

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ERIC TAKASHI KATAYAMA

**PRODUÇÃO DE COQUETEL ENZIMÁTICO RICO EM ENDOGLUCANASE
TERMOESTÁVEL EM BIORRETOR DE LEITO EMPACOTADO E SUA APLICAÇÃO
NA OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE**

SÃO CARLOS
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ERIC TAKASHI KATAYAMA

**PRODUÇÃO DE COQUETEL ENZIMÁTICO RICO EM ENDOGLUCANASE
TERMOESTÁVEL EM BIORRETOR DE LEITO EMPACOTADO E SUA APLICAÇÃO
NA OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.
Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori

SÃO CARLOS
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Eric Takashi Katayama, realizada em 21/10/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (EMBRAPA)

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori (UFSCar)

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Stanley Endrigo Bilatto Rodrigues (EMBRAPA)

Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo (EMBRAPA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a:
Meus pais Makoto e Marilena
Minha irmã Katia

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu pai Makoto, minha mãe Marilena e minha irmã Katia pelo apoio e suporte necessário.

Às orientadoras Cristiane Sanchez Farinas e Fernanda Perpétua Casciotori por ter me orientado e aceitado me orientar em um momento conturbado.

Ao professor Alberto pela utilização do laboratório.

À Natália pela ajuda e parceria durante a primeira etapa do projeto.

À Thalita, Paula e ao Stanley por ter me ajudado na contribuição na segunda etapa do projeto.

Aos amigos de laboratório Ana, Camila V., Emanuela, Ivan, Isabela, Juliana, Kaio, Marília, Marina, Matheus, Mayara, Rauber, Samuel e Taise pela parceria, apoio e amizade especialmente nos momentos finais.

Aos amigos da bioquímica e pós-graduação Alice, Cintia, Camila F., Diego, Ediane, Gustavo, Juliana S., Maria Carlota, José Roberto, Josivan, Laiane, Letícia, Mateus, Murilo, Rafael, Sheila, Thais, Thiago, Vanessa e Vitor pela amizade.

Ao pessoal do meu antigo laboratório Carol, Diogo, Jessica, Juliana S., Monize, Pedro, Rebeca, Viviane e ao professor Claudio que devido a imprevistos não foi possível continuar a pesquisa na área.

À toda minha família que sempre esteve junto comigo.

Aos técnicos da Embrapa em especial Silviane pela ajuda e ensinamentos quando necessário.

À UFSCar, PPG-EQ, EMBRAPA Instrumentação e todos os funcionários.

A todos que foram de alguma forma importante para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2018/00996-2 e 2016/10636-8), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código de Financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. 430786/2018-2) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Nanocelulose é um bioproduto com alto valor agregado obtido através da conversão da biomassa lignocelulósica. Devido a características como alta razão de aspecto, baixa toxicidade, estabilidade térmica e alta cristalinidade, a nanocelulose tem diversas aplicações. A obtenção de nanocelulose pela rota enzimática se destaca por ser um método ambientalmente amigável, porém ainda são necessários estudos para melhorar a eficiência desse e torna-la economicamente viável. Nesse sentido, a utilização de um coquetel enzimático com propriedades termoestáveis pode ser uma estratégia interessante para a obtenção de nanocelulose. Neste trabalho, utilizou-se um o biorreator de leito empacotado para a produção de coquetel enzimático termoestável e posterior aplicação na obtenção de nanocelulose. Para se obter esse coquetel, o fungo termofílico *M. thermophila* foi cultivado por fermentação em estado sólido em pequena escala utilizando como ferramenta o planejamento fatorial completo variando a massa de bagaço, a fração de farelo de soja e umidade. As condições de cultivo selecionadas foram replicadas em um biorreator de leito empacotado em multicamadas. O coquetel enzimático foi utilizado para hidrolisar polpa de celulose nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C, e converter o substrato em nanocelulose. Os extratos enzimáticos do fungo *M. thermophila* obtidos tanto em pequena escala quanto em biorreator apresentaram atividades de endoglucanase em torno de 200 U/g-substrato. A hidrólise da polpa de celulose realizada a 60 °C por 96 horas apresentou melhores resultados, convertendo 60% da celulose, com rendimento de 16,2% de nanocelulose. Os nanomateriais obtidos apresentaram índice de cristalinidade de 77,4%. Pelo método de espectroscopia por FTIR foi possível verificar que as composições químicas dos nanomateriais obtidos eram de nanocelulose. As temperaturas “on set” apresentaram valores entre 152 a 194 °C. A microscopia de força atômica mostrou que foram obtidos nanocristais com comprimento médio de 157 nm e uma razão de aspecto que variou de 1,1 a 10,0. Apesar do rendimento de nanocelulose ainda ser inferior se comparado ao da hidrólise ácida, ainda podem ser obtidos avanços na hidrólise enzimática, investigando-se outras possíveis enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica, como as enzimas oxidativas.

Palavras chave: Nanocelulose, Endoglucanase, Hidrólise enzimática, Fermentação em estado-sólido, Biorreator de leito empacotado

ABSTRACT

Nanocellulose is a bioproduct with high added value obtained through the conversion of lignocellulosic biomass. Due to characteristics such as high aspect ratio, low toxicity, thermal stability and high crystallinity, nanocellulose has several applications. Obtaining nanocellulose through the enzymatic route stands out for being an environmentally friendly method, however studies are necessary to improve the efficiency of this process. In this sense, the use of an enzymatic cocktail with thermostable properties can be an interesting strategy for obtaining nanocellulose. In this work, the objective was to use the packaged bed bioreactor for the production of thermostable enzymatic cocktail and apply the enzymes to obtain nanocellulose. To obtain this cocktail, the thermophilic fungus *M. thermophila* was cultivated by fermentation in solid state on a small scale using full factorial design varying the bagasse mass, soybean meal fraction and moisture. The selected cultivation conditions were replicated in a multilayer-packaged bed bioreactor. The enzymes were then used to hydrolyze cellulose pulp at temperatures of 50, 60 and 70 °C and convert the substrate into nanocellulose. The enzymatic extracts of the fungus *M. thermophila* obtained both on a small scale and in bioreactor showed the activities of endoglucanase around 200 U/g-substrate. The hydrolysis of the pulp performed at 60 °C showed better results, converting 60% of the cellulose, with yield of 16.2% of nanocellulose with 96 hours of hydrolysis. The nanomaterials obtained presented crystalline index of 77.4%. By FTIR it was possible to verify that the chemical compositions of the nanomaterials obtained were nanocellulose. On set temperatures were 152 to 194 °C. Atomic force microscopy showed that the obtained nanocrystals had an average length of 157 nm and an aspect ratio ranging from 1.1 to 10.0. Although the yield of nanocellulose is still lower when compared to that of acid hydrolysis, advances in enzymatic hydrolysis can still be obtained, investigating other possible enzymes that degrade lignocellulosic biomass, such as oxidative enzymes.

Keywords: Nanocellulose, Endoglucanase, Enzymatic Hydrolysis, Solid-state fermentation, Packed-bed bioreactor

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Figura demonstrando a complexidade do material lignocelulósico.....	24
Figura 2 – Estrutura molecular da celulose e indicação da molécula de celobiose.....	25
Figura 3 – Exemplo da estrutura molecular da hemicelulose.....	26
Figura 4 – Principais monômeros que formam a hemicelulose.	26
Figura 5 – Estrutura química complexa da lignina.....	27
Figura 6 – Principais monômeros presentes na lignina.	28
Figura 7 – Modelo de um biorreator utilizado para fermentação submersa.....	30
Figura 8 – Modelo esquemático do biorreator de bandejas.....	33
Figura 9 – Diagrama esquemático de um biorreator de leito empacotado.	34
Figura 10 – Modelo do biorreator de leito empacotado em multicamadas proposto por Mitchell <i>et al.</i> 2010 nos modos de operação em batelada (a), cíclica (b) e <i>plug-flow</i> (c).	34
Figura 11 – Diferentes tipos de morfologia que o fungo <i>A. niger</i> pode assumir.....	37
Figura 12 – Sequência de reações da transformação da celulose e a ação das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase.	39
Figura 13 – Número de publicações referente a nanocelulose. Pode-se notar que houve um aumento na última década.	41
Figura 14 – Imagem microscópica de nanofibras de celulose.....	44
Figura 15 – Imagem microscópica dos nanocristais de celulose. Erro! Indicador não definido.	
Figura 16. Sistema experimental para biorreator de fermentação em estado sólido em leito empacotado em escalas de bancada e piloto.....	49
Figura 17 – Equipamentos utilizados durante a fermentação, a saber: filtro de ar (a), umidificador (b) e seu volume interno (c) e banho termostático que bombeia água para a camisa (d).	50
Figura 18 – Esquema representativo do biorreator de leito empacotado em multicamadas e suas partes com (a) módulo fermentativo, (b) módulos de entrada e saída, (c) biorreator montado sem substrato, (d) biorreator montado com substrato e (e) foto do biorreator.	51
Figura 19 – Bagaço que fica retido sobre a peneira com abertura de 6 mm (a) e bagaço que fica retido sobre a tela de 2 mm (b).	54

Figura 20 – Ágar preparado em Erlenmeyer (a) e os fungos crescidos no ágar <i>A. niger</i> (b), <i>M. thermophila</i> (c) e <i>T. reesei</i> (d).....	55
Figura 21 – Embalagens fermentativas com a biomassa, o cilindro e o algodão hidrofóbico.	58
Figura 22 – Ilustração do procedimento de (a) fermentação em estado sólido e (b) extração enzimática.....	58
Figura 23 – Embalagens fermentativas após o cultivo do fungo <i>M. thermophila</i>	59
Figura 24 – Módulo fermentativo do biorreator após a inoculação (a), e após os crescimentos dos fungos <i>A. niger</i> (b), <i>M. thermophila</i> (c) e <i>T. reesei</i> (d).....	62
Figura 25 – Esquemas da troca dos módulos fermentativos.	63
Figura 26 – Polpa de celulose kraft de eucalipto após passar pelo moinho de bolas.....	65
Figura 27 – Preparação do substrato e hidrólise enzimática.	66
Figura 28 – Atividade enzimática de endoglucanase de acordo com o planejamento experimental do cultivo em pequena escala variando a composição do substrato e umidade.	75
Figura 29 – Gráfico de Pareto do cultivo com os fungos (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>M. thermophila</i> e (c) <i>T. reesei</i> de acordo com o planejamento experimental do cultivo em escala de frascos para a atividade de endoglucanase.....	75
Figura 30 – Atividade enzimática de β -glucosidase de acordo com o planejamento experimental do cultivo em pequena escala variando a composição do substrato.....	77
Figura 31 – Gráfico de Pareto do cultivo com os fungos (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>M. thermophila</i> e (c) <i>T. reesei</i> de acordo com o planejamento experimental do cultivo em escala de frascos para atividade de β -glicosidase.....	78
Figura 32 – Razão entre atividades endoglucanase e β -glicosidase de acordo com o planejamento experimental do cultivo em escala de frascos variando a composição e a umidade do substrato.....	79
Figura 33 – Concentração de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos (a), atividade específica da endoglucanase (b) e atividade específica da β -glicosidase (c) dos cultivos em escala de frascos referentes ao planejamento experimental com os três fungos utilizados.....	80
Figura 34 – Gráficos de Pareto de concentração de proteínas solúveis nos extratos produzidos dos cultivos em escala de frascos referentes aos planejamentos experimentais com os fungos (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>M. thermophila</i> e (c) <i>T. reesei</i>	81

Figura 35 – Gráficos de Pareto das atividades específicas de endoglucanase dos extratos enzimáticos oriundos dos cultivos em escala de frascos dos planejamentos experimentais com os fungos (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>M. thermophila</i> e (c) <i>T. reesei</i>	83
Figura 36 – Gráficos de Pareto das atividades específicas de β -glucosidase dos extratos enzimáticos oriundos cultivos em escala de frascos dos planejamentos experimentais com (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>M. thermophila</i> e (c) <i>T. reesei</i>	84
Figura 37 – Perfis de temperatura no biorreator durante o cultivo com os fungos (a) <i>A. niger</i> , (b) <i>M. thermophila</i> e (c) <i>T. reesei</i>	88
Figura 38 – Atividade enzimática da endoglucanase comparando os cultivos realizados em pequena escala com os cultivos realizados em biorreator para os diferentes fungos.	91
Figura 39 – Atividade da enzima β -glicosidase comparando os cultivos feitos no fermentador e nas embalagens plásticas.	94
Figura 40 – Comparação da razão entre as enzimas endoglucanase e β -glicosidase no fermentador e nas embalagens plásticas.	96
Figura 41 – Concentração de proteínas solúveis e atividades específicas de endoglucanase e β -glicosidase comparando os cultivos feitos no fermentador e nas embalagens plásticas.	98
Figura 42 – Curvas representativas da hidrólise enzimática da polpa de celulose Kraft onde (a) representa a concentração de glicose e a conversão de celulose durante o tempo e (b) representa a atividade de endoglucanase total durante a hidrólise.	103
Figura 43 – Composição química das partículas geradas durante a hidrólise a 48 e 96 horas.	105
Figura 44 – Termogravimetria das amostras de nanocelulose e da polpa de celulose sendo que (a) representa a perda de massa das amostras de acordo com a temperatura e (b) representa a degradação térmica derivativa de acordo com a temperatura.	107
Figura 45 – Imagem obtida por AFM da solução dos nanomateriais e distribuição de diâmetro, largura e razão de aspecto dos cristais de nanocelulose.	109

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Composição e informações nutricionais dos substratos utilizados no cultivo.	48
Tabela 2 – Diluições da solução mãe de glicose para gerar a curva padrão em espectrofotômetro.	52
Tabela 3 – Planejamento experimental feito no software Chemoface.	56
Tabela 4 – Execução do planejamento experimental, de acordo com as massas do bagaço de cana, farelo de soja e farelo de trigo e do volume de solução nutriente a ser utilizado em cada experimento.	57
Tabela 5 – Condições de incubação durante o cultivo para cada espécie de fungo.	59
Tabela 6 – Composição da biomassa nos módulos fermentativos de acordo com o microrganismo a ser cultivado.	62
Tabela 7 – Tempos de troca dos módulos para cada fungo e posição dos módulos após a troca.	64
Tabela 8 – Teste de Tukey comparando médias dois a dois entre os módulos ou entre os módulos e o experimento 4 do cultivo de <i>A. niger</i> para a atividade enzimática de endoglucanase.	91
Tabela 9 – Teste de Tukey comparando médias dois a dois de atividade de endoglucanase entre os módulos do fermentador e seus respectivos cultivos em embalagens plásticas para <i>M. thermophila</i>	92
Tabela 10 – Teste de Tukey entre as médias da atividade de endoglucanase para o <i>T. reesei</i> comparando os módulos do fermentadores entre si e com o experimento de pequena escala.	92
Tabela 11 – Teste de Tukey comparando as médias de atividade de β -glicosidase de <i>A. niger</i> dos módulos fermentativos com experimento equivalente em pequena escala. ...	94
Tabela 12 – Teste de Tukey comparando os módulos fermentativos e os experimentos em embalagens plásticas equivalentes do cultivo de <i>M. thermophila</i> para a atividade de β -glicosidase.	94
Tabela 13 – Teste de Tukey para comparação das médias da atividade de β -glicosidase do cultivo de <i>T. reesei</i> dos experimentos no fermentador e do cultivo em pequena escala.	95

Tabela 14 – Teste de Tukey comparando a média das proteínas produzidas entre os módulos fermentativos e os cultivos em embalagens plásticas para <i>A. niger</i>	99
Tabela 15 – Teste de Tukey da produção de proteína do cultivo de <i>M. thermophila</i> comparando as médias dos cultivos de pequena escala e o cultivo no fermentador.	99
Tabela 16 – Teste de Tukey da produção de proteína do cultivo de <i>T. reesei</i> comparando as médias nos cultivos de pequena escala e o cultivo no fermentador.	99
Tabela 17 – Índice de cristalinidade e rendimento de nanomateriais liberados durante a hidrólise nas correspondentes temperaturas e tempos de hidrólise.	103
Tabela 18 – Degradação mássica da polpa de celulose dos nanomateriais obtidos após a hidrólise de 96 horas. A tabela indica a temperatura na qual a massa começa a degradar (T_{onset}), a temperatura na qual a maior quantidade de massa está sendo decomposta (T_{max}) e os resíduos resultantes a 600 °C.	107

INDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1	56
Equação 2	56
Equação 3	56
Equação 4	66
Equação 5	67
Equação 6	68
Equação 7	69
Equação 8	69
Equação 9	69
Equação 10	71
Equação 11	71
Equação 12	72

LISTA DE VARIÁVEIS

$Abs_{amostra}$: absorvância da amostra

$Abs_{padrão}$: absorvância do padrão

Atv_{enz} : atividade enzimática por massa de sólido de substrato

Atividade_{enz}: atividade enzimática por volume de líquido do extrato enzimático

C_g : concentração de glicose

C_p : concentração de proteína

C_{padrao} : concentração de glicose do padrão

CI: índice de cristalinidade

d: diâmetro da nanocelulose

D: fator de diluição

I_{200} : altura do pico do plano cristalino 200

I_{am} : altura do pico do plano amorfo

K_B : coeficiente angulara para a curva de Bradford

L: comprimento da nanocelulose

m: coeficiente angular para a curva de DNS

m_{bag} : massa de bagaço

m_{far} : massa de farelo

m_g^0 : massa de glicose no tempo zero de hidrólise

m_g^t : massa de glicose liberada no tempo de hidrólise t

m_p^t : massa de polpa de celulose de eucalipto inicial

m_{tri} : massa de farelo de trigo

m_{so} : massa de farelo de soja

m_t : massa total de substrato sólidos

n: coeficiente linear da curva de DNS

R: razão entre volume reacional de hidrólise e volume de amostra retirada para medir rendimento

t: tempo de cultivo ou hidrólise

$t_{reação}$: tempo de reação

T: temperatura

Um: umidade

V_{CMC} : volume de CMC

V_{ext} : volume de extrato enzimático

V_{SN} : volume de solução nutriente

x_{so} : fração de farelo de soja

X : conversão de celulose

Y : rendimento de nanocelulose

Y_c : fração de celulose na polpa

σ : razão de aspecto da nanocelulose

LISTA DE ABREVIATURAS

CMC: carboximetilcelulose

DNS: Ácido dinitrosalicílico

DRX: Difração de raios X

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

TGA: Termogravimetria

SUMÁRIO

1	Introdução.....	20
2	Revisão bibliográfica.....	23
2.1	Biomassa lignocelulósica	23
2.1.1	Celulose	24
2.1.2	Hemicelulose	25
2.1.3	Lignina.....	26
2.2	Fermentação.....	28
2.2.1	Fermentação submersa	28
2.2.2	Fermentação em estado sólido.....	30
2.3	Biorreatores de fermentação em estado sólido	32
2.3.1	Biorreator de bandeja.....	32
2.3.2	Biorreator de leito empacotado.....	33
2.4	Microrganismos	36
2.4.1	Fungos filamentosos	37
2.5	Enzimas	38
2.5.1	Endoglucanase	39
2.5.2	Exoglucanase	39
2.5.3	β -glicosidase	40
2.5.4	Xilanase	40
2.5.5	Celobiose desidrogenase.....	40
2.6	Nanocelulose	41
2.6.1	Nanofibras de celulose.....	43
2.6.2	Nanocristais de celulose	44
2.7	Considerações finais da revisão.....	44
3	Objetivos.....	46

	18
3.1	Objetivos gerais 46
3.2	Objetivos específicos 46
4	Material e métodos 47
4.1	Material..... 47
4.1.1	Fungos 47
4.1.2	Substratos 47
4.1.3	Sistema do biorreator..... Erro! Indicador não definido.
4.1.4	Solução de DNS 51
4.1.5	Solução tampão 52
4.1.6	Solução de CMC..... 53
4.1.7	Glicose liquiform..... 53
4.1.8	Solução de celobiose 53
4.2	Metodologia..... 53
4.2.1	Secagem dos substratos e peneiramento do bagaço 53
4.2.2	Preparação do inóculo 54
4.2.3	Planejamento experimental..... 55
4.2.4	Cultivo em embalagens plásticas..... 57
4.2.5	Extração das enzimas do material cultivado..... 59
4.3	Montagem e cultivos no biorreator de leite empacotado 59
4.4	Extração Enzimática dos módulos fermentativos..... 64
4.5	Hidrólise enzimática e obtenção de nanocelulose 64
4.5.1	Extração da nanocelulose 66
4.6	Quantificação de proteínas 67
4.7	Atividade de endoglucanase 68
4.8	Atividade de xilanase..... 69
4.9	Atividade Celobiase..... 70
4.10	Glicose liberada na hidrólise enzimática 71

4.11	Difração de raio X (DRX)	71
4.12	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	71
4.13	Análise termogravimétrica (TGA).....	72
4.14	Microscopia	72
4.15	Softwares	72
5	Resultados e discussões	73
5.1	Produção enzimática em embalagens plásticas	73
5.1.1	Atividade enzimática de endoglucanase e de celobiase	73
5.1.2	Síntese de proteínas e atividade específica dos extratos enzimáticos	79
5.2	Cultivos em biorreator	84
5.2.1	Perfis de temperatura durante a fermentação	85
5.2.2	Produção enzimática em biorreator	88
5.3	Obtenção de nanocelulose	100
5.3.1	Índice de cristalinidade.....	104
5.3.2	Composição química dos nanomateriais	104
5.3.3	Característica térmica	105
5.4	Nanocelulose obtida	108
6	Conclusão	110
7	Sugestões PARA trabalhoS FUTUROS	111
8	Referências	112

1 INTRODUÇÃO

Nanoceluloses são estruturas de celulose nas quais pelo menos uma de suas dimensões está na escala nanométrica. Esses nanomateriais apresentam um alto valor agregado por suas características como alta resistência mecânica, alta rigidez, propriedade de barreira. Por causa de suas propriedades, a nanocelulose possui um potencial para diversas aplicações, tais como melhorar a impermeabilidade de embalagens (AULIN; STRÖM, 2013) e torná-las antimicrobianas (LEITE et al., 2020), utilização para produção de hidrogéis para cultivo de células animais (RAJA et al., 2021; TANG et al., 2021; YOON et al., 2014), tratamento de lesões (XU et al., 2019), eletrônicos verdes (HEISE et al., 2021; ZHU et al., 2016), reforços mecânicos e térmicos em polímeros (GAN et al., 2020), entre outros. Devido a ampla gama de aplicações, houve um grande aumento de publicações de artigos e patentes na última década relacionada à nanocelulose (RIBEIRO et al., 2019). Além disso, a nanocelulose pode ser obtida a partir de materiais lignocelulósicos, o que a torna interessante como um produto de alto valor agregado em biorrefinarias (FARINAS; MARCONCINI; MATTOSO, 2018; GARCÍA et al., 2016).

O conceito de biorrefinaria envolve o uso de biomassa lignocelulósica, resíduos agroindustriais e materiais ricos em celulose para serem convertidos em biocombustíveis e outros bioprodutos através de uma série de processos (CHERUBINI, 2010). O combustível proveniente de uma biorrefinaria seria de uma fonte limpa e renovável por utilizar materiais celulósicos como matéria prima. No entanto, o conceito de biorrefinaria ainda encontra diversas dificuldades relacionadas à logística, limitações tecnológicas e econômicas (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2019).

Uma das dificuldades técnicas está na conversão eficiente do material lignocelulósico, que é um material recalcitrante, em açúcares fermentescíveis (BHUTTO et al., 2017; SUN; CHENG, 2002). A conversão dos materiais lignocelulósicos em açúcares solúveis ou nanocelulose pode ser realizada por hidrólise ácida ou enzimática.

A hidrólise ácida para obtenção de nanocelulose utiliza, na maioria dos casos, ácido sulfúrico como reagente (BILATTO et al., 2020; RIBEIRO et al., 2019) e por isso gera resíduos ácidos com necessidade de tratamento. Um grande volume de água é utilizado no processo, além de equipamentos que sejam resistentes ao ácido gerado. Em contrapartida, a reação enzimática ocorre em condições brandas de pH e, por isso, é

considerada ambientalmente amigável (RIBEIRO et al., 2019). Apesar disso, a hidrólise ácida ainda é a mais economicamente viável, principalmente quando se deseja obter a nanocelulose (ROSALES-CALDERON; PEREIRA; ARANTES, 2021), já que os processos com hidrólise ácida têm rendimentos maiores e menores tempos de reação.

De acordo com ROSALES-CALDERON; PEREIRA; ARANTES, (2021) um dos problemas da hidrólise enzimática para se obter nanocelulose é a indisponibilidade de um coquetel enzimático que seja específico para a produção de nanocelulose. Outro problema é o alto custo de enzimas (BHATI; SHREYA; SHARMA, 2021), o que torna o processo por hidrólise enzimática mais oneroso quando comparado à rota ácida. Assim, pelo apelo de ser ambientalmente amigável, estudos recentes focam em viabilizar a hidrólise enzimática para obter nanocelulose (RIBEIRO et al., 2019; SQUINCA et al., 2020).

