejados) em tubos de ensaio. Os tubos foram dispostos em banho termostático com agitação (Marconi, modelo Ma 093) durante 60 min nas temperaturas em estudo. Transcorrido o tempo, as enzimas foram inativadas pela adição de 1 mL de NaOH (1 mol/L), seguidas de banho termostático (100 °C por 10 min). Em seguida, as proteínas foram precipitadas pelo acréscimo de solução de Carrez I (solução 15% de ferrocianeto de potássio) e II (solução 30% de sulfato de zinco) e a concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método 3,5 DNS (MILLER, 1959).

3.2.6. Análise estatística

As diferenças entre as médias dos ensaios foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança, seguidos pelo teste de Tukey.

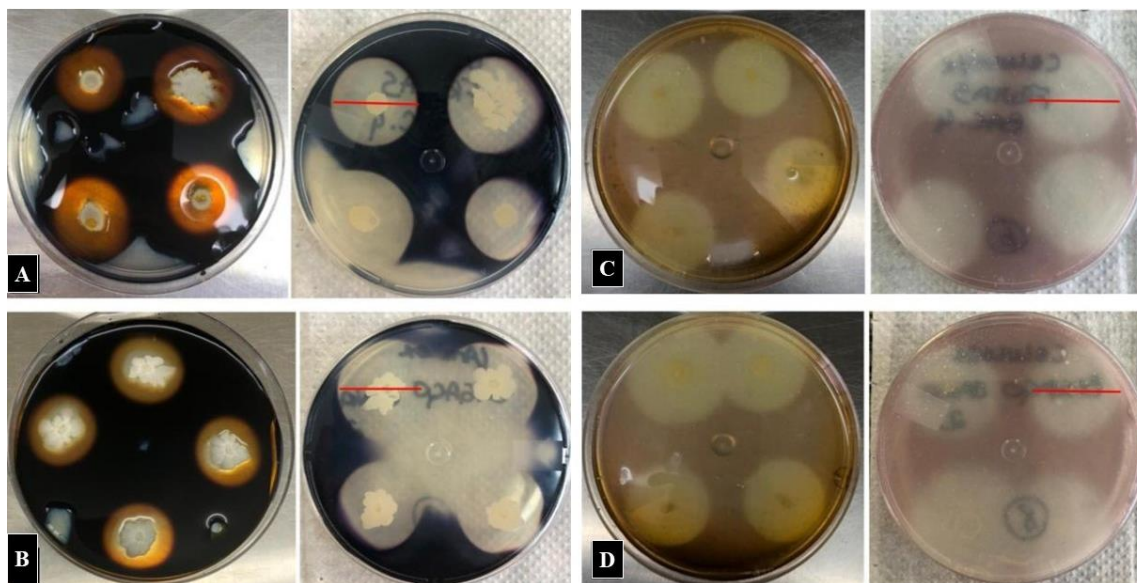
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1. Isolamento de microrganismos e triagem de cepas

A produção de enzimas a partir do isolamento de microrganismos obtidos por recursos naturais, como resíduos de hortifruti, caracteriza-se como uma atividade importante para a obtenção de novas linhagens de microrganismos, denominada como prospecção microbiana (BAKKER, 2017). Para a obtenção de cepas puras foram realizados isolamentos de microrganismos em condições anaeróbicas obtidos a partir de resíduos de hortifruti. Nas condições testadas, foram isolados 11 bactérias, 2 fungos e 1 levedura.

As colônias isoladas foram avaliadas frente à produção qualitativa de amilases e celulases através da formação de halos no meio de cultivo, ao redor do ponto de inoculação dos microrganismos. Para a triagem amilolítica, o resultado positivo para a produção foi confirmado pela formação de halos de zonas brancas claras ao redor do inóculo do microrganismo, que ocorre devido a reação do iodo no meio reagindo com a estrutura da amilose do amido, quebrando as ligações α -(1-4) e α -(1-6) e aprisionando a substância no interior da hélice da amilose, formando um complexo azul escuro. Essa reação não ocorre pelo contato com a amilopectina, pois não há conformação helicoidal em sua estrutura, resultando em uma coloração menos intensa, de tom avermelhado (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Embora todos os isolados tenham crescido no meio contendo amido e, portanto, foram capazes de utilizar o polissacarídeo como fonte de carbono, apenas as bactérias B1 e B2 (isoladas do mix de frutas e do bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente) foram consideradas positivas para a produção de amilase por meio da formação de halos amilolíticos, conforme pode ser observado na Figura 1a (para B1) e Figura 1b (para B2). Não foi verificada atividade amilolítica para os demais isolados ou ainda, estes podem ter apresentado baixa produção de amilase, não detectada no ensaio, pois considerando que todos os isolados analisados desenvolveram colônias no meio sólido específico estima-se que o tempo de incubação foi o suficiente para a indução da produção enzimática (MARCHI et al., 2006).

Figura 1 - Cepas das bactérias B1 (A e C) e B2 (B e D) positivas para a produção de amilase (A e B) e celulase (C e D) pela formação de halos.



*Traço vermelho indica o diâmetro do halo formado. (a) Cepa da bactéria B1 positiva para a produção de amilase. (b) Cepa da bactéria B2 positiva para a produção de amilase. (c) Cepa da bactéria B1 positiva para a produção de celulase. (d) Cepa da bactéria B2 positiva para a produção de celulase.

O diâmetro dos halos formados permite avaliar o rendimento enzimático e a capacidade de degradação dos polissacarídeos de interesse pelos microrganismos, auxiliando no processo de seleção das cepas (FARIA SILVA et al., 2017). Há um ligeiro aumento do diâmetro do halo de degradação com o passar do tempo, devido à indução da atividade enzimática. Baseado no sistema de pontuação do diâmetro dos halos formados (item 3.2.1), na triagem amilolítica as bactérias B1 e B2 foram consideradas produtoras enzimáticas satisfatórias, obtendo halos de diâmetro médio de $3,46 \pm 0,64$ cm e $3,82 \pm 0,20$ cm, respectivamente. É desejado empregar cepas produtoras de halos com diâmetro acima de 3,5 cm, para obter resultados eficientes de atividade enzimática, pois sabe-se que taxas de hidrólise elevadas conferem uma formação de halos maiores (ZHANG et al., 2006).

Outro fator importante a considerar é a disparidade de formação dos halos. Na triagem de cepas celulolíticas, seis bactérias isoladas formaram halos de cor amarelo claro nas placas, indicando a produção de celulase. No entanto, apenas as bactérias B1 e B2 foram selecionadas para a etapa fermentativa, pois as demais bactérias formaram halos pontuados como fracos e não se destacaram na placa de forma nítida, definida e proeminentes ao redor das colônias, mas sim com baixa intensidade na zona produzida, indicando baixa atividade (KASANA et al., 2008). Assim, os melhores isolados

produtores de celulase, pontuados como uma produção enzimática satisfatória foram as bactérias B1 (Figura 1c) e B2 (Figura 1d), que apresentaram diâmetro médio dos halos de $3,7 \pm 0,14$ cm e $4,03 \pm 0,25$ cm, respectivamente. Os halos formados foram bem definidos e apresentaram diâmetro proporcional à atividade celulolítica, demonstrando que os isolados possuem elevada capacidade de produção enzimática.

Considerando a triagem celulolítica, na Figura 2 é possível avaliar a diferença visual entre colônias sem atividade enzimática (Figura 2a) e colônias positivas para a produção enzimática (Figura 2b). Pode-se observar que na Figura 2a que contém a colônia que não apresenta atividade celulolítica não houve formação de halos circundando os inóculos, enquanto na Figura 2b as zonas claras formadas em torno dos inóculos são visíveis, representando a formação de celulase. Esse método de triagem é considerado rápido e simples, indicado para identificar a produção enzimática (BIBI et al., 2018).

Figura 2 - Comparação visual entre uma cepa negativa (A) e uma cepa positiva (B) para produção de celulase.



*(a) Colônias sem atividade celulolítica devido à ausência de halos de produção de celulase. (b) Colônias com atividade celulolítica e formação de halos de produção de celulase.

A produção enzimática por fungos é abundante devido a facilidade de cultivo e de crescimento sob a superfície do meio que os mesmos se encontram. Fungos filamentosos são capazes de secretar as enzimas diretamente no meio de cultivo (FARIA SILVA et al., 2017), onde hidrolisam os polímeros e fornecem fonte de carbono para a nutrição dos fungos. Os fungos isolados demonstraram atividade amilolítica visto que se desenvolveram no meio contendo amido, enquanto para cepas celulolíticas não apresentaram atividade enzimática. O fato de que a celulose é um polímero de alta massa molecular, quando presente em altas concentrações pode ocasionar a repressão catabólica,

inibindo a produção de celulases (BAKKER, 2017), o que pode ter ocorrido para os fungos avaliados, visto que não se desenvolveram no meio contendo o polissacarídeo de interesse.

Do total de isolados analisados, os dois fungos obtidos apresentaram capacidade de produção de amilase, enquanto as bactérias B1 e B2 apresentaram atividade amilolítica e celulolítica, demonstrando uma similaridade entre os resultados e habilidade para hidrolisar amido e celulose, sendo definidos como bons produtores de enzimas. Por outro lado, quatro bactérias (isoladas de abacaxi e de bagaço de cana-de-açúcar) apresentaram fraca atividade celulolítica, não sendo selecionados para os processos fermentativos. No entanto, esse resultado mostra que estas bactérias são hábeis em degradar a celulose frente ao amido, indicando a hipótese de que o perfil enzimático do isolado pode ser relacionado aos substratos de origem (abacaxi, mix de frutas e bagaço de cana-de-açúcar). Dessa forma, as bactérias B1 e B2 e os fungos F1 e F2 foram selecionados para a produção enzimática.

3.3.2. Caracterização das matérias-primas

A produção enzimática é induzida pelo emprego de substratos fontes de nutrientes para o processo fermentativo, portanto é necessário o conhecimento da caracterização físico-química destes em relação ao conteúdo de nutrientes. A Tabela 5 apresenta a composição química do bagaço de cana-de-açúcar e do triticale, em base seca.

Tabela 5 - Composição química das matérias-primas.

% base seca					
Matéria-prima	Proteínas	Lipídios	Cinzas	Fibra bruta	Carboidrato
Triticale	1,26 ± 0,01	2,15 ± 0,03	1,56 ± 1,19	3,21 ± 0,43	79,71
Bagaço de cana-de-açúcar	0,21 ± 0,00	0,76 ± 0,33	0,69 ± 0,25	26,61 ± 0,02	65,38

*Valores médios obtidos por determinações em duplicata ± desvio padrão.

A composição do triticale neste estudo está de acordo com pesquisas anteriores (PEJIN et al., 2009; FRÁS et al., 2016; TAMAKI; MAZZA, 2011; DENNETT; TRETROVAN, 2013). A redução de partículas do cereal confere uma maior área de superfície disponível, permitindo maior acessibilidade dos microrganismos ao substrato,

o que é desejável na produção enzimática (ABDULLA et al., 2018). Tamaki e Mazza (2010) avaliaram o efeito do tamanho da partícula na composição química de triticales moído em três frações: fina (<180 µm), média (180 µm a 850 µm) e grossa (850 µm a 2000 µm) e perceberam que os teores de cinzas são inversamente proporcionais aos tamanhos de partícula, pois reduziram significativamente com o aumento do tamanho da partícula. A composição de cinzas da fração fina avaliada pelos autores foi de 3,8%, enquanto as frações média e grossa resultaram em 1,3% e 1,6%, respectivamente. O resultado obtido em nosso estudo para o teor de cinzas de triticales (1,56%) está em conformidade com estudos anteriormente, como Tamaki e Mazza (2011) de 1,6%, Dennett e Trethovan (2013) com valores entre 1,4% e 2,0%, Fraś et al. (2016) variando entre 1,6% a 2,0% e Pejin et al. (2009), que avaliou quatro variedades do cereal (1,64%, 1,56%, 1,50% e 1,56). Esse teor é justificado pelo fato de que na redução de farinhas de grão inteiro as cinzas são mantidas retidas na fração de farelo.

A elevada quantidade de carboidrato presente na composição química do bagaço de cana-de-açúcar (65,38%) demonstra uma possível valorização deste resíduo, devido a possibilidade de hidrólise de carboidratos complexos em açúcares simples durante a hidrólise enzimática. A natureza hemicelulósica do bagaço da cana-de-açúcar e a presença de nutrientes também favorecem a produção enzimática (YE et al., 2018; BADHAN et al., 2007, DHILLON et al., 2012). Assim, a produção de enzimas celulasas e amilases desse substrato são de grande interesse. De acordo com a literatura a composição química do bagaço de cana-de-açúcar é representada por aproximadamente 40% de celulose, 35% de hemicelulose, 10% de lignina (YE et al., 2018; MARTÍN et al., 2007, DOGARIS et al., 2009), 11% a 13% de fibras (FRAŚ et al., 2016; DIAS et al., 2012) e 5,5% cinzas. Nossos resultados de fibra bruta são superiores aos relatados, enquanto o teor de cinzas está bem inferior, indicando que a composição química depende da natureza do substrato e da metodologia empregada (GAO et al., 2008, DESWAL et al., 2011; CRAGO et al., 2010). Além disso, o bagaço de cana-de-açúcar avaliado em nosso estudo foi resultante da moagem para obter caldo de cana ou garapa, o que justifica o baixo teor de cinzas (0,68%) quando comparado a outros estudos que utilizam o resíduo de usinas e conseqüentemente apresenta areia de bagaço de cana, aumentando o teor de cinzas.

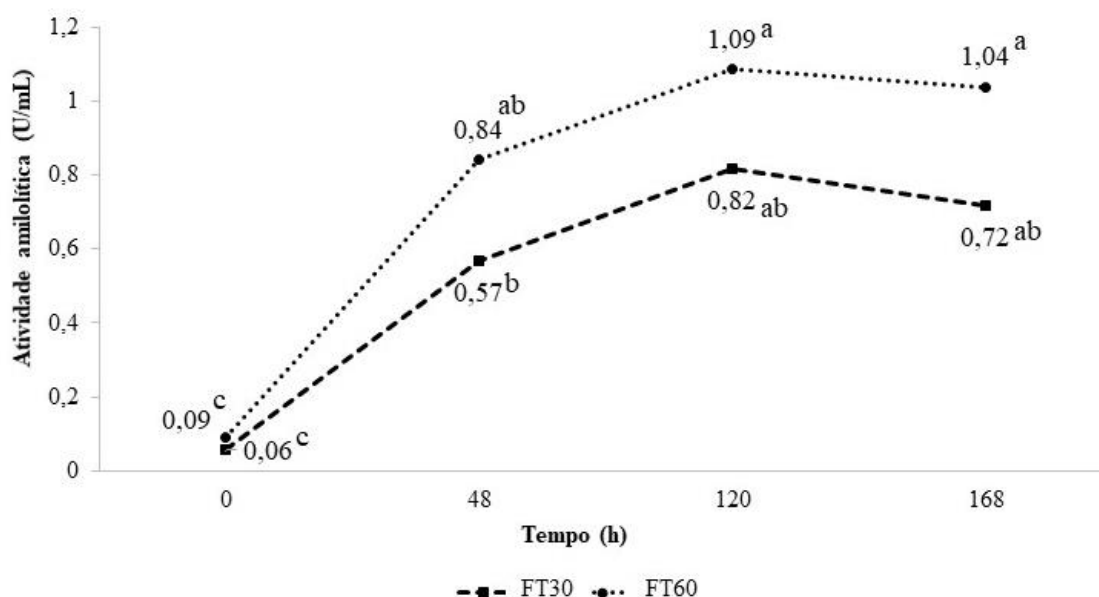
3.3.3. Tamanho de partícula

O teste de peneiramento foi realizado nos grãos de triticales triturados em liquidificador industrial (potência 1) durante entre 30 s (FT30) e 60 s (FT60) para obter o diâmetro médio de Sauter (DS). A amostra FT30 apresentou duas frações de granulometrias distintas: (1) fração com dimensão inferior a 0,84 mm, denominada como pó e (2) fração com dimensão superior a 0,84 mm, denominada como grão inteiro. A fração mássica de grão inteiro representou 89,04% da amostragem total, enquanto a fração mássica de pó conferiu os 10,96% restantes, demonstrando a predominância da partícula inteira. Para FT60 as frações foram divididas em (1) inferiores a 0,71 mm, denominadas como pó e correspondendo a 15,43% da massa total e (2) superiores a 0,71 mm, referidas à farinha de triticales de grão inteiro, representando 84,57% da fração mássica.

A discrepância do tamanho de partícula das frações não é desejada para o processo de FES, pois a heterogeneidade da mistura do substrato pode comprometer o desempenho da fermentação e o dimensionamento do processo, visto que na FES a dificuldade em controlar parâmetros (pH, temperatura e principalmente concentrações de substrato e produtos) é uma desvantagem característica, pois o crescimento celular pode ser interferido (BAKKER, 2017). Dessa forma, aplicar substratos com tamanhos de partícula semelhantes pode conferir melhores desempenhos fermentativos.

Um teste preliminar de FES foi conduzido durante 7 dias, sendo avaliado dois experimentos em 0 h, 48 h, 120 h e 168 h de processo. A atividade amilolítica para a enzima produzida pelo fungo F1 foi analisada variando o tempo de trituração dos grãos de triticales em 30 s (FT30) e 60 s (FT60) e as máximas atividades enzimáticas foram verificadas para o experimento conduzido com o tempo de trituração de 60 s (FT60), conforme pode ser observado na Figura 3. Assim, o tempo de 60 s foi definido para a trituração dos grãos de triticales para obtenção da farinha de triticales de grão inteiro a ser empregada como substrato na produção enzimática.

Figura 3 - Atividade amilolítica observada para a enzima fúngica ao longo da fermentação em estado sólido para experimentos utilizando grãos de triticales triturados durante 30 s (FT30) e 60 s (FT60).



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). FT30: grãos de triticales submetidos a 30 s de trituração em liquidificador industrial; FT60: grãos de triticales submetidos a 60 s de trituração em liquidificador industrial.

O DS da amostra FT30 foi de 1,6972 mm, enquanto para FT60 foi de 1,1159 mm. Os valores obtidos não foram considerados diferentes significativamente ($p < 0,05$) e os resultados se assemelham ao obtido por Bakker (2017), que aplicou resíduo de farelo de trigo com granulometria de 0,9 mm na FES e o definiu como um substrato potencial enzimático, pois a granulometria reduzida auxiliou na formação de grumos que induziram ao crescimento filamentoso aglomerado, além de aumentar a temperatura do meio, fazendo com que a aeração seja dificultada e ocorra crescimento das hifas. Dessa forma, as amostras aplicadas corresponderam às expectativas, visto que DS próximos a 1,0 mm eram esperados (JORDAN et al., 2016) em função de que o tempo de trituração dos grãos foi breve, pois para a FES são indicados substratos particulados sólidos como fonte de nutrientes e as frações reduzidas a pó não eram desejadas.

3.3.4. Atividade enzimática

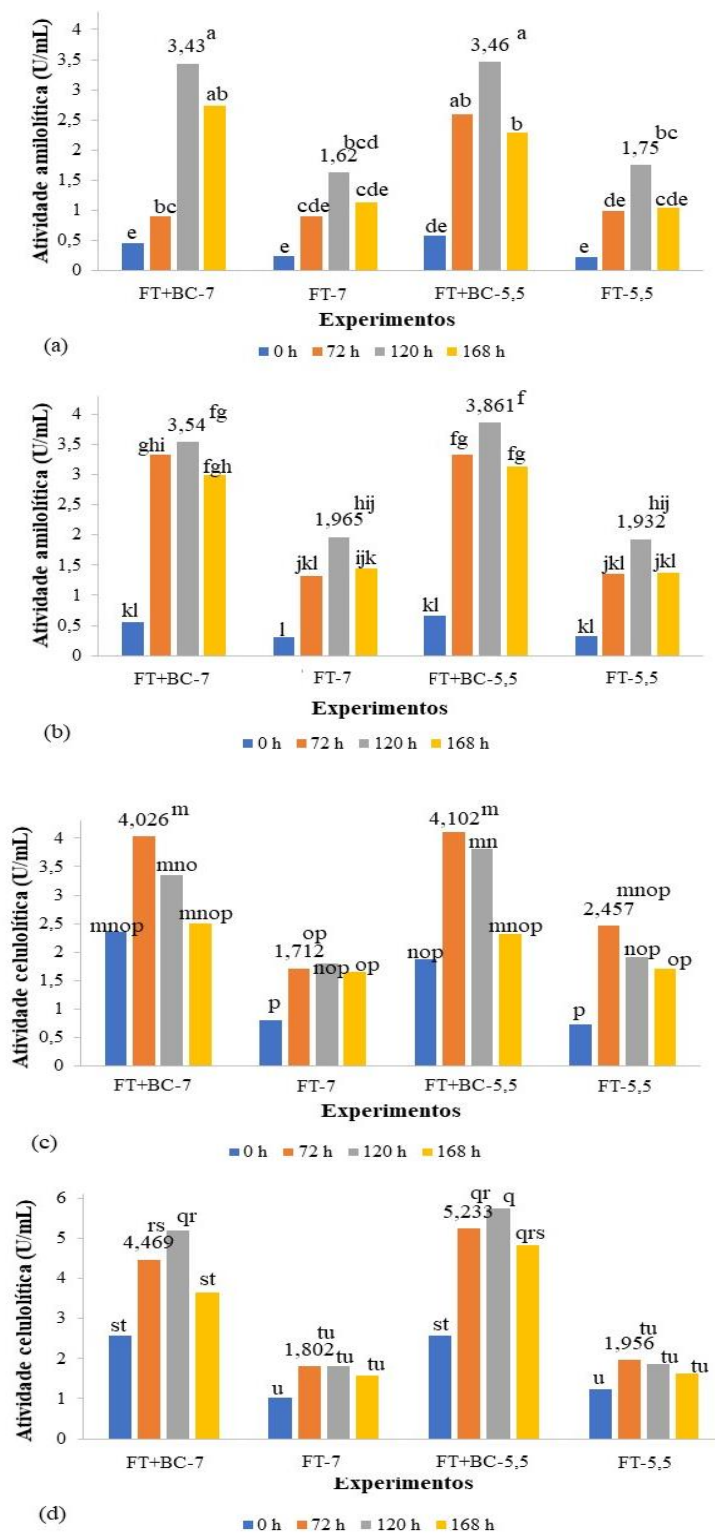
Duas bactérias (B1 e B2) e dois fungos (F1 e F2) previamente isolados de resíduos de hortifruti capazes de produzir simultaneamente enzimas amilolíticas e celulolíticas foram rastreados qualitativamente e selecionados com base nas zonas claras ao redor das colônias. Os fungos foram submetidos à fermentação em estado sólido (FES) devido à

semelhança do ambiente fermentativo com seu habitat natural (crescimento em superfície na ausência ou baixa atividade de água), enquanto as bactérias foram empregadas na fermentação submersa (FSm), em meio líquido contendo nutrientes dissolvidos, condição favorável para os microrganismos.

A atividade enzimática é o principal parâmetro de controle que determina o término da fermentação, além de características do caldo fermentativo e duração do ciclo operacional. A atividade enzimática é avaliada como a quantidade de substrato convertido por unidade de tempo, considerando que em um determinado tempo de reação a enzima perde totalmente sua atividade (LIMA et al., 2001).

A produção de enzimas amilolíticas e celulolíticas através da fermentação submersa (FSm) empregando as bactérias B1 e B2 está demonstrada na Figura 4. A fermentação foi conduzida durante 7 dias, sendo avaliados quatro experimentos nos dias 0 (0 h), 3 (72 h), 5 (120 h) e 7 (168 h) do processo. As atividades enzimáticas foram analisadas de acordo com as seguintes variáveis independentes: (1) pH (variando os níveis em pH 7,0 e pH 5,5) e (2) proporção de substrato em relação ao teor de farinha de triticales de grão inteiro (FT) (variando os níveis em 80% e 100%). As proporções de substrato e os pHs de cada experimento estão presentes na Tabela 4.

Figura 4 - Atividade enzimática observada para a enzima amilolítica produzida pela bactéria B1 (a) e pela bactéria B2 (b) e para a enzima celulolítica produzida pela bactéria B1 (c) e pela bactéria B2 (d) ao longo da fermentação submersa em experimentos contendo farinha de tritcale de grão inteiro (FT) e bagaço de cana-de-açúcar (BC) como substrato, em diferentes pHs (pH 5,5 e pH 7).



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). (a) Atividade enzimática observada para enzima amilolítica produzida pela bactéria 1 (B1). (b) Atividade enzimática

observada para a enzima amilolítica produzida pela bactéria 2 (B2). (c) Atividade enzimática observada para a enzima celulolítica produzida pela bactéria 1 (B1). (d) Atividade enzimática observada para a enzima celulolítica produzida pela bactéria 2 (B2). FT+BC-7: experimento contendo farinha de triticales de grão inteiro+bagaço de cana-de-açúcar em pH 7,0. FT+BC-5,5: experimento contendo farinha de triticales de grão inteiro+bagaço de cana-de-açúcar em pH 5,5. FT-7: experimento contendo farinha de triticales de grão inteiro em pH 7,0. FT-5,5: experimento contendo farinha de triticales de grão inteiro em pH 5,5.

A combinação de farinha de triticales de grão inteiro e bagaço de cana-de-açúcar (FT+BC) demonstrou ser a melhor condição na produção enzimática para as enzimas produzidas pela bactéria B1. Com a mistura de substratos, a atividade amilolítica (AA) verificada foi de 3,43 U/mL em pH 7,0 e 3,46 U/mL em pH 5,5 e a atividade celulolítica (AC) foi de 4,03 U/mL (pH 7,0) e 4,10 U/mL (pH 5,5). A mesma tendência foi verificada para as enzimas da B2, com resultados eficientes de AA (3,54 U/mL em pH 7,0 e 3,86 U/mL em pH 5,5) e AC (4,47 U/mL em pH 7,0 e 5,23 U/mL em pH 5,5).

Os resultados elevados em relação aos demais experimentos sugerem uma melhor acessibilidade dos nutrientes da mistura às enzimas. O elevado conteúdo de amido presente nos grãos de triticales (cerca de 60% a 67%) (FRAŚ et al., 2016, FARINAS, 2015, CASTRO et al., 2011) pode ter atuado como um indutor para a produção amilolítica e os nutrientes presentes no grão proporcionaram condições adequadas para a proliferação das bactérias, resultando em um aumento da atividade enzimática (CERDA et al., 2016, AFRISHAM et al., 2016). Os resultados podem ser atribuídos à degradabilidade favorável e a natureza da farinha de triticales de grão inteiro, pois a presença das cascas do grão, por exemplo, aumenta a porosidade do meio, além de apresentar celulose e hemicelulose em sua composição, assim como o bagaço de cana-de-açúcar, que induz a secreção de enzimas celulolíticas (GAO et al., 2008, BADHAN et al., 2007, DHILLON et al., 2012).

Em nosso estudo, o bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado sem pré-tratamento antecedendo a fermentação, visando a redução de custos do processo. Amadi et al. (2020) também avaliaram a produção enzimática empregando a mesma fonte de carbono sem pré-tratamento e relataram resultados satisfatórios na produção de celulase (12,45 U). No entanto, sabe-se que a composição do resíduo lignocelulósico pode variar entre as matérias-primas, afetando a produção enzimática. É demonstrado que a eficiência da produção enzimática depende da composição química do substrato, no entanto além da natureza, a produção de enzimas celulolíticas também depende da digestibilidade da fonte de carbono, que está diretamente relacionado ao método de pré-tratamento empregado (HIDENO et al., 2011; AMADI et al., 2020; ZHANG et al., 2006).

Métodos de pré-tratamento no bagaço de cana-de-açúcar antecedendo a fermentação foram avaliados em estudos anteriores e demonstraram que esse resíduo é considerado um substrato adequado para a produção de enzimas celulolíticas e que o pré-tratamento adequado pode contribuir com a exposição da celulose, conferindo maiores atividades enzimáticas e rendimentos (JABASINGH; NACHIYAR, 2011; MARTÍN et al., 2007; CAMASSOLA; DILLON, 2009; ZHANG et al., 2006). Nesse sentido, para obter resultados superiores de AC, o estudo de condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar se faz necessário.

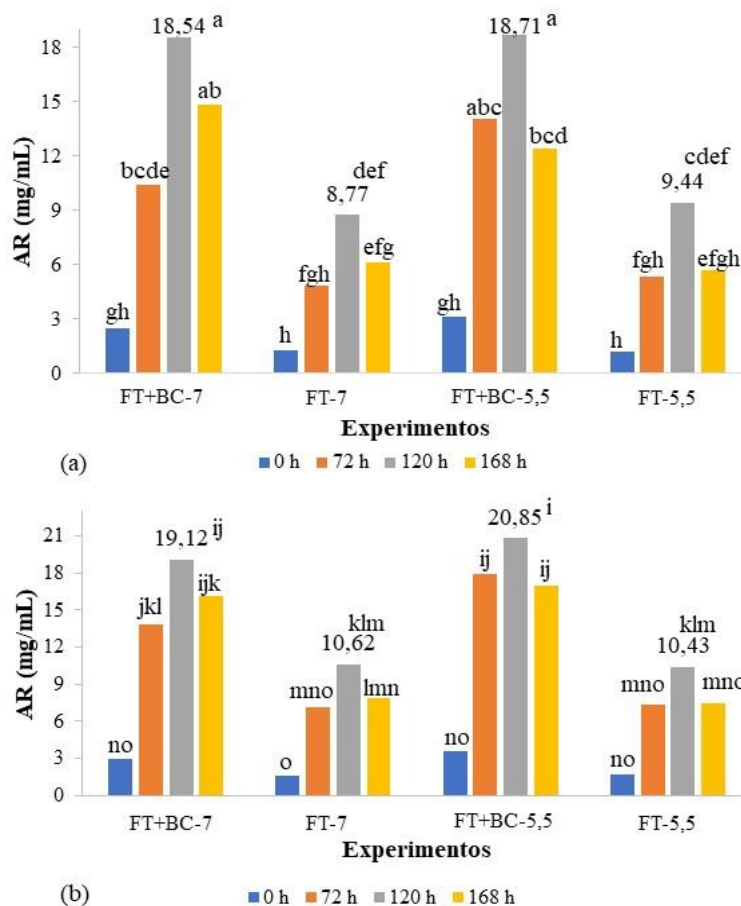
Em relação ao tempo do processo, observou-se para as enzimas produzidas pelas bactérias B1 (Figura 4a) e B2 (Figura 4b) uma tendência de aumento nos resultados de AA a partir do tempo inicial (0 h) em todos os experimentos, que se estende até às 120 h de fermentação, quando a AA apresenta seu pico máximo e em seguida um decréscimo em seus resultados (168 h). Os resultados demonstraram que 120 h de fermentação é o suficiente para garantir AA entre 3,4 U/mL a 3,8 U/mL para as enzimas das bactérias B1 e B2, respectivamente. O mesmo foi verificado por Qureshi et al. (2016), que observaram o pico de produção de protease e amilase no quinto dia de fermentação. Para a AC (Figura 4c e Figura 4d) por sua vez, a fermentação pode ser finalizada em 72 h de processo, pois nessa condição as concentrações máximas foram verificadas para as enzimas celulolíticas da bactéria B1 (4,03 U/mL em pH 7,0 e 4,10 U/mL em pH 5,5) e B2 (4,47 U/mL em pH 7,0 e 5,23 U/mL em pH 5,5), seguidas de redução e estabilização nos resultados ($p > 0,05$).

Esse comportamento é característico de uma curva de crescimento microbiano, onde a fase de latência ocorre inicialmente para a adaptação do microrganismo ao meio de cultivo, findando quando os mesmos encontram características ideais para sua multiplicação e, como consequência, há um crescimento progressivo, na fase exponencial. A redução da atividade enzimática ocorre na sequência, na fase de declínio ou morte (LIMA et al., 2001). Essa tendência de produção máxima durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo reflete positivamente no processo, conferindo redução de custos, visto que os maiores rendimentos enzimáticos são verificados em um meio que contém nutrientes disponíveis (AMADI et al., 2020).

A redução das atividades enzimáticas após o pico de produção pode estar relacionada ao esgotamento de nutrientes ou ainda por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática. A redução na AA em todos os experimentos avaliados em nosso estudo para as enzimas amilolíticas das bactérias B1 e B2 pode ser atribuída a diversos fatores, dentre eles uma possível repressão catabólica na síntese enzimática. Esse fator

está relacionado a inibição enzimática pela presença de glicose no meio, devido à alta produção enzimática que, conseqüentemente, libera elevadas quantidades de açúcares redutores, conforme observado na Figura 5 em 120 h de processo, para as enzimas amilolíticas das bactérias B1 (Figura 5a) e B2 (Figura 5b), pois sabe-se que os polissacarídeos de baixo grau de polimerização são normalmente consumidos rapidamente pelos microrganismos durante a fermentação (CERDA et al., 2016; BOTELLA et al., 2005).

Figura 5 - Concentração de açúcar redutor ao longo da fermentação submersa para as enzimas amilolíticas produzidas pelas bactérias B1 (a) e B2 (b) em experimentos contendo farinha de triticale de grão inteiro (FT) e bagaço de cana-de-açúcar (BC) como substrato, em diferentes pHs (pH 5,5 e pH 7).



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). (a) Concentração de açúcar redutor observado para a enzima amilolítica produzida pela bactéria 1 (B1). (b) Concentração de açúcar redutor observado para a enzima amilolítica produzida pela bactéria 2 (B2). FT+BC-7: experimento contendo farinha de triticale de grão inteiro+bagaço de cana-de-açúcar em pH 7,0. FT+BC-5,5: experimento contendo farinha de triticale de grão inteiro+bagaço de cana-de-açúcar em pH 5,5. FT-7: experimento contendo farinha de triticale de grão inteiro em pH 7,0. FT-5,5: experimento contendo farinha de triticale de grão inteiro em pH 5,5.

O pH demonstrou não influenciar na produção enzimática. As AA e AC para as enzimas amilolíticas das bactérias B1 e B2 não diferiram entre si ($p > 0,05$) com o ajuste de pH para os experimentos avaliados, apresentando valores semelhantes nos experimentos FT+BC, em pH 7,0 e 5,5 (Figura 4), observados como as atividades máximas. Os experimentos conduzidos em pH 5,5 em nosso estudo dispensaram o uso de ácidos e bases para ajuste, pois as matérias-primas apresentavam pH inicial ácido. Assim, é possível concluir que o pH inicial do meio é muito eficaz no rendimento de enzimas amilolíticas e celulolíticas, sendo possível conduzir a produção enzimática por FSm com o uso de bagaço de cana-de-açúcar e triticale sem ajuste de pH (com pH inicial do meio em torno de 5,5), o que confere redução de custos no processo por dispensar o uso de reagentes. Nesse contexto, o experimento contendo a mistura dos substratos (FT+BC) em pH 5,5 foi selecionado para caracterização, pois foi o experimento com melhor produção enzimática.

Para avaliar a suplementação do meio de cultivo com solução de nutrientes, foram conduzidos experimentos no ponto central (proporção 90% FT + 10% BC, pH 6,25 com adição de 10% de solução de nutrientes) e controle (proporção 90% FT + 10% BC, pH 6,25 sem adição de solução de nutrientes). A Tabela 6 apresenta os resultados máximos obtidos para AA e AC ao longo da FSm para as enzimas produzidas pelas bactérias B1 e B2 nos melhores tempos de fermentação, demonstrando que a fermentação dispensa a suplementação, pois os resultados verificados não diferem entre si ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$), o que reduz os custos de processo e confere AA e AC satisfatórias.