Uma das possíveis estratégias para melhorar a obtenção de nanocelulose pela rota enzimática seria produzir um coquetel enzimático que fosse rico em endoglucanase e pobre em β -glicosidase (RIBEIRO et al., 2019; SIQUEIRA; DIAS; ARANTES, 2019a) e, para isso, é essencial que se escolha um microrganismo que produza as proteínas nessas condições. Os microrganismos mais utilizados comercialmente para a produção dessas enzimas são os fungos filamentosos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*. No entanto, trabalhos recentes vêm mostrando o potencial do fungo termófilo *Myceliophthora thermophila* para a produção de endoglucanase (CASCIATORI et al., 2015; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019; ZANELATO et al., 2012). A utilização de microrganismos termófilos tem a vantagem de produzir enzimas termoestáveis, podendo-se utilizar temperaturas elevadas no processo de hidrólise, evitando a contaminação e também possibilitando que as enzimas penetrem mais facilmente no substrato, já que a porosidade expandirá com o aumento da temperatura (BRUINS; JANSSEN; BOOM, 2001; COWAN, 1997; PAËS; O'DONOHUE, 2006).

Com relação ao custo elevado de enzimas comerciais, uma alternativa é utilizar a fermentação em estado sólido para sua produção. A fermentação em estado sólido utiliza resíduos agroindustriais como principal substrato e abre a possibilidade para a produção de coquetéis enzimáticos *in house*. A fermentação em estado sólido é também a condição ideal para cultivo de fungos, já que esse processo mimetiza o ambiente natural do fungo com ausência de água livre (FARINAS, 2015). No entanto, a geração de calor durante o cultivo microbiano e a natureza heterogênea da fermentação em estado sólido torna difícil o processo de aumento de escala. Assim, estudos e avanços têm sido feitos para propor novos tipos de biorreatores para a fermentação em estado sólido, como os biorreatores de

leito empacotado (CASCIATORI et al., 2016; MITCHELL et al., 2010; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019).

PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019) estudaram o efeito da vazão de ar na ampliação de escala em biorreator de leito empacotado durante o cultivo do fungo *M. thermophila*, para a produção de endoglucanase. MITCHELL et al. (2010) propuseram outros modos de operação através da movimentação de módulos fermentativos com o biorreator de leito empacotado em multicamadas, além do modo em batelada. Os modos propostos foram *plug flow* e troca periódica de posição de módulos com a intenção de evitar acúmulo de calor em um ponto específico do biorreator ao longo de todo o cultivo. O modo *plug flow* foi o que apresentou melhores resultados com o fungo *A. niger*. DE OLIVEIRA et al. (2020b) trabalharam com o biorreator de leito empacotado em multicamada com *M. thermophila* nos modos de operação batelada e *plug flow* e, apesar de nenhum dos módulos apresentar grandes problemas de elevação de temperatura, o modo *plug flow* apresentou resultados ligeiramente melhores. Além disso, DE OLIVEIRA et al. (2020b) também estudaram a possibilidade de extração enzimática por percolação de água e, por esse processo, conseguiram extrair em torno de 85% das enzimas contidas no material cultivado. Esses trabalhos indicam que o biorreator de leito empacotado em multicamadas se mostra uma boa opção para a produção de um coquetel enzimático de celulase que possa ser usado para hidrolisar a biomassa lignocelulósica visando a obtenção de nanocelulose.

Visto isso, este trabalho teve como objetivo produzir um coquetel enzimático termostável rico em endoglucanase, pelo o fungo *M. thermophila* em biorreator de leito empacotado e empregar esse coquetel para determinar a melhor condição para a obtenção de nanocelulose, destacando-se a vantagem da produção das enzimas *in house*. Para isso, foram realizados experimentos de fermentação em estado sólido em escala de bancada utilizando planejamento fatorial completo para obter um coquetel enzimático rico em endoglucanase e pobre em β -glicosidase. Após estes ensaios, as condições que proporcionaram a obtenção do melhor coquetel enzimático foram reproduzidas em biorreator de leito empacotado de multicamadas para produção de maior quantidade de enzimas e validar os resultados em um equipamento em escala ampliada. O efeito da temperatura na reação de hidrólise com o coquetel enzimático termostável foi avaliado para a obtenção de nanocelulose e, por fim, o produto foi caracterizado por DRX, FTIR e TGA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

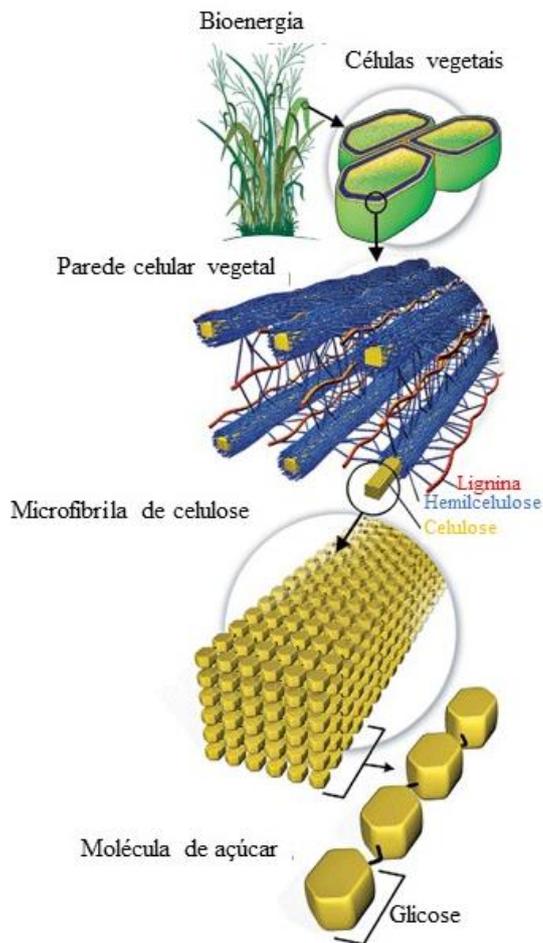
O material lignocelulósico está presente na biomassa vegetal como na madeira de angiospermas e gimnospermas e plantas gramíneas como a cana de açúcar, trigo, entre outros. Os componentes majoritários da biomassa lignocelulósica são a celulose, a hemicelulose e a lignina além de outros componentes como proteínas, lipídeos, pectinas, açúcares solúveis e minerais (HORN et al., 2012).

A biomassa lignocelulósica é recalcitrante e esta característica se deve a estrutura da parede das células vegetais, na qual é contida uma rede de polissacarídeos, proteínas glicosiladas e lignina (Figura 1) (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Essa recalcitrância funciona como mecanismo de proteção contra microrganismos ou enzimas para os vegetais. Outros fatores contribuem para a recalcitrância da biomassa vegetal como o tecido epidérmico da planta, particularmente a cutícula e ceras epicuticular, o grau de lignificação, a complexidade da parede celular como microfibrila e polímeros da matriz, entre outros (ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

Por ser considerada uma fonte renovável, ela tem despertado interesse pois através de processos químicos é possível converter parte da biomassa em bioprodutos de alto valor agregado como o biocombustível ou a nanocelulose. No entanto, devido à alta recalcitrância e à complexa estrutura baseada na celulose, hemicelulose e lignina, são necessários pré-tratamentos antes do processo de conversão de biomassa e esses têm sido um desafio para a viabilidade de uma biorrefinaria. Os pré-tratamentos consistem em deixar a celulose e hemicelulose mais expostas, removendo a lignina.

Os processos da conversão da biomassa podem ser feitos através de microrganismos como bactérias ou fungos que secretam enzimas que conseguem agir na biomassa. O pré-tratamento auxilia deixando a celulose e a hemicelulose mais acessíveis as enzimas.

Figura 1 – Figura demonstrando a estrutura do material lignocelulósico.



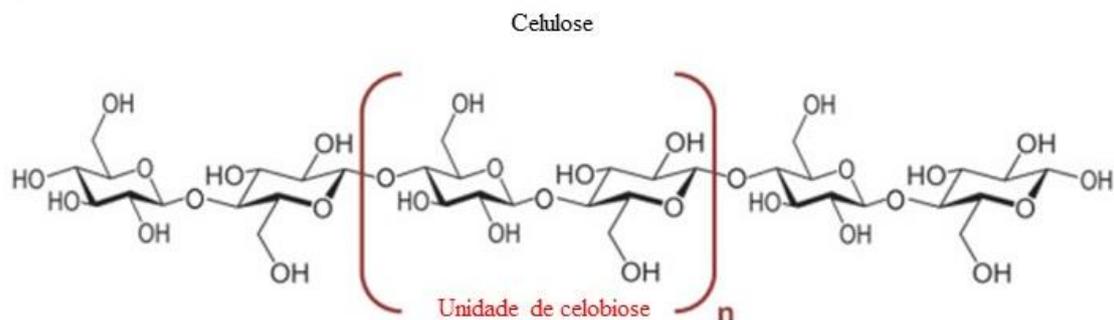
Fonte: Ritter, S. K. (2008).

A seguir, serão apresentados os principais constituintes da biomassa lignocelulósica, que são a celulose, a hemicelulose e a lignina.

2.1.1 Celulose

Celulose, derivado do latim células pequenas, é um polímero natural que contém várias unidades de glicose conectadas por ligações glicosídicas β -1,4. É o polímero mais abundante na natureza e o constituinte principal da parede celular vegetal. Das plantas, o algodão é o mais rico em celulose, com 90% em sua composição; em madeira, a quantidade de celulose está entre 40 e 50%. Celulose pode ser encontrada também em outras espécies como bactérias e algas (BÖRJESSON; WESTMAN, 2015).

Figura 2 – Estrutura molecular da celulose e indicação da molécula de celobiose.



Fonte: FRASSOLDATI, A.; RANZI, E. (2019).

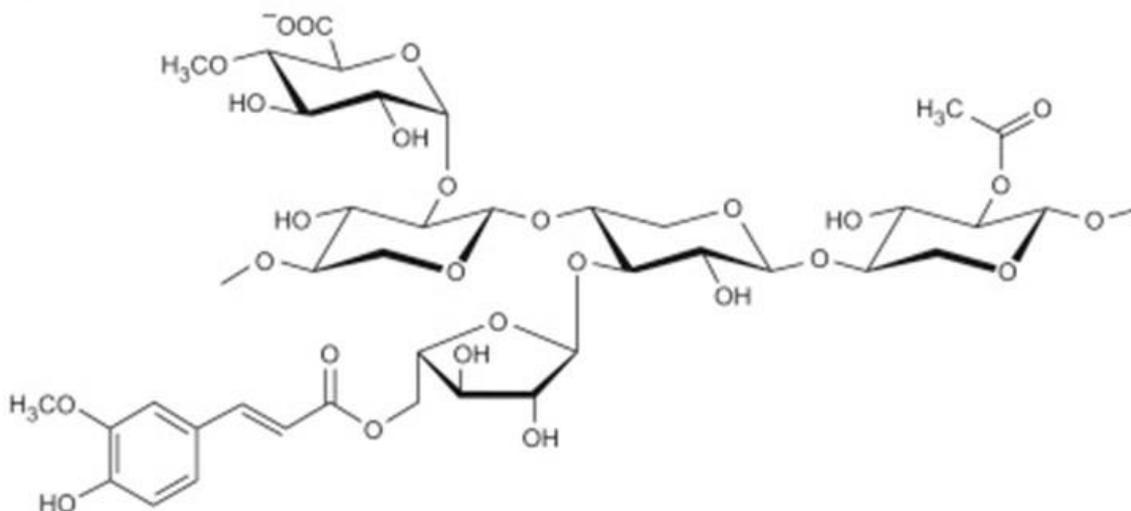
O polímero de celulose consiste em um polissacarídeo linear formado por anidroglicopyranose unida por ligação β -1,4-glicosídica. A menor unidade de repetição é a celobiose (Figura 2). A estrutura linear e regular da celulose e muitos grupos hidroxilas na molécula são responsáveis por sua estrutura cristalina, cuja configuração é mantida junta por ligações de hidrogênio (HORN et al., 2012). Apesar da alta cristalinidade, ela apresenta regiões amorfas. A região cristalina fornece importantes propriedades mecânicas às fibras de celulose. Devido a essa estrutura, a celulose é insolúvel em água e resistente a ações de enzimas digestivas. O alto grau de cristalinidade também garante aos vegetais força, rigidez e estabilidade.

2.1.2 Hemicelulose

Hemicelulose é o segundo polissacarídeo dominante dos vegetais, sendo seu conteúdo em torno de 20-35% em madeira seca, atrás apenas da celulose. Diferente da celulose, a hemicelulose é composta de diferentes unidades de monossacarídeos (Figura 3), sendo estes pentoses e hexoses. Devido a isso, a estrutura da hemicelulose é complexa, já que inclui glicose, xilose, manose, galactose, arabinose, frutose e ácido glucurônico (Figura 4). A composição de unidades monoméricas varia de acordo com a fonte da hemicelulose (MACHMUDAH et al., 2017).

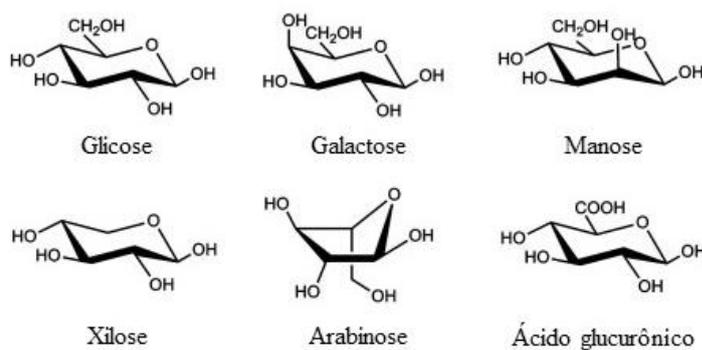
A estrutura randômica, heterogênea e amorfa torna a hemicelulose menos resistente, mais suscetível a hidrólise e também mais solúvel e instável. A hemicelulose é solúvel em hidróxido de sódio (NaOH) 18,5% e em água quando a temperatura está em torno de 180 °C (BAJPAI, 2018).

Figura 3 – Exemplo da estrutura molecular da hemicelulose.



Fonte – MACHMUDAH et al. (2017).

Figura 4 – Principais monômeros que formam a hemicelulose.



Fonte: LI et al. (2013).

Um dos principais componentes da hemicelulose é a xilana, que é um polissacarídeo formado por ligações β -1,4-xilose, representando em torno de 20% da composição da hemicelulose. A xilana forma uma rede complexa recobrando e conectando os cristaltos de celulose. Além disso, a xilana limita a hidrólise de celulose, já que a biomassa com alta xilana tende a ter uma baixa velocidade na hidrólise (AWANO; TAKABE; FUJITA, 2001).

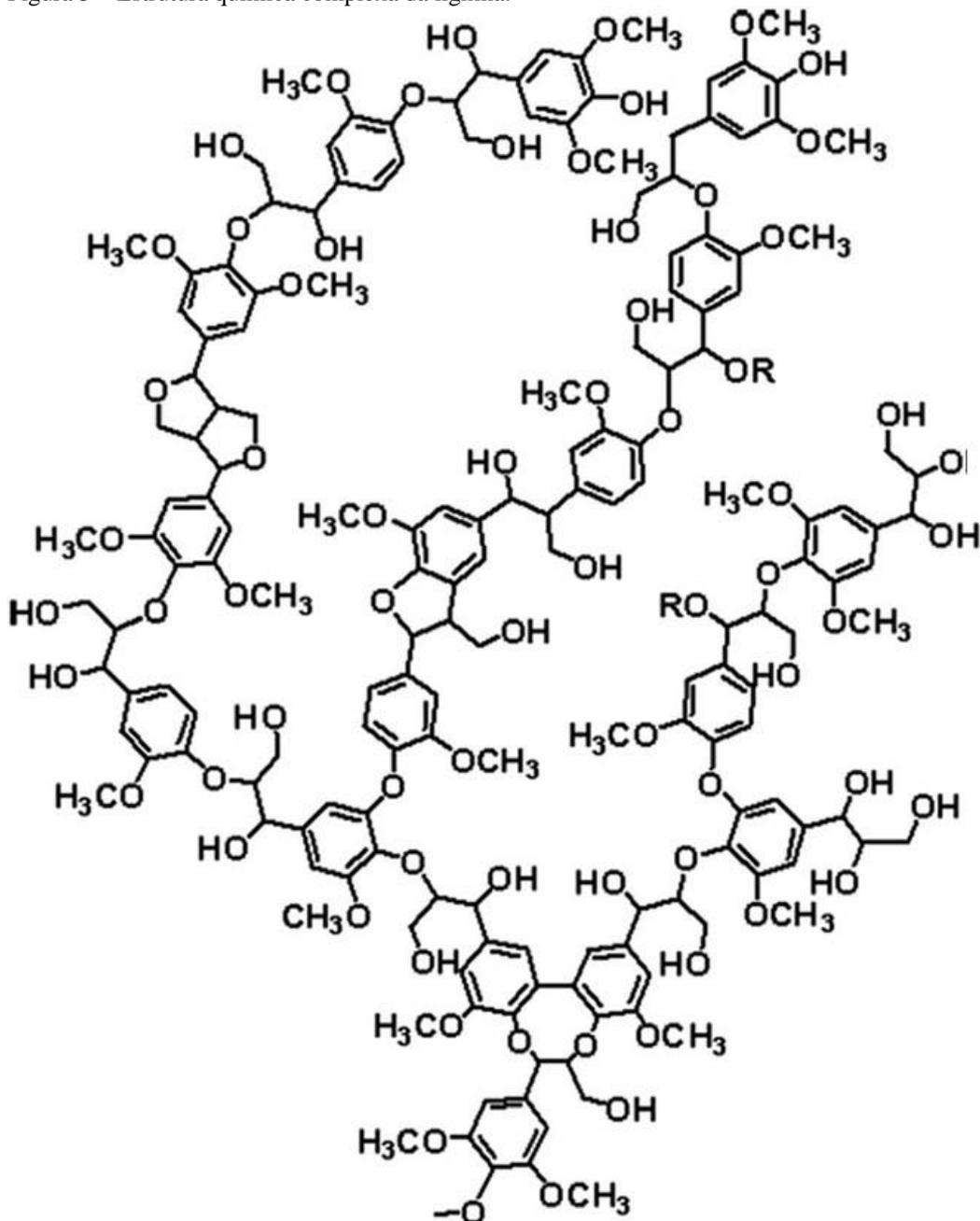
2.1.3 Lignina

Lignina, que significa madeira em latim, é uma macromolécula complexa constituída de álcoois aromáticos (Figura 5). Algumas funções específicas da lignina nos vegetais são fornecer rigidez em plantas como gramas e árvores, impermeabilizar, agir

como barreira contra insetos e fungos e auxiliar no transporte de líquidos por toda a estrutura vegetal (ASHTER, 2018).

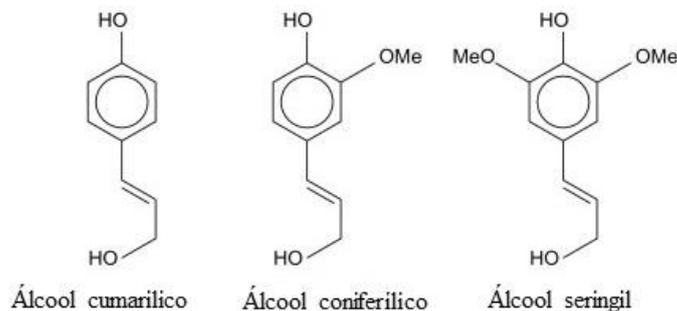
A estrutura química da lignina é extremamente complexa, o que a torna inerte e insolúvel em quase todos os solventes. A estrutura principal da lignina constitui-se de três diferentes monômeros fenólicos: álcool coniferílico, álcool seringil e álcool cumarílico (Figura 6) (ASHTER, 2018).

Figura 5 – Estrutura química complexa da lignina.



Fonte: PRIEUR et al. (2017).

Figura 6 – Principais monômeros presentes na lignina.



Fonte: ASHTER (2018).

2.2 FERMENTAÇÃO

A palavra fermentação era usada para designar a conversão anaeróbia que convertia a glicose a metabólitos orgânicos como ácido lático, etanol, acetona, butanol, ácido acético e outros produtos. No entanto, o termo é atualmente utilizado também para conversão enzimática e microbiana mesmo sob condições aeróbicas. Historicamente, fermentação era majoritariamente utilizada em alimentos, já que a liberação de álcool, ácido acético e ácido lático contribuíam para sua preservação. Eventualmente, a fermentação começou a ser utilizada em outros tipos de alimentos como cerveja, pães e queijo com a finalidade de conferir textura e sabor (MALO; URQUHART, 2016).

Atualmente, o processo fermentativo é utilizado para a obtenção de alimentos como vinagre, ácido lático, iogurte, pães, queijos, entre outros (MALO; URQUHART, 2016), para biocombustíveis como o etanol (KRISHNAN et al., 2020; YANG; LIU; ZHANG, 2007) e para obtenção de enzimas (BHATI; SHREYA; SHARMA, 2021; BUFFO et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2020b; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019). O processo de fermentação alcoólica em conjunto com a produção de enzimas pode ser importante para o processo de produção de etanol 2G e de outros bioprodutos em uma biorrefinaria (HASSAN; WILLIAMS; JAISWAL, 2019; LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014).

A seguir são apresentados os tipos de processos de fermentação: a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido.

2.2.1 Fermentação submersa

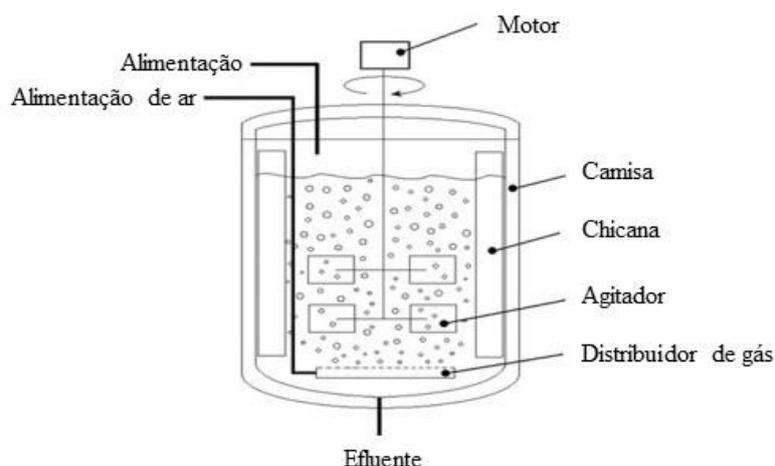
O processo de fermentação submersa ocorre quando microrganismos como bactérias ou fungos são inoculados em um líquido que contem substratos necessários para o crescimento e manutenção dos microrganismos. Os substratos podem estar dissolvidos

ou em suspensão. O líquido normalmente é homogeneizado por um agitador e pode ser oxigenado por aeração. Em equipamentos mais sofisticados (Figura 7), pode haver ainda monitoramento e controle de temperatura e pH.

Uma das vantagens da fermentação submersa é a eficiência da transferência de massa e calor, fácil esterilização, monitoramento e controle de pH e temperatura, extração e recuperação de proteínas, bioativos e automaticidade. Além disso, é possível conduzir o bioprocesso em diversos modos de operação como batelada, batelada alimentada ou contínuo. Em contrapartida, há algumas desvantagens para a fermentação submersa, como para a produção de enzimas. O custo do processo pode ser elevado, pois é obtida uma baixa concentração de produto que requerem diversas etapas adicionais para concentração e purificação (KRONTRAS; GATENHOLM; HAGG, 2015; SINGHANIA et al., 2010; YOON et al., 2014). Outra desvantagem é que em cultivos de fungos filamentosos, o processo de homogeneização pode alterar a estrutura morfológica do fungo (BUFFO et al., 2021), pois o cisalhamento gerado durante a mistura pode alterar a estrutura do fungo, alterando o metabolismo, o que pode não ser benéfico na obtenção do produto de interesse.

O processo de fermentação submersa é utilizado para produção de etanol, ácidos orgânicos como o ácido cítrico, ácido glucônico, ácido lático, ácido acético (MOREIS; PARENTE, 2014) e enzimas (BHATI; SHREYA; SHARMA, 2021). Para a produção de enzimas, no entanto, a maior desvantagem se deve ao longo tempo de incubação com menor produção (BHATI; SHREYA; SHARMA, 2021). Apesar dessa desvantagem, as enzimas comerciais são produzidas pelo método de fermentação submersa (SRIVASTAVA et al., 2018), devido ao fato de esta metodologia já ser bastante utilizada nos processos fermentativos. Porém, como alternativa à fermentação submersa, há a fermentação em estado sólido, que pode ocorrer de forma estática e pode ser benéfica para cultivos de fungos visando à produção de enzimas.