Tabela 6 - Atividade enzimática obtida para os experimentos dos pontos centrais e controle nos melhores tempos de fermentação submersa.

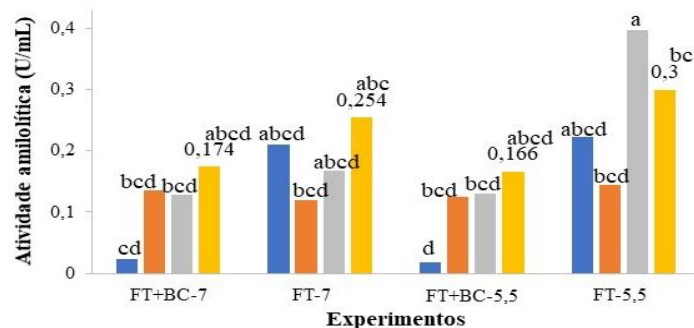
Tempo de fermentação	120 h		72 h	
	AA B1 (U/mL)	AA B2 (U/mL)	AC B1 (U/mL)	AC B2 (U/mL)
PC	1,90 ^a	2,56 ^{ab}	1,97 ^a	2,40 ^{abc}
Controle	2,02 ^a	3,00 ^a	2,31 ^a	2,67 ^{abc}

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). PC: pontos centrais. AA: atividade amilolítica. AC: atividade celulolítica. B1: bactéria 1. B2: bactéria 2.

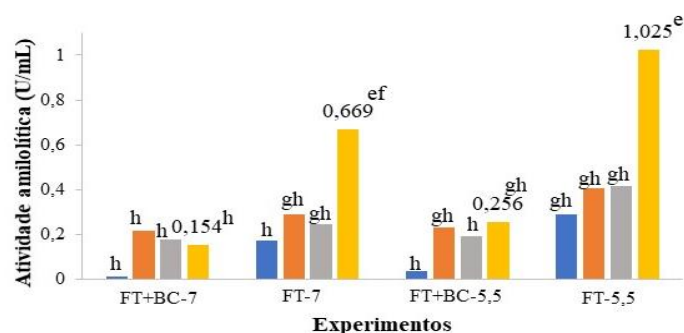
Na FES, as AA máximas obtidas para as enzimas produzidas pelos fungos F1 e F2 (Figura 6a e Figura 6b, respectivamente) foram observadas nos experimentos contendo

farinha de triticales de grão inteiro em sua composição (proporção 100%), dispensando o uso de bagaço de cana-de-açúcar. Isso pode ser explicado devido à homogeneidade do meio. Na FES esse fator é considerado importante, visto que o desenvolvimento fúngico é influenciado positivamente pelo tamanho de partícula do substrato. A granulometria reduzida auxilia na formação de grumos no meio de cultivo (esporos agrupados) que favorecem o crescimento filamentosos aglomerados, além de aumentar a temperatura do meio, fazendo com que a aeração seja dificultada e ocorra crescimento das hifas (BAKKER, 2017, BOTELLA et al., 2005).

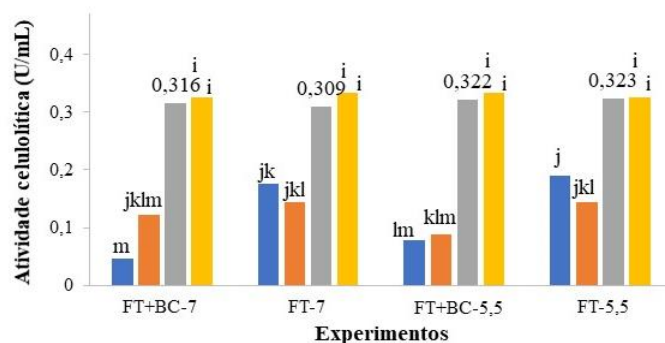
Figura 6 - Atividade enzimática observada para a enzima amilolítica produzida pelo fungo F1 (a) e pelo fungo F2 (b) e para a enzima celulolítica produzida pelo fungo F1 (c) e pelo fungo F2 (d) ao longo da fermentação em estado sólido em experimentos contendo farinha de triticale de grão inteiro (FT) e bagaço de cana-de-açúcar (BC) como substrato, em diferentes pHs (pH 5,5 e pH 7).



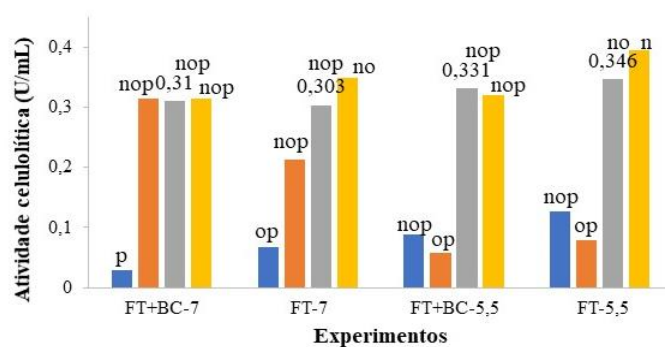
(a) 0 h 72 h 120 h 168 h



(b) 0 h 72 h 120 h 168 h



(c) 0 h 72 h 120 h 168 h



(d) 0 h 72 h 120 h 168 h

*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). (a) Atividade enzimática observada para a enzima amilolítica produzida pelo fungo 1 (F1). (b) Atividade enzimática observada para a enzima amilolítica produzida pelo fungo 2 (F2). (c) Atividade enzimática observada para a enzima celulolítica produzida pelo fungo 1 (F1). (d) Atividade enzimática observada para a enzima celulolítica produzida pelo fungo 2 (F2). FT+BC-7: experimento contendo farinha de triticales de grão inteiro+bagaço de cana-de-açúcar em pH 7,0. FT+BC-5,5: experimento contendo farinha de triticales de grão inteiro+bagaço de cana-de-açúcar em pH 5,5. FT-7: experimento contendo farinha de triticales de grão inteiro em pH 7,0. FT-5,5: experimento contendo farinha de triticales de grão inteiro em pH 5,5.

É possível relacionar o resultado obtido às composições químicas do meio, principalmente ao teor de fibra, pois é relatado que as fibras afetam o crescimento fúngico e a síntese enzimática (BOTELLA et al., 2005, GAO et al., 2008). O bagaço de cana-de-açúcar utilizado na FES apresentou elevado teor de fibras em sua composição (26,61%), o que pode ter afetado diretamente a produção enzimática devido à estrutura do material lignocelulósico que apresenta uma parede celular com frações rígidas e de difícil degradação (MEMBRILLO et al., 2008).

Verificou-se para as enzimas produzidas pelos fungos F1 e F2 que as atividades enzimáticas dos tempos iniciais (0 h até 120 h) não diferem entre si ($p<0,05$), enquanto os resultados do tempo final de fermentação (168 h) para os experimentos contendo apenas farinha de triticales de grão inteiro em sua composição (FT em pH 7,0 e FT em pH 5,5) se destacam, apresentando as maiores AA para a enzima amilolítica do F1 (0,25 U/mL em pH 7,0 e 0,30 U/mL em pH 5,5) e para a enzima amilolítica do F2 (0,67 U/mL em pH 7,0 e 1,02 U/mL em pH 5,5). Dessa forma, pode-se concluir que em 168 h de fermentação são obtidas as AA máximas, demonstrando que o processo pode ser finalizado nesse tempo.

As AA máximas observadas para as enzimas amilolíticas do F1 (0,3 U/mL) e para as enzimas amilolíticas do F2 (1,02 U/mL) são cerca de 70% a 90% inferiores ($p>0,05$) às observadas para as enzimas amilolíticas da B1 (3,46 U/mL) e das enzimas amilolíticas da B2 (3,86 U/mL), demonstrando que a produção enzimática por bactérias é mais eficiente comparada à produção fúngica, por conferir maiores resultados de AA nas condições em estudo. Observou-se que 120 h de FSm é o tempo favorecido para a produção de enzimas amilolíticas e que a combinação de matérias-primas é eficiente na fermentação por bactérias, conferindo uma economia de processo com resultados de AA acima de 3,40 U/mL.

Em relação aos resultados de AC, em todos os experimentos avaliados para as enzimas celulolíticas dos fungos F1 e F2 observa-se uma similaridade significativa ($p>0,05$) nos resultados. Para as variáveis avaliadas: pH variando nos níveis 7,0 e 5,5 e proporção de substrato em relação à farinha de triticales de grão inteiro e bagaço de cana-

de-açúcar, em níveis de 80/20 (v/v) e 100%, não foi verificada influência significativa ($p < 0,05$). É possível concluir que para as enzimas celulolíticas produzidas pelos fungos F1 e F2, o aumento no período de incubação não favoreceu o aumento na produção enzimática e que o momento ideal para a interrupção da fermentação é 120 h de processo, pois após esse período são observadas tendências de estabilização na atividade enzimática. No entanto, a produção celulolítica fúngica apresentou-se inferior à produção por bactérias, conferindo resultados na faixa de 0,30 U/mL enquanto a AC máxima para as enzimas celulolíticas da B1 foi de 4,10 U/mL e da B2 foi de 5,23 U/mL.

Assim, os complexos enzimáticos produzidos pelas bactérias B1 e B2 nas melhores condições de FSm (experimento FT+BC em pH 5,5) foram selecionados para caracterização enzimática frente à atividade específica, temperatura e pH ótimos de atuação.

3.3.5. Atividade específica

A Tabela 7 apresenta os resultados de atividade específica (AE) das enzimas amilolíticas e celulolíticas produzidas pelas bactérias B1 e B2. Nota-se que a enzima celulolítica produzida pela bactéria B2 apresenta uma AE maior significativamente ($p > 0,05$) do que a enzima celulolítica por B1, devido à diferença dos resultados de atividade celulolítica obtidos, cerca de 28% superior ao verificado pela enzima celulolítica por B1. Esses resultados mostram que para as bactérias B1 e B2, a combinação de farinha de triticale de grão inteiro e bagaço de cana-de-açúcar em pH 5,5 demonstrou ser a fonte de carbono mais adequada para a produção de enzimas degradantes de celulase.

Tabela 7 - Resultados de atividade específica das enzimas amilolíticas e celulolíticas obtidas pelas bactérias 1 (B1) e 2 (B2).

Enzima/Bactéria	AA (U/mL)	AC (U/mL)	AE (U/mg_{proteína})	Proteína (mg_{proteína}/ mL)
Amilolítica/B1	3,46±0,50 ^e	-	0,61±0,07 ^b	5,69±0,29 ^d
Amilolítica/B2	3,86±0,04 ^e	-	0,54±0,01 ^b	7,13±0,09 ^c
Celulolítica/B1	-	4,10±0,45 ^e	0,62±0,07 ^b	6,58±0,16 ^c
Celulolítica/B2	-	5,74±0,06 ^d	0,80±0,00 ^a	7,13±0,09 ^c

*Valores médios obtidos por determinações em duplicata \pm desvio padrão. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). AA: atividade amilolítica. AC: atividade celulolítica. AE: atividade específica.

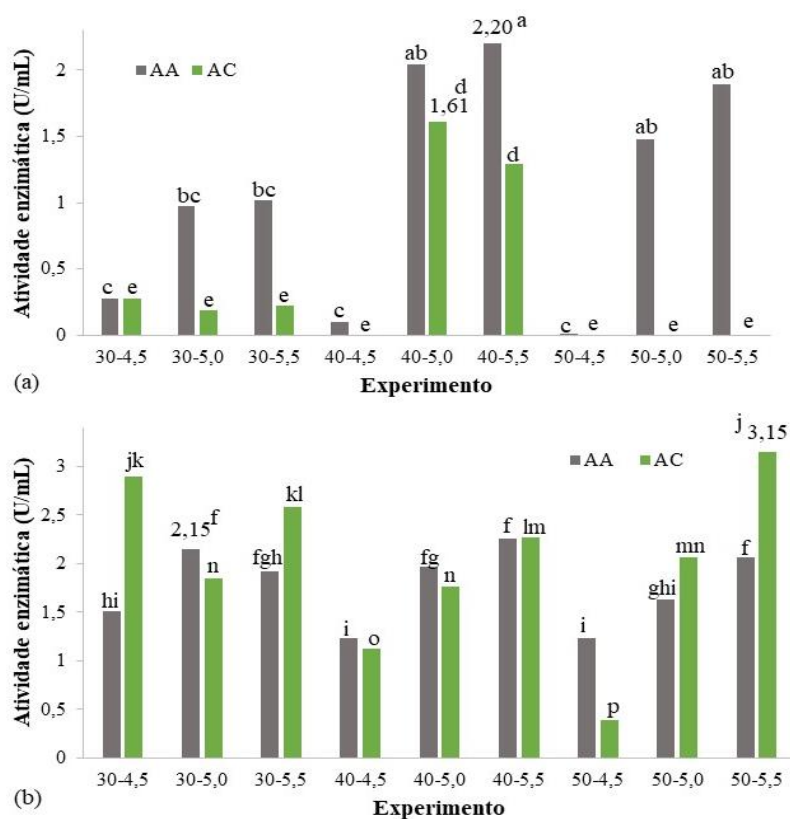
Nossos resultados de AE se assemelham aos obtidos por Juhász et al. (2005), que produziram enzimas celulasas por fermentação do fungo *Trichoderma reesei*. A AE da enzima celulolítica produzida pela bactéria B1 (0,62 U/mg_{proteína}) é comparada à verificada para as enzimas comerciais Celluclast 1,5 L e Econase CE, de 0,55 FPU/mg e 0,63 FPU/mg, respectivamente (JUHÁSZ et al., 2005). Enquanto a enzima celulolítica por B2 apresentou resultado superior. Nesse sentido, sugere-se que a produção de celulasas bacteriana não depende apenas da quantidade de celulose e hemiceluloses presentes na fonte de carbono, mas também na sua digestibilidade, relacionada ao método de pré-tratamento (HIDENO et al., 2011). Assim, a otimização do processo produtivo empregando uma etapa adicional de pré-tratamento no bagaço de cana-de-açúcar pode conferir maiores resultados de AC e AE para as enzimas celulolíticas produzidas pelas bactérias B1 e B2.

Nossos resultados de AE para as enzimas amilolíticas foram semelhantes, independente da bactéria isolada, o que confirma que a AE depende da natureza da fonte de carbono, uma vez que as condições de produção foram as mesmas.

3.3.6. Determinação de temperatura e pH ótimos de atuação

Os efeitos da temperatura e pH nas atividades enzimáticas para as enzimas obtidas pelas bactérias B1 e B2 são mostrados na Figura 7. As temperaturas avaliadas variaram entre 30 °C, 40 °C e 50 °C, enquanto os pHs variaram na faixa de 4,5 a 5,5.

Figura 7 - Efeito de diferentes temperaturas (30 °C, 40 °C e 50 °C) e pHs (4,5; 5,0 e 5,5) nas atividades amilolíticas (AA) e celulolíticas (AC) das enzimas obtidas pelas bactérias B1 (a) e B2 (b).



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). (a) Atividade enzimática observada para a enzima obtida pela bactéria 1 (B1). (b) Atividade enzimática observada para a enzima obtida pela bactéria 2 (B2). AA: Atividade amilolítica. AC: atividade celulolítica. 30-4,5: experimento nas condições de 30 °C e pH 4,5. 30-5,0: experimento nas condições de 30 °C e pH 5,0. 30-5,5: experimento nas condições de 30 °C e pH 5,5. 40-4,5: experimento nas condições de 40 °C e pH 4,5. 40-5,0: experimento nas condições de 40 °C e pH 5,0. 40-5,5: experimento nas condições de 40 °C e pH 5,5. 50-4,5: experimento nas condições de 50 °C e pH 4,5. 50-5,0: experimento nas condições de 50 °C e pH 5,0. 50-5,5: experimento nas condições de 50 °C e pH 5,5.

A AA foi avaliada usando amido como substrato e a temperatura ótima observada para a enzima produzida pela bactéria B1 foi de 40 °C (Figura 7a). Abaixo de 40 °C, a atividade enzimática reduziu rapidamente, conferindo resultados entre 0,27 U/mL e 1,01 U/mL em temperatura de 30 °C. No entanto, os resultados de AA na temperatura de 50 °C foi semelhante ($p > 0,05$) ao obtido em 40 °C, demonstrando que a enzima obtida por B1 apresenta atuação na faixa de temperatura entre 40 °C a 50 °C. Estudos anteriores verificaram a atividade ótima de enzimas amilolíticas em temperaturas de 40 °C e 50 °C, o que justifica os resultados em nosso estudo (LIMA et al., 2020; NASEER et al., 2020). A faixa de pH ótimo da enzima amilolítica obtida por B1 foi entre pH 5,0 e 5,5. A AA máxima (2,20 U/mL) foi verificada na condição experimental de pH 5,5 em 40 °C,

enquanto o pH 4,5 apresentou resultados inferiores para todas as temperaturas avaliadas (0,005 U/mL a 50 °C; 0,1 U/mL a 40 °C e 0,27 U/mL a 30 °C). O pH de 5,5 também foi considerado como o pH ótimo de atuação através do resultado de rendimento máximo de atividade (76,56%) da enzima amiloglicosidase obtida por *Aspergillus niger* (ASLAN et al., 2020).

A atividade celulolítica da enzima obtida pela bactéria B1 foi influenciada negativamente pelo efeito da temperatura (Figura 7a). As concentrações máximas de AC (1,61 U/mL) foram obtidas em 40 °C na faixa de pH entre 5,0 e 5,5, enquanto temperaturas abaixo (30 °C) e acima (50 °C) apresentaram resultados próximos de zero. Esses resultados mostraram que a enzima bacteriana produzida por B1 atua sobre amido e celulose em 40 °C na faixa de pH 5,0 a 5,5. Abaixo de pH 5,0, a atividade diminuiu rapidamente. No entanto, sua atuação em 50 °C também é observada na produção amilolítica. O pH ótimo de atuação da enzima celulolítica por B1 foi semelhante ao pH ótimo da enzima celulase por *Saccharomyces cerevisiae* SCPW 17, em pH 5,0 (AMADI et al., 2020).

Para a enzima produzida pela bactéria B2 (Figura 7b), o melhor resultado de AA foi na faixa de pH entre 5,0 a 5,5. Fora dessa faixa de pH houve uma redução na atividade enzimática ($p > 0,05$). Em relação a temperatura, a característica mais notável dessa enzima é sua atuação em toda faixa de temperatura avaliada (30 °C, 40 °C e 50 °C) pois apresentou resultados semelhantes estatisticamente ($p > 0,05$) nessas temperaturas em pH entre 5,0 e 5,5 para a produção amilolítica e celulolítica. Uma cepa celulolítica obtida pelo isolamento de *S. cerevisiae* SCPW 17 também apresentou estabilidade nessa faixa de temperatura (AMADI et al., 2020). A maior produção de celulase foi obtida na condição de pH 5,5 e temperatura de 50 °C para B2 (3,15 U/mL), indicando que a combinação de alta temperatura e pH levou a uma produção mais eficiente do que outros valores de pH e temperatura para a bactéria em estudo. Esses resultados estão de acordo com relatos anteriores indicando que o pH foi favorável para aumentar a conversão enzimática da celulose (AMADI et al., 2020).

Avaliando os resultados para AA e AC das enzimas produzidas pela bactéria B1, verifica-se uma faixa de atuação ótima comum entre elas, nas condições de temperatura de 40 °C e pH entre 5,0 e 5,5. Para as enzimas amilolíticas e celulolíticas produzidas por B2, a atuação máxima ocorreu em pH na faixa de 5,0 a 5,5 para todas as temperaturas avaliadas (30 °C, 40 °C e 50 °C). Esses resultados são eficazes pois demonstram que em uma hidrólise industrial (como na produção de bioetanol, por exemplo), as enzimas atuam

de forma conjunta, reduzindo etapas de ajuste de pH e temperatura durante o processo. Com essas características, as enzimas produzidas pelas bactérias B1 e B2 poderiam ser empregadas na produção de biocombustíveis. No entanto, otimizações no processo produtivo são necessárias para conferir maiores resultados de atividades enzimáticas para uma aplicação futura.

3.4. CONCLUSÕES

A conversão de resíduos de hortifrutí para a produção de cepas fúngicas e bacterianas capazes de produzir complexos enzimáticos foi eficaz. Uma fermentação em estado sólido (FES) e uma fermentação submersa (FSm) foram conduzidas por farinha de triticale de grão inteiro em diferentes proporções com bagaço de cana-de-açúcar, demonstrando resultados eficientes na produção de amilases e celulases. A produção de ambas as enzimas foi maximizada em pH inicial de 5,5, com duração de 120 h (FSm) e 168 h (FES). Altas concentrações amilolíticas e celulolíticas podem ser alcançadas por FSm empregando bactérias em comparação com atividades enzimáticas observadas por fungos via FES. Para a enzima produzida a partir da bactéria B1 (isolada de resíduos de frutas) a concentração máxima de amilase foi de 3,46 U/mL e o pico de produção de celulase foi de 4,10 U/mL. A enzima produzida pela bactéria B2 apresentou resultados superiores para a produção amilolítica (3,86 U/mL) e celulolítica (5,23 U/mL), sendo isolada de bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados verificados a partir das condições estudadas demonstram que o método aplicado de produção de enzimas e geração de açúcares foi eficaz.

A combinação de bagaço de cana-de-açúcar e farinha de triticale de grão inteiro mostrou-se uma estratégia para redução de custos na produção enzimática. O desempenho da enzima amilolítica produzida pela bactéria B1 em pH na faixa de 5,0 a 5,5 e temperatura de 40 °C foi de 2,20 U/mL, demonstrando que essa é sua condição ótima de atuação. Desempenho semelhante foi registrado pela enzima celulolítica por B1, produzindo 1,61 U/mL na mesma temperatura e faixa de pH (40 °C em pH entre 5,0 e 5,5). Esses resultados são importantes na aplicação industrial, pois demonstram que na hidrólise de bioetanol por exemplo, as enzimas atuam de forma conjunta, reduzindo etapas de ajuste de pH e temperatura durante o processo.

A atividade elevada em pH na faixa de 5,0 a 5,5 para todas as temperaturas em estudo (30 °C, 40 °C e 50 °C) demonstrou o potencial amilolítico e celulolítico do

complexo enzimático produzido pela bactéria B2 (AA: 2,15 U/mL e AC: 3,15 U/mL) podendo ser aplicada na produção de biocombustíveis, como o bioetanol. No entanto, a otimização das condições de fermentação deve ser considerada para obter maiores resultados de produção de amilases e celulasas. Assim, são necessários mais estudos sobre a produção enzimática pela conversão de resíduos de hortifruti, a fim de tornar a conversão uma estratégia de redução de custos do processo.

4. CAPÍTULO 4: ARTIGO EXPERIMENTAL 2

INTEGRAÇÃO DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO DE BIOETANOL DE RESÍDUOS DE FRUTAS E TRITICALE POR SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SEPARADA E SIMULTÂNEA

RESUMO

O objetivo do estudo foi produzir bioetanol associando triticales e resíduos de banana e mamão, comparando os métodos de sacarificação e fermentação separada (SHF) e simultânea (SSF). Foi calculada a eficiência e a produtividade de bioetanol em cada modo de operação e a comparação entre os métodos demonstrou que a SSF confere resultados significativamente superiores ($p > 0,05$) nas condições avaliadas. Os resíduos de frutas associados ao material amiláceo (triticales) dispensaram a necessidade de suplementação adicional e conseqüentemente reduziram os custos de processo. O potencial do resíduo de banana foi avaliado diante dos resultados de concentração de bioetanol e produtividade (30,70 g/L; 2,56 g/L.h, respectivamente, para SSF e 25,68 g/L; 1,95 g/L.h, respectivamente, para SHF) indicando que essa fonte contém os nutrientes necessários para um processo fermentativo eficaz e que além da biodisponibilidade e baixo custo para obtenção, a conversão eficiente pode ser garantida com condições otimizadas de produção. No entanto, a adição de matérias-primas combinadas nos experimentos conferiu uma diluição ao meio, o que compreende um gargalo do processo. Visando a biorrefinaria sustentável é necessário avaliar soluções que minimizam a produção de água da mistura e permitam maximizar a produção de bioetanol por resíduos de frutas e materiais alternativos, como o triticales. Na SSF, as concentrações máximas de bioetanol para todos os experimentos foram identificadas em 12 h de processo, demonstrando que esse modo de operação nas condições testadas permite benefícios como redução de tempo, energia e investimentos, quando comparado ao processo separado. Diante dos resultados obtidos, demonstra-se a possibilidade da produção em escala laboratorial integrando a primeira e a segunda geração de bioetanol, combinando resíduos lignocelulósicos e material amiláceo, podendo reduzir o descarte de resíduos de frutas e os destinando para a biorrefinaria, integrando o conceito de bioeconomia circular com a produção de um produto de alto valor agregado.

Palavras-chave: Biocombustível. Resíduos lignocelulósicos. Segunda geração. Economia de processo.

4.1. INTRODUÇÃO

O consumo energético industrial provém de produtos do refino de petróleo e representa uma problemática econômica e sustentável, pois estão expostos ao esgotamento progressivo e contribuem majoritariamente às mudanças climáticas, causando prejuízos ao meio ambiente e a depreciação de recursos naturais (CHEN et al., 2021; LEONG et al., 2021; ARUWAJOYE et al., 2020; MAHRAN et al., 2020). Visando alterar o cenário ambiental, o uso de biocombustíveis de biomassa renovável como o

bioetanol possibilita uma combustão menos agressiva, de forma limpa e sustentável, em comparação aos combustíveis fósseis (CHEN et al., 2021; LOMTHONG et al., 2020; GRONCHI et al., 2019; NIZAMI et al., 2017).

O bioetanol é classificado de acordo com a matéria-prima empregada como substrato em bioetanol de primeira geração, proveniente de matéria-prima amilácea e sacarínea (STRAK-GRACZYK; BALCEREK, 2020; KARP, 2021; KOGA et al., 2009), bioetanol de segunda geração, por resíduos lignocelulósicos (ARUWAJOYE et al., 2020; SIRIWONG et al., 2019; WOBIWO et al., 2019), bioetanol de terceira geração, a partir de microalgas (REMPEL et al., 2019; LEONG et al., 2018), e bioetanol de quarta geração, por algas geneticamente modificadas (SHOKRAVI et al., 2021; ABDULLAH et al., 2019).

O bioetanol pode ser produzido a partir da combinação de diferentes matérias-primas, o que envolve o uso de tecnologias para produção de gerações diferentes de bioetanol, e consiste em uma oportunidade para diversificar a matriz energética para o abastecimento de energia (DEVOS; COLLA, 2022; MACIEL et al., 2020; ASTOLFI et al., 2020; SAGGI; DEY, 2019; AYODELE et al., 2020). Nesse contexto, estudar a combinação de diferentes substratos permite disponibilizar uma variedade de nutrientes para os microrganismos presentes no processo de produção de bioetanol, visando uma melhor conversão.

Devido a grande quantidade de resíduos gerados, a produção de bioetanol por resíduos lignocelulósicos é constantemente incentivada (CHEN et al., 2021; WOBIWO et al., 2019; KANNAH et al., 2020; DUQUE et al., 2021, GÓMEZ et al., 2020). A produção de banana confere cerca de 250 milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos, como cascas, pseudocaules, pedúnculos, bulbos, raque, além da biomassa da fruta em um estágio avançado de maturação, que pode atingir até 30% da produção total, visto que a banana é uma fruta muito produzida a nível mundial (cerca de 100 milhões de toneladas anualmente) (WOBIWO et al., 2019). Esses resíduos apresentam potencial bioenergético devido sua composição de aproximadamente 50% de amido, 20% de lignocelulose (o que confere uma hidrólise facilitada na produção de bioetanol) e por ser fonte de vitaminas e minerais (WOBIWO et al., 2019; PALÁCIOS et al., 2017; GÓMEZ et al., 2020; UTAMA et al., 2019).

Assim como a banana, o mamão é uma fruta destaque de produção mundial. Cerca de 12 milhões de toneladas de mamão foram produzidas anualmente. No entanto, a geração de resíduos, como cascas, sementes e o fruto descartado em estágio avançado de

maturação, é proporcional à produção (taxa de descarte de 35% a 50% da colheita total). A casca de mamão e a semente representam cerca de 12% e 8,5%, respectivamente, do peso do fruto. A composição do mamão demonstra a alternativa da sua conversão em produtos de valor agregado, como na produção de bioetanol. Além de ser fonte de compostos bioativos, como carotenóides, vitaminas, minerais e fibras, a composição química do mamão demonstra elevados teores de carboidratos e proteínas. Ainda, a relação de carbono e nitrogênio demonstra ser uma boa base para cultivo e desenvolvimento de microrganismos (PATHAK et al., 2019; BONATTO et al., 2021; HAN et al., 2018; ABDULLA et al., 2018).

Outro fator importante para o estímulo da produção de bioetanol a partir de lignocelulósicos é o potencial energético relacionado ao elevado teor de carboidratos presentes (KANNAH et al., 2020; DE LA TORRE et al., 2019) e por serem considerados uma fonte de carbono de baixo custo (CHEN et al., 2021; LEONG et al., 2021). Estima-se que o bioetanol de segunda geração pode reduzir as emissões de gases de efeito estufa em até 86% quando comparado à gasolina (HOSSAIN et al., 2021) e que cerca de 442 bilhões de litros de bioetanol poderiam ser convertidos anualmente em escala mundial pelo uso de resíduos lignocelulósicos (CHEN et al., 2021). Assim, o emprego de resíduos de banana e de mamão para a produção de bioetanol de segunda geração é uma alternativa que contribui para a bioeconomia circular (WOBIWO et al., 2019; PALACIOS et al., 2017; UTAMA et al., 2019; BONATTO et al., 2021; ABDULLA et al., 2018).

Visando a diversificação de matérias-primas, o triticale é um cereal usado na tecnologia de primeira geração que apresenta vantagens comparado a outros cereais, pois é uma cultura não convencional que não compete com a produção de alimentos, visto que seu uso é majoritariamente para a alimentação animal (STRAK-GRACZYK et al., 2019; PEJIN et al., 2015; MERGOUM et al., 2009). Suas características de alto rendimento de grãos em condições de cultivo desfavoráveis e a resistência às condições climáticas adversas do solo, pragas e doenças, caracterizam o cereal como uma fonte eficiente para produção de bioetanol (KUČEROVÁ, 2007; MOJOVIĆ et al., 2012; PEJIN et al., 2012). O alto teor de amido e baixos teores de proteínas solúveis do cereal é desejado para a produção do biocombustível (STRAK-GRACZYK et al., 2019). Além disso, o cereal permite economias no processo. A temperatura de preparo do triticale é considerada mais baixa quando comparada à do trigo e milho, por exemplo, reduzindo em torno de 44% no consumo energético (MOJOVIĆ et al., 2012). O cereal se destaca por dispensar o uso de enzimas sacarificantes quando submetido ao processo de maltagem do grão, devido sua

elevada atividade auto-amilolítica, permitindo a hidrólise apenas com uso das enzimas presentes no grão (KUČEROVÁ, 2007, MOJOVIĆ et al., 2012, PEJIN et al., 2012, PEJIN et al., 2015).

A conversão do bioetanol pode ocorrer por diferentes modos de operação, como pelos métodos de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) ou separada (SHF), sacarificação simultânea e co-fermentação (SSCF) e bioprocessamento consolidado (CBP). A SSF é um método que se destaca devido seu potencial operacional e econômico, conferindo maiores resultados de concentração de bioetanol, rendimento e produtividade em menor tempo de conversão (DEVOS; COLLA, 2022; ASTOLFI et al., 2020; ARUWAJOYE et al., 2020; MAHRAN et al., 2020; SAGGI; DEY, 2019).

Objetivou-se o uso de resíduos de banana e mamão em diferentes proporções com triticale, para produção de bioetanol através dos métodos de sacarificação e fermentação simultânea e sacarificação e fermentação separada.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Matérias-primas e caracterização

Foram utilizados grãos de triticale (cedidos pela Embrapa Trigo, localizada na cidade de Passo Fundo/RS) e resíduos de banana e mamão em condições de descarte (elevado grau de maturação, cortes e partes amassadas), cedidos pelo Centro de Distribuição de Frutas Tibola, localizado na cidade de Passo Fundo/RS.

Os grãos de triticale foram higienizados para retirada de impurezas e moídos em moinho refrigerado para redução das partículas (PEJIN et al., 2015; WANG et al., 2008). De forma individual, os resíduos de banana e mamão (inteiros e com casca) foram secos em estufa com circulação de ar sob temperatura de 50 °C até peso constante. Após secagem, os resíduos foram individualmente triturados em liquidificador industrial (WOBIWO et al., 2019; ABDULLA et al., 2018).

As amostras foram caracterizadas físico-quimicamente através das determinações de umidade em estufa a 105 °C, proteínas por Kjeldahl (fator de conversão 6,21) e lipídios por Soxhlet (AOAC, 2005). A fibra bruta foi determinada pela medida do resíduo após digestão *in vitro* com ácido e álcali (IAL, 1985) e as cinzas através da carbonização das amostras em bico de Bunsen seguidas de mufla (550 °C) até a obtenção de cinza de coloração branca. As amostras foram pesadas até o peso constante (IAL, 1985). O teor de carboidratos foi determinado pelo cálculo de diferença conforme Equação 1.

$$CHO = 100 - (\% U + \% P + \% L + \% F + \% C) \quad \text{Eq. (1)}$$

Sendo:

CHO: carboidratos;

U: umidade;

P: proteínas;

L: lipídios;

F: fibras;

C: cinzas.

4.2.2. Enzimas

Foram utilizadas as enzimas comerciais Pectinex® Ultra Pulp (PP), Pectinex® Ultra SP-L (P SP), Amylase™ AG XXL (A) e Celluclast® 1,5 L (C), fornecidas pela Novozymes. As enzimas apresentam as seguintes características: Pectinex® Ultra Pulp obtida de *Aspergillus aculeatus*, com atividade declarada de 8600 PECTU/g; Pectinex® Ultra SP-L também obtida de *A. aculeatus*, com atividade declarada de 3300 PGNU/g; Amylase™ AG XXL obtida de uma cepa selecionada de *A. niger*, com atividade declarada de 400 AGU/g, e Celluclast® 1,5 L com atividade declarada de 700 EGU/g.

4.2.3. Preparo do meio para sacarificação

Para o preparo dos meios, os grãos de triticale foram triturados em liquidificador industrial (potência 1, durante 1 min) para redução das partículas e, em seguida, foram cozidos na proporção de 10% em água destilada (v/v), durante 30 min a 100 °C. Por fim, a mistura foi filtrada para obtenção do meio triticale. Os resíduos de banana e mamão foram cortados e triturados individualmente em liquidificador industrial com água destilada, na proporção 1:1 (v/v), para obtenção dos meios banana e mamão. O pH dos meios foi ajustado entre 4,0 e 4,5 pela adição de ácido cítrico (0,5 M).

4.2.4. Estudo da hidrólise dos meios

A fim de definir quais enzimas deveriam ser utilizadas para a sacarificação de cada matéria prima, os meios triticale, banana e mamão, preparados conforme item 4.2.3, foram ajustados a pH 4,0 e 4,5 com ácido cítrico 0,5 M, gelatinizados (10 min, 100 °C) e

utilizados para o teste de hidrólise (REMPEL et al., 2019). A sacarificação foi realizada com a adição das enzimas nos meios conforme indicação do fabricante: Amylase™ e Celluclast® na proporção 1:100 (v/v), Pectinex® Ultra Pulp e Pectinex® Ultra SP-L na proporção 1,5:100 (v/v). A hidrólise foi realizada em reatores (volume de trabalho de 50 mL) em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE-421) a 50 °C, 1.12 G, por 1 h. As amostras foram coletadas nos tempos inicial e final para determinação da concentração dos açúcares redutores liberados. Os ensaios foram realizados em duplicata. Foram realizados 12 ensaios, variando a matéria-prima e enzima adicionada individualmente:

- (1) Banana+Amylase™;
- (2) Banana+Celluclast®;
- (3) Banana+Pectinex® Ultra SP-L;
- (4) Banana+Pectinex® Ultra Pulp.