Figura 7 – Modelo de um biorreator utilizado para fermentação submersa.



Fonte: Shuler, M. L.; Kargi, F. (2002).

2.2.2 Fermentação em estado sólido

Diferente da fermentação submersa, a fermentação ou cultivo em estado sólido ocorre na ausência de um caldo, apenas com os substratos sólidos umidificados que podem ser posteriormente umidificados e o microrganismo. O teor de umidade requerido para o crescimento de microrganismos é suprido pelo líquido que os substratos absorvem. Uma das vantagens de se cultivar microrganismos em meio sólido é por esta condição mimetizar o ambiente natural de alguns microrganismos como os fungos filamentosos, já que eles crescerem naturalmente em substratos com baixa atividade de água. Além disso, um dos substratos que podem ser utilizado no cultivo são os resíduos agroindustriais, que são materiais lignocelulósicos e que teriam uma finalidade além da incineração (PANDEY, 2003).

Por utilizar resíduos agroindustriais como principal matéria-prima, diferentes tipos de substratos sólidos têm sido estudados para fermentação. DE ALMEIDA et al. (2019) utilizaram capim gamba e DE ALBUQUERQUE; GUIMARÃES; DE REZENDE (2020) utilizaram farinha de beterraba para produzir um coquetel de celulase para sacarificar bagaço de cana. PALUZAR; TUNCAY; AYDOGDU (2021) empregaram polpa de girassol para produzir lipase e SALES et al. (2020) utilizaram casca de melancia como substrato suplementar para aumentar a atividade de lipase e esterase.

A fermentação em estado sólido é um processo antigo muito utilizado no processamento de alimentos como o queijo e o pão. No entanto, principalmente no ocidente, a fermentação submersa, na qual os microrganismos crescem em um ambiente

líquido, prevaleceu após 1940, pois foi nesta época que houve a produção em grande escala da penicilina. Por este motivo, toda a atenção na pesquisa e desenvolvimento foi voltada para a fermentação submersa. A vantagem da utilização da fermentação submersa foi pela facilidade de controle do processo, como o monitoramento de pH, oxigênio dissolvido, temperatura e concentração de água e substratos e pela homogeneidade (FARINAS, 2015).

Devido ao crescimento global das agroindústrias, a fermentação em estado sólido despertando interesse. Parte desse ressurgimento se deve ao fato de a fermentação em estado sólido poder utilizar os resíduos agroindustriais como substrato principal, já que estes servem tanto como suporte sólido quanto como fonte de carbono e nutrientes. Outro grande motivo é que a fermentação em estado sólido é uma etapa importante na geração de biocombustíveis. Os biocombustíveis surgem como fonte alternativa aos combustíveis de origem fóssil. Segundo Pandey (2003) e Soccol *et al.* (2017), houve um grande aumento no número de patentes e publicações na fermentação em estado sólido devido a essas utilidades.

Os microrganismos mais utilizados na fermentação em estado sólido são os fungos filamentosos. Um dos motivos é que esses têm melhor desempenho quando o substrato está em baixa atividade de água. Outro motivo é que esses fungos não são favorecidos em fermentação submersa, pois neste caso meio líquido é constantemente homogeneizado por agitadores e as forças hidrodinâmicas geradas por esses agitadores prejudicam a formação dos filamentos.

A escolha do microrganismo na fermentação está ligada com o produto de interesse que se deseja produzir e um dos possíveis produtos de interesse são as enzimas, como celulase e lipase que podem ser utilizadas para a síntese de biocombustíveis como o bioetanol e o biodiesel (FARINAS, 2015). Ainda de acordo com Soccol *et al.* (2017), a maioria das publicações sobre a fermentação em estado sólido está ligada à produção de enzimas, principalmente a celulases e a xilanase. Também foi reportado que o fungo *T. reesei* apresentou maior rendimento na produção do coquetel enzimático de celulase na fermentação em estado sólido do que na submersa (CHAHAL, 1985).

Um dos maiores desafios se utilizar a fermentação em estado sólido em escala industrial é que esta produz grande quantidade de calor, que é proporcional às atividades metabólicas do microrganismo. Parte da dificuldade da remoção deste calor é que os substratos sólidos utilizados neste tipo de fermentação têm baixa condutividade térmica, podendo acarretar o acúmulo de calor e consequentemente interferir no crescimento do

microrganismo. Além disso, a alta temperatura pode desnaturar o produto de interesse. Também há falta de informações sobre a modelagem de equações cinéticas relacionadas a microrganismos em fermentação em estado sólido (PANDEY, 2003). Essas questões são alguns dos motivos que levam à dificuldade de se aumentar a escala da fermentação em estado sólido. Apesar disso, já se têm avanços em propostas de fermentadores de grandes escalas (ARORA; RANI; GHOSH, 2018; MITCHELL et al., 2010).

2.3 BIORREADORES PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

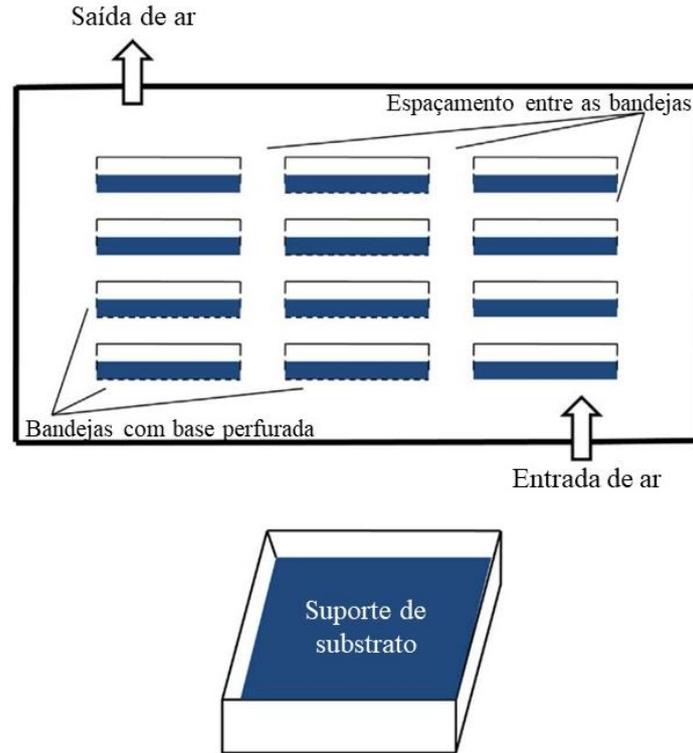
Há várias classificações de biorreatores em estado sólido encontradas na literatura. Os biorreatores de bandeja e o biorreator de leito empacotado são os equipamentos operados em modo estático, dos quais mais se encontram informações na literatura.

2.3.1 Biorreator de bandeja

Este tipo de biorreator tem o design simples, sendo composto por várias bandejas contendo a biomassa com o microrganismo; essas bandejas são inseridas em uma câmara na qual há circulação constante de ar úmido e temperatura constante (Figura 8). Esse modelo já tem sido usado para fermentação de alimentos como o missô e o shoyu (ZHU; TRAMPER, 2013). As bandejas podem ser feitas de vários materiais como madeira, metal ou plásticos e podem ser ou não perfuradas (ARORA; RANI; GHOSH, 2018). As perfurações das bandejas ajudam o fornecimento de ar aos fungos.

O aumento de escala deste tipo de biorreator está ligado com o aumento da superfície das bandejas e o aumento do número de bandejas. Esse tipo de biorreator já está sendo usado em escala laboratorial e comercial para produção de enzimas devido a sua simplicidade. No entanto, devido à alta quantidade de bandejas necessárias para produção em grande escala, esse biorreator se torna desinteressante (FARINAS, 2015).

Figura 8 – Modelo esquemático do biorreator de bandejas.



Fonte: ALI; ZULKALI, 2011; ARORA; RANI; GHOSH, 2018.

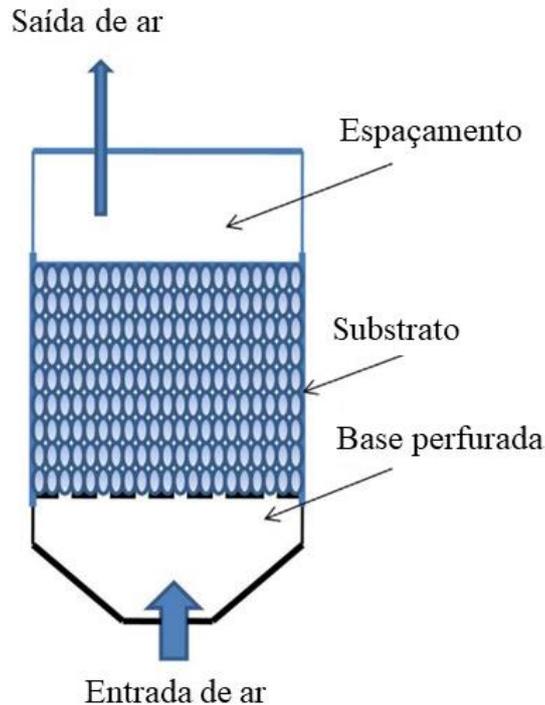
2.3.2 Biorreator de leito empacotado

O biorreator de leito empacotado consiste em uma coluna, podendo ser de metal ou vidro (ARORA et al., 2018), cuja base é perfurada para permitir a passagem de ar. No interior da coluna é colocado o substrato, onde irá ocorrer o crescimento do microrganismo. Essas colunas podem ser encamisadas para facilitar a troca de calor entre o meio sólido e o líquido da camisa. Nesse tipo de biorreator, um fluxo de ar passa por toda a biomassa (Figura 9), o que permite fornecimento de oxigênio e retirada de dióxido de carbono por convecção forçada. Um dos grandes problemas em se aumentar a escala deste tipo de biorreator está associado ao calor gerado acumulado no leito devido ao crescimento, sua heterogeneidade e a perda de carga gerada durante a passagem do ar.

Para diminuir o problema do calor acumulado no leito, Mitchell et al. 2010 propuseram um modelo alternativo deste tipo de biorreator, que foi denominado biorreator de leito empacotado de multicamadas. Neste modelo, cada módulo, com a biomassa em seu interior, consiste em uma camada, sendo que a base deste módulo é perfurada para a passagem de ar. Acima deste módulo, poderão ser conectados n módulos em condições similares, com a biomassa em seu conteúdo interno e com a base do módulo

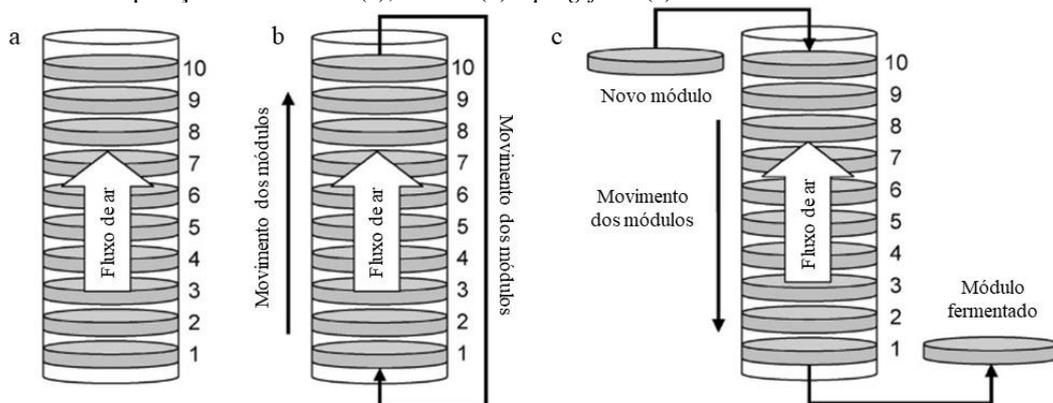
perfurada, formando um biorreator com o formato de uma torre. Nesse modelo proposto, o fluxo de ar entra pela base da torre e sai pelo topo (Figura 10 – a).

Figura 9 – Diagrama esquemático de um biorreator de leito empacotado.



Fonte: ARORA; RANI; GHOSH, 2018.

Figura 10 – Modelo do biorreator de leito empacotado em multicamadas proposto por Mitchell *et al.* 2010 nos modos de operação em batelada (a), cíclica (b) e *plug-flow* (c).



Fonte: MITCHELL *et al.*, 2010.

Em biorreator de multicamadas com 10 módulos para fermentação (Figura 10 – a), Mitchell *et al.* 2010 simularam, através de equações matemáticas, o perfil de calor gerado pelo metabolismo do fungo *A. niger* em cada módulo. O resultado mostrou que a temperatura aumenta conforme aumenta a altura do módulo. O motivo deste aumento de

temperatura é devido ao acúmulo de calor, já que o calor gerado no módulo 1 é transferido através do fluxo de ar para o módulo 2, que também gera calor e transfere para os módulos acima, e assim sucessivamente.

Para tentar reduzir o problema de calor acumulado no leito, Mitchell et al. 2010 propuseram outros modos de operação, como o cíclico (Figura 10 – b) e o *plug-flow* (Figura 10 – c). No modo cíclico, os módulos são movimentados do topo para a base a cada hora e, por esse motivo, cada módulo é exposto a diferentes temperaturas. Esse modo, no entanto, não evitou altas temperaturas, que por sua vez afetariam a cinética de crescimento do fungo.

Na simulação do modo *plug-flow*, um módulo novo é colocado no topo do biorreator ao mesmo tempo que um módulo é retirado na base a cada 3 horas e 30 minutos. Um modo contínuo é atingido após 20 módulos passarem pelo biorreator. Nesse modo de operação, o módulo mais novo é aquecido rapidamente devido ao calor gerado na fermentação nos módulos mais baixos e transportados pelo ar. À medida que os módulos vão descendo, a temperatura vai decrescendo por estarem expostos a um menor acúmulo de calor e estarem mais próximos do fluxo de entrada de ar. Pelo fato de os módulos estarem mudando de posição constantemente, esse modo de operação teve o menor acúmulo de temperatura. Os resultados de Mitchell et al. 2010, indicaram que este é o melhor modo de operação por evitar altas temperaturas indesejáveis.

No trabalho de PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019), foi estudado o biorreator de leito empacotado com o fungo *M. thermophila*. Neste trabalho, foi avaliada a velocidade de entrada de ar que produzisse mais enzima (endoglucanase e xilanase) e foi monitorada a temperatura em várias alturas do leito. Os pontos mais altos do biorreator foram os que atingiram maior temperatura, excedendo 14 °C da temperatura controle, e isso pode ter afetado a produção de enzimas.

No trabalho de DE OLIVEIRA et al. (2020b), encontra-se uma aplicação experimental do biorreator de leito empacotado proposto por Mitchell et al. (2010). DE OLIVEIRA et al. (2020b) trabalharam nos modos de operação batelada e *plug-flow* com o fungo *M. thermophila*. Diferentemente do que foi reportado no trabalho de PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019), a temperatura máxima excedeu 2,9 °C no modo batelada e 2,7 °C no modo *plug-flow*, o que indica que o modo contínuo conseguiu diminuir ligeiramente o acúmulo de temperatura e que esse biorreator pode proporcionar uma troca térmica melhor que o de PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019). Além disso, este trabalho estudou a extração enzimática utilizando os próprios módulos

(camadas) do biorreator. Neste caso, foi utilizada uma vazão de água destilada para entrar no módulo do biorreator, de baixo para cima, e realizar a extração por percolação. Foi possível extrair em torno de 85% de enzimas por este método.

2.4 MICRORGANISMOS

Os microrganismos são muito utilizados em processo de fermentação para produzir algum produto de interesse. Alguns microrganismos utilizados na fermentação são a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol (COSTA et al., 2021), o fungo *Talaromyces amestolkiae* para produzir colorante natural (DE OLIVEIRA et al., 2020a), *T. reesei*, *A. niger* e *M. thermophila* para produzir a enzima celulase (BENOCCI et al., 2017; BUFFO et al., 2021; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019), entre outros. Uma maneira de se classificar os microrganismos são como mesófilos e termófilos.

Os microrganismos mesófilos são aqueles que se adaptam melhor a crescimento em temperatura ambiente ou temperatura de algum organismo desenvolvido, sendo a temperatura entre 20 a 45 °C. Os microrganismos termófilos tem a temperatura de crescimento entre 40 e 60 °C (GLEESON; O'CONNELL; JORDAN, 2013), apesar de algumas bactérias conseguirem crescer a temperaturas entre 70 e 75 °C (HOLDEN, 2009). Uma das vantagens no uso de microrganismos termofílicos é que as moléculas de interesse por eles produzidas, como enzimas, são termoestáveis. Além disso, foi reportado que fungos termófilos produzem mais celulase que os fungos mesófilos, já que os fungos termófilos *Chaetomium thermophile*, *Sporotrichum thermophile* e *Thermoascus aurantiacus* apresentaram atividade três vezes maior que o fungo mesófilo *Trichoderma viridae* (ACHARYA; CHAUDHARY, 2012; FOLAN; COUGHLAN, 1978). Outra vantagem de se trabalhar com microrganismos termófilos é que eles são menos suscetíveis a contaminação, já que os microrganismos presentes no ambiente tendem a não sobreviver sob a temperatura de cultivo do microrganismo termófilo. Apesar de a produção de enzima termoestável ser uma característica de fungos termófilos, eles não são exclusivos a proporcionar esta vantagem, já que alguns fungos mesófilos podem produzir proteínas termoestáveis, como *Aspergillus terreus* (SRIVASTAVA et al., 2018).

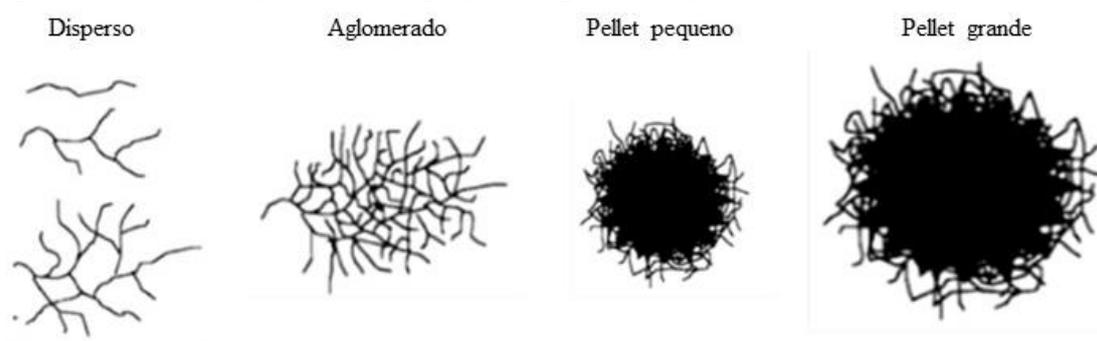
Quando se trata de produzir enzimas, os microrganismos mais interessantes para a produção dessas proteínas são os fungos filamentosos (BAKRI; JACQUES; THONART, 2003; RAWAT et al., 2014).

2.4.1 Fungos filamentosos

Para a produção de enzimas, como a celulase, os fungos filamentosos conseguem secretar uma maior quantidade de proteínas que as bactérias, além destes conseguirem utilizar o substrato de maneira mais versátil e ter habilidade de penetrá-los. (SRIVASTAVA et al., 2018). Apesar de os fungos serem a melhor fonte de produção de enzimas, como o coquetel de celulase, são raros os fungos com a capacidade de excretar todos os componentes do coquetel de forma que este sacarifique completamente a biomassa lignocelulósica. Apesar disso, há formas de induzir o fungo a produzir mais de uma determinada enzima.

Um dos fatores que pode alterar a produção de enzimas é a morfologia dos fungos (Figura 11). BUFFO et al. (2021) observaram que a morfologia do fungo pode alterar a produção de enzimas em uma fermentação submersa de pequena escala, realizada em shaker. Neste trabalho, foi observado que, em fermentações nas quais o fungo *A. niger* estava na forma dispersa (Figura 11), houve uma baixa produção de endoglucanase e uma alta produção de β -glicosidase, enquanto quando os fungos foram cultivados na forma de pellet, houve uma alta produção de endoglucanase e uma baixa produção de β -glicosidase. Isso indica que é possível explorar a morfologia do fungo para produzir seletivamente uma enzima de interesse.

Figura 11 – Diferentes tipos de morfologia que o fungo *A. niger* pode assumir.



Fonte: BUFFO et al. (2021).

Os fungos mais utilizados para produzir coquetéis de celulase comercialmente são os fungos *A. niger* e *T. reesei*, que são fungos mesófilos. Um fungo que vem se destacando para produção de coquetel de celulase é *M. thermophila* (PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019; SINGH, 2016; ZANELATO et al., 2012) tanto em cultivos submersos quanto sólidos, o que o torna um bom candidato para produzir enzimas industrialmente (SINGH, 2016). Além disso, ele é um microrganismo

termoestável, o que indica que é possível cultivá-lo em temperatura elevada. Outro motivo para este fungo se destacar é o fato de produzir enzimas oxidativas, que trabalham sinergicamente com a celulase na desconstrução da biomassa lignocelulósica (DOS SANTOS et al., 2016; KADOWAKI et al., 2018).

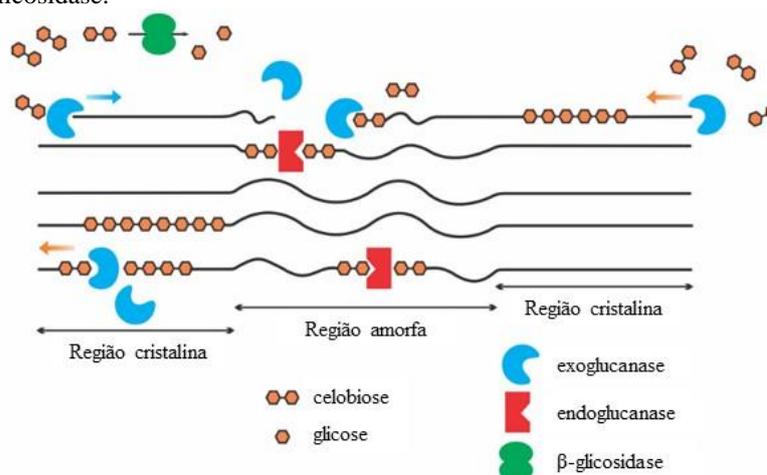
2.5 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores que em condições moderadas de temperatura e pH realizam reações com alta eficiência (BLANCO; BLANCO, 2017). Um dos produtos mais comuns na fermentação em estado sólido são as enzimas. Um dos motivos é que os microrganismos que melhor se adaptam a fermentação em estado sólido são os fungos filamentosos que são bons produtores de enzimas. Uma das vantagens das enzimas produzidas por fermentação em estado sólido é que elas apresentam menos problemas de inibição, são mais estáveis a pH e temperatura e são extracelulares, o que facilita o processo de extração (ACUÑA-ARGÜELLES et al., 1995). Uma enzima na qual se tem grande interesse para um processo em biorrefinaria é a celulase, por sua capacidade de converter celulose em glicose e também em nanocelulose (BONDANCIA et al., 2017; SIQUEIRA; BRAS; DUFRESNE, 2010; SQUINCA et al., 2020).

A celulase é um coquetel enzimático utilizado para transformação da celulose, que é um polissacarídeo formado por unidades de glicose, em moléculas glicose (WRIGHT; WYMAN; GROHMANN, 1988) (Figura 12), que por sua vez podem ser convertidas em etanol através de uma fermentação alcoólica. Esse processo acaba sendo interessante para uma biorrefinaria que utiliza material lignocelulósico para a obtenção de biocombustível.

Para a utilização de enzimas na obtenção de biocombustíveis, é importante reduzir o custo de sua produção, já que seu custo impacta diretamente na produção de biocombustíveis. O custo de enzimas para a conversão de substrato em açúcares é alto, mesmo considerando máximos rendimentos teóricos (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012). Porém, há trabalhos tentando viabilizar técnico-economicamente a produção de biocombustíveis utilizando enzimas obtidas através da fermentação em estado sólido (FERREIRA; AZZONI; FREITAS, 2018; KHOOTAMA; PUTRI; HERMANSYAH, 2018).

Figura 12 – Sequência de reações da transformação da celulose e a ação das enzimas endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase.



Fonte: AKHTAR et al., (2016).

A celulase é um coquetel enzimático e nesse coquetel há várias enzimas que atuam sinergicamente para a transformação da celulose (Figura 12); as mais conhecidas são endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase.

2.5.1 Endoglucanase

A endoglucanase, também conhecida como CMCase, atua na quebra das regiões amorfas da celulose, produzindo e expondo cadeias menores de celulose (WRIGHT; WYMAN; GROHMANN, 1988). Essas enzimas podem ser inibidas pela celobiose, que é um dos produtos da conversão da celulose pela endoglucanase.