O mesmo ocorreu para os meios mamão e triticales. A eficiência de hidrólise (EH) foi calculada através da Equação 2.

$$EH(\%) = \frac{(AR_{T1})}{\frac{(m_{biomassa} * CHO_h * 1.1)}{V}} * 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde:

AR_{T1} (mg/mL) = açúcar redutor obtido após hidrólise;

m_{biomass} (g) = quantidade de biomassa usada na sacarificação;

CHO_h = CHO: carboidrato hidrolisável da biomassa;

1,1 = fator de conversão de carboidrato em glicose;

V = volume de trabalho.

4.2.5. Obtenção de bioetanol

4.2.5.1. Levedura

Foi empregada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 pertencente à coleção do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da UPF. A levedura foi mantida em tubos de ensaio a 4 °C em meio sólido inclinado (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar). A ativação das células da levedura foi realizada através de uma etapa de pré-inóculo, conforme proposto por Rempel et al. (2019), em

meio de cultivo contendo 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose, submetido à esterilização (121 °C por 20 min) e arrefecimento. O pré-inóculo ocorreu em erlenmeyer (volume útil de 100 mL) em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE-421) (1.12 G) durante 48 h a 30 °C. Em seguida, foi preparado o inóculo, pela adição de 10% (v/v) do pré-inóculo ao meio de cultivo (2% de glicose, 1% de extrato de levedura e 2% de peptona). O inóculo foi mantido na incubadora a 30 °C, 1.12 G, por 10 h (tempo necessário para que a levedura se encontre em fase exponencial de crescimento).

4.2.5.2. Sacarificação

Os experimentos foram realizados de acordo com as seguintes proporções de substrato. Após o preparo inicial dos meios, os mesmos foram gelatinizados em banho termostático durante 10 min a 100 °C (REMPEL et al., 2019):

- (a) Meio 100% banana (B-SHF);
- (b) Meio 50% tritcale + 50% banana (TB-SHF);
- (c) Meio 50% tritcale + 25% banana + 25% mamão (TBM-SHF).

Após a gelatinização, as enzimas foram adicionadas de forma simultânea na concentração de 0,1% (v/v). O processo foi realizado de acordo com Rempel et al. (2019) em reator de 1 L com volume útil de 400 mL. Os reatores foram dispostos em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE-421) a 50 °C e 1.12 G. A sacarificação foi conduzida durante 4 h, sendo coletadas amostras a cada 1 h para determinação da concentração de açúcares redutores. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.2.5.3. Fermentação

Após a sacarificação, o pH dos meios hidrolisados foi ajustado entre 4,5 e 5,0 pela adição de KOH (0,5 M), seguindo para a esterilização (autoclave a 121 °C por 20 min) e inoculação de 10% (v/v) do inóculo da levedura *S. cerevisiae* CAT-1, preparada de acordo com o item 4.2.5.1.

A fermentação foi conduzida de acordo com Rempel et al. (2019) em estufa sob temperatura de 30 °C e ausência de agitação. O processo ocorreu durante 24 h, com coleta de amostras a cada 6 h, para determinação de açúcares redutores e etanol.

4.2.5.4. *Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF)*

Os meios previamente gelatinizados foram utilizados para os experimentos de SSF. Os experimentos foram realizados em duplicata de acordo com as seguintes proporções de substrato:

- (a) Meio 100% banana (B-SSF);
- (b) Meio 50% triticales + 50% banana (TB-SSF);
- (c) Meio 50% triticales + 25% banana + 25% mamão (TBM-SSF).

O pH dos meios foi ajustado entre 4,5 e 5,0 pela adição de ácido cítrico (0,5 M), seguido de esterilização (autoclave a 121 °C por 20 min). A adição das enzimas (na concentração de 0,1% (v/v)) e da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 (preparada de acordo com o item 4.2.5.1 em uma razão de inoculação de 10% (v/v)) foi realizada simultaneamente (ASTOLFI et al., 2020). O processo foi realizado em reator de 1 L com volume útil de 800 mL sob condições anaeróbicas. A SSF foi conduzida em incubadora refrigerada com agitação (Tecnal, modelo TE-421) a 30 °C, 1.12 G, durante 24 h, com coleta de amostras a cada 6 h. O processo ocorreu durante 24 h, com coleta de amostras a cada 6 h, para determinação de açúcares redutores e etanol.

4.2.6. **Determinações analíticas**

4.2.6.1. *Concentração de açúcares redutores (AR)*

A concentração de AR foi determinada pelo método 3,5 DNS, pelo emprego de uma curva padrão de glicose (MILLER, 1959). As amostras coletadas das fermentações seguiram para a precipitação das proteínas, através de solução de Carrez I e II, seguida de centrifugação a 1.320 g por 10 min. O sobrenadante foi filtrado e utilizado para determinar a concentração de AR pelo método 3,5-DNS. As determinações foram realizadas em duplicatas.

4.2.6.2. *Concentração de bioetanol*

A concentração de bioetanol foi obtida pelo método espectrofotométrico proposto por Salik e Povh (1993), onde o mosto fermentado foi centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5810) a 1320 g por 10 min e destilado em microdestilador de bancada (Tecnal, modelo TE-012). Foi avaliada a reação com dicromato de potássio, sob temperatura de 60 °C durante 30 min. O processo foi realizado em duplicata.

A eficiência (η) da formação do bioetanol foi verificada através da Equação 3 (HANG; LEE; WOODAMS, 1981).

$$\eta(\%) = \frac{\Delta E}{0,511 \times (s_0 - s)} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde:

ΔE = variação da concentração de bioetanol (g/L);

S_0 = concentração de açúcares redutores totais no início da fermentação (g/L);

S = concentração de açúcares redutores totais no final da fermentação (g/L);

0,511 = coeficiente estequiométrico da reação.

A determinação da produtividade de bioetanol ($P_{\text{bioetanol}}$) foi calculada pela Equação 4 (SCHMIDELL et al., 2011).

$$P_{\text{bioetanol}}(\text{g/L.h}) = \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde:

ΔE = variação da concentração de bioetanol (g/L);

Δt = variação do tempo de fermentação (h).

4.2.7. Análise estatística

As diferenças entre as médias dos ensaios foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança, seguidos pelo teste de Tukey.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1. Caracterização das matérias-primas

A Tabela 1 apresenta a composição química dos resíduos de banana e mamão e do triticale, em base seca.

Tabela 1 - Composição química das matérias-primas.

% base seca					
Matéria-prima	Proteínas	Lipídios	Cinzas	Fibra bruta	Carboidrato
Triticale	1,26 ± 0,01	2,15 ± 0,03	1,56 ± 1,19	3,21 ± 0,43	79,71
Banana	0,58 ± 0,01	1,87 ± 0,72	8,08 ± 0,43	5,22 ± 0,45	72,17
Mamão	0,64 ± 0,04	5,78 ± 2,59	4,43 ± 0,27	10,03 ± 0,47	66,66

*Valores médios obtidos por determinações em duplicata ± desvio padrão.

O elevado teor de carboidratos das matérias-primas é desejado para a produção efetiva de bioetanol (ARREDONDO et al., 2010; WOBIWO et al., 2019; BONATTO et al., 2021). A composição química dos substratos sugere que, além de açúcares, a banana e o mamão também são ricos em cinzas e fibra bruta. O teor de cinzas está associado à presença do mineral e foi relatado em estudos anteriores na faixa de 6,4% a 13,1% para diferentes variedades e estágios de maturação de bananas (GÓMEZ et al., 2020; WOBIWO et al., 2019; EMAGA et al., 2007; GUERRERO et al., 2018). As cinzas quantificadas no estudo estão dentro da faixa mencionada. Assim como a banana, a composição química do mamão sofre influência com o estágio de maturação da fruta. Teores de proteínas (10,56% e 6,89%), fibra bruta (14,52% e 9,67%), cinzas (5,25% e 3,15%) e lipídios (0,23% e 0,33%) do mamão verde e maduro (respectivamente) foram avaliados por Pathak et al. (2019), que avaliaram uma redução significativa nos teores de proteína, lipídios e carboidratos com a maturação do fruto. Os resultados para cinzas (4,43%) e fibra bruta (10,03%) obtidos em nosso estudo (mamão maduro) estão nessa faixa. O teor de fibras dos resíduos também é um indicativo do uso como fonte de energia (EMAGA et al., 2007).

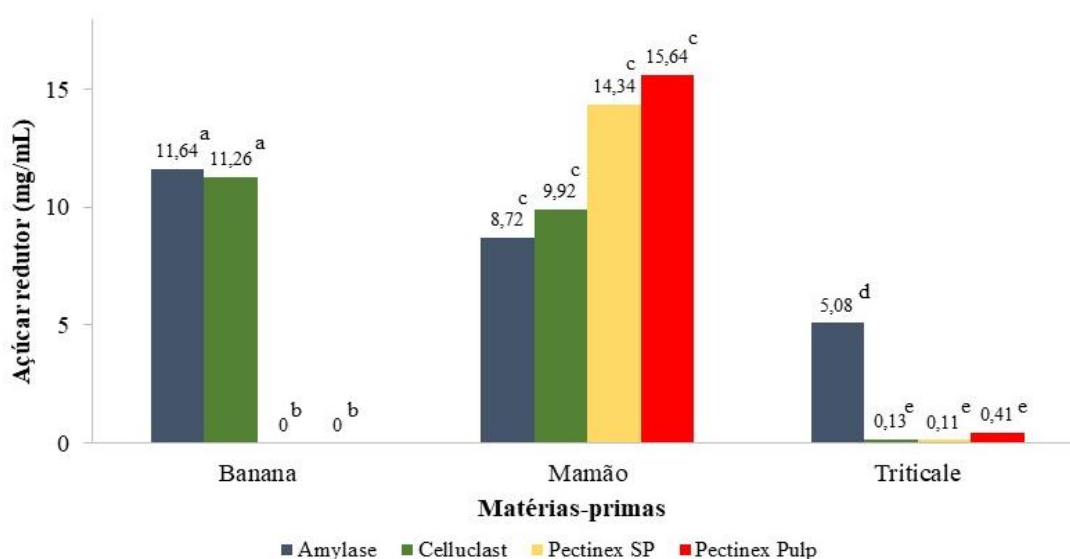
A composição do triticale neste estudo está de acordo com pesquisas anteriores (PEJIN et al., 2009; FRÁS et al., 2016; TAMAKI; MAZZA, 2011; DENNETT; TRETROVAN, 2013). O uso do triticale como fonte amilácea no estudo tornou-se relevante para a produção de bioetanol pelos processos SSF e SHF. A redução de

partículas do cereal é indicada para conferir uma maior área de superfície disponível, permitindo que as células de levedura sejam capazes de converter mais substrato em bioetanol, com maior facilidade (ABDULLA et al., 2018). Elevadas produtividades de bioetanol foram alcançadas com o uso de triticales (STRAK-GRACZYK et al., 2020; PEJIN et al., 2015; MOJOVIĆ et al., 2012; BALCEREK et al., 2012), demonstrando ser uma cultura eficiente na produção do biocombustível.

4.3.2. Hidrólise enzimática

Foi analisada a hidrólise das matérias-primas isoladas utilizando as enzimas Pectinex® Ultra Pulp (PP), Pectinex® Ultra SP-L (P SP), Amylase™ AG XXL (A) e Celluclast® 1,5 L ©, de forma individual em cada meio. As condições de hidrólise, bem como quantidade de enzimas adicionadas estão descritas no item 4.2.4. A Figura 1 mostra a produção de açúcares redutores (AR) em cada meio analisado.

Figura 1 - Concentração de açúcar redutor obtido por diferentes enzimas sacarificantes (Amylase, Celluclast, Pectinex SP e Pectinex Pulp) na hidrólise dos meios de banana, mamão e triticales de forma individual.



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

As enzimas sacarificantes são selecionadas para processos fermentativos de acordo com a especificidade da matéria-prima e potencial hidrolítico, definido pelo rendimento de glicose. Enzimas como amilase, pectinase e celulase são empregadas na sacarificação para produção de bioetanol para quebrar os compostos de açúcar

fermentescível de matérias-primas em monômeros de glicose (CRIPWELL et al., 2015; LI et al., 2018; ARUWAJOYE et al., 2020).

A eficiência enzimática depende da acessibilidade e disponibilidade das fontes de carbono. O triticale pode ser usado na produção de bioetanol de primeira geração, sendo acessível às enzimas que degradam amido. Na hidrólise enzimática, apenas a enzima Amylase apresentou conversão de AR significativa ($p > 0,05$), fazendo-se necessário o emprego desta enzima na sacarificação do cereal. Para o resíduo de banana, as enzimas Amylase e Celluclast conferiram atividade enzimática, transformando açúcares complexos em açúcares fermentáveis, enquanto as enzimas pectinases não tiveram atividade. Portanto, para hidrolisar o resíduo de banana as enzimas Pectinex Ultra Pulp e Pectinex Ultra SP são dispensáveis. Isso pode ser explicado pela composição da matéria-prima. Comportamento semelhante foi observado por Wobiwo et al. (2019) na hidrólise de resíduos de banana, indicando que enzimas amilase e celulase são necessárias para a conversão dessa matéria-prima. Os baixos valores de AR para as enzimas Pectinex Ultra SP e Pectinex Ultra Pulp sugerem acesso insuficiente das enzimas aos polissacarídeos alvo, ou mesmo inibição enzimática pelo acúmulo de glicose, resultado da hidrólise realizada pelas enzimas Amylase e Celluclast. Em contrapartida, para o resíduo de mamão, todas as enzimas foram capazes de sacarificar os açúcares presentes no meio. Nesse sentido, foram selecionadas as enzimas apropriadas para cada substrato de acordo com seu potencial hidrolítico (definido pela concentração de AR):

- (a) B-SHF e B-SSF: enzimas Amylase e Celluclast;
- (b) TB-SHF e TB-SSF: enzimas Amylase e Celluclast;
- (c) TBM-SHF e TBM-SSF: enzimas Amylase, Celluclast, Pectinex Ultra Pulp e Pectinex Ultra SP.

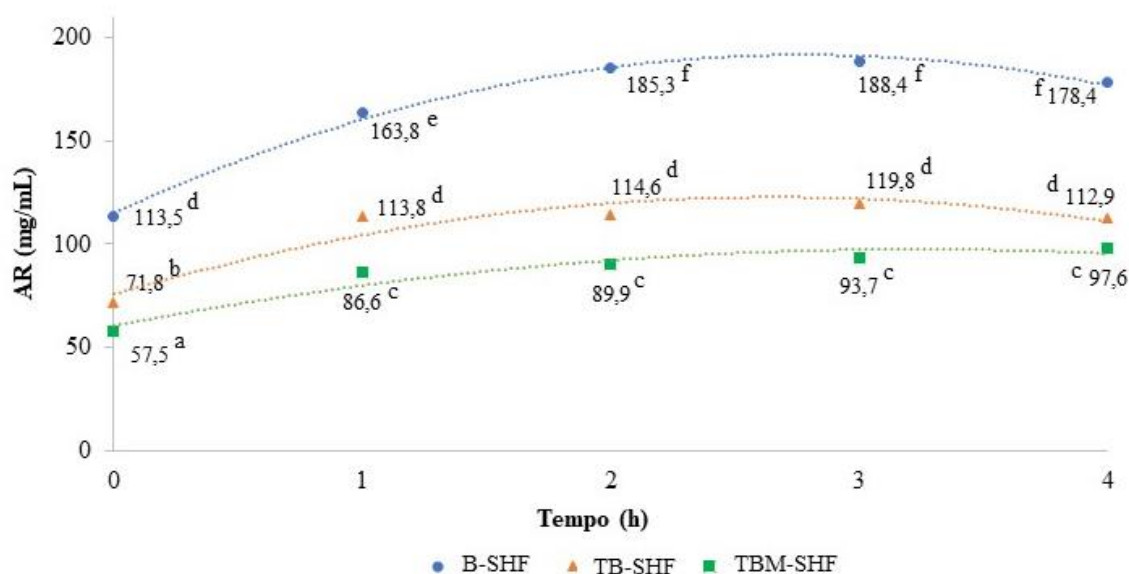
4.3.3. Produção de bioetanol

4.3.3.1. Sacarificação

A cinética de conversão de glicose em açúcares fermentescíveis pelas enzimas sacarificantes durante 4 h de hidrólise é apresentada na Figura 2. Para B-SHF, a maior concentração de AR foi obtida em 2 h de sacarificação (185,30 mg/mL), conferindo uma eficiência de hidrólise (EH) de 18,87%. O experimento TB-SHF apresentou EH de 17,31% em 1 h de hidrólise, mantendo-se constante até o final da sacarificação (4 h). A mesma tendência foi seguida para TBM-SHF, com uma EH de 12,41% constante a partir da primeira hora de sacarificação até o final do processo. Esse resultado demonstra que

para os experimentos contendo a mistura das matérias-primas, a maior conversão de amido é obtida em 1 h de hidrólise, enquanto para B-SHF, em 2 h.

Figura 2 - Concentração de açúcares redutores (AR) ao longo da sacarificação com experimentos contendo banana (B) em diferentes proporções com triticales (T) e mamão (M) em sua composição.



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). AR: Açúcar redutor. SHF: Sacarificação e fermentação separada. B-SHF: experimento contendo resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação separada. TB-SHF: experimento contendo triticales e resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação separada. TBM-SHF: experimento contendo triticales, resíduo de banana e resíduo de mamão na sua composição por sacarificação e fermentação separada.