Quando o objetivo é a obtenção de nanocelulose por hidrólise enzimática, endoglucanase é a enzima mais importante por reduzir o tamanho das cadeias das celuloses até eventualmente estarem em escala nanométrica e restarem apenas regiões cristalinas (RIBEIRO et al., 2019; SIQUEIRA; DIAS; ARANTES, 2019a). A endoglucanase ainda pode agir como pré-tratamento quando se deseja a obtenção de nanocelulose por outra metodologia como tratamento mecânico (BERTO et al., 2021).

2.5.2 Exoglucanase

A exoglucanase, também conhecida como celobiohidrolase, atua nas extremidades redutoras e não redutoras das cadeias menores de celulose. O produto da hidrólise dessa região é a celobiose; este produto pode se acumular na solução e inibir

tanto a endoglucanase quanto a exoglucanase (WRIGHT; WYMAN; GROHMANN, 1988).

2.5.3 β -glicosidase

A β -glicosidase ou celobiase atua nas moléculas de celobiose hidrolisando as ligações glicosídicas β -1,4, transformando-as em duas moléculas de glicose. Essa reação pode ocorrer totalmente na fase líquida, já que a celobiose é solúvel (WRIGHT; WYMAN; GROHMANN, 1988).

Para a produção de nanocelulose, essa enzima pode atrapalhar, pois existe a possibilidade de hidrolisar nanomateriais de celulose, ou pode ajudar, já que a celobiose pode inibir a endoglucanase. SIQUEIRA; DIAS; ARANTES (2019) observaram os dois casos: em uma hidrólise, a adição de β -glicosidase fez com que as partículas de nanocelulose fossem consumidas; com um outro coquetel, houve o surgimento de nanocelulose após ser adicionada a enzima β -glicosidase. A diferença entre os dois coquetéis utilizados foi o microrganismo de origem da endoglucanase.

2.5.4 Xilanase

A enzima xilanase é responsável por hidrolisar as ligações β -1,4 da xilana e hidrolisá-la em xilose. Ela é utilizada em conjunto com a celulase para hidrólise da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentativos. Outro uso para a xilanase é para fabricação de pães e clarificação de cerveja e de sucos (KATAPODIS; CHRISTAKOPOULOU; CHRISTAKOPOULOS, 2006; SINGH, 2016).

Apesar de a xilanase não hidrolisar a celulose, ela acaba auxiliando na hidrólise da mesma por catalisar a hidrólise da hemicelulose, que por sua vez facilita na remoção de pequenos resíduos de lignina, ao mesmo tempo em que deixa a celulose mais livre para as outras enzimas atuarem sobre ela. Uma maneira de diminuir a composição de lignina e hemicelulose é com o tratamento alcalino seguido de xilanase. Esse tratamento consegue aumentar a fração de celulose (MEESUPHONG et al., 2021).

2.5.5 Celobiose desidrogenase

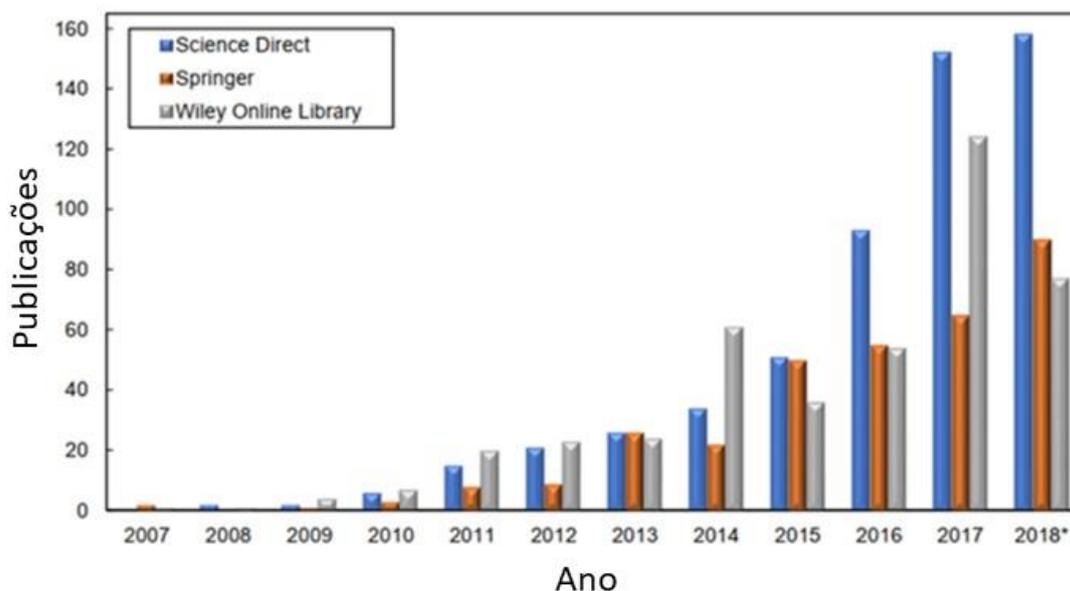
A celobiose desidrogenase é uma enzima oxidativa que tem como substrato a celobiose e, com auxílio de um aceptor, que pode ser o oxigênio, converte a celobiose em celobiono-1,5-lactona. Essa enzima é extracelular e são normalmente excretadas por

fungos “mofos brancos” como é o caso de *M. thermophila* (DOS SANTOS et al., 2016). Há indícios de que essa enzima também participa de reações que auxiliam na desconstrução da lignina (DOS SANTOS et al., 2016; ZHU et al., 2016). Por catalisar a reação da celobiose, acredita-se que essa enzima possa competir com a β -glicosidase.

2.6 NANOCELULOSE

Nanocelulose é definido como material celulósico no qual pelo menos uma de suas dimensões está na escala nanométrica. Ela é resultado da remoção das regiões amorfas da celulose, sobrando apenas a região cristalina. A nanocelulose tem diversas aplicações, como no aumento da impermeabilidade de papel (AULIN; STRÖM, 2013), embalagens antimicrobianas (LEITE et al., 2020), em hidrogéis para cultivo de células (CHENG; PARK; HYUN, 2014; RAJA et al., 2021; TANG et al., 2021), regeneração de tecidos (XU et al., 2019), reforço mecânico e térmico de materiais poliméricos (GAN et al., 2020), eletrônicos verdes (HEISE et al., 2021; ZHU et al., 2016), entre outras aplicações. Por ser aplicado em muitos tipos de materiais, houve um grande aumento de publicações e patentes relacionadas à produção de nanocelulose na última década (Figura 13), e há uma projeção de aumento no número de publicações e patentes nos próximos anos (RIBEIRO et al., 2019).

Figura 13 – Número de publicações referente a nanocelulose. Pode-se notar que houve um aumento na última década.



Fonte: RIBEIRO et al. (2019).

A obtenção da nanocelulose pode ser feita por hidrólise ácida (ESPINO-PÉREZ et al., 2014) ou por hidrólise enzimática da celulose (BONDANCIA et al., 2017). Além dos métodos de hidrólise, é possível obter nanocelulose por tratamento mecânico, por métodos oxidativos e através de microrganismos. No entanto, em um processo no qual se deseja a utilização de material lignocelulósico para se obter nanocelulose e ao mesmo tempo obter glicose para uma possível obtenção de etanol em uma biorrefinaria, os métodos hidrolíticos são mais interessantes.

Dos dois métodos de obtenção por hidrólise, a hidrólise ácida, a princípio, tem o custo mais elevado. O principal fator que eleva o custo de hidrólises ácidas é a acidez na qual a reação ocorre, já que normalmente a hidrólise é feita em ácido sulfúrico (BILATTO et al., 2020) e isso eleva o custo fixo do processo, já que são necessários equipamentos resistentes a corrosão. Além disso, também são necessários processos para tratar os efluentes ácidos, havendo grande gasto de água para neutralização do ácido (RIBEIRO et al., 2019; ROSALES-CALDERON; PEREIRA; ARANTES, 2021). Apesar de um custo inicial elevado, o tempo de hidrólise é baixo e o rendimento de nanocelulose é alto quando comparado a hidrólise enzimática, sendo que o tempo de hidrólise pode ser de 45 a 105 minutos e o rendimento de 64 % de nanocelulose (BILATTO et al., 2020).

Em contrapartida, a hidrólise enzimática é realizada em condições de pH moderado, não necessitando de equipamentos resistentes a alta acidez e também não necessitando tratar os efluentes gerados pela hidrólise, o que torna o custo de produção inicial de nanocelulose por este método menor (RIBEIRO et al., 2019; SIQUEIRA; DIAS; ARANTES, 2019a). No entanto, o custo elevado de enzimas comerciais (BHATI; SHREYA; SHARMA, 2021), o elevado tempo de hidrólise de 48 a 96 horas (BONDANCIA et al., 2017; SQUINCA et al., 2020) e o baixo rendimento de nanocelulose torna o processo enzimático menos economicamente viável e não atrativo (MORAES et al., 2012).

Alguns motivos para o baixo rendimento de nanocelulose por hidrólise enzimática é o fato de não se ter um coquetel enzimático especializado na produção de nanocelulose e também por haver menos resultados em obtenção por hidrólise enzimática do que por hidrólise ácida (ROSALES-CALDERON; PEREIRA; ARANTES, 2021). Pelo apelo de ser mais ambientalmente amigável, há tentativas de deixar a hidrólise enzimática mais atrativa. SQUINCA et al. (2020) estudaram o pré-tratamento do substrato polpa de eucalipto para melhorar o rendimento de nanocelulose e utilizaram enzimas obtidas por fermentação em estado sólido, obtendo um rendimento de 24,6%.

SIQUEIRA; DIAS; ARANTES (2019) utilizaram endoglucanase e β -glucosidase comercial e obtiveram melhor condição para obtenção de nanocelulose em comparação a quando utilizaram apenas endoglucanase. Outra maneira para tornar o processo de obtenção de nanocelulose mais atrativa seria reduzindo o custo das enzimas.

Uma das maneiras para reduzir o custo de enzimas seria utilizando enzimas produzidas *in house* através de fermentação em estado sólido. Trabalhos como os de CASCIATORI et al. (2014); CASCIATORI FRASSATTO et al. (2020); DE OLIVEIRA et al. (2020b); PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019) tentam viabilizar a produção de celulase em biorreator em estado sólido para utilização deste em biorrefinarias. Além disso, há a tentativa de se utilizar vários outros microrganismos para verificar qual deles produz o melhor coquetel de celulase para o uso em biorrefinarias (DE OLIVEIRA et al., 2020b; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019; ZANELATO et al., 2012).

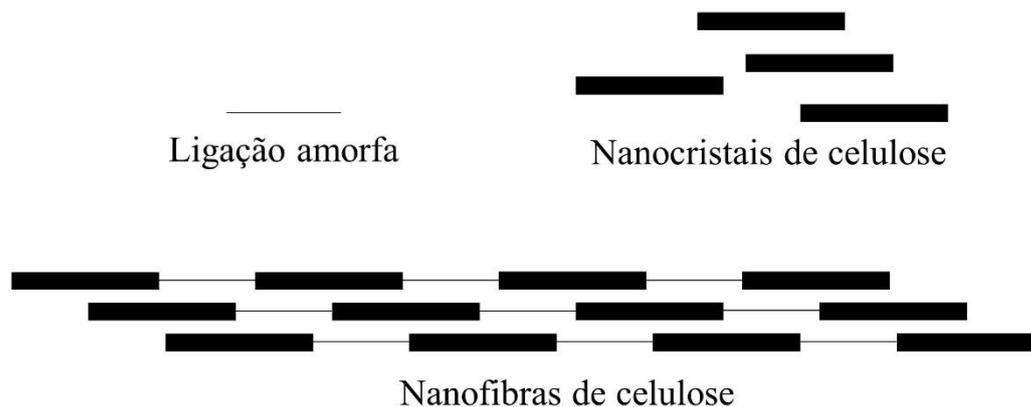
As nanoceluloses obtidas por processo de hidrólise podem ser classificadas de duas formas, como nanofibras de celulose e como nanocristais de celulose.

2.6.1 Nanofibras de celulose

Nanofibras de celulose são materiais alongados e flexíveis contendo em sua estrutura regiões amorfas e cristalina. De acordo com CHAKRABARTY; TERAMOTO (2018), se a razão de aspecto comprimento/diâmetro for maior que 100, pode-se considerar nanofibras de celulose, apesar de não haver um número definido que diferencia nanofibras e nanocristais de celulose. Pelo fato de ainda haver muitas regiões amorfas na estrutura, é possível que as nanofibras de celulose contenham mais lignina que os nanocristais de celulose.

A Figura 14 ilustra as nanofibras de celulose, no qual ainda há ligações amorfas entre os cristais. Devido a essas ligações amorfas, as nanofibras de celulose são mais flexíveis que os nanocristais e por isso são utilizados na formação de hidrogéis. Por sua capacidade de empacotamento, as nanofibras de celulose possuem uma menor permeabilidade ao oxigênio e podem ser com essa finalidade (YAMATO et al., 2021).

Figura 14 – Esquema ilustrando os nanocristais e as nanofibras de celulose.



Fonte: Acervo pessoal.

2.6.2 Nanocristais de celulose

Nanocristais de celulose, ou celulose nanocristalina, é a nanocelulose que representa as regiões predominantemente cristalinas da celulose. A alta cristalinidade dos nanocristais é devida à remoção das regiões amorfas da celulose. Podem ser produzidas através da hidrólise ácida a altas temperaturas (SHANKARAN, 2018), mas trabalhos recentes mostram que é possível de serem obtidas em temperaturas moderadas (BILATTO et al., 2020) ou através de hidrólise enzimática (BONDANCIA et al., 2017; SQUINCA et al., 2020).

O formato dos nanocristais de celulose é similar a bastonetes alongados ou agulhas e, devido à sua estrutura, são menos flexíveis se comparados com as nanofibras de celulose. O tamanho dos nanocristais varia de acordo com a fonte da biomassa e com o método de obtenção de celulose, mas de acordo com CHAKRABARTY; TERAMOTO (2018), o comprimento está entre 100 e 2000 nm. A Figura 14 apresenta um esquema dos nanocristais de celulose.

A área superficial dos nanocristais está entre 250-500 m²/g e nessa área há grande presença de grupos hidroxilas. Essa área de contato com os grupos hidroxilas possibilita modificação em pequenas moléculas e polímeros. Apresentam alta força tensorial de 7500 MPa e modulo Young de 100 a 140 GPa (CHAKRABARTY; TERAMOTO, 2018).

2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS DA REVISÃO

Os microrganismos que são mais utilizados para a produção de enzimas são os fungos filamentosos. Para degradar a biomassa lignocelulósica, deseja-se um fungo que

produza celulasas e alguns dos fungos que são muito utilizados para essa finalidade são *A. niger* e *T. reesei* (BHATI; SHREYA; SHARMA, 2021). Um fungo termófilo que vem se destacando por produzir um coquetel rico em endoglucanase é *M. thermophila* (CASCIATORI et al., 2015; ZANELATO et al., 2012). Esse fungo termófilo produz enzimas termoestáveis que podem hidrolisar materiais lignocelulósicos em temperaturas mais elevadas. Em uma biorrefinaria, a produção do coquetel enzimático de celulase por cultivo em estado sólido pode ser mais interessante do que o cultivo submerso pois o substrato principal para esse tipo de cultivo são os resíduos agroindustriais.

A fermentação em estado sólido tem sido amplamente explorada para a produção de enzimas utilizando em geral fungos filamentosos (DE ALBUQUERQUE; GUIMARÃES; DE REZENDE, 2020; DE ALMEIDA et al., 2019). Devido à natureza heterogênea e o calor gerado pelo metabolismo celular, há dificuldades em realizar este tipo de fermentação em escalas maiores, mas apesar dessas dificuldades, há avanços (FARINAS, 2015; PANDEY, 2003; SOCCOL et al., 2017). Equipamentos com possibilidades de aumento de escala têm sido desenvolvidos e o biorreator de leito empacotado vem apresentando avanços para resolver os problemas (DE OLIVEIRA et al., 2020b; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019).

Uma das possíveis aplicação da celulase é na conversão da celulose em bioprodutos como o bioetanol e a nanocelulose. A nanocelulose é um produto de alto valor agregado com diversas aplicações em diversas áreas e por isso vem sendo amplamente estudada (RIBEIRO et al., 2019). A obtenção de nanocelulose por hidrólise enzimática é a mais ambientalmente amigável (RIBEIRO et al., 2019; SIQUEIRA; DIAS; ARANTES, 2019b), mas ao mesmo tempo não é economicamente viável com a tecnologia atual, pelo baixo rendimento (ROSALES-CALDERON; PEREIRA; ARANTES, 2021). Uma das maneiras de melhorar o rendimento é utilizando um coquetel enzimático que seja mais específico para a obtenção de nanocelulose.

Ainda não há na literatura um coquetel enzimático na intenção de melhorar o rendimento em nanocelulose e tão pouco utilizando enzimas termoestáveis. A produção de um coquetel enzimático específico e o uso de enzimas termoestáveis pode contribuir para a produção de nanocelulose por um processo ambientalmente amigável. Além disso, a produção de enzimas em biorreator de laboratório para a produção de enzimas pode oferecer uma alternativa às biorrefinarias para produzir enzimas *in house*, o que também contribui para a produção de nanocelulose.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi produzir um coquetel enzimático termoestável rico em endoglucanase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito empacotado em multicamadas visando sua aplicação na obtenção de nanocelulose.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do trabalho foram os seguintes:

1. Avaliar diferentes espécies de fungos para produzir coquetéis enzimáticos visando aplicação na produção de nanocelulose;
2. Otimizar a produção do coquetel enzimático por fermentação em estado sólido variando a composição e a umidade do substrato usando planejamento experimental como ferramenta;
3. Avaliar a produção em biorreator de leito empacotado em multicamadas para obter volume suficiente de extratos enzimáticos para composição de coquetéis a serem aplicados na hidrólise de polpa de celulose visando a obtenção de nanocelulose;
4. Produzir e caracterizar a nanocelulose por meio de técnicas analíticas e instrumentais avançadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Fungos

Os fungos utilizados para a produção das enzimas endoglucanase e β -glicosidase foram *A. niger* C, *M. thermophila* I-1D3b e *T. reesei* Rut-C30. O fungo *M. thermophila* I-1D3b foi isolado por Zanelato et al. (2012), apresentando resultados muito promissores de produção de endoglucanase em escalas de frascos e de biorreatores de bancada (ZANELATO, 2011; CASCIATORI, 2015). O fungo *A. niger* C foi obtido da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro – RJ). Fungos dessa espécie são muito estudados na área de fermentação sólida. Por fim, o fungo *T. reesei* Rut-C30 pertence à coleção de cultura do Reino Unido (Center for Agricultural Bioscience International) (CABI – IMI number: 345108) e foi escolhido devido ao fato de suas celulases estarem entre as mais comercializadas.

4.1.2 Substratos

Para o preparo do inóculo, foram utilizados os meios Potato Dextrose Agar (PDA) na concentração de 39 g/L e Sabouraud Dextrose Agar na concentração de 65 g/L.

Os substratos utilizados para a realização do cultivo em estado sólido foram o bagaço de cana, o farelo de soja e o farelo de trigo. A Tabela 1 mostra a composição dos substratos sendo que a variação da composição ocorre devido a origem do substrato. Pela Tabela 1, é possível observar que o bagaço é o substrato mais rico em celulose e lignina e o mais pobre em proteína, enquanto que os farelos são mais ricos em proteínas que o bagaço, principalmente o de farelo de soja. Ambos os farelos têm menos lignina que o bagaço, o que facilita o acesso dos microrganismos à celulose e hemicelulose, além deles também apresentarem maior superfície de contato.

Tabela 1 – Composição e informações nutricionais dos substratos utilizados no cultivo.

	Bagaço de cana	Farelo de soja	Farelo de trigo
Celulose	34,1-55,2% ¹	6,6% ²	9,6-19% ^{3,4}
Hemicelulose	16,8-32,2% ¹	20,4% ²	31,6% ⁴
Lignina	19,1-32,4% ¹	2,46% ²	6% ³
Proteínas	1,13% ¹	41% ²	15% ⁴

Fonte: ¹SZCZERBOWSKI et al., 2014, ²POTRICH et al., 2020, ³BERGMANS et al., 1996, ⁴GHODRAT et al., 2017.

O bagaço foi doado pela Usina São Manoel (São Manoel – SP), e pela Usina Santa Cruz do Grupo São Martinho (Américo Brasiliense – SP). Os farelos de trigo e de soja foram adquiridos no comércio local (Agropecuária Claro, São Carlos – SP). A umidificação dos substratos foi realizada pela adição de uma solução nutriente que continha a seguinte composição: 0,35 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 % de KH_2PO_4 , 0,05 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % de CaCl_2 e 0,1 % de Tween 20 (densidade 1,1 g/cm³) (Zanelato et al., 2012). O pH da solução foi ajustado em pH 5,0 e foi a mesma utilizada por PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019) para fornecer sais no cultivo, além de servir para umidificar o meio sólido. Os substratos, juntamente com a solução nutriente, foram autoclavados antes de todos os cultivos.

Para a hidrólise enzimática, o substrato utilizado foi a polpa kraft de eucalipto fornecido por Suzano Papel e Celulose (São Paulo – SP, Brasil). A composição da polpa foi determinada por BONDANCIA et al. (2017) e é de 75,6±2,3% de celulose, 14,6±0,6 de hemicelulose, 6,7% de lignina e 1,1±0,2% de cinzas. A escolha desse substrato deveu-se ao mesmo ser rico em celulose, o que potencializa a produção de nanocelulose, e por conter pouca lignina.

4.1.3 Biorreator

O biorreator utilizado, já estudado nos trabalhos de ZANELATO et al. (2012) e de SAHIR; KUMAR; KUMAR (2007), foi o de leito empacotado. A Figura 15 representa o sistema de operação do equipamento, no qual o biorreator é alimentado com ar fornecido por um compressor. O ar passa previamente por um filtro para a retirada de impurezas grosseiras e segue para uma válvula de agulha posicionada imediatamente antes de um medidor de vazão. Usando a válvula e o medidor, a vazão de entrada de ar é estabelecida. O ar segue para um filtro biológico (Figura 16 - a) para retenção de microrganismos que poderiam contaminar a fermentação e, em seguida, passa pelo primeiro umidificador de ar (Figura 16 - b), que consiste em uma coluna recheada com esferas de vidro e água (Figura 16 - c) responsável por saturar o ar à temperatura ambiente.

Após a saturação, o ar segue para um segundo umidificador, mantido em temperatura mais elevada pela circulação de água na camisa, responsável por saturar e aquecer o ar na temperatura da fermentação. O ar úmido entra então pela base do fermentador e percola o leito, fornecendo oxigênio aos fungos e auxiliando na remoção de calor e do gás carbônico produzido ao longo do cultivo. Da saída do biorreator, o ar é finalmente conduzido para fora do laboratório e liberado na atmosfera.

Visando a manutenção da temperatura de operação do fermentador e do segundo umidificador, foi utilizado um banho ultratermostatzado (Solab, SL 152, Figura 16 - d). A água do banho foi enviada, com auxílio de bomba, do banho para a camisa do umidificador, de onde segue para a camisa dos módulos do fermentador, desde a base até o topo. Da camisa do módulo do topo, a água volta para o banho ultratermostatzado. Em diferentes alturas do fermentador, foram inseridos termopares, para monitorar a temperatura do fermentador ao longo do processo, e os sinais dos termopares foram enviados a um computador e registrados por um sistema de aquisição de dados da National Instruments COMPAQ-DAQ, gerenciado por uma rotina do software Labview (National Instruments, Austin, USA).

Figura 15. Sistema experimental para biorreator de fermentação em estado sólido em leito empacotado em escalas de bancada e piloto.