A hidrólise antecedendo a fermentação permite que as enzimas atuem por um tempo específico em sua temperatura ideal (nesse caso, durante 4 h e 50 °C), facilitando a liberação de glicose no meio. No entanto, devido a elevada concentração de AR disponível nos meios, a glicose hidrolisada pode ter ocasionado uma inibição do produto da celulase (pelos resíduos lignocelulósicos), impedindo uma hidrólise mais eficiente e conferindo uma baixa eficiência (HE et al., 2016; PODGORBUNSKIKH et al., 2019). Além disso, os resíduos lignocelulósicos não passaram por uma etapa de pré-tratamento, o que pode ter influenciado de forma negativa na conversão (PALACIOS et al., 2017; GUERRERO et al., 2018).

Os baixos rendimentos de hidrólise também podem indicar que as enzimas empregadas apresentam baixa afinidade com os substratos, ou ainda, que a quantidade adicionada não foi suficiente para hidrolisar os meios no curto período de tempo

(ARUWAJOYE et al., 2020). Sabe-se que na hidrólise de resíduos lignocelulósicos pode ocorrer o efeito da inibição por retroalimentação, relacionada à carga enzimática, visto que a hidrólise ocorre até que todos os sítios ativos das enzimas sejam ocupados (ARUWAJOYE et al., 2020; LI et al., 2014; PODGORBUNSKIKH et al., 2019). Portanto, a baixa EH pode ser relacionada à saturação e inativação enzimática, reduzindo a eficiência hidrolítica, pois o produto de glicose do processo de sacarificação é altamente dependente do desempenho das enzimas sacarificantes.

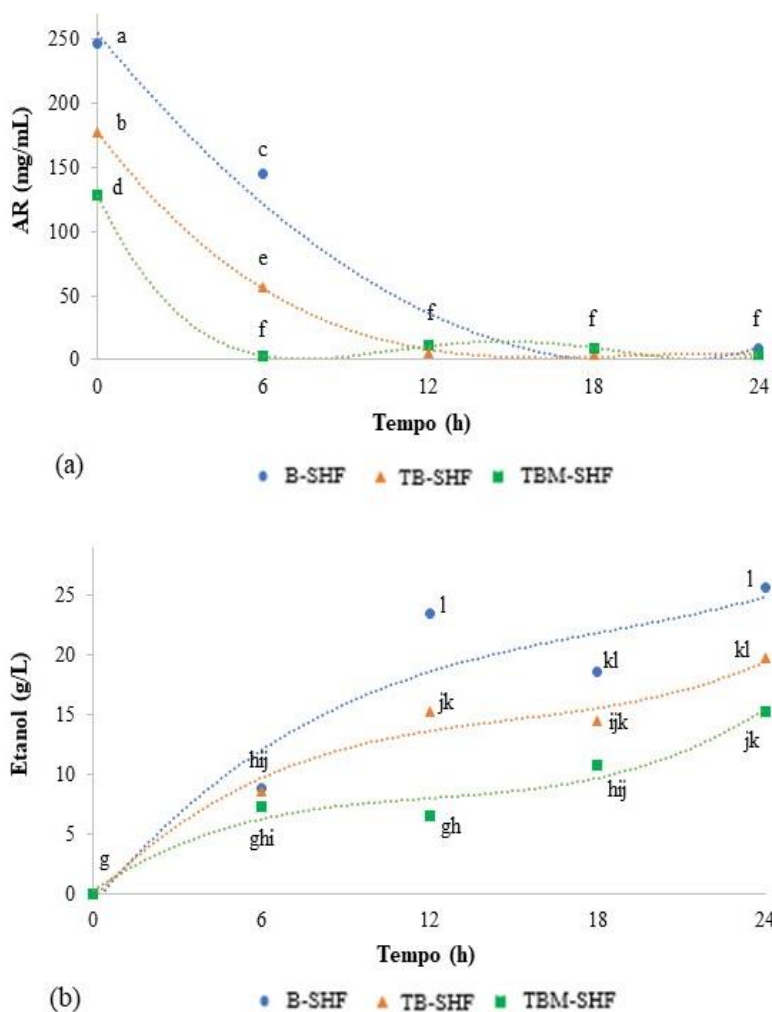
Para aumentar a eficiência é necessário o uso de coquetéis enzimáticos que melhorem a hidrólise enzimática, além do estudo de pré-tratamentos para os materiais lignocelulósicos. Apesar da baixa EH, os níveis de AR para B-SHF demonstram que o resíduo de banana é uma alternativa promissora para a produção energética, pois quanto maior a quantidade de AR disponível para uso da levedura, maior será seu crescimento e consumo de glicose e, conseqüentemente, conversão de metabólitos como bioetanol e CO₂ no caso de fermentação (ABDULLA et al., 2018).

4.3.3.2. Comparação entre os modos de operação

As Figuras 3 e 4 mostram o consumo de açúcares fermentescíveis pela levedura (Figura 3a e Figura 4a) ocorrendo de forma simultânea com a produção de bioetanol (Figura 3b e Figura 4b) para todos os experimentos ao longo da fermentação separada e simultânea. Esse consumo é observado nas horas iniciais da fermentação, seguido de estabilização após 12 h, produzindo apenas bioetanol nos tempos seguintes. Ainda, percebe-se que não há presença de bioetanol no início da fermentação (0 h), confirmando que não houve produção durante o preparo do inóculo da levedura. Esse comportamento também foi observado por Rempel et al. (2019) e Astolfi et al. (2020), usando a mesma cepa de levedura (*S. cerevisiae* CAT-1) para produção de bioetanol. Eles relatam o consumo de AR nas horas iniciais com estabilização em 16 h e 12 h de fermentação, respectivamente. O comportamento é esperado pois a levedura é adicionada no meio em sua fase exponencial de crescimento e temperatura ótima de atuação (30 °C), permitindo que o AR disponível seja consumido, favorecendo o crescimento e conseqüentemente produção de bioetanol, sem que ocorra inibição do produto pela elevada concentração de glicose disponível (ABDULLA et al., 2018; ARUWAJOYE et al., 2020). Nesse sentido, a máxima concentração de bioetanol ocorre durante a fase exponencial de crescimento da *S. cerevisiae* e pode ser associada à rápida conversão de glicose. Além disso, a produção

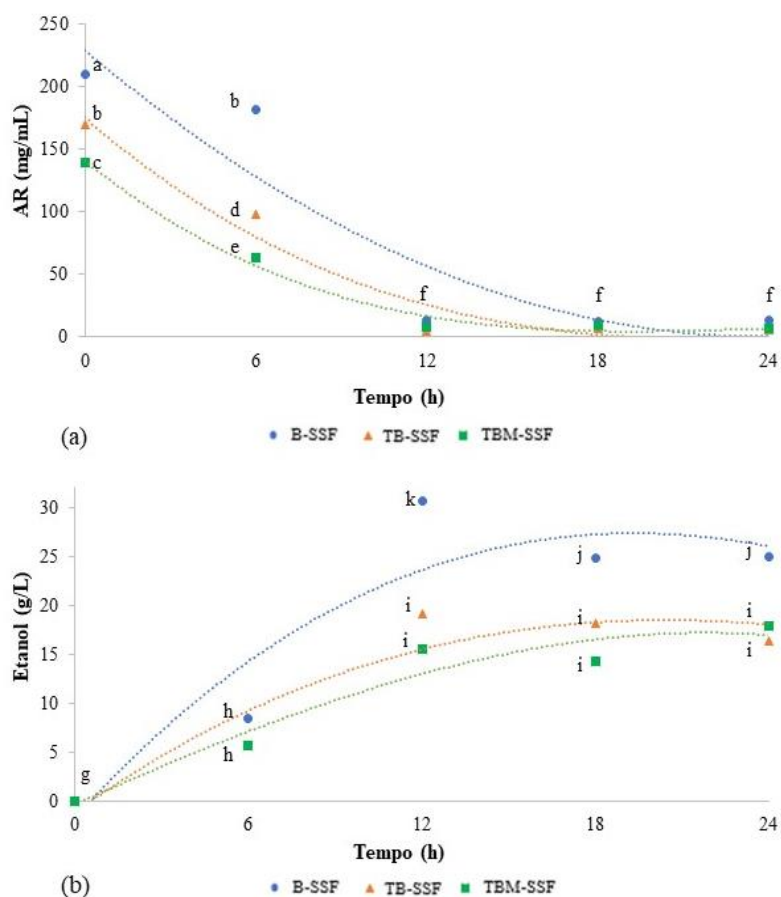
de bioetanol é menor em 6 h de fermentação (Figura 3b e Figura 4b) porque a glicose disponível no meio não é totalmente utilizada pela *S. cerevisiae*.

Figura 3 - Concentração de açúcares redutores (a) e etanol (b) ao longo da fermentação separada (SHF) com experimentos contendo banana (B) em diferentes proporções com triticales (T) e mamão (M) em sua composição.



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). AR: açúcar redutor. SHF: Sacarificação e fermentação separada. B-SHF: experimento contendo resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação separada. TB-SHF: experimento contendo triticales e resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação separada. TBM-SHF: experimento contendo triticales, resíduo de banana e resíduo de mamão na sua composição por sacarificação e fermentação separada.

Figura 4 - Concentração de açúcares redutores (a) e etanol (b) ao longo da SSF com experimentos contendo banana (B) em diferentes proporções com triticales (T) e mamão (M) em sua composição.



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). AR: açúcar redutor. SSF: Sacarificação e fermentação simultânea. B-SSF: experimento contendo resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação simultânea. TB-SSF: experimento contendo triticales e resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação simultânea. TBM-SSF: experimento contendo triticales, resíduo de banana e resíduo de mamão na sua composição por sacarificação e fermentação simultânea.

Fatores intrínsecos à conversão, como por exemplo temperatura do processo, agitação, pH, entre outros, podem afetar a produtividade de bioetanol (DEVOS; COLLA, 2022). O processo simultâneo resultou em maiores concentrações de bioetanol ($p > 0,05$) na faixa de 15,52 g/L a 30,70 g/L em comparação ao processo separado (6,46 g/L a 25,68 g/L), para todos os experimentos em 12 h de conversão. A menor conversão pode estar relacionada à ausência de agitação da SHF, que pode ter contribuído para a decantação das células de levedura no fundo do reator, reduzindo a disponibilidade de substrato para a *S. cerevisiae*. A agitação constante da SSF permite um crescimento e desempenho eficiente da levedura, melhorando a disponibilidade de substrato e consequentemente de

AR e outros nutrientes, além de conferir uma melhor homogeneidade do hidrolisado e facilitar a remoção de gases produzidos pelo catabolismo celular (ABDULLA et al., 2018; BONATTO et al., 2021).

Esses resultados demonstram que nas condições testadas, o conteúdo máximo de produto é alcançado por SSF, indicando que a fermentação em apenas um biorreator permite uma produção razoável de bioetanol. Embora a concentração de bioetanol produzida não tenha sido muito superior ao obtido por SHF, a SSF permite reduzir custos de investimento, tempo de processo e energia. Além disso, com ajustes de processo, como por exemplo aplicar pré-tratamento aos resíduos lignocelulósicos, a produção de bioetanol por SSF nas condições testadas pode ser superior ao verificado.

Para todos os experimentos foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na concentração de bioetanol durante o processo de SSF. Os experimentos TB-SSF e TBM-SSF atingiram concentrações máximas de bioetanol de 19,17 g/L e 15,52 g/L, respectivamente, em 12 h. A maior concentração de bioetanol por SSF foi verificada para B-SSF (30,70 g/L), conferindo 2,56 g/L.h de produtividade de bioetanol. Esses resultados podem estar relacionados aos açúcares disponíveis, uma vez que o experimento contendo resíduo de banana em sua composição continha a maior concentração de AR inicial (210,07 mg/mL), beneficiando a formação do produto.

No entanto, a concentração de bioetanol produzida diante da alta concentração de AR consumido levanta a hipótese da formação de outros produtos, não identificados usando as análises realizadas. Estudos anteriores mostram ação eficiente da levedura *S. cerevisiae* CAT-1 na conversão de glicose em produção de bioetanol (REMPEL et al., 2019; ASTOLFI et al., 2020) o que eleva a hipótese de que o AR disponível em nosso estudo não seja utilizado pela levedura. Açúcares como xilana e glucanos podem estar presentes na matriz lignocelulósica e não são convertidos em etanol pela levedura. Assim, sugere-se a necessidade de analisar os açúcares disponíveis nos substratos, a fim de aplicar cepas que utilizam eficientemente os açúcares liberados, atingindo maiores concentrações de bioetanol.

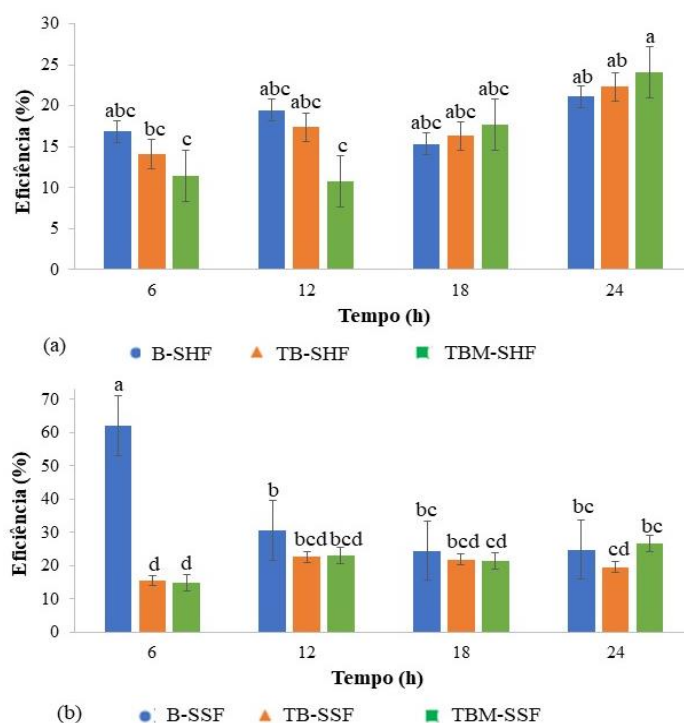
As concentrações de bioetanol do estudo foram comparadas com artigos anteriores (por SSF). Aruwajoye et al. (2020) registraram concentrações de bioetanol na faixa de 1,75 g/L a 24,65 g/L, observando as melhores conversões em 8 h de SSF de cascas de mandioca. Da mesma forma, He et al. (2016) estudaram a produção de bioetanol de resíduo de furfural durante 72 h de conversão e concluíram que a rápida produção pode ser causada por elevados teores de glicose hidrolisada no estágio inicial da fermentação.

Eles observaram concentrações de bioetanol entre 15,7 g/L e 19,3 g/L, próximas das verificadas para TB-SSF e TBM-SSF. A concentração de bioetanol de 26,3 g/L foi alcançada por Li et al. (2014) utilizando palha de milho como substrato, em 18 h de processo, enquanto Carrillo-Nieves et al. (2017) verificaram concentrações de bioetanol superiores ao estudo, na faixa de 25,8 g/L a 34,7 g/L pela produção a partir de resíduos de manga variando a carga de substrato e temperatura do processo após 48 h de processo.

As discrepâncias entre o presente estudo e relatórios anteriores por SSF, pode ser relacionada aos diferentes fatores de hidrólise e fermentação, como por exemplo o tipo de substrato e preparo do meio, pH, temperatura, enzimas, entre outros.

Um total de 23,44 g/L de bioetanol foi produzido por B-SHF, conferindo 14,24% de eficiência em 18 h de processo. Para TB-SHF e TBM-SHF, as eficiências de produção de bioetanol obtidas em 6 h de fermentação (16,85% e 14,09%, respectivamente) permaneceram constantes durante o processo, não alterando significativamente ($p > 0,05$) nos tempos seguintes. A maior eficiência do processo de SHF foi verificada para TBM-SHF em 24 h de fermentação (24,09%). A Figura 5 apresenta as eficiências de produção de bioetanol para os processos de SHF (Figura 5a) e SSF (Figura 5b).

Figura 5 - Eficiência da produção de bioetanol na SHF (a) e SSF (b) com experimentos contendo banana (B) em diferentes proporções com triticales (T) e mamão (M) em sua composição.



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). SHF: Sacarificação e fermentação separada. SSF: Sacarificação e fermentação simultânea. B-SHF: experimento contendo resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação separada. TB-SHF: experimento contendo triticale e resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação separada. TBM-SHF: experimento contendo triticale, resíduo de banana e resíduo de mamão na sua composição por sacarificação e fermentação separada. B-SSF: experimento contendo resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação simultânea. TB-SSF: experimento contendo triticale e resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação simultânea. TBM-SSF: experimento contendo triticale, resíduo de banana e resíduo de mamão na sua composição por sacarificação e fermentação simultânea.

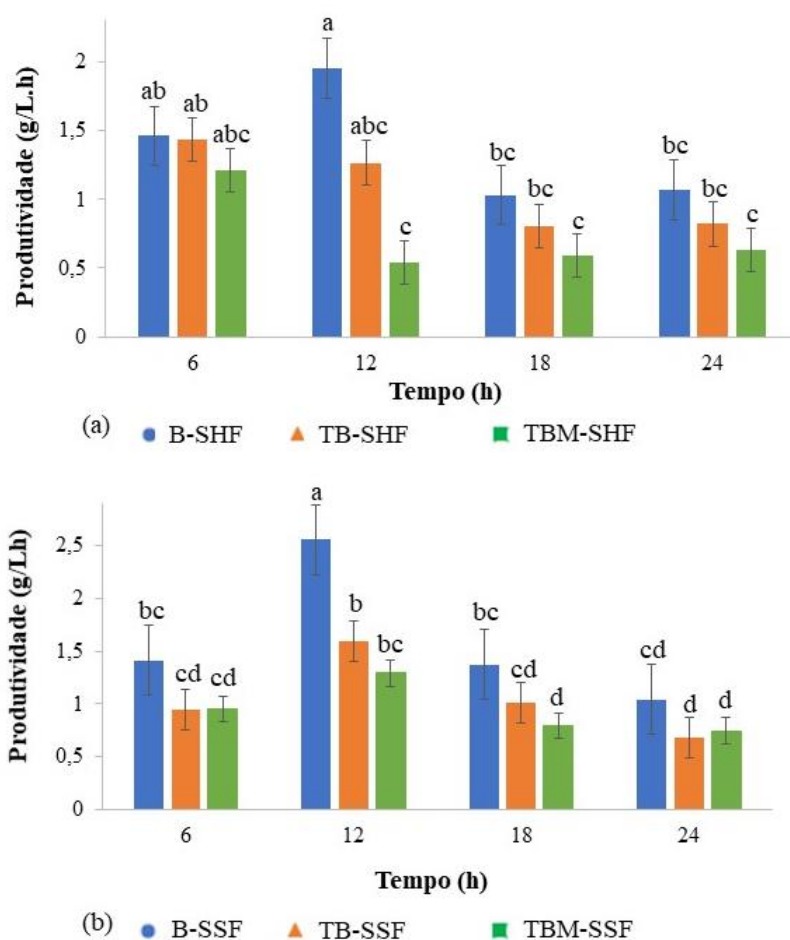
As eficiências de produção de bioetanol em 18 h de processo para os experimentos B-SHF e B-SSF foram de 15,33% e 24,55%, respectivamente. A diferença significativa ($p>0,05$) entre os resultados no momento em que o açúcar disponível para conversão é totalmente consumido pela levedura demonstra que a SSF permite otimizar a conversão do produto, permitindo uma produção mais eficiente em relação ao método separado em apenas um biorreator. Nota-se que em 12 h de SSF, para todos os experimentos é observadas eficiências de produção de bioetanol acima de 20% (B-SSF: 30,7%, TB-SSF: 22,7% e TBM-SSF: 23,1%), demonstrando que esse tempo de processo é suficiente para uma conversão eficaz, pois após o pico de produção, os níveis de bioetanol reduzem e/ou se mantêm estáveis ($p>0,05$) (Figura 5), indicando que se iniciou a fase estacionária. O comportamento também é observado para as concentrações de AR (Figura 4a), as quais não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) a partir de 12 h, pois para todos os experimentos a concentração de AR permaneceu constante até o final do processo.

A SSF se destaca por ser um processo que permite a rápida conversão da glicose em bioetanol, pois a medida em que os substratos são hidrolisados pelas enzimas ocorre liberação de glicose no meio, que será consumida pelas células de levedura como fonte de carbono e energia para seus processos metabólicos, resultando em conversão de açúcares em bioetanol em um menor tempo de processo, descartando a possibilidade de inibição do substrato pelas enzimas atuantes (ARUWAJOYE et al., 2020). Estudos anteriores verificaram esse comportamento em 72 h de SSF (GUERRERO et al., 2018), 48 h (CARRILLO-NIEVES et al., 2017), 24 h (ASTOLFI et al., 2020) e 18 h (LI et al., 2014), demonstrando que nosso estudo foi eficaz na conversão nas condições avaliadas, reduzindo o tempo de processo, que pode ser justificado pelo teor de açúcares fermentescíveis dos substratos no início da fermentação, potencializando a conversão.

A produtividade de bioetanol na SHF e SSF é mostrada na Figura 6. As produtividades máximas para B-SSF, TB-SSF e TBM-SSF foram de 2,56 g/L.h, 1,60 g/L.h e 0,95 g/L.h respectivamente. Em contrapartida, B-SHF, TB-SHF e TBM-SHF tiveram produtividades de: 1,95 g/L.h, 1,44 g/L.h e 1,21 g/L.h, respectivamente. O

experimento TB-SSF teve um aumento de produtividade de 0,94 g/L.h para 1,60 g/L.h em 12 h de processo. Todavia, a mesma tendência não foi observada para TBM-SSF, pois o parâmetro não teve aumento significativo ($p>0,05$) ao longo da fermentação, com produtividade de 0,95 g/L.h em 6 h.

Figura 6 - Produtividade de bioetanol ao longo dos processos de SHF (a) e SSF (b) com experimentos contendo banana (B) em diferentes proporções com triticales (T) e mamão (M) em sua composição.



*Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$). SHF: Sacarificação e fermentação separada. SSF: Sacarificação e fermentação simultânea. B-SHF: experimento contendo resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação separada. TB-SHF: experimento contendo triticales e resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação separada. TBM-SHF: experimento contendo triticales, resíduo de banana e resíduo de mamão na sua composição por sacarificação e fermentação separada. B-SSF: experimento contendo resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação simultânea. TB-SSF: experimento contendo triticales e resíduo de banana na sua composição por sacarificação e fermentação simultânea. TBM-SSF: experimento contendo triticales, resíduo de banana e resíduo de mamão na sua composição por sacarificação e fermentação simultânea.

Valores semelhantes de produtividade foram encontrados por Aruwajoye et al. (2020) pela produção de bioetanol por cascas de mandioca (1,18 g/L.h), enquanto

Guerrero et al. (2018) na conversão de resíduos de banana obtiveram 0,64 g/L.h em 72 h de processo e Carrillo-Nieves et al. (2017) produtividades de 0,54 g/L.h a 0,72 g/L.h na produção de bioetanol por resíduos de manga. Bonatto et al. (2021) produziram bioetanol de resíduos de mamão e diferentes fontes hídricas: água do mar (AM) e água residuais da produção de camarão (ARC), com a mesma cepa de levedura do estudo (*S. cerevisiae* CAT-1). Concentrações máximas de bioetanol (24,53 g/L usando AM e 21,84 g/L usando ARC) foram resultantes de 12 h de fermentação, conferindo produtividades de 2,04 g/L.h (AM) e 1,82 g/L.h (ARC).

Em nosso estudo, as maiores produtividades foram verificadas em 12 h para os experimentos B-SSF (2,56 g/L.h) e B-SHF (1,95 g/L.h), confirmando que o resíduo de banana influencia positivamente na produtividade do bioetanol. Além disso, esses resultados reforçam que 12 h de processo é eficiente para a conversão nas condições avaliadas.

A comparação entre os modos de operação demonstrou que a SSF resultou em concentrações de bioetanol, produtividades e eficiências de produção significativamente superiores ($p > 0,05$) à SHF nas condições avaliadas. A diferença verificada para todos os experimentos pode ser atribuída à otimização do processo, pois sabe-se que na SSF a conversão ocorre em apenas um biorreator, reduzindo custos associados aos equipamentos e possíveis falhas operacionais, além de resultar em benefícios como a redução de tempo (economia de 12 h em relação ao método separado). No entanto, visando a produção de bioetanol em nível industrial, são necessários estudos de aumento de escala para uma conversão eficiente.

O estudo da combinação de diferentes matérias-primas na conversão de bioetanol permitiu disponibilizar uma variedade de nutrientes para os microrganismos presentes no processo. De acordo com os resultados obtidos, ambos os resíduos demonstraram ser fontes de substrato promissoras para a conversão de bioetanol, além de serem facilmente disponíveis e de baixo custo. No entanto, a adição dos substratos combinados nos experimentos conferiu uma diluição ao meio, o que compreende um gargalo do processo, pois a remoção de água da mistura envolve a necessidade de processos térmicos adicionais que aumentam os custos e a produção energética do processo. Nesse sentido, visando a biorrefinaria sustentável é necessário avaliar soluções que minimizam a produção de água da mistura e permitam maximizar a produção de bioetanol por resíduos de frutas e materiais alternativos, como o triticale. Assim, sugere-se que avaliar a conversão de bioetanol com os substratos de forma individual é uma abordagem

promissora que pode conferir resultados mais eficientes quando comparados aos verificados no estudo das matérias-primas em combinação. A hipótese baseia-se nos resultados observados nas condições do estudo, onde o experimento contendo resíduo de banana na composição promoveu concentrações de bioetanol superiores (para ambos os modos de operação) aos experimentos com resíduo de mamão e triticales integrados no meio.

4.4. CONCLUSÕES

Os resíduos de banana e mamão associados ao triticales foram convertidos em bioetanol. O potencial de resíduos de mamão na conversão de bioetanol foi avaliado anteriormente (ABDULLA et al., 2018; BONATTO et al., 2021; PATHAK, et al., 2019), demonstrando que além da biodisponibilidade e baixo custo para obtenção, a conversão eficiente pode ser garantida com condições otimizadas de produção. Resíduos de banana como substrato apresentaram resultados satisfatórios de produção (PALACIOS et al., 2017; GUERRERO et al., 2018), indicando que essa fonte contém os nutrientes necessários para um processo fermentativo eficaz.

No entanto, a adição de matérias-primas combinadas nos experimentos conferiu uma diluição ao meio, o que compreende um gargalo do processo, pois a remoção de água da mistura envolve a necessidade de processos térmicos adicionais que aumentam os custos e a produção energética do processo. Nesse sentido, visando a biorrefinaria sustentável é necessário avaliar soluções que minimizam a produção de água da mistura e permitam maximizar a produção de bioetanol por resíduos de frutas e materiais alternativos, como o triticales.

Os resíduos de frutas associados ao material amiláceo (triticales) dispensaram a necessidade de suplementação adicional e consequentemente reduziram os custos de processo. A combinação das fontes de substrato em diferentes proporções conferiu concentrações de bioetanol entre 5,66 g/L e 19,17 g/L, em SSF e 6,46 g/L a 19,70 g/L em SHF. O resíduo de banana demonstrou ser uma fonte eficiente de conversão, fornecendo os nutrientes essenciais para a fermentação, conferindo elevadas concentrações e produtividades de bioetanol (30,70 g/L; 2,56 g/L.h para SSF e 25,68 g/L; 1,95 g/L.h para SHF).

A comparação entre os modos de operação demonstrou que a SSF resultou em concentrações de bioetanol, produtividades e eficiências de produção significativamente

superiores ($p > 0,05$) à SHF nas condições avaliadas, além de resultar em benefícios como a redução de tempo (economia de 12 h em relação ao método separado) e otimização do processo (conversão ocorre em apenas um biorreator, reduzindo custos associados aos equipamentos).

O estudo mostrou que é possível produzir bioetanol a partir de resíduos de frutas e material amiláceo nas condições avaliadas, podendo converter os resíduos de frutas que seriam descartados em um produto de maior valor agregado, destinando os resíduos para a biorrefinaria como forma de integrar o conceito de bioeconomia circular e suprir a demanda energética. No entanto, são necessários estudos de aumento de escala para uma produção eficiente em nível industrial.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O isolamento de dois fungos e duas bactérias de resíduos de hortifruti resultou na produção de complexos enzimáticos capazes de degradar fontes de amido e celulose. As bactérias demonstraram ser mais eficientes na produção enzimática em relação aos fungos. O complexo enzimático bacteriano se destacou em pH entre 5,0 e 5,5 na faixa de temperatura de 30 °C a 50 °C, com resultados máximos de atividade celulolítica e amilolítica. Essas características são importantes na aplicação industrial pois permitem a atuação conjunta, reduzindo etapas de ajuste de pH e temperatura durante o processo, demonstrando que as enzimas poderiam ser empregadas na produção de bioetanol. No entanto, otimizações no processo produtivo são necessárias para conferir maiores resultados de atividades enzimáticas para uma aplicação futura.

A produção de bioetanol por resíduos de banana e mamão em diferentes proporções com triticale ocorreu com êxito. As elevadas concentrações de bioetanol obtidas por sacarificação e fermentação simultânea mostraram que o método é uma estratégia efetiva para otimizar e reduzir o tempo de processo, conferindo elevadas produtividades, em comparação à sacarificação e fermentação separada nas condições avaliadas.

As fontes de substrato empregadas para a conversão foram assertivas, uma vez que resultaram em altas concentrações de bioetanol, dispensando a necessidade de suplementação adicional, pois apresentavam em sua composição os nutrientes necessários para um processo fermentativo eficaz, reduzindo os custos de processo.

Os resultados do presente estudo sugerem que é possível produzir bioetanol a partir de resíduos de frutas e material amiláceo desempenhando um papel fundamental na biorrefinaria, reduzindo o descarte de resíduos de frutas altamente biodisponíveis e com baixo custo para obtenção, para integrar o conceito de bioeconomia circular e suprir a demanda energética. No entanto, são necessários estudos de aumento de escala para uma produção eficiente em nível industrial.

Como perspectivas futuras, ressalta-se a necessidade de trabalhos que abordem: 1) o emprego de coquetéis enzimáticos que permitam melhores eficiências hidrolíticas visando uma conversão de bioetanol superior; 2) aplicar pré-tratamentos nos resíduos de banana e mamão antecedendo os processos fermentativos e no bagaço de cana-de-açúcar antecedendo a produção enzimática; 3) realizar a maltagem do triticale a fim de avaliar a produção de bioetanol com as enzimas disponíveis no cereal, 4) otimizar a produção

enzimática buscando melhores resultados de atividade celulolítica e amilolítica, 5) estudar o aumento de escala da produção de bioetanol nas condições avaliadas, e 6) avaliar a conversão de bioetanol empregando os substratos de forma individual nas condições avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, B.; MUHAMMAD, S.A.F.S.; SHOKRAVI, Z.; ISMAIL, S.; KASSIM, K.A.; MAHMOOD, A.N.; AZIZ, M.M.A. Fourth generation biofuel: a review on risks and mitigation strategies. **Renew. Sustain. Energy Rev.**, v. 107, p. 37–50, 2019.
- ABDULLA, R.; DERMAN, E.; RAVINTARAN, P.T.; JAMBO, S.A. Fuel Ethanol Production from Papaya Waste using Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **ASM Sc. J.**, v. 11, n. 2, p. 112-123, 2018.
- AFRISHAM, S.; BADOEI-DALFARD, A.; NAMAKI-SHOUSHTARI, A.; KARAMI, Z. Characterization of a thermostable, CaCl₂-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid state fermentation by utilizing agricultural wastes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p. 98-106, 2016.
- ALVA, S.; ANUPAMA, J.; SAVLA, J.; CHIU, Y.Y.; VYSHALI, P.; SHRUTI, M.; KUMUDINI, B.S. Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus* sp. JGI 12 in solid state culture. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 576-581, 2007.
- AMADI, O.C.; EGONG, E.J.; NWAGU, T.N.; OKPALA, G.; ONWOSI, C.O.; CHUKWU, G.C.; OKOLO, B.N.; AGU, R.C.; MONEKE, A.N. Process optimization for simultaneous production of cellulase, xylanase and ligninase by *Saccharomyces cerevisiae* SCPW 17 under solid state fermentation using Box-Behnken experimental design. **Heliyon**, v. 6, n. 7, e04566, 2020.
- ARUWAJOYE, G.S.; SEWSYNKER-SUKAY, Y.; KANA, E.B.G. Valorisation of cassava peels through simultaneous saccharification and ethanol production: Effect of prehydrolysis time, kinetic assessment and preliminary scale up. **Fuel**, v. 278, 118351, 2020.
- ASLAN, Y.; SHARIF, Y.M.; SAHIN, O. Covalent immobilization of *Aspergillus niger* amyloglucosidase (ANAG) with ethylenediamine-functionalized and glutaraldehyde-activated active carbon (EFGAAC) obtained from sesame seed shell. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 222-231, 2020.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18 Ed. Washington: AOAC, 2005.
- ASTOLFI, A.L.; REMPEL, A.; CAVANHI, V.A.F.; ALVES, M.; DEAMICI, K.M.; COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. Simultaneous saccharification and fermentation of *Spirulina* sp. and corn starch for the production of bioethanol and obtaining biopeptides with high antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 301, 122698, 2020.
- AYODELE, B.V.; ALSAFFAR, M.A.; MUSTAPA, S.I. An overview of integration opportunities for sustainable bioethanol production from first- and second-generation sugar-based feedstocks. **Journal of Cleaner Production**, v. 245, 118857, 2020.

BADHAN, A.K.; CHADHA, B.S.; KAUR, J.; SAINI, H.S.; BHAT, M.K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 504-510, 2007.

BAIER, A.C.; NEDEL, J.L.; REIS, E.M.; WIETHOLTER, S. **Triticale: cultivo e aproveitamento**. Passo Fundo: Embrapa-CNPT, 72 p., 1994.

BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. 2017. 144 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química), Doutorado em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

BALCEREK, M.; PIELECH-PRZYBYLSKA, K. Effect of simultaneous saccharification and fermentation conditions of native triticale starch on the dynamics and efficiency of process and composition of the distillates obtained. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 4, p. 615–622, 2012.

BOAKYE-BOATEN, N.A.; KURKALOVA, L.; XIU, S.; SHAHBAZI, A. Techno-economic analysis for the biochemical conversion of *Miscanthus x giganteus* into bioethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 98, p. 85-94, 2017.

BONATTO, C.; SCAPINI, T.; ZANIVAN, J.; DALASTRA, C.; BAZOTI, S.F.; ALVES JR, S.; FONGARO, G.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Utilization of seawater and wastewater from shrimp production in the fermentation of papaya residues to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 321, 124501, 2021.

BOTELLA, C.; de ORY, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2-3, p. 100-106, 2005.

CARRILLO-NIEVES, D.; ALANÍS, M.J.R.; QUIROZ, R.C.; RUIZ, H.A.; IQBAL, H.M.N.; PARRA-SALDÍVAR, R. Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 102, p. 63-74, 2019.

CARRILLO-NIEVES, D.; RUIZ, H.A.; AGUILAR, C.N.; ILYINA, A.; PARRA-SALDIVAR, R.; TORRES, J.A.; HERNÁNDEZ, J.L.M. Process alternatives for bioethanol production from mango stem bark residues. **Bioresource Technology**, v. 239, p. 430-436, 2017.

CASTRO, A.M.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. An overview on advances of amylases production and their use in the production of bioethanol by conventional and non-conventional processes. **Biomass Conv. Bioref.**, v. 1, p. 245-255, 2011.