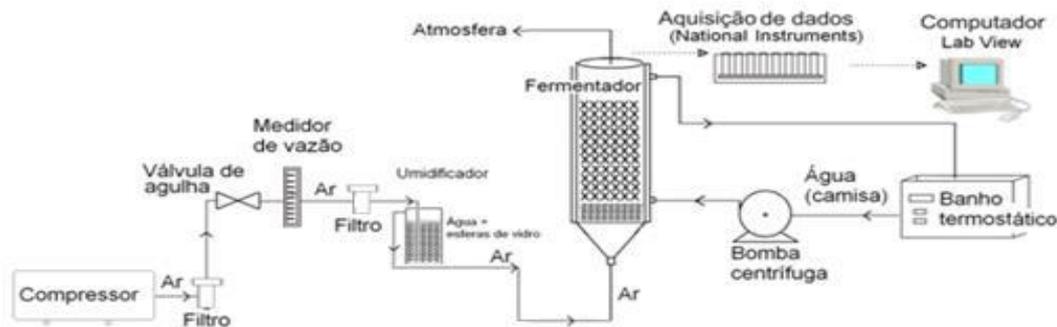
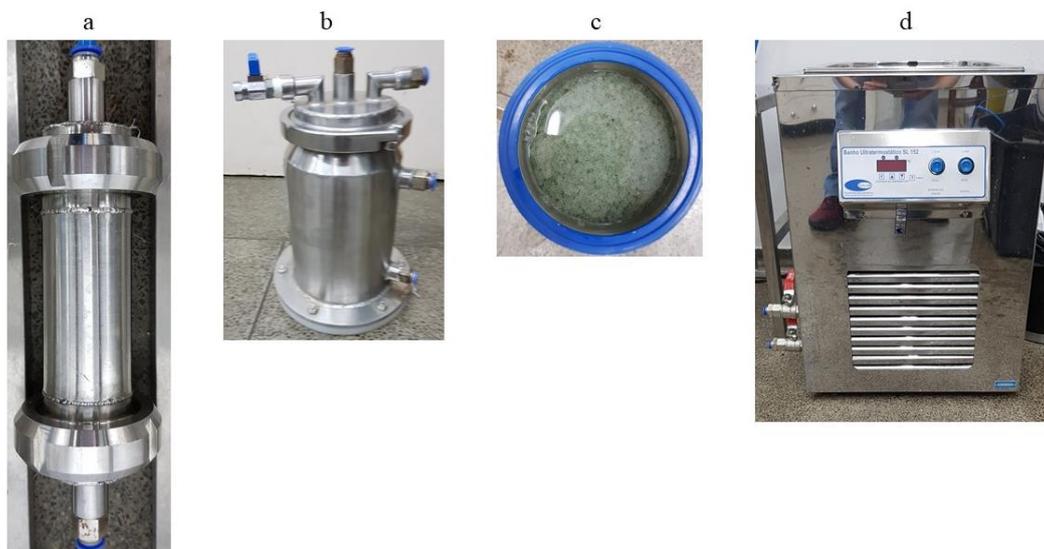


Figura 16 – Equipamentos utilizados durante os cultivos: filtro de ar (a), umidificador (b) e seu volume interno (c) e banho termostático que bombeia água para a camisa (d).



Fonte: Acervo pessoal.

4.1.3.1 Biorreator de leito empacotado

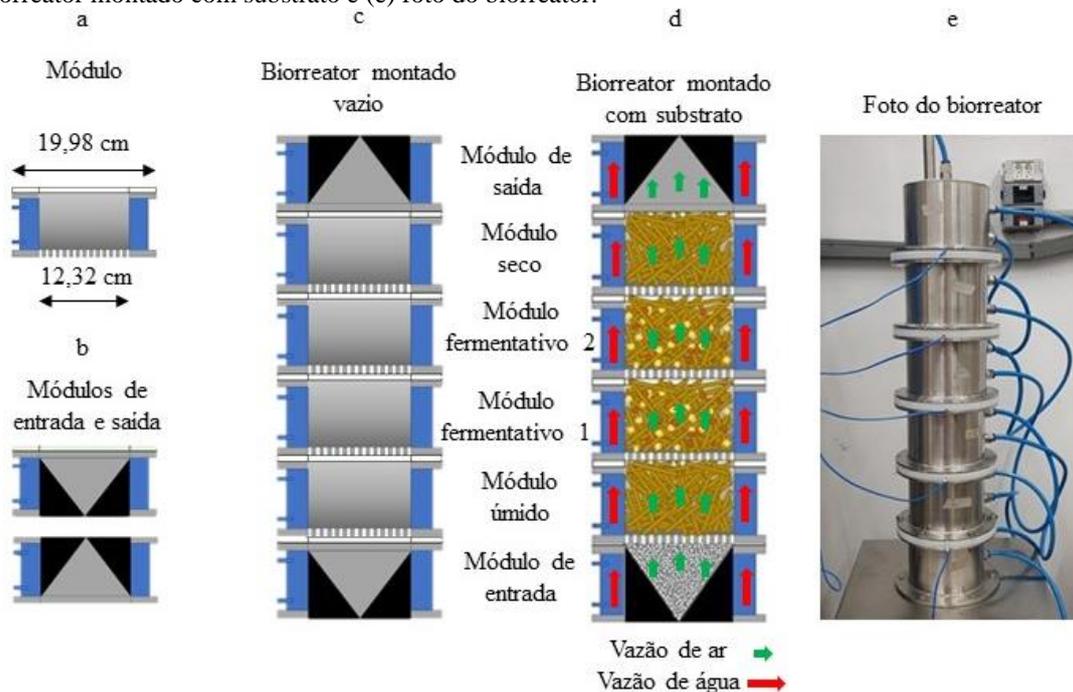
O biorreator utilizado está localizado no Laboratório de Fermentação do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. O biorreator utilizado é de leito empacotado de multicamadas, composto por módulos de aço inox e na Figura 17 – a estão ilustradas as dimensões desses módulos; no interior desses módulos, se localiza o substrato sólido. A base dos módulos do fermentador contém uma tela perfurada para sustentar o substrato sólido e ao mesmo tempo permitir a passagem de ar. Os módulos de entrada e saída (Figura 17 - b) se diferenciam dos outros módulos pelo seu interior cônico.

Entre dois módulos, um flange foi posicionado. O flange consiste em um disco feito em nylon, contendo anéis de vedação nas faces superior e inferior, os quais evitam o vazamento do ar percolante no sistema. Através dos flanges também se inserem os termopares, cujas pontas ficam posicionadas no centro do leito.

A montagem do biorreator consiste primeiramente no módulo de entrada, que se localiza na base. Na base deste módulo é que ocorre a entrada de ar saturado com água. O módulo de entrada foi preenchido com esferas de vidro que tem a função de distribuir o fluxo e garantir a percolação do ar por todo o leito, assim como estabelecer o perfil de velocidade. No entanto, no trajeto através das esferas, pode ocorrer perda de umidade do ar. Acima do módulo de entrada se posiciona o módulo úmido, que consiste em bagaço umidificado com solução nutriente, para repor a umidade do ar antes de percolar nos

módulos superiores. Os próximos módulos posicionados foram os fermentativos. Nestes módulos foram posicionados os substratos inoculados e foram onde ocorreu crescimento dos microrganismos. Estes módulos foram também os que mais requereram monitoramento de temperatura, pois o crescimento dos fungos gera calor e eleva a temperatura. Os dois módulos finais foram o seco e o de saída. O módulo seco foi preenchido com bagaço seco, pois o ar úmido ao sair do biorreator entra em contato com a temperatura ambiente e esse choque térmico faz com que a água presente no ar condense. Para a água condensada não gotejar nos módulos fermentativos, um módulo com bagaço seco foi posicionado entre o módulo de saída e o módulo fermentativo. O esquema deste biorreator montado está ilustrado na Figura 17 – c, com os módulos preenchidos e com a vazão de ar e água na camisa concorrente na Figura 17 – d e uma foto do equipamento pode ser visualizada na Figura 17 – e.

Figura 17 – Esquema representativo do biorreator de leito empacotado em multicamadas e suas partes com (a) módulo fermentativo, (b) módulos de entrada e saída, (c) biorreator montado sem substrato, (d) biorreator montado com substrato e (e) foto do biorreator.



Fonte: Acervo pessoal.

4.1.4 Solução de DNS

Para a quantificação de açúcares redutores, foi utilizada solução de ácido dinitrosalicílico (DNS). Essa solução é composta por 7,6 mL de fenol, 8,3 g de metabissulfito de sódio, 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico, 19,8 g de NaOH, 1416 mL

de água destilada e 21,78 g de tartarato duplo de sódio e potássio hidratado. Para seu preparo, o metabissulfito de sódio foi colocado em béquer e posteriormente adicionou-se o fenol fundido em banho termostático a 50 °C. Uma segunda mistura foi feita com o ácido 3,5-dinitrossalicílico, NaOH e parte da água destilada. Essa segunda mistura foi feita em um béquer de vidro, no qual adicionou-se primeiramente o ácido com uma parcela de água, posteriormente o NaOH e mais uma parcela de água. Juntaram-se as duas misturas e após a homogeneização adicionou-se o tartarato duplo de sódio e potássio hidratado previamente dissolvido com parte da água e homogeneizou-se novamente. Finalizou-se adicionando-se a parcela final de água e transferindo-se para um recipiente de vidro recoberto com papel alumínio para proteção contra a luz. A solução foi mantida por 24 h a temperatura ambiente no escuro, sendo posteriormente transferida para armazenamento sob refrigeração.

Para se obter a curva padrão por absorvância em espectrofotômetro, foi preparada uma solução de glicose em um balão volumétrico de 100 mL na concentração de 0,1 g/100 mL. A partir dessa solução mãe, foram feitas várias diluições com água destilada, e adicionou-se 1 mL da solução de DNS (Tabela 2). Por 10 minutos, essas soluções foram mantidas sob fervura em banho a 100 °C, após o que os tubos foram colocados em banho de gelo até resfriamento. Por fim, adicionaram-se 8 mL de água destilada. Para cada solução, foi feita a leitura da absorvância no comprimento de onda de 540 nm, após o equipamento ser zerado com água destilada.

Tabela 2 – Diluições da solução mãe de glicose para gerar a curva padrão em espectrofotômetro.

Solução mãe de glicose (mL)	Água destilada (mL)	DNS (mL)
0,0	1,0	1,0
0,1	0,9	1,0
0,2	0,8	1,0
0,3	0,7	1,0
0,4	0,6	1,0
0,5	0,5	1,0
0,6	0,4	1,0
0,7	0,3	1,0
0,8	0,2	1,0
0,9	0,1	1,0
1,0	0,0	1,0

4.1.5 Solução tampão

Para o preparo da solução tampão para as análises de atividade enzimática, foi seguida a tabela de GOMORI (1955). A solução preparada foi a de tampão acetato. Para o preparo de 100 mL, misturaram-se 14,8 mL de solução de ácido acético (0,2 M), 35,2

mL de solução de acetato de sódio (0,2 M) e completou-se o volume com 50 mL de água destilada. Essa solução teve seu pH ajustado para 5,0.

4.1.6 Solução de CMC

A solução de carboximetilcelulose (CMC) para análise de atividade endoglucanase foi preparada na concentração de 4% (m/v) de tampão de acetato (pH = 5). A solução foi suavemente misturada com bastão de vidro e deixada na geladeira por dois dias ou até total hidratação e dissolução da CMC. A CMC utilizada foi a de baixa viscosidade da Merck.

4.1.7 Glicose liquiform

O reagente glicose liquiform (Labtest) foi utilizado para medir a glicose produzida pelas enzimas β -glicosidase através de uma reação colorimétrica. Além da atividade enzimática, este reagente foi utilizado para determinar a glicose liberada durante a hidrólise enzimática da polpa de celulose.

4.1.8 Solução de celobiose

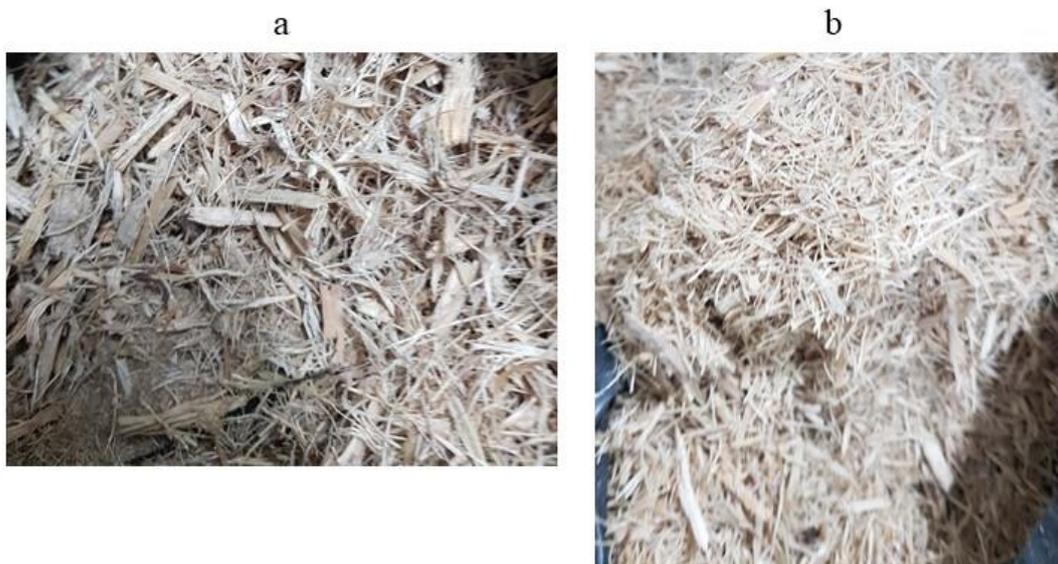
Foi preparada uma solução de celobiose adicionando-se 0,513 g de celobiose e adicionando-se 100 mL de solução tampão de acetato (pH = 5). A solução de celobiose foi preparada para quantificar a atividade de β -glicosidase e a solução era preparada apenas no dia da análise e não era armazenada.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Secagem dos substratos e peneiramento do bagaço

O bagaço e os farelos utilizados como substratos foram secos a 60 °C por 48 a 72 h (até massa constante) em estufa de convecção forçada, para evitar deterioração dos materiais. O bagaço seco foi peneirado duas vezes para uniformização do tamanho das fibras: inicialmente em uma peneira com abertura de 6 mm, que reteve fibras mais grossas; posteriormente em uma tela com abertura de 2 mm, que reteve as fibras mais finas e as separou do pó. O bagaço grosso é o que fica retido na peneira com abertura de 6 mm (Figura 18 – a) e o bagaço fermentativo é o que fica retido sobre a tela com abertura de 2 mm (Figura 18 – b).

Figura 18 – Bagaço retido sobre a peneira com abertura de 6 mm (a) e bagaço retido sobre a tela de 2 mm (b).



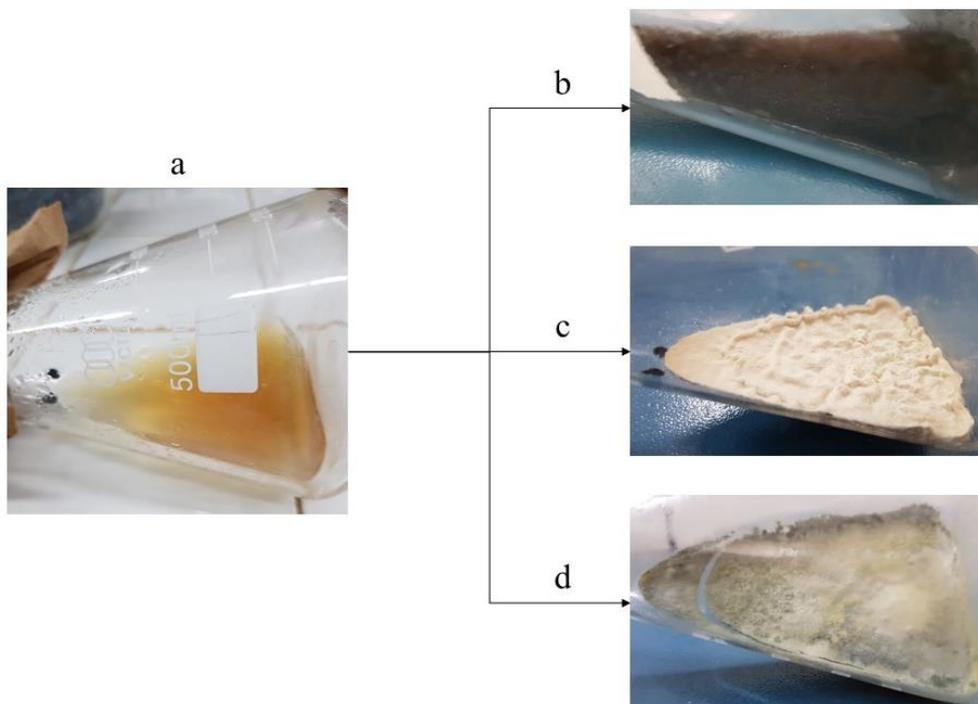
Fonte: Acervo pessoal.

4.2.2 Preparação do inóculo

O inóculo foi iniciado com preparo do ágar em Erlenmeyer 60 mL. Para o fungo *A. niger* e *T. reesei*, foi utilizado o Potato Dextrose Ágar e para o fungo *M. thermophila* foi utilizado o Sabouraud Dextrose Ágar. A dissolução do ágar foi realizada com auxílio do micro-ondas, no qual foram feitos aquecimentos sucessivos de 10 segundos seguidos de agitação até que a solução estivesse completamente translúcida. Após a dissolução do ágar, o Erlenmeyer foi tampado com algodão hidrofóbico, para evitar contaminação, e esterilizado em autoclave a 121 °C e 1,1 atm por 20 minutos. Após a esterilização, o Erlenmeyer foi deixado deitado por uma noite até solidificar (Figura 19 - a).

Após a solidificação, o Erlenmeyer foi levado a câmara de fluxo laminar, onde foi inoculado com aproximadamente 2,5 mL de uma suspensão contendo esporos de fungo. Em seguida, o Erlenmeyer foi levado a uma incubadora BOD (demanda bioquímica de oxigênio) onde ficou incubado a 28, 30 e 45 °C, para *T. reesei*, *A. niger* e *M. thermophila* respectivamente, até crescer por toda a superfície do ágar, como indicado na Figura 19 – b para *A. niger*, Figura 19 – c para *M. thermophila* e Figura 19 – d para *T. reesei*.

Figura 19 – Ágar preparado em Erlenmeyer (a) e os fungos crescidos no ágar *A. niger* (b), *M. thermophila* (c) e *T. reesei* (d).



Fonte: Acervo pessoal.

4.2.3 Planejamento experimental

Para determinar uma condição para produzir um coquetel enzimático rico em endoglucanase, optou-se por realizar um planejamento experimental fatorial completo, com auxílio do programa Chemoface. Para aplicar o planejamento, foram realizados cultivos em pequena escala, nos quais a massa total (m_t) dos substratos (Equação 1) sólidos foi de 5 g. Além dos substratos, foi adicionada uma solução líquida para controle de umidade. Os substratos utilizados foram o bagaço de cana, o farelo de soja e o farelo de trigo e a solução para acerto de umidade foi a solução nutriente de Zanelato et al. (2012). Para o planejamento, foram determinadas três variáveis que foram as massas do bagaço, fração de farelo de soja e umidade. A utilização do bagaço de cana é justificada por ele ser um substrato com alto teor de celulose em sua composição (LEANG; SAW, 2011) e também por ele ser o substrato mais estudado em biorreatores de leite empacotado (CASCIATORI et al., 2016; DE OLIVEIRA et al., 2020b; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019). O farelo de soja e trigo são substratos mais ricos em proteínas que o bagaço e os fungos têm maior facilidade de acesso aos nutrientes devido a menor quantidade de lignina (Tabela 1) e maior superfície de contato.

Com o valor de m_t definido, foi escolhido que a primeira variável do planejamento seria a massa de bagaço (m_{bag}), no nível menor 2 g, no nível maior 4 g e no nível central 3 g. Com a massa de bagaço definida, pode-se calcular a massa total de farelo (m_{far}) calculada pela Equação 1. A massa de farelo não pode ser uma variável pois há dois componentes nela; por esse motivo, a segunda variável escolhida foi a fração de farelo de soja (x_{so}), definida pela Equação 3 e com os níveis menor, central e maior de 25, 50 e 75% respectivamente e com esses valores definidos foi possível calcular a massa de farelo de soja (m_{so}). A última variável definida para o planejamento foi a umidade nos níveis 55, 65 e 75% como menor, central e maior, respectivamente.

Com as variáveis e níveis definidos, montou-se um planejamento experimental fatorial completo com três repetições no ponto central, totalizando 11 experimentos ($2^3+3=11$) para cada fungo. Na Tabela 3 está o planejamento gerado pelo Chemoface mostrando os níveis de cada variável e a Tabela 4 apresenta os níveis da Tabela 3 em massa e volume, sendo que a massa do farelo de trigo (m_{tri}) foi calculada pela Equação 2. Em ambas as tabelas estão inclusas as codificações do experimento da forma bXsYYhZZ onde b representa m_{bag} , s representa x_{so} , h representa umidade e X, Y e Z representam os valores da massa, da fração de farelo de soja e da umidade, respectivamente. Com essa estrutura de planejamento experimental, foi possível determinar os efeitos dos substratos sólido bagaço e farelo de soja e da umidade. Além disso, foi possível determinar também o efeito do farelo de trigo, que foi o mesmo efeito do farelo de soja com o valor negativo.

$$m_t = m_{bag} + m_{far} \quad \text{Equação 1}$$

$$m_{far} = m_{so} + m_{tri} \quad \text{Equação 2}$$

$$x_{so} = \frac{m_{so}}{m_{far}} \quad \text{Equação 3}$$

Tabela 3 – Planejamento experimental feito no software Chemoface com as codificações do experimento.

Exp.	Codificação	Bagaço		Farelo de soja		Umidade	
		Nível	m_{bag} (g)	Nível	x_{so} (%)	Nível	Um (%)
1	b2s25h55	-1	2	-1	25	-1	55
2	b2s25h75	-1	2	-1	25	+1	75
3	b2s75h55	-1	2	+1	75	-1	55
4	b2s75h75	-1	2	+1	75	+1	75
5	b4s25h55	1	4	-1	25	-1	55
6	b4s25h75	1	4	-1	25	+1	75
7	b4s75h55	1	4	+1	75	-1	55
8	b4s75h75	1	4	+1	75	+1	75
9	b3s50h65	0	3	0	50	0	65
10	b3s50h65	0	3	0	50	0	65
11	b3s50h65	0	3	0	50	0	65

Tabela 4 – Execução do planejamento experimental, de acordo com as massas do bagaço de cana, farelo de soja e farelo de trigo e do volume de solução nutriente a ser utilizado em cada experimento.

<i>Experimento</i>		m_{bag} (g)	m_{so} (g)	m_{tri} (g)	V_{sn} (mL)
1	Codificação	2,00	0,75	2,25	6,1
2	b2s25h55	2,00	0,75	2,25	15,0
3	b2s25h75	2,00	2,25	0,75	6,1
4	b2s75h55	2,00	2,25	0,75	15,0
5	b2s75h75	4,00	0,25	0,75	6,1
6	b4s25h55	4,00	0,25	0,75	15,0
7	b4s25h75	4,00	0,75	0,25	6,1
8	b4s75h55	4,00	0,75	0,25	15,0
9	b4s75h75	3,00	1,00	1,00	9,8
10	b3s50h65	3,00	1,00	1,00	9,8
11	b3s50h65	3,00	1,00	1,00	9,8

4.2.4 Cultivo em embalagens plásticas

Para a execução dos ensaios do planejamento experimental, foram realizados cultivos em embalagens plásticas de polipropileno acopladas a bocal de PVC. As biomassas a serem utilizadas nos cultivos foram o bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e farelo de soja. Para umidificar a biomassa e fornecer outros nutrientes essenciais, foi utilizada a solução nutriente.

Para o preparo do cultivo, a biomassa foi pesada de acordo com a Tabela 4 e adicionada nas embalagens plásticas. Sequencialmente, as embalagens foram fechadas com auxílio do bocal de PVC e de um rodilhão de algodão hidrofóbico (Figura 20). Após seladas, as embalagens foram esterilizadas em autoclave por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm de pressão. A solução nutriente também foi esterilizada nas mesmas condições.

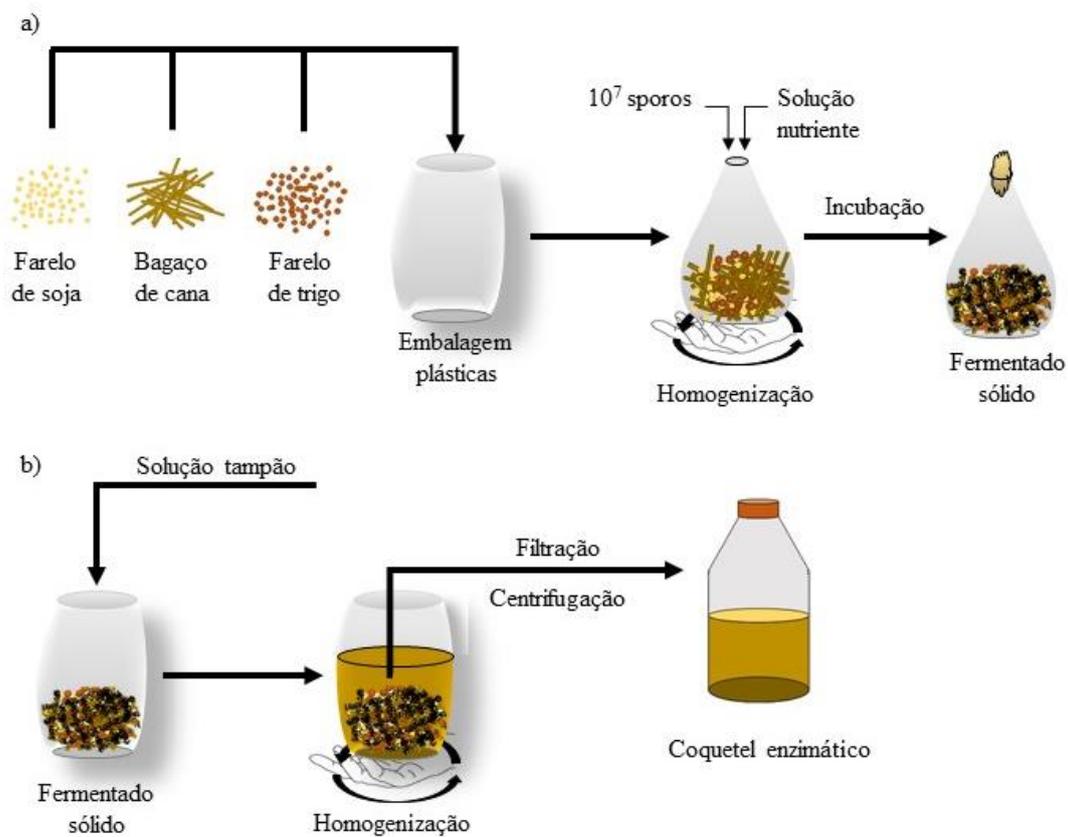
Todo material esterilizado foi levado a câmara de fluxo laminar, junto com ágar em Erlenmeyer contendo o fungo (Figura 19). Dentro do Erlenmeyer, foram adicionados em torno de 100 mL de solução nutriente com a pipeta e, com a ponteira, a superfície contendo os esporos foi raspada para transferir os esporos para a solução nutriente. Após essa raspagem, foi retirada uma alíquota desta solução para realizar-se a contagem de esporos. Para a contagem, essa alíquota foi diluída por um fator de diluição de 20 vezes, e os esporos foram quantificados com auxílio de microscópio e de uma câmara de Neubauer. Após a contagem foram adicionadas nas embalagens plásticas em torno de 10^7 esporos e a solução nutriente de forma que o volume líquido seja de acordo com os experimentos indicados na Tabela 4. Após este procedimento as embalagens foram levadas em incubadoras BOD. O processo do cultivo em embalagens plásticas está ilustrado na Figura 21 – a e o tempo e temperatura do cultivo está indicado na Tabela 5.

Figura 20 – Embalagens de cultivo com a biomassa.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 21 – Ilustração do procedimento de (a) fermentação em estado sólido e (b) extração enzimática.



Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 5 – Condições de incubação durante o cultivo para cada espécie de fungo.

Fungo	T (°C)	t (dias)
<i>A. niger</i>	30	3
<i>M. thermophila</i>	45	4
<i>T. reesei</i>	28	7

4.2.5 Extração das enzimas do material cultivado

Após o término do cultivo, as embalagens plásticas adquirem um aspecto similar ao apresentado na Figura 22. Em cada embalagem plástica, foram adicionados 50 mL de água destilada (na proporção de 10 mL de extrato para cada grama de substrato sólido seco inicial), para realizar a extração das proteínas secretadas para o meio extracelular. Após adicionar o líquido dentro das embalagens, homogeneizou-se manualmente toda a biomassa pela parte externa da embalagem por aproximadamente três minutos. Em seguida, o extrato líquido obtido por embalagem foi filtrado e transferido para tubos falcons cônicos e as amostras foram centrifugadas à temperatura de 4 °C e velocidade 10000 rpm por 15 minutos. As amostras foram, em seguida, armazenadas a 4 °C para posterior realização das análises de quantificação de proteínas e de atividades enzimáticas. A Figura 21 – b ilustra o procedimento de extração de enzimas.

Figura 22 – Embalagens fermentativas após o cultivo do fungo *M. thermophila*.

Fonte: Acervo pessoal.

4.3 MONTAGEM E CULTIVOS NO BIORREATOR DE LEITO EMPACOTADO

Os primeiros cultivos em biorreator foram feitos de acordo com os resultados do planejamento dos cultivos em pequena escala, na intenção de produzir quantidade de enzima suficiente para a hidrólise enzimática. A quantidade de biomassa em cada módulo

variou dependendo de sua composição; para manter o leito do biorreator empacotado, era preciso preencher todo o volume e os substratos que foram utilizados apresentam diferentes densidades de empacotamento. Portanto, se na composição da biomassa houver grande quantidade de bagaço, menor será a massa total por módulo, pois o volume ocupado por uma certa massa de bagaço é maior que o volume ocupado por essa mesma massa de farelo.

Os cultivos selecionados para serem escalados para o biorreator foram os b4s25h75 e b4s75h75 para o fungo *M. thermophila* e o cultivo do planejamento b4s75h75 para os fungos *A. niger* e *T. reesei*. Por possuir uma grande quantidade de bagaço em sua proporção, a quantidade de biomassa dos cultivos com *M. thermophila* foi de 130 g por módulo. No caso dos cultivos com *A. niger* e *T. reesei*, a biomassa total por módulo foi de 195 g, pois a composição da biomassa utilizada foi mais rica em farelos. O empacotamento da biomassa nos módulos fermentativos está ilustrado na Figura 23 – a.

Primeiramente foi preparado o inóculo, o que foi feito da mesma maneira descrita para o cultivo em pequena escala. No cultivo em pequena escala, foi inoculado em torno de 10^7 esporos para cada 5 gramas de biomassa. Tentando manter as mesmas condições em biorreator, foi inoculado em torno de 2×10^6 esporos por grama de substrato.

O preparo da biomassa foi semelhante ao do cultivo em pequena escala, tendo sido a biomassa pesada em embalagens plásticas de polipropileno. A Tabela 6 indica a quantidade de biomassa total que foi pesada de acordo com o módulo do biorreator. A solução nutriente foi preparada da mesma forma que para o cultivo em pequena escala, mas em maior quantidade. Além da biomassa e da solução nutriente, foram preparadas embalagens plásticas contendo bagaço grosso para ser colocado nos módulos seco e úmido, sendo que em cada um desses módulos foram inseridos 100 g de bagaço. A biomassa em embalagens plásticas e a solução nutriente foram esterilizadas em autoclave a 121 °C e 1,1 atm por 20 minutos.

Após esterilização, a biomassa, o bagaço grosso, a solução nutriente e o inóculo foram levados a câmara de fluxo laminar. No fluxo, foi primeiramente preparado o módulo úmido. O conteúdo interno deste módulo era de bagaço úmido, que foi preparado adicionando-se 300 mL de solução nutriente (para 75% de umidade em base úmida) em uma das embalagens contendo bagaço grosso, e em seguida o conteúdo foi homogeneizado e empacotado no módulo. Em seguida, foram preparados os módulos de cultivo. Em cada embalagem plástica, foram adicionados o inóculo e a solução nutriente, com volume total tal que o material nos módulos de cultivo atingisse umidade de 75 %.

O volume total de líquido (inóculo mais solução nutriente) introduzido está apresentado na Tabela 6. Na sequência, os módulos fermentativos foram levados à coluna para serem conectados sequencialmente ao módulo úmido. O módulo seco foi o último a ser preparado, no qual foram empacotados 100 g do bagaço grosso seco, sendo este conectado ao segundo módulo fermentativo e fechando-se a coluna com o módulo de saída de interior cônico.

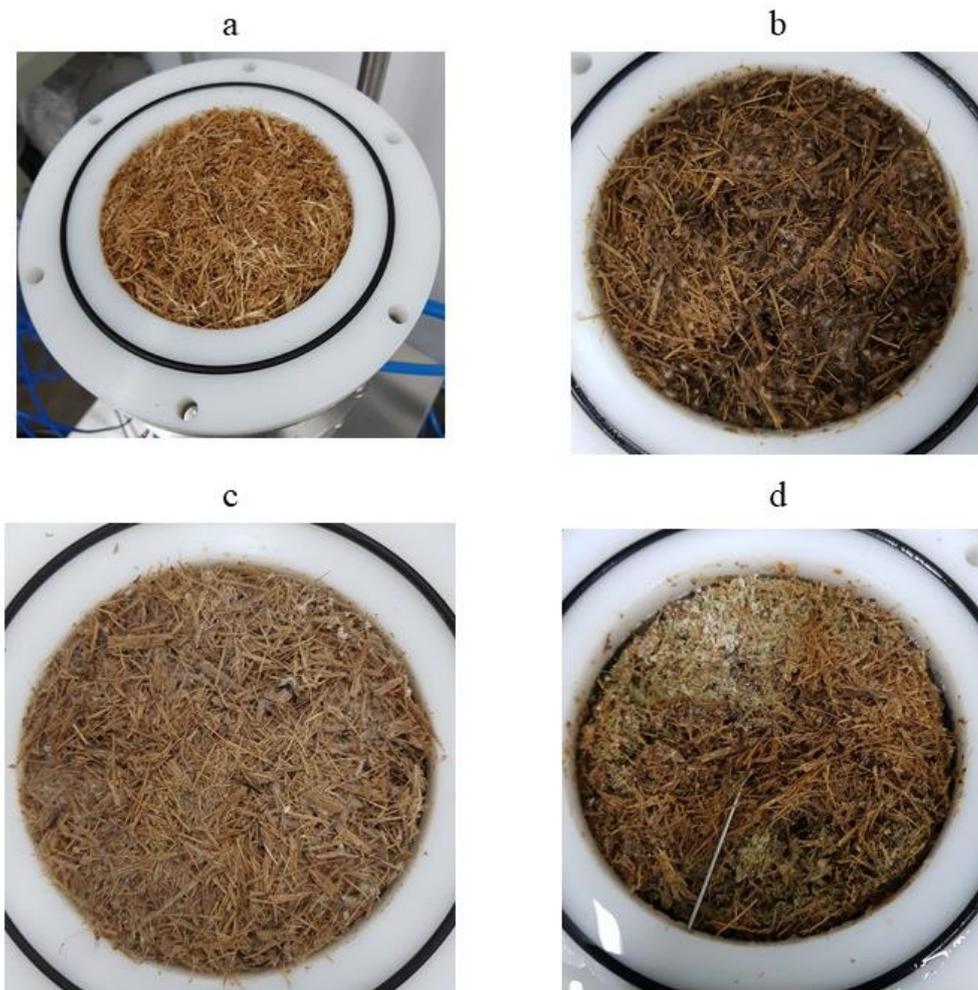
A montagem do biorreator está representada na Figura 17 - c. Antes de iniciar o cultivo, foi preparado o módulo de entrada, no qual foram inseridas esferas de vidro, bem como os umidificadores de ar, nos quais foram adicionadas esferas de vidro e água destilada. O módulo de entrada foi então conectado ao umidificador de temperatura elevada, que estava conectado ao umidificador a temperatura ambiente seguindo a rotâmetro, filtro e válvula de ar comprimido. A água no umidificador era repostada a cada 24 horas, pois durante o cultivo a água foi levada pelo ar por evaporação, para saturação do ar percolante.

Após a montagem da coluna, foram conectadas as mangueiras que levavam água à camisa do biorreator. Outra mangueira, responsável por levar ar do umidificador à coluna, foi conectada ao módulo de entrada. Foram também inseridos os termopares através dos flanges posicionados entre os módulos. Após montar todo o sistema do biorreator, foi aberta a válvula de ar comprimido, de forma que a vazão indicada no rotâmetro fosse de 350 L/h, e foi ligado o banho ultratermostatizado e sua bomba. A temperatura do banho e o tempo de cultivo foram os mesmos dos cultivos em pequena escala, conforme indicados na Tabela 5.

Para cada cultivo, foram montados dois módulos fermentativos. No caso do cultivo com *A. niger*, foram adicionados 195 g de substrato por módulo; no entanto, houve uma pequena diferença na composição de cada módulo. Na composição de um dos módulos, foi usada a mesma proporção b2s75h75 do planejamento experimental; no outro módulo, retirou-se totalmente o farelo de trigo da composição do substrato, sendo esta condição codificada como b2s100h75. A retirada do farelo de trigo foi para verificar a importância do farelo de trigo na produção das enzimas de interesse. Para *T. reesei*, o mesmo procedimento foi adotado: cada módulo foi empacotado com 195 g de substrato, sendo que um dos módulos foi empacotado com a mesma composição do experimento b2s75h75 e o outro módulo foi empacotado com substrato isento de farelo de trigo, também codificado como b2s100h75. Para *M. thermophila*, foram replicados dois experimentos do planejamento, os experimentos b4s25h75 e b4s75h75. Para cada

módulo, a quantidade de substrato foi de 130 g, já que possuíam grande quantidade de bagaço. A quantidade dos substratos em cada módulo está indicada na Tabela 6 e os módulos fermentados podem ser visualizados na Figura 23 – b para *A. niger*, Figura 23 para *M. thermophila* e Figura 23 – d para *T. reesei*.

Figura 23 – Módulo fermentativo do biorreator após a inoculação (a), e após os crescimentos dos fungos *A. niger* (b), *M. thermophila* (c) e *T. reesei* (d).



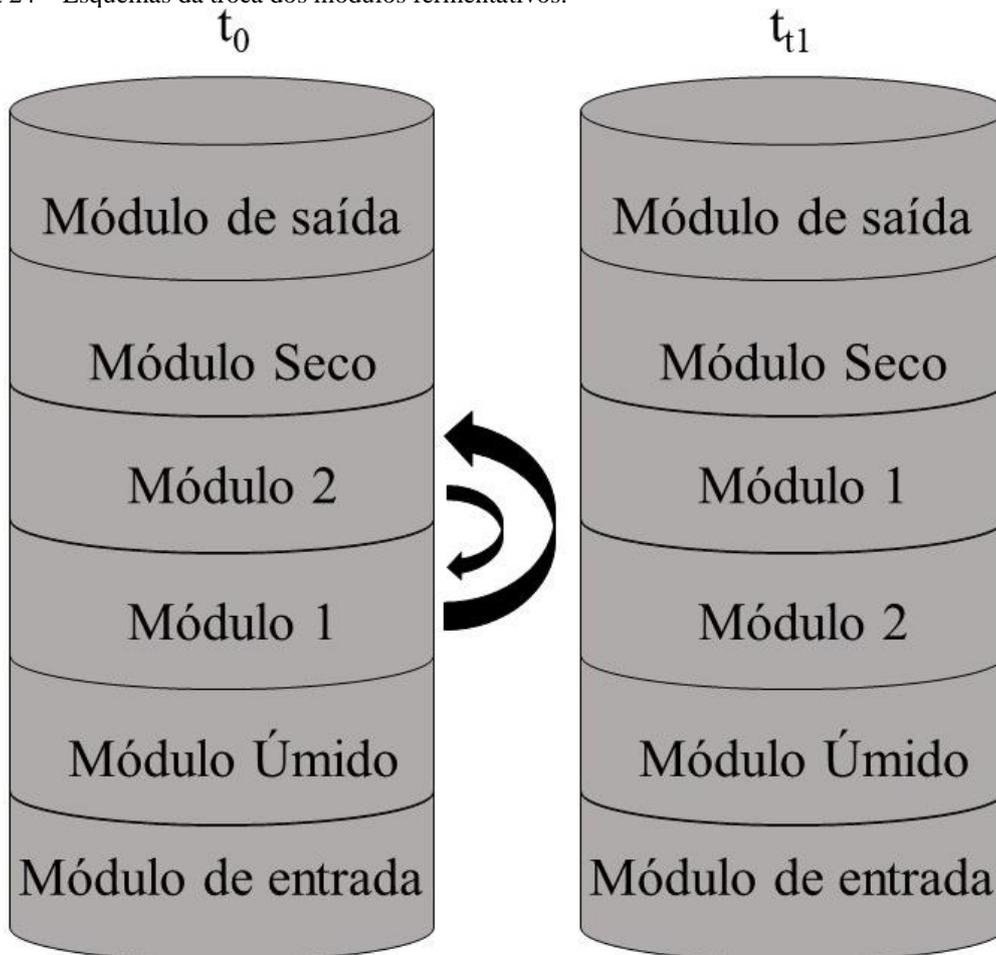
Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 6 – Composição da biomassa nos módulos fermentativos de acordo com o microrganismo a ser cultivado.

Substrato	<i>A. niger</i>		<i>M. thermophila</i>		<i>T. reesei</i>	
	Módulo 1 b2s75h75	Módulo 2 b2s100h75	Módulo 1 b4s25h75	Módulo 2 b4s75h75	Módulo 1 b2s75h75	Módulo 2 b2s100h75
Bagaço fermentativo (g)	78	78	104	104	78	78
Farelo de soja (g)	87,75	117	6,50	19,50	87,75	117
Farelo de trigo (g)	29,25	0,00	19,50	6,50	29,75	0,00
Solução nutriente + inóculo (mL)	585	585	390	390	585	585

Como apenas dois módulos foram testados, foi possível, de tempos em tempos, trocar os módulos 1 e 2 de posição, com a finalidade de que ambos os módulos recebessem, periodicamente, ar fresco, contendo maior concentração de oxigênio e menor concentração de gás carbônico e também para distribuição do calor gerado. No cultivo de *A. niger*, o tempo de troca dos módulos foi de 18 horas, sendo os módulos trocados três vezes durante o cultivo. Nos cultivos com *M. thermophila*, os módulos foram trocados a cada 24 horas, também sendo trocados três vezes. Nos cultivos com *T. reesei*, os módulos foram trocados de forma intermitente, sendo que nas primeiras quatro vezes, os módulos foram trocados a cada 24 horas e na quinta vez a posição foi trocada após 36 horas. A Figura 24 ilustra a troca dos módulos fermentativos, onde t_0 representa o tempo do início da fermentação e t_{t1} refere-se ao tempo de troca dos módulos. A Tabela 7 mostra em quais tempos os módulos foram trocados e a posição dos módulos após a troca.

Figura 24 – Esquemas da troca dos módulos fermentativos.



Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 7 – Tempos de troca dos módulos e posição dos módulos após a troca para cada microrganismos.

<i>A. niger</i>	<i>M. thermophila</i>	<i>T. reesei</i>
0 – 18 h $\left(\frac{\text{mod } 1}{\text{mod } 2}\right)$	0 – 24 h $\left(\frac{\text{mod } 1}{\text{mod } 2}\right)$	0 – 24 h $\left(\frac{\text{mod } 1}{\text{mod } 2}\right)$
18 – 36 h $\left(\frac{\text{mod } 2}{\text{mod } 1}\right)$	24 – 48 h $\left(\frac{\text{mod } 2}{\text{mod } 1}\right)$	24 – 48 h $\left(\frac{\text{mod } 2}{\text{mod } 1}\right)$
36 – 54 h $\left(\frac{\text{mod } 1}{\text{mod } 2}\right)$	48 – 72 h $\left(\frac{\text{mod } 1}{\text{mod } 2}\right)$	48 – 72 h $\left(\frac{\text{mod } 1}{\text{mod } 2}\right)$
54 – 72 h $\left(\frac{\text{mod } 2}{\text{mod } 1}\right)$	72 – 96 h $\left(\frac{\text{mod } 2}{\text{mod } 1}\right)$	72 – 96 h $\left(\frac{\text{mod } 2}{\text{mod } 1}\right)$
		96 – 132 h $\left(\frac{\text{mod } 1}{\text{mod } 2}\right)$
		132 – 168 h $\left(\frac{\text{mod } 2}{\text{mod } 1}\right)$

4.4 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DOS MÓDULOS FERMENTATIVOS

A extração das enzimas ao final dos cultivos em biorreator foi realizada segundo a mesma metodologia já descrita para os cultivos em embalagens plásticas, ou seja, adicionando-se líquido extrativo na proporção de 10 mL/g de substrato sólido seco inicial ao material fermentado.

Para a extração das enzimas a partir do material cultivado no biorreator, primeiramente, a biomassa foi transferida de cada módulo para uma embalagem plástica de polipropileno. Para preservar as enzimas, que posteriormente foram utilizadas em hidrólise enzimática, ao invés de utilizar água destilada, foi utilizada uma solução tampão de acetato de sódio pH = 5,0 como líquido de extração, na mesma proporção de 10 mL/g. Da mesma maneira, o substrato foi homogeneizado manualmente. Após extração por 15 minutos, uma pequena parcela foi transferida para tubos falcons para análises de quantificação de proteínas e de atividades enzimáticas (Figura 21 - b). O restante do volume do extrato foi transferido para garrafas plásticas e congelado.

4.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE

Dos complexos enzimáticos produzidos em biorreator de leite empacotado em multicamadas, o escolhido para realizar a hidrólise enzimática foi o complexo produzido pelo fungo *M. thermophila*, no experimento b4s25h75 do biorreator, pois foi um coquetel mais rico em endoglucanase e também com maior seletividade em relação a β -glicosidase. Após a fermentação, as enzimas foram extraídas e em seguida filtradas em membranas de poliestireno, sendo a porosidade da primeira membrana de 0,45 μm e a segunda de

0,22 μm . Essa filtração foi para retirar a maior quantidade de sólidos que poderiam interferir nas análises para caracterização de nanocelulose.

Em conjunto com a filtração dos coquetéis enzimáticos, a polpa kraft de eucalipto recebeu um pré-tratamento para ser utilizada na hidrólise, visando reduzir o volume da polpa, aumentar a superfície de contato e deixar a celulose mais exposta para a ação das enzimas. Os tratamentos utilizados na polpa de celulose foram os mesmos utilizados por SQUINCA et al., (2020), no qual blocos da polpa passaram primeiramente em um moinho de facas tipo Willey 500 W (SOLAB) para redução de volume e para poder realizar o segundo pré-tratamento, que foi no moinho de bola (modelo CT-12241, Servitech) por 90 minutos, que por sua vez reduziu o volume da polpa kraft à dimensão de partículas. A imagem da polpa pré-tratada pode ser visualizada na Figura 25.

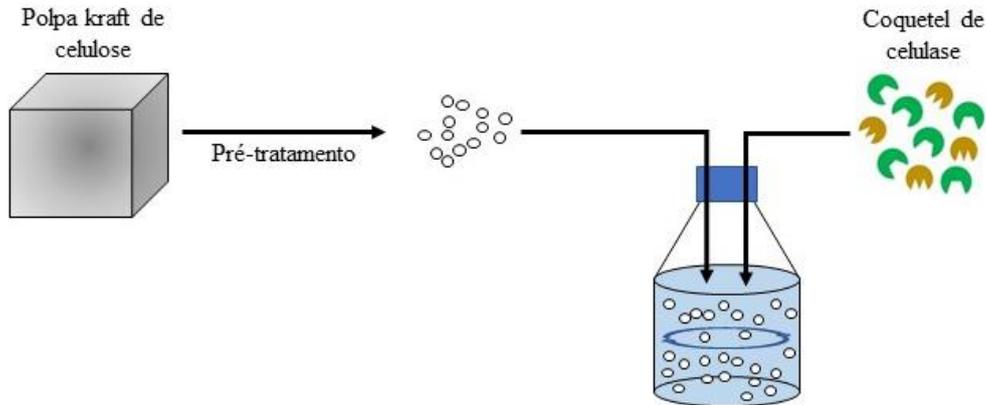
Figura 25 – Polpa de celulose kraft de eucalipto após passar pelo moinho de bolas.



Fonte: Acervo pessoal.

Após o pré-tratamento da polpa, foi realizada a hidrólise enzimática com o coquetel enzimático de celulase filtrado (Figura 26). A reação foi realizada na condição de 2% (m/v) de polpa e com carga enzimática de 10 mg-proteína/g-polpa. A hidrólise foi conduzida em garrafas schott de 100 mL, fechadas para evitar perda de líquido por evaporação, com volume reacional de 50 mL em incubadora rotativa à 200 rpm de agitação e nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C, para verificar em qual condição a enzima termoestável proporcionaria melhor conversão da celulose e melhor rendimento de produção de nanocelulose.

Figura 26 – Preparação do substrato e hidrólise enzimática.



Fonte: Acervo pessoal.