CERDA, A.; EL-BAKRY, M.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Long term enhanced solid-state fermentation: Inoculation strategies for amylase production from soy and bread wastes by *Thermomyces* sp. in a sequential batch operation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 2394-2401, 2016.

CHEN, J.; ZHANG, B.; LUO, L.; ZHANG, F.; YI, Y.; SHAN, Y.; LIU, B.; ZHOU, Y.; WANG, X.; LÜ, X. A review on recycling techniques for bioethanol production from

lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 149, 111370, 2021.

COLLA, L.M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M.H.; REINEHR, C.O.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8308-8314, 2010.

CRIPWELL, R.; FAVARO, L.; ROSE, S.H.; BASAGLIA, M.; CAGNIN, L.; CASELLA, S.; van ZYL, W. Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast. **Applied Energy**, v. 160, p. 610-617, 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Editora Artmed, 4ª Ed., 2010.

DEEPTHI, M.K.; M. SOLOMON SUDHAKAR, M.S.; DEVAMMA, M.N. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. from coringa mangrove soils for enzyme production and antimicrobial activity. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 110-116, 2012.

DE LA TORRE, I.; MARTIN-DOMINGUEZ, V.; ACEDOS, M.G.; ESTEBAN, J.; SANTOS, V.E.; LADERO, M. Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 103, p. 5975-5991, 2019.

DENNETT, A. L.; TRETOWAN, R.M. Milling efficiency of triticale grain for commercial flour production. **Journal of Cereal Science**, v. 57, n. 3, p. 527-530, 2013.

DESWAL, D.; KHASA, Y.P.; KUHAD, R.C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6065-6072, 2011.

DEVOS, R.J.B.; COLLA, L.M. Simultaneous saccharification and fermentation to obtain bioethanol: A bibliometric and systematic study. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, 100924, 2022.

DHILLON, G.S.; BRAR, S.K.; KAUR, S.; METAHNI, S.; M'HAMDI, N. Lactoserum as a moistening medium and crude inducer for fungal cellulase and hemicellulase induction through solid-state fermentation of apple pomace. **Biomass and Bioenergy**, v. 41, p. 165-174, 2012.

DIAS, M.O.S.; JUNQUEIRA, T.L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M.P.; JESUS, C.D.F.; ROSSELL, C.E.V.; FILHO, R.M.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 152-161, 2012.

DOGARIS, I.; VAKONTIOS, G.; KALOGERIS, E.; MAMMA, D.; KEKOS, D. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 2-3, p. 404-411, 2009.

DUQUE, A.; ÁLVAREZ, C.; DOMÉNECH, P.; MANZANARES, P.; MORENO, A.D. Advanced Bioethanol Production: From Novel Raw Materials to Integrated Biorefineries. **Processes**, v. 9, n. 206, 2021.

EC. **Report from the Commission to the Council and the European Parliament on sustainability requirements for the use of solid and gaseous biomass sources in electricity, heating and cooling**. European Commission: Brussels, p. 65-66, 2010.

EMAGA, T.H.; ANDRIANAVIO, R.H.; WATHELET, B.; TCHANGO, J.T.; PAQUOT, M. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 590-600, 2007.

FARIA SILVA, L.A. de; de CARVALHO, S.A.; FILHO, D.F.; ALVES, M.F.; SILVA, N.L.T.; GOMES, J.R.; SANTOS, K.S. Production of amylase by endophytic filamentous fungi by submerged fermentation. **Cad. Ciênc. Agrá.**, v. 9, n. 3, p. 49-53, 2017.

FARINAS, C.S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

FRAŚ, A.; GOŁĘBIEWSKA, K.; GOŁĘBIEWSKI, D.; MAŃKOWSKI, D. R.; BOROS, D.; SZECÓWKA, P. Variability in the chemical composition of triticale grain, flour and bread. **Journal of Cereal Science**, v. 71, p. 66-72, 2016.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic *fungus Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, 2008.

GÓMEZ, C.R.; QUESADA, M.R.; ASTÚA, S.V.; ZAMORA, J.P.M.; LOPRETTI, M.; BAUDRIT, J.R.V. Biorefinery of Biomass of Agro-Industrial Banana Waste to Obtain High-Value Biopolymers. **Molecules**, v. 25, n. 17, 3829, 2020.

GRONCHI, N.; FAVARO, L.; CAGNIN, L.; BROJANIGO, S.; PIZZOCCHERO, V.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S. Novel Yeast Strains for the Efficient Saccharification and Fermentation of Starchy By-Products to Bioethanol. **Energies**, v. 12, n. 4, 714, 2019.

GUERRERO, A.B.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. The potential of agricultural banana waste for bioethanol production. **Fuel**, v. 213, p. 176-185, 2018.

HANG, Y.D., LEE, C.Y., WOODAMS, E.E., COOLEY, H.J. Production of alcohol from apple pomace. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 1128-1129, 1981.

HAN, Z.; PARK, A.; SU, W.W. Valorization of papaya fruit waste through low-cost fractionation and microbial conversion of both juice and seed lipids. **RSC Adv.**, v. 49, n. 8, p. 27963-27972, 2018.

- HE, J.; ZHANG, W.; LIU, X.; XU, N.; XIONG, P. Optimization of prehydrolysis time and substrate feeding to improve ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of furfural process residue. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 122, n. 5, p. 563-569, 2016.
- HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; YANO, S.; FANG, X.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 162-168, 2011.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3 Ed., v. 1, São Paulo, 1985.
- JABASINGH, S. A.; NACHIYAR, C. V. Utilization of pretreated bagasse for the sustainable bioproduction of cellulase by *Aspergillus nidulans* MTCC344 using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 3, p. 1564-1571, 2011.
- JORDAN, R. A.; JUNIOR, R. B.; CORTEZ, L. A. B.; MOTOMIYA, A. V. A. Characterization of particle size of polydispersed biomass by mechanical sieving. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, v. 36, n. 1, p. 102-113, 2016.
- KANNAH, R.Y.; MERRYLIN, J.; DEVI, T.P.; KAVITHA, S.; SIVASHANMUGAM, P.; KUMAR, G.; BANU, J.R. Food waste valorization: Biofuels and value added product recovery. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, 100524, 2020.
- KARP, S.G.; MEDINA, J.D.C.; LETTI, L.A.J.; WOICIECHOWSKI, A.L.; de CARVALHO, J.C.; SCHMITT, C.C.; PENHA, R.O.; KUMLEHN, G.S.; SOCCOL, C.R. Bioeconomy and biofuels: the case of sugarcane ethanol in Brazil. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 15, n. 3, p. 899-912, 2021.
- KASANA, R.C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503-507, 2008.
- KAUR, S.; DHILLON, G.S.; BRAR, S.K.; CHAUHAN, V.B. Carbohydrate degrading enzyme production by plant pathogenic mycelia and microsclerotia isolates of *Macrophomina phaseolina* through koji fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 140-148, 2012.
- KOGA, N.; TAKAHASHI, H.; OKAZAKI, K.; KAJIYAMA, T.; KOBAYASHI, S. Potential agronomic options for energy-efficient sugar beet-based bioethanol production in northern Japan. **GCB Bioenergy**, v. 1, n.3, p. 220-229, 2009.
- KUČEROVÁ, J. The effect of year, site and variety on the quality characteristics and bioethanol yield of winter triticale. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, p. 142-146, 2007.
- LAKNER, Z.; OLÁH, J.; POPP, J.; BALÁZS, E. The structural change of the economy in the context of the bioeconomy. **EFB Bioeconomy Journal**, v. 1, 100018, 2021.

- LEONG, H.Y.; CHANG, C.K.; KHOO, K.S.; CHEW, K.W.; CHIA, S.R.; LIM, J.W.; CHANG, J.S.; SHOW, P.L. Waste biorefinery towards a sustainable circular bioeconomy: a solution to global issues. **Biotechnol Biofuels**, v. 14, n. 87, 2021.
- LEONG, W.H.; LIM, J.W.; LAM, M.K.; UEMURA, Y.; HO, Y.C. Third generation biofuels: a nutritional perspective in enhancing microbial lipid production. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, v. 91, p. 950–961, 2018.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. Processos Fermentativos e Enzimáticos. v. 3. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1 ed., 593 p., 2001.
- LI, X.; CHEN, S.; HUANG, H.; JIN, M. In-situ corn fiber conversion improves ethanol yield in corn dry-mill process. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 217-224, 2018.
- LI, X.; LU, J.; ZHAO, J.; QU, Y. Characteristics of Corn Stover Pretreated with Liquid Hot Water and Fed-Batch Semi-Simultaneous Saccharification and Fermentation for Bioethanol Production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, e95455, 2014.
- LOMTHONG, T.; NETPRASOM, P.; KANCHARU, N. JITMALA, K.; AREESIRISUK, A.; TRAKARNPAIBOON, S.; KITPREECHAVANICH, V. Very high Gravity (VHG) Bioethanol Production Using Modified Simultaneous Saccharification and Fermentation of Raw Cassava Chips with Molasses by *Kluyveromyces marxianus* DMKU-KS07. **Waste Biomass Valor**, 2020.
- MACIEL, E.O.; SINGH, A.; CHABLE-VILLACIS, R.; TUSSELL, R.T.; RUIZ, H.A. Consolidated bioprocessing, an innovative strategy towards sustainability for biofuels production from crop residues: an overview. **Agronomy**, v. 10, n. 1834, 2020.
- MAHRAN, R.I.M.; NAIM, M.M.; YEHIA, M.E.O.; EL-BATOUTI, M.; ELEWA, M.M. Bioconversion of Potatoes to Bioethanol. **Revista de Chimie.**, v. 71, n. 10, p. 118-130, 2020.
- MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; MIZUBUTI, E. S. G. Amilolytic and pectinolytic activities of *Alternaria solani* and aggressiveness in tomato plants. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 4, p. 345-352, 2006.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 426-432, 2007.
- MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O.; Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7842-7847, 2008.
- MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012.

MERGOUM, M.; SINGH, P.K.; PEÑA, R.J.; LOZANO-del RÍO, A.J.; COOPER, K.V.; SALMON, D.F.; GÓMEZ, H.M. Triticale: A “new” crop with old challenges. **Cereals**, p. 267-287, 2009.

MILLER, G.L. Modified DNS method for reducing sugars. **Anal. Chem**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOJOVIĆ, L.; PEJIN, D.; RAKIN, M.; PEJIN, J.; NIKOLIĆ, S.; DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A. How to improve the economy of bioethanol production in Serbia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 6040-6047, 2012.

NASEER, S.; CHEN, J.O.X.; PU, S.; GUO, Y.; ZHANG, X.; LI, D.; YANG, C. Immobilization of β -glucosidase by self-catalysis and compared to crosslinking with glutaraldehyde. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 154, p. 1490-1495, 2020.

NIZAMI, A.S.; REHAN, M.; WAQAS, M.; NAQVI, M.; OUDA, O.K.M.; SHAHZAD, K.; MIANDAD, R.; KHAN, M.Z.; SYAMSIRO, M.; ISMAIL, I.M.I.; PANT, D. Waste biorefineries: Enabling circular economies in developing countries. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 1101-1117, 2017.

PALACIOS, S.; RUIZ, H.A.; RAMOS-GONZALEZ, R.; MARTÍNEZ, J.; SEGURA, E.; AGUILAR, M.; AGUILERA, A.; MICHELENA, G.; AGUILAR, C.; ILYNA, A. Comparison of physicochemical pretreatments of banana peels for bioethanol production. **Food Sci Biotechnol**, v. 26, p. 993–1001, 2017.

PARIS, L.D.; SCHEUFELE, F.B.; JÚNIOR, A.T.; GUERREIRO, T.L.; HASAN, S.D.M. Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. **Acta Scientiarum**, v. 34, n. 2, p. 193-200, 2012.

PATHAK, P.D.; MANDAVGANE, S.A.; KULKARNI, B.D. Waste to Wealth: A Case Study of Papaya Peel. **Waste Biomass Valor**, v. 10, p. 1755–1766, 2019.

PEJIN, D.; MOJOVIC, L.J.; VUČUROVIĆ, V.; PEJIN, J.; DENČIĆ, S.; RAKIN, M. Fermentation of wheat and triticale hydrolysates: A comparative study. **Fuel**, v. 88, n. 9, p.1625-1628, 2009.

PEJIN, D.J.; MOJOVIĆ, L.V.; PEJIN, J.D.; GRUJIĆ, O.S.; MARKOV, S.L.; NIKOLIĆ, S.B.; MARKOVIĆ, M.N. Increase in bioethanol production yield from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with application of ultrasound. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 170-176, 2012.

PEJIN, J.D.; MOJOVIC, L.V.; PEJIN, D.J.; KOCIC-TANACKOV, S.D.; SAVIC, D.S.; NIKOLIC, S.B.; DJUKIC-VUKOVIC, A.P. Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. **Fuel**, v. 142, p. 58-64, 2015.

PODGORBUNSKIKH, E.M.; BYCHKOV, A.L.; LOMOVSKY, O.I. Determination of Surface Accessibility of the Cellulose Substrate According to Enzyme Sorption. **Polymers**, v. 11, n. 7, 1201, 2019.

POONSRISAWAT, A.; WANLAPATIT, S.; PAEMANEE, A.; EURWILAICHITR, L.; PIYACHOMKWAN, K.; CHAMPREDA, V. Viscosity reduction of cassava for very high gravity ethanol fermentation using cell wall degrading enzymes from *Aspergillus aculeatus*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1950-1957, 2014.

PYKA, A.; CARDELLINI, G.; MEIJL, H.V.; VERKERK, P.J. Modelling the bioeconomy: Emerging approaches to address policy needs. **Journal of Cleaner Production**, v. 330, 129801, 2022.

QURESHI, A.S.; KHUSHK, I.; ALI, C.H.; CHISTI, Y.; AHMAD, A.; MAJEED, H. Coproduction of protease and amylase by thermophilic *Bacillus* sp. BBXS-2 using open solid-state fermentation of lignocellulosic biomass. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 146-151, 2016.

REMPEL, A. **Produção de bioetanol e biometano a partir da biomassa de *Spirulina* sp.** 2018. 87 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental), Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

REMPEL, A.; SOSSELLA, F.S.; MARGARITES, A.C.; ASTOLFI, A.L.; STEINMETZ, R.L.R.; KUNZ, A.; TREICHEL, H.; COLLA, L.M. Bioethanol from *Spirulina platensis* biomass and the use of residuals to produce biomethane: An energy efficient approach. **Bioresource Technology**, v. 288, 121588, 2019.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M. **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual, Bactérias e Fungos.** 1 Ed., 112 p., Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.

RODRIGUES, E.F. **Produção e purificação de enzimas amilolíticas para hidrólise enzimática de biomassa de *Spirulina*.** 2016. 93 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

SAGGI, S.K.; DEY, P. An overview of simultaneous saccharification and fermentation of starchy and lignocellulosic biomass for bio-ethanol production. **Biofuels**, v. 10, n. 3, p. 287-299, 2019.

SALIK, F.L.M.; POVH, N.P. **Método espectrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas.** In: Congresso Nacional da STAB, ed. 5, São Paulo: BR, p. 262-266, 1993.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A.U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial.** v. 2. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 1 ed., 254 p., 2011.

SHOKRAVI, H.; SHOKRAVI, Z.; HEIDARREZAEI, M.; ONG, H.C.; KOLOOR, S.S.R.; PETRU, M.; LAU, W. J.; ISMAIL, A.F. Fourth generation biofuel from genetically modified algal biomass: challenges and future directions. **Chemosphere**, v. 285, 131535, 2021.

SIRIWONG, T.; LAIMEHERIWA, B.; AINI, U.N.; CAHYANTO, M.N.; REUNFSANG, A.; SALAKKAM, A. Cold hydrolysis of cassava pulp and its use in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process for ethanol fermentation. **Journal of Biotechnology**, v. 292, p. 57-63, 2019.

STRAK-GRACZYK, E.; BALCEREK, M. Effect of Pre-hydrolysis on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Native Rye Starch. **Food and Bioprocess Technology**, v. 13, p. 923-936, 2020.

STRAK-GRACZYK, E.; BALCEREK, M.; PRZYBYLSK, K.; ŻYŻELEWICZ, D. Simultaneous saccharification and fermentation of native rye, wheat and triticale starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 11, p. 4904-4912, 2019.

TAMAKI, Y.; MAZZA, G. Measurement of structural carbohydrates, lignins, and micro-components of straw and shives: Effects of extractives, particle size and crop species. **Industrial Crops and Products**, v. 31, n. 3, May 2010, p. 534-541, 2010.

TAMAKI, Y.; MAZZA, G. Rapid Determination of Carbohydrates, Ash, and Extractives Contents of Straw Using Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 12, 6346-6352, 2011.

UTAMA, G.L.; SIDABUTAR, F.E.E.; FELINA, H.; WIRA, D.W.; BALIA, R.L. The utilization of fruit and vegetable wastes for bioethanol production with the inoculation of indigenous yeasts consortium. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 25, n. 2, p. 264-270, 2019.

WANG, D.; BEAN, S.; MCLAREN, J.; SEIB, P.; MADL, R.; TUINSTRA, M.; SHI, Y.; LENZ, M.; WU, X.; ZHAO, R. Grain sorghum is a viable feedstock for ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 313-320, 2008.

WOBIWO, F.A.; CHATURVEDI, T.; BODA, M.; FOKOU, E.; EMAGA, T.H.; CYBULSKA, I.; DELEU, M.; GERIN, P.A.; THOMSEN, M.H. Bioethanol potential of raw and hydrothermally pretreated banana bulbs biomass in simultaneous saccharification and fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 9, p. 553-563, 2019.

YE, G.; ZENG, D.; ZHANG, S.; FAN, M.; ZHANG, H.; XIE, J. Ethanol production from mixtures of sugarcane bagasse and *Dioscorea composita* extracted residue with high solid loading. **Bioresource Technology**, v. 257, p. 23-29, 2018.

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