Durante a hidrólise, foram retiradas amostras de 1 mL nos tempos de 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h, a fim de se determinar a concentração de glicose liberada. Com esse dado, foi possível calcular a conversão de celulose da polpa kraft pela Equação 4, onde %X representa a conversão percentual de celulose, m_g^t a massa de glicose produzida no tempo t , m_g^0 a massa de glicose no tempo zero, m_p^0 a massa inicial de polpa kraft, que foi aproximadamente 1 g, y_c o valor de celulose contida na polpa e 0,90 é a razão das massas molares entre o anidroglicano presente na celulose e a glicose liberada. Os tempos de finalização de hidrólise foram de 48 e 96 h, nos quais as garrafas Schott foram retiradas da incubadora e levadas a banhos com água fervente e foram deixadas nos banhos por 10 minutos, para desnaturar as enzimas e finalizar a reação. Com a hidrólise finalizada, iniciou-se o processo de extração dos nanomateriais.

$$\%X = \frac{(m_g^t - m_g^0) \cdot 0,9}{m_p^0 \cdot y_c} \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

4.5.1 Extração da nanocelulose

Após finalizada a reação de hidrólise, toda a massa foi transferida para tubos cônicos falcons, onde foi feita uma centrifugação a 8000 rpm por 20 min a 4 °C para separar todo o sólido do líquido. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o volume do sobrenadante foi substituído por água mili-Q. O processo de centrifugação foi repetido nas mesmas condições e novamente o sobrenadante foi retirado e substituído por água mili-Q. Esse processo foi repetido aproximadamente cinco vezes para a retirar toda

a glicose que pudesse ter ficado junto aos sólidos (BONDANCIA et al., 2017; SQUINCA et al., 2020).

Com toda a glicose retirada, água mili-Q foi novamente repostada e a solução foi sonicada por 5 minutos na amplitude de 50 % (1375 W) em banho de gelo (SONICS VIBRA CELL VCX130) (SQUINCA et al., 2020). Esse processo teve como finalidade remover a nanocelulose que pudesse estar aderida na polpa e também para desaglomerar partículas de nanocelulose entre si. Após a sonicação, a solução foi ressuspensa em vórtex e centrifugada na velocidade de 4000 rpm por 2 min a 4 °C. Após a centrifugação, 4 mL da suspensão foi transferida para uma placa de Petri e colocada em uma estufa a 60 °C, onde foi deixada até que todo o líquido fosse evaporado. Com o líquido evaporado, foi possível determinar a massa de nanomateriais contida nos 4 mL de solução e foi possível calcular o rendimento de nanocelulose pela Equação 5 (SQUINCA et al., 2020), onde %Y representa o rendimento percentual de nanomateriais, m_{nano} a massa de nanomateriais presente na placa seca, R a relação entre volume reacional de hidrólise (50 mL) e o volume amostral analisado (4 mL), m_p^0 a massa inicial da polpa a ser hidrolisada, y_c a fração de celulose na polpa e m_g^t a massa de glicose liberada no tempo de hidrólise.

$$\%Y = \frac{m_{\text{nano}} \cdot R}{m_p^0 \cdot y_c - m_g^t} \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

O volume de líquido retirado para calcular o rendimento foi repostado com água mili-Q e as amostras foram novamente centrifugadas na velocidade de 8000 rpm por 20 min a 4 °C. Parte do sobrenadante foi retirado, este foi seco por liofilização e, após a sublimação do líquido, sobrou o nanomaterial sólido. O sólido foi caracterizado por DRX para determinar o índice de cristalinidade, por FTIR para determinar os compostos químicos e por TGA, para determinar as propriedades térmicas das partículas. Outra parte do sobrenadante foi separada para a análise microscópica.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas foi determinada utilizando o reagente de Bradford (BRADFORD, 1976). Esta metodologia determina a quantidade de proteínas solúveis através de método colorimétrico utilizando a leitura de absorvância no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

Antes da preparação das amostras, foi necessário preparar o branco, amostra de referência para a qual a absorbância seria ajustada em zero. Esta amostra foi preparada em um microtubo eppendorf contendo 1 mL de reagente de Bradford e 20 μ L de água destilada. Com o branco preparado, fez-se a leitura e zerou-se o espectrofotômetro.

As amostras de extratos enzimáticos foram preparadas de forma semelhante. Em um tubo eppendorf, inseriram-se primeiramente 20 μ L do extrato enzimático e em seguida foi adicionado 1 mL do reagente de Bradford. Após a inserção do reagente de Bradford, deixou-se cada amostra reagir por exatos 5 minutos, após o que foi feita a leitura de absorbância da amostra. Esta análise foi realizada em triplicata por amostra.

Com os valores de absorbância da amostra, foi possível calcular a quantidade de proteína (C_P em mg/L) pela Equação 6, na qual se multiplica a absorbância Abs por uma constante característica do reagente de Bradford (k_B em mg/L).

$$C_P = k_B \cdot \text{Abs} \quad \text{Equação 6}$$

4.7 ATIVIDADE DE ENDOGLUCANASE

A atividade de endoglucanase foi determinada com base na metodologia de GHOSE (1987). A reação enzimática foi realizada em tubo de ensaio, adicionando-se primeiramente 450 μ L de solução de CMC 4% (V_{CMC}) e deixando-se o tubo de ensaio em um banho termostático a 45 °C (extratos de *A. niger* ou *T. reesei*) ou 60 °C (extrato de *M. thermophila*) (CASCIATORI et al., 2015) e no banho adicionaram-se 50 μ L da amostra de extrato enzimático (V_{ext}), podendo ou não estar diluído (D). Agitou-se rapidamente a solução e deixou-se a enzima reagir por 10 minutos ($t_{\text{reação}}$). Passado o tempo, foram adicionados 500 μ L de solução de DNS e agitou-se novamente. Após a agitação, o tubo de ensaio foi transferido imediatamente a outro banho com água fervente por 10 minutos, onde o DNS reage com os açúcares redutores, mudando de cor de acordo com a quantidade de açúcar disponível, e também inativa as enzimas. A reação de açúcares redutores com DNS foi interrompida deixando-se os tubos de ensaio em banho de gelo por 5 minutos. Após esse tempo, a solução no tubo de ensaio foi diluída com 4 mL de água destilada, agitada em vórtice e em seguida foi feita leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro. A análise de cada extrato foi feita em triplicata.

Paralelamente, para quantificar corretamente a produção de glicose, foi necessário determinar através de uma solução controle a quantidade de glicose presente no extrato enzimático. Para essa reação, em um tubo de ensaio foram adicionados 450 μ L de solução

de CMC, em seguida adicionaram-se 500 μL de solução de DNS e 50 μL de extrato enzimático. Após esse procedimento, agitou-se a amostra e os tubos foram imediatamente colocados em um banho com água fervente por 10 minutos e em seguida em banho de gelo por 5 minutos. Na sequência, foi feita uma diluição com 4 mL de água e agitou-se em vórtice. Foi feito um controle por amostra para leitura no espectrofotômetro.

Com os valores de absorbância, primeiramente subtraiu-se do valor da absorbância da amostra, o valor da absorbância do controle e com esse valor foi possível determinar a concentração de glicose produzida em cada amostra através da Equação 7, onde Abs foi o valor de absorbância obtido pelo espectrofotômetro, m e n os coeficientes angular e linear da reta obtida com base na absorbância das soluções conforme Tabela 2 e C_g foi a concentração que se calculou. Com o valor da concentração de glicose, foi possível calcular a atividade de endoglucanase ($\text{Atividade}_{\text{enz}}$) pela Equação 8. A atividade foi obtida em U (μmol de açúcares redutores produzidos por minuto de reação) mL^{-1} . Porém, como as enzimas foram obtidas através de uma fermentação em estado sólido, foi mais interessante expressar a atividade em termos de glicose produzida pela massa de substrato sólido seco inicial. Para isso, bastou multiplicar a Equação 8 pela razão de volume por massa usado para extrair as enzimas do substrato, que foi de 10 mL/g -substratos. A Atv_{enz} da Equação 9 expressa a atividade em U/g-substratos.

$$\text{Abs} = m \cdot C_g + n \quad \text{Equação 7}$$

$$\text{Atividade}_{\text{enz}} = D \cdot \frac{C_g \cdot (V_{\text{ext}} + V_{\text{CMC}})}{t_{\text{reação}} \cdot V_{\text{ext}}} \quad \text{Equação 8}$$

$$\text{Atv}_{\text{enz}} = 10 \cdot \text{Atividade}_{\text{endo}} \quad \text{Equação 9}$$

4.8 ATIVIDADE DE XILANASE

Para a atividade de xilanase, a metodologia foi similar à utilizada para medir a atividade de endoglucanase. A diferença foi o substrato utilizado para que a xilanase catalisasse a reação, e para isso se utilizou uma solução de xilana 1% (m/v) (GHOSE; BISARIA, 1987). Para a reação, foram adicionados 450 μL da solução de xilana e 50 μL de extrato enzimático, agitou-se em vórtice e a reação enzimática aconteceu em banho termostático a 60 $^{\circ}\text{C}$ para *M. thermophila* por 10 minutos. Após a reação enzimática, adicionaram-se 500 μL de DNS e deixou-se a reação colorimétrica ocorrer a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e, em seguida, o tubo foi colocado em banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 4 mL de água destilada e foi feita leitura a 540 nm em

espectrofotômetro. A concentração de xilanose foi calculada por uma curva de ajuste para o DNS com a xilanose e através da Equação 8 e da Equação 9 foi obtido o valor da atividade enzimática de xilanase por grama de substrato.

4.9 ATIVIDADE DE β -GLICOSIDASE

A metodologia para a atividade de β -glicosidase foi semelhante à da endoglucanase, com a diferença no reagente de coloração e no substrato, tendo também sido baseada na metodologia de GHOSE (1987). O substrato utilizado foi uma solução de celobiose 15 mM e o reagente do kit glicose liquiform.

O preparo do teste enzimático foi feito em tubos de ensaio, no qual adicionou-se primeiramente 0,5 mL da solução de celobiose, seguido por 0,5 mL de extrato enzimático diluído. Logo após a adição do extrato, a solução foi homogeneizada em vórtice e colocada em banho termostático à temperatura de 50 °C, condição na qual ocorre a reação enzimática, durante 30 minutos. Após esse tempo, os tubos foram imediatamente transferidos para banho fervente por 5 minutos para cessar a reação, desnaturando as enzimas. Após a desnaturação, os tubos foram colocados em banho de gelo.

Durante o tempo de banho de gelo, foram preparados tubos de ensaios, um para cada reação enzimática, contendo 1 mL do reagente do kit de glicose liquiform onde adicionaram-se 10 μ L do produto de reação, homogeneizando-se no vórtice em seguida, e deixando-se reagir por 10 minutos no banho termostático a 37 °C. Após essa reação, a absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 505 nm, segundo o manual do reagente.

Paralelamente à preparação das amostras, foram feitas amostras de controle para verificar a quantidade de glicose contida nos extratos enzimáticos. Da mesma forma, foram colocadas 0,5 mL de solução de celobiose e em seguida 0,5 mL de extrato diluído. Para impedir a reação imediata da enzima, os tubos foram colocados em água fervente. A partir deste ponto, o procedimento foi igual ao dos extratos, transferindo-se os tubos controle para banho de gelo e misturando-se 10 μ L da mistura controle com 1 mL do reagente de glicose peroxidase. Além dos controles, também foram preparados os padrões. A solução padrão vem junto com o kit, tendo-se adicionado 10 μ L dessa solução a 1 mL do reagente. Tanto as soluções controles quanto a padrão também foram lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 505 nm.

Com o valor das absorvâncias das amostras e da média dos padrões, utilizando a Equação 10, foi possível quantificar a concentração de glicose na amostra e, com a Equação 8 e a Equação 9, calculou-se a atividade enzimática do extrato.

$$C_g = \frac{Abs_{amostra}}{Abs_{padrão}} \cdot C_{padrão} \quad \text{Equação 10}$$

4.10 GLICOSE LIBERADA NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Para verificar a quantidade de glicose liberada durante a hidrólise, foi utilizado o kit glicose liquiform, no qual 10 µL de amostra (diluído se necessário) foi adicionado em 1 mL do reagente e homogeneizado. A reação ocorreu em banho termostático a 37 °C por 10 minutos. Após a reação, foi feita leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda 505 nm e, com a Equação 10, calculou-se a concentração de glicose liberada.

4.11 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

Os nanomateriais obtidos da hidrólise enzimática da polpa foram primeiramente analisados para determinar o índice de cristalinidade pela análise de DRX. Essa análise foi feita no difratômetro Shimadzu LabX XRD-6000 operado com radiação Cu K α ($\lambda = 0,15428$), a 30 kV e 30 mA, na faixa 2 Θ de 5° a 40°, com escaneamentos de 2° min⁻¹. O índice de cristalinidade foi calculado pela Equação 11, segundo método determinado por SEGAL et al. (1959), no qual I₂₀₀ representa a altura do pico no plano cristalino 200 e I_{am} representa a região amorfa.

$$\%CI = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \cdot 100 \quad \text{Equação 11}$$

4.12 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise FTIR foi feita para determinar os grupos químicos presentes nas partículas sólidas obtidas da hidrólise da polpa. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Vertex 70-RAM II (Bruker Scientific instruments, EUA). A transformada de Fourier de reflexão total infravermelho foi adquirida na resolução de 2 cm⁻¹ na faixa de número de onda de 4000 e 400 cm⁻¹, com 32 escaneamentos.

4.13 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

O TGA foi realizado para determinar as características térmicas das partículas sólidas obtidas da hidrólise enzimática da polpa. A análise foi realizada em uma câmara ambientada com nitrogênio, sendo este alimentado na vazão volumétrica de 50 mLmin⁻¹. O equipamento utilizado para a análise foi o analisador termogravimétrico TGA-Q500, TA Instrumets, EUA. A câmara com os nanomateriais foi aquecida na faixa de temperatura de 20 até 700 °C, sendo que o aumento da temperatura na câmara foi de 10 °C min⁻¹.

4.14 MICROSCOPIA

Para demonstrar que as partículas obtidas da hidrólise da polpa de celulose eram nanocelulose, foi feita a análise de microscopia de força atômica. Para obter as imagens, foi utilizado o microscópio Multimode 8, Bruker, Alemanha, disponível no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Uma amostra contendo nanomateriais foi depositada em mica, tendo sido aplicada a técnica de força de pico. Uma sonda de nitreto de silício (ScanAsyst-Air, Bruker, Alemanha) foi empregada, onde foi aplicada a força nominal de 0,4 N m⁻¹. As escalas das imagens obtidas foram de 5 x 5 µm e 2,5 x 2,5 µm. Para análise populacional, 100 partículas foram selecionadas para medição de comprimento e diâmetro e, com essas medições, foi possível calcular a razão de aspecto (σ), onde L representa o comprimento e do diâmetro da nanocelulose.

$$\sigma = \frac{L}{d} \quad \text{Equação 12}$$

4.15 SOFTWARES

Para o planejamento experimental, foi utilizado o software Chemoface e, para os testes estatísticos, como o teste de Tukey, foi utilizado o software Origin 8.5. Para os testes, utilizou-se o nível de significância (α) de 10%. Para análise de imagem, foi utilizado o software ImageJ 64-bit Java 1,8,0_172.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM EMBALAGENS PLÁSTICAS

Um planejamento experimental fatorial completo foi utilizado para determinar a melhor composição de substrato e umidade para produzir um coquetel enzimático rico em endoglucanase e pobre em β -glicosidase no cultivo em embalagens plásticas com os fungos *A. niger*, *M. thermophila* e *T. reesei*.

5.1.1 Atividades enzimáticas de endoglucanase e de β -glicosidase

As atividades enzimáticas de endoglucanase dos experimentos realizados estão ilustradas na Figura 27. Foi possível verificar que o complexo enzimático do fungo *M. thermophila* apresentou maior atividade de endoglucanase, na condição do experimento b4s25h75 (codificação de acordo com a Tabela 3) no qual o valor de atividade foi de 199 ± 4 U/g-substrato. Os fungos *A. niger* e *T. reesei* apresentaram valores semelhantes de atividade, sendo que *A. niger* apresentou atividade máxima de endoglucanase no experimento b2s75h75 de $30,2 \pm 0,5$ U/g-substrato e *T. reesei* no b4s75h55 de $27,2 \pm 0,8$ U/g-substrato.

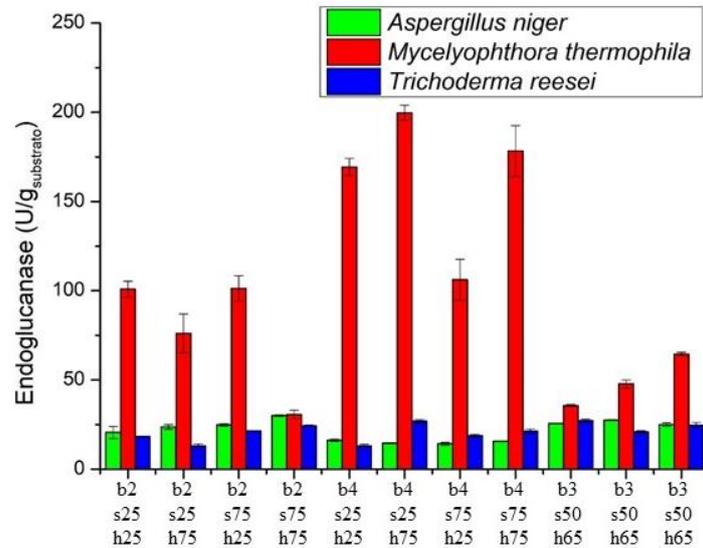
Para *M. thermophila*, os experimentos com maior composição de bagaço de cana foram os que proporcionaram maior atividade enzimática de endoglucanase. Segundo o gráfico de Pareto da Figura 28 - b, o bagaço de cana foi a variável que teve o maior efeito positivo para a produção de endoglucanase, seguido pela interação entre o bagaço e a umidade, ambos com efeito significativo. O efeito do farelo de soja também foi considerado significativo, porém seu aumento na composição diminui a produção de endoglucanase. Como o efeito do farelo de soja foi negativo, isso significa que o efeito do farelo de trigo foi significativamente positivo o que indica que seu aumento na composição contribui para a produção de endoglucanase. Os outros fatores ou a interação entre fatores não contribuíram significativamente para a produção de endoglucanase. Como a concentração do bagaço foi o fator que apresentou maior efeito positivo e o farelo de soja apresentou um efeito negativo, isso indica que *M. thermophila* consegue ter acesso à celulose presente no bagaço com uma pequena quantidade de farelo, sendo que o farelo de trigo é mais benéfico para a produção de celulase do que o farelo de soja. Os farelos possuem maior quantidade de proteína que o bagaço e eles são de fácil assimilação pelo

fungo, mas este fungo não precisou de muito farelo para sintetizar alta quantidade de endoglucanase.

Em termos de produção de endoglucanase por *A. niger*, os extratos que apresentaram maiores atividades foram oriundos dos experimentos nos quais a concentração de bagaço foi menor. As variáveis significativas foram a concentração de bagaço de cana de açúcar e a interação entre bagaço de cana e farelo de soja (Figura 28 - a). Apesar de não significativa, a concentração do farelo de soja teve um efeito positivo, o que indica que o fungo precisa da proteína dos farelos para possivelmente crescer e produzir mais endoglucanase. Pelo fato de a massa de bagaço ter um efeito negativo, pode significar que o fungo *A. niger* tem dificuldade de acessar a celulose presente no bagaço, possivelmente devido à lignina (Tabela 1) e esse pode ser também um dos motivos de o fungo ter apresentado atividade de endoglucanase inferior à obtida do cultivo de *M. thermophila*.

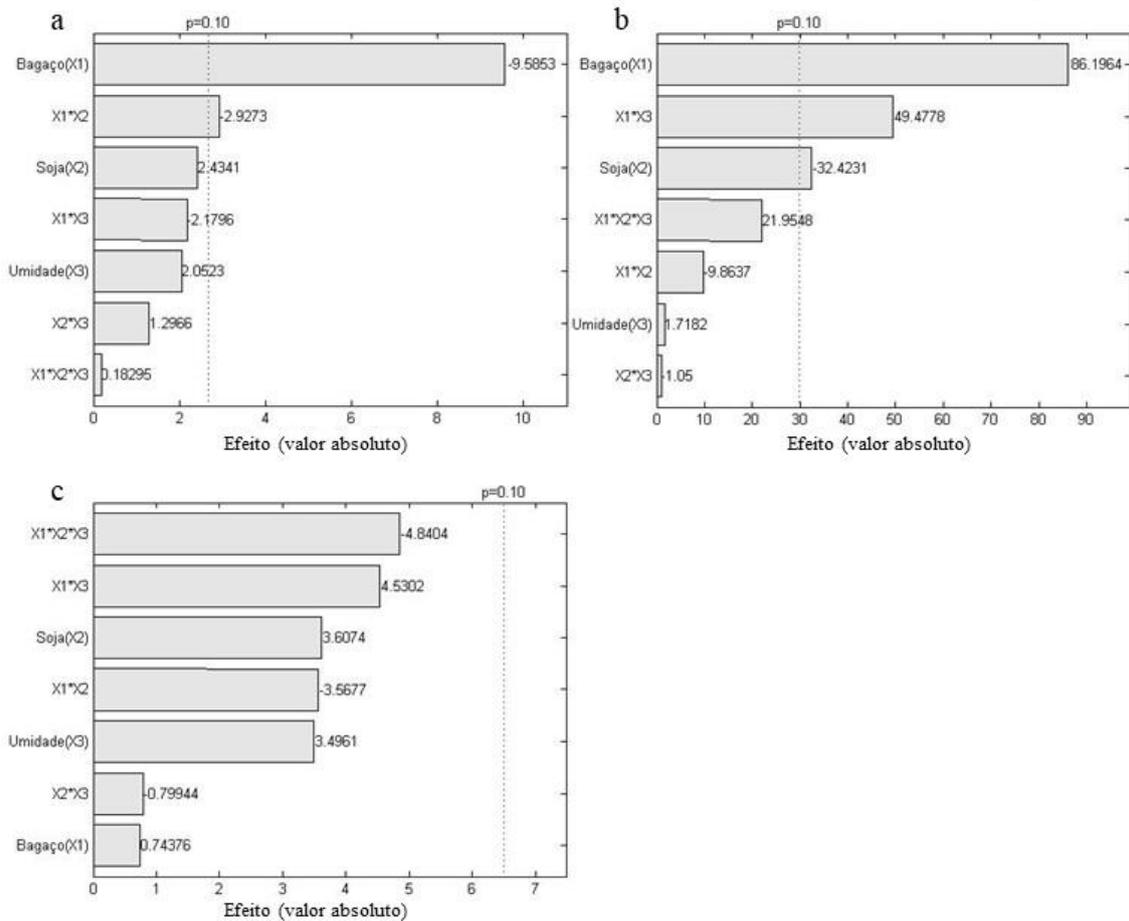
O coquetel enzimático de *T. reesei* apresentou atividades de endoglucanase semelhantes às dos extratos de *A. niger* e, como demonstrado no gráfico de Pareto, nenhuma das variáveis, nem suas interações, apresentaram significância (Figura 28 - c). Uma das possíveis explicações pode ser que o fungo consiga consumir todos os substratos de maneira equalitária. Apesar de nenhuma variável apresentar efeito significativo, o farelo de soja apresentou um efeito positivo maior que o bagaço, o que pode indicar que as proteínas presentes no farelo de soja foram benéficas para a produção de endoglucanase, pelo fato de a produção da enzima estar fortemente associada ao crescimento do fungo.

Figura 27 – Atividade enzimática de endoglucanase de acordo com o planejamento experimental do cultivo em pequena escala variando a composição dos substratos e umidade.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 28 – Gráfico de Pareto do cultivo com os fungos (a) *A. niger*, (b) *M. thermophila* e (c) *T. reesei* de acordo com o planejamento experimental do cultivo em escala de frascos para a atividade de endoglucanase.

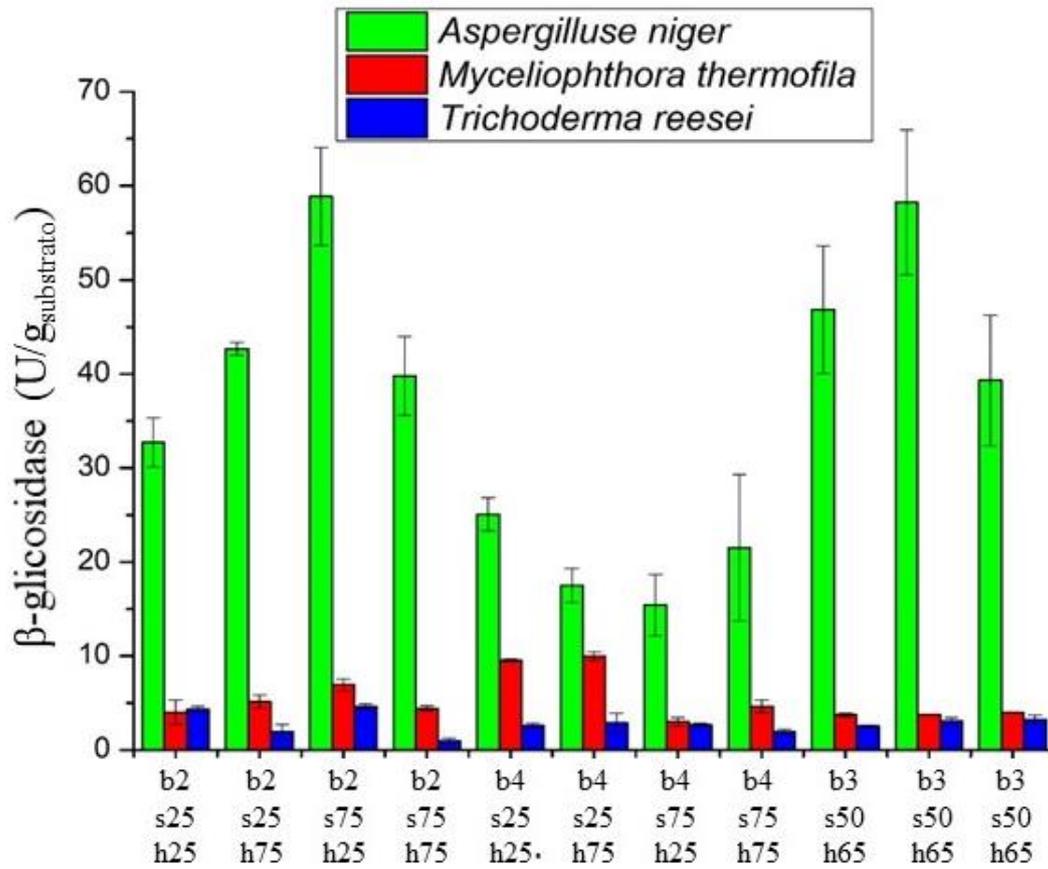


Fonte: Acervo pessoal

Já quanto à produção de β -glicosidase, no geral, *A. niger* foi o fungo que proporcionou maiores atividades dessa enzima, sendo a condição b2s75h55 a condição com maior atividade, igual a $58,9 \pm 5,2$ U/g-substrato, seguido por *M. thermophila*, que no experimento b4s25h75 apresentou atividade de $10,0 \pm 0,4$ U/g-substrato e *T. reesei*, que no experimento b2s75h55 teve a atividade de $4,5 \pm 4,4$ U/g-substrato (Figura 29). No cultivo com *A. niger*, a concentração de bagaço de cana foi a única variável significativa e seu efeito foi negativo (Figura 30 - a), ou seja, quanto menor a concentração de bagaço de cana, maior a quantidade de β -glicosidase produzida. Para *M. thermophila*, com exceção da variável umidade, todas as outras variáveis e interações foram significativas para a produção da enzima (Figura 30 - b). Já *T. reesei* (Figura 30 - c) foi o fungo que menos produziu β -glicosidase, e a variável que foi mais significativa foi a umidade, com efeito negativo, e a interação entre umidade e concentração de bagaço de cana.

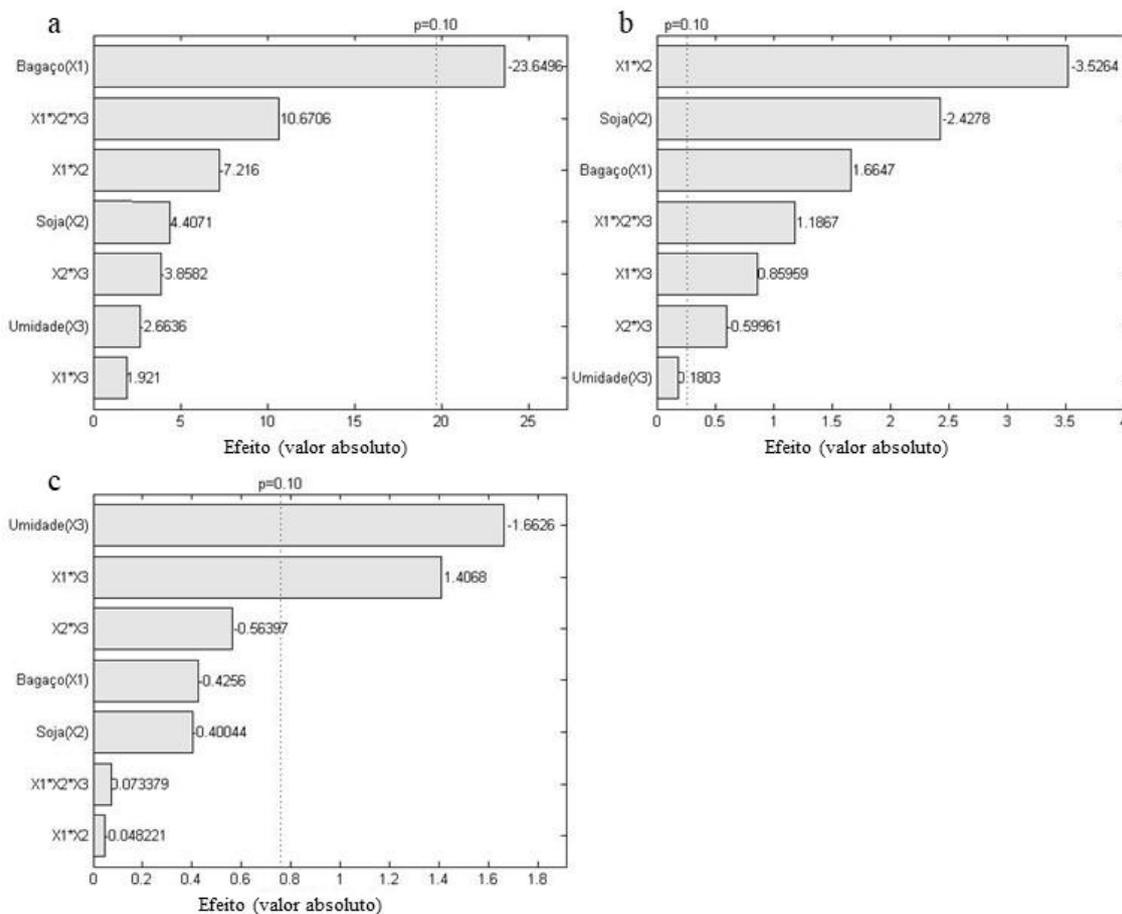
Apesar de *A. niger* ser o fungo que mais produziu a enzima β -glicosidase, sabe-se que essa enzima faz a hidrólise da celobiose para liberação de glicose. Além disso, SIQUEIRA; DIAS; ARANTES (2019) reportou um possível caso de consumo de nanocristais de celulose por essa enzima, o que pode significar que uma alta concentração de β -glicosidase não é favorável. Porém, SIQUEIRA; DIAS; ARANTES (2019) também mencionam que há casos em que a β -glucosidase pode ajudar na produção de nanocristais, ao contribuir para não inibição da endoglucanase, já que a celobiose é um inibidor dessa enzima.

Figura 29 – Atividade enzimática de β -glucosidase de acordo com o planejamento experimental do cultivo em pequena escala variando a composição do substrato.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 30 – Gráfico de Pareto do cultivo com os fungos (a) *A. niger*, (b) *M. thermophila* e (c) *T. reesei* de acordo com o planejamento experimental do cultivo em escala de frascos para atividade de β -glicosidase.



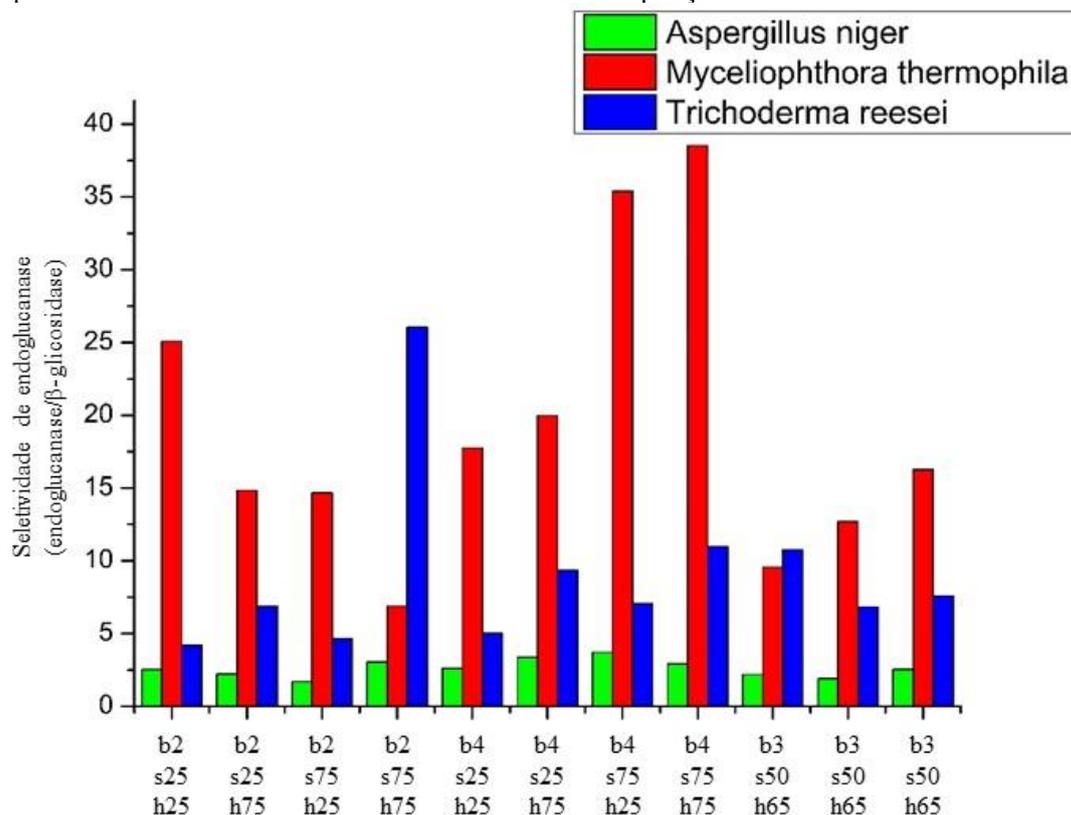
Fonte: Acervo pessoal.

Apesar de a β -glicosidase ter ajudado em alguns casos na produção de nanocelulose, ela foi necessária em pequenas concentrações (SIQUEIRA; DIAS; ARANTES, 2019a); por isso, espera-se que coquetéis enzimáticos com altas concentrações de endoglucanase e baixa concentração de β -glicosidase (alta seletividade de endoglucanase) sejam as melhores combinações para produzir nanocelulose. Por esse motivo, foi confeccionado um gráfico da seletividade de endoglucanase em relação à β -glicosidase (Figura 31) sendo que *M. thermophila* foi o fungo que apresentou a maior valor desse parâmetro de desempenho. O b2s75h75 para *T. reesei* também apresentou alta seletividade de endoglucanase, já que este extrato, apesar de ter apresentado baixa atividade de endoglucanase, apresentou também a menor atividade de β -glicosidase. O cultivo com *A. niger* gerou baixa seletividade de endoglucanase, por ter produzido altas quantidades de β -glicosidase quando comparado com os outros fungos.

Para *M. thermophila*, foram escolhidos para serem reproduzidos no biorreator o experimento b4s25h75, que apresentou maior atividade de endoglucanase, e b4s75h75, que apresentou maior seletividade de endoglucanase. Para *A. niger*, o cultivo b2s75h75

foi o que se destacou por produzir maior atividade de endoglucanase. O cultivo de *T. reesei* que se destacou em relação aos demais também foi o cultivo b2s4h75, que apresentou uma alta seletividade de endoglucanase, além de apresentar concentração muito baixa de β -glicosidase.

Figura 31 – Razão entre atividades endoglucanase e β -glicosidase de acordo com o planejamento experimental do cultivo em escala de frascos variando a composição e a umidade do substrato.



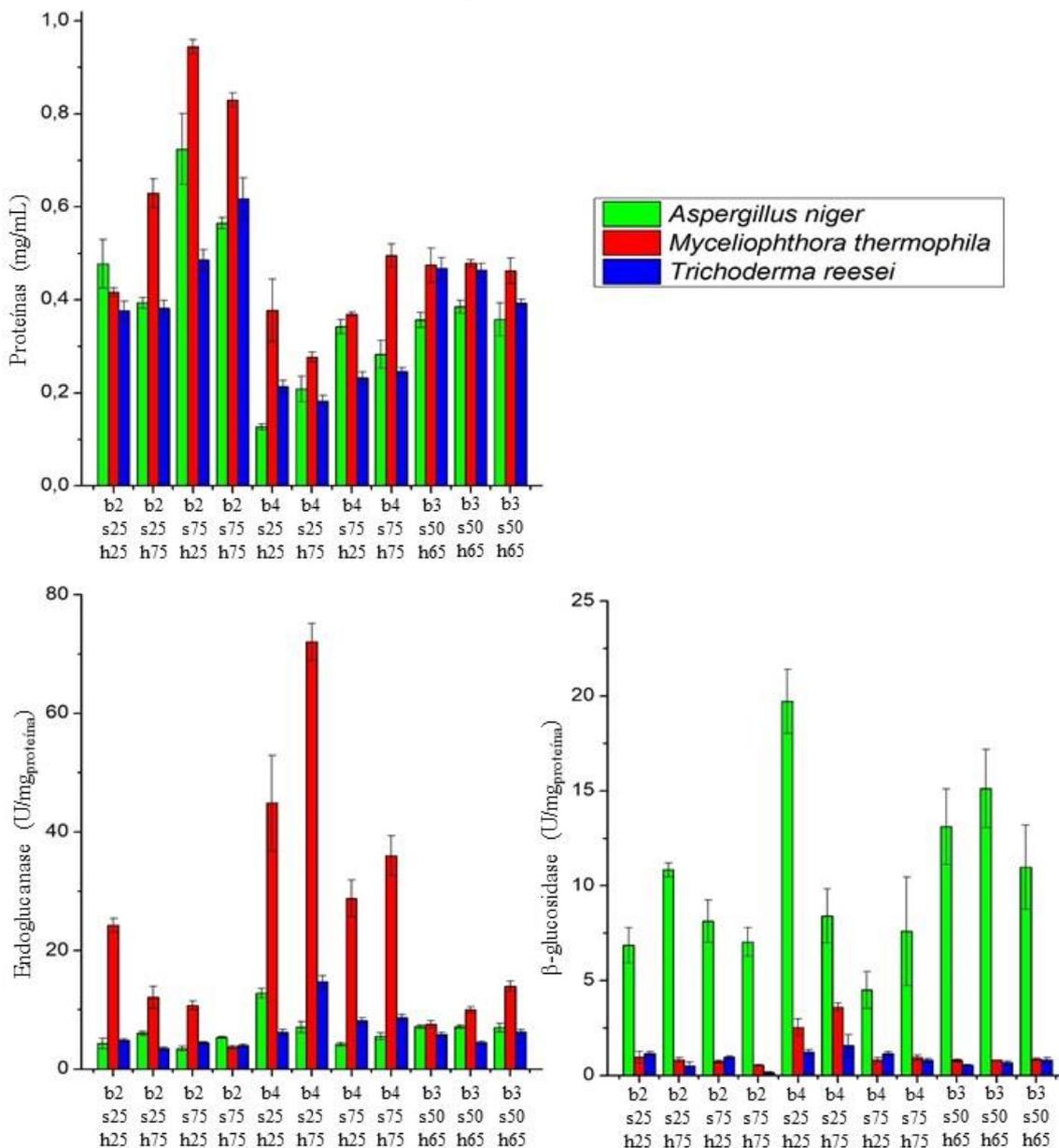
Fonte: Acervo pessoal.

5.1.2 Síntese de proteínas e atividade específica dos extratos enzimáticos

Os experimentos que forneceram os extratos com maiores concentrações de proteínas, para os três fungos utilizados, foram os experimentos nos quais havia menor massa de bagaço e maior fração de soja (experimentos b2s75), o que pode ser verificado no gráfico de barras da Figura 32 e no gráfico de Pareto da Figura 33. O diagrama de Pareto ainda indica que a concentração de bagaço foi a que teve o efeito mais significativo para a produção de proteínas, sendo que sua presença em grande quantidade no substrato reduz a quantidade de proteína produzida. Esse efeito negativo se deve ao fato de o bagaço possuir menos proteínas em sua composição, sendo uma fonte pobre de nitrogênio (Tabela 1). A concentração de farelo de soja também apresentou um efeito significativo na produção de proteínas, sendo que os experimentos com maior concentração de farelo

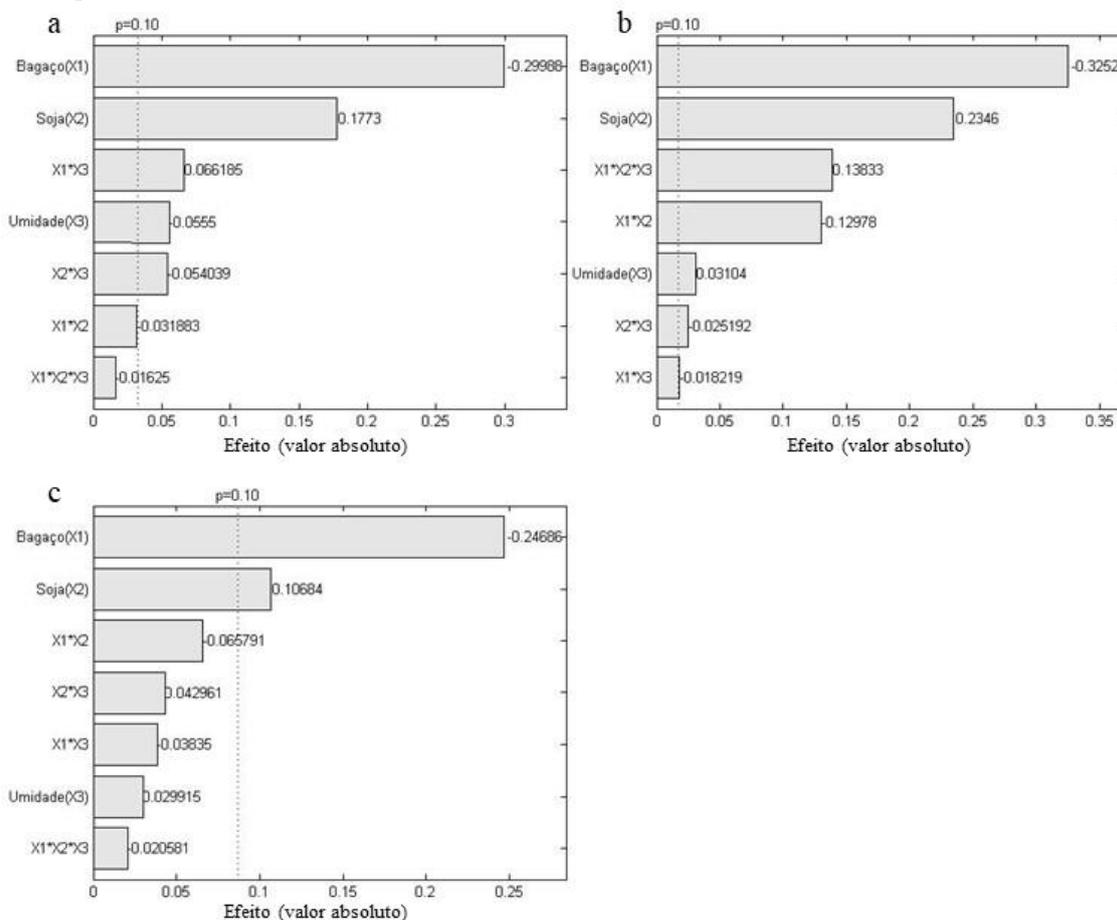
de soja (experimentos b2s75), substrato mais rico em proteína, foram os que apresentaram maiores concentrações de proteínas nos extratos enzimáticos. A umidade e as interações entre os outros fatores foram significativos para a síntese de proteínas nos cultivos de *A. niger* (Figura 33 - a) e *M. thermophila* (Figura 33 - b), mas não foram significativos nos cultivos de *T. reesei* (Figura 33 - c).

Figura 32 – Concentração de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos (a), atividade específica da endoglucanase (b) e atividade específica da β -glicosidase (c) dos cultivos em escala de frascos referentes ao planejamento experimental com os três fungos utilizados.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 33 – Gráficos de Pareto de concentração de proteínas solúveis nos extratos produzidos dos cultivos em escala de frascos referentes aos planejamentos experimentais com os fungos (a) *A. niger*, (b) *M. thermophila* e (c) *T. reesei*.



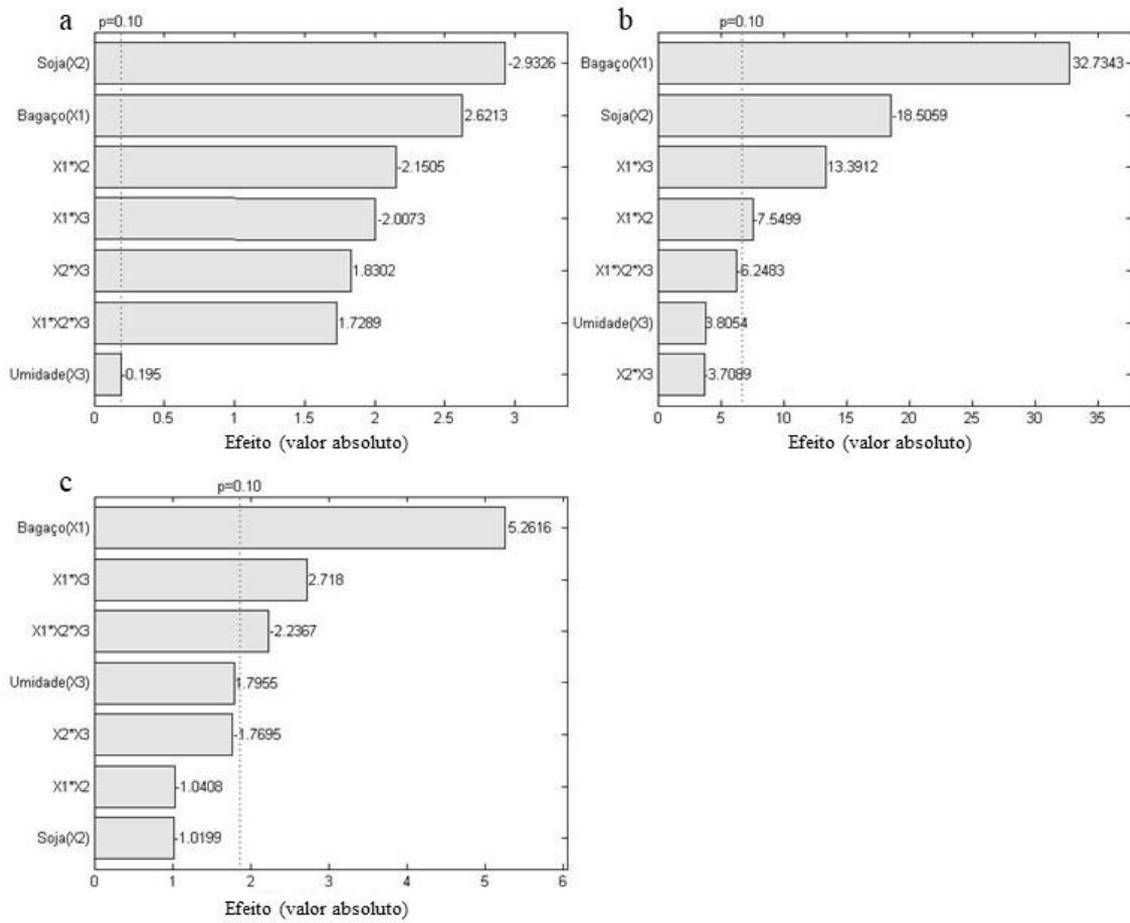
Fonte: Acervo pessoal.

Apesar de os experimentos ricos em farelos (experimentos b2) terem proporcionado a maior produção de proteínas, muitas dessas proteínas não estavam relacionadas com a enzima endoglucanase (Figura 32 - b), pois nesses quatro cultivos as atividades específicas de endoglucanase foram baixas. Isso indica que os cultivos em que havia baixa massa de bagaço resultaram na produção de outras proteínas, que possivelmente estavam associadas ao crescimento do micélio e das hifas dos fungos. Outro motivo da alta concentração de proteína nestes experimentos é o fato de que proteínas solúveis presentes nos farelos de soja e de trigo podem ter sido removidas junto com o extrato enzimático durante o processo de extração de enzimas. Analisando o gráfico de Pareto para atividade específica de endoglucanase (Figura 34), os fatores mais importantes foram a massa de bagaço de cana e fração de farelo de soja. O fato de o bagaço apresentar um efeito positivo apenas para *M. thermophila* reforça que este fungo foi o que apresentou melhor desempenho em sintetizar endoglucanase a partir do bagaço. Outro resultado interessante foi que os experimentos b4s25h55, para *A. niger*, e

b4s25h75, para *M. thermophila* e *T. reesei*, experimentos nos quais as atividades específicas de endoglucanase foram maiores, possuem a mesma composição de substrato, alterando-se apenas a umidade do meio, o que indica que a massa de bagaço e a fração do farelo de trigo ajudam na rota metabólica de produção de endoglucanase.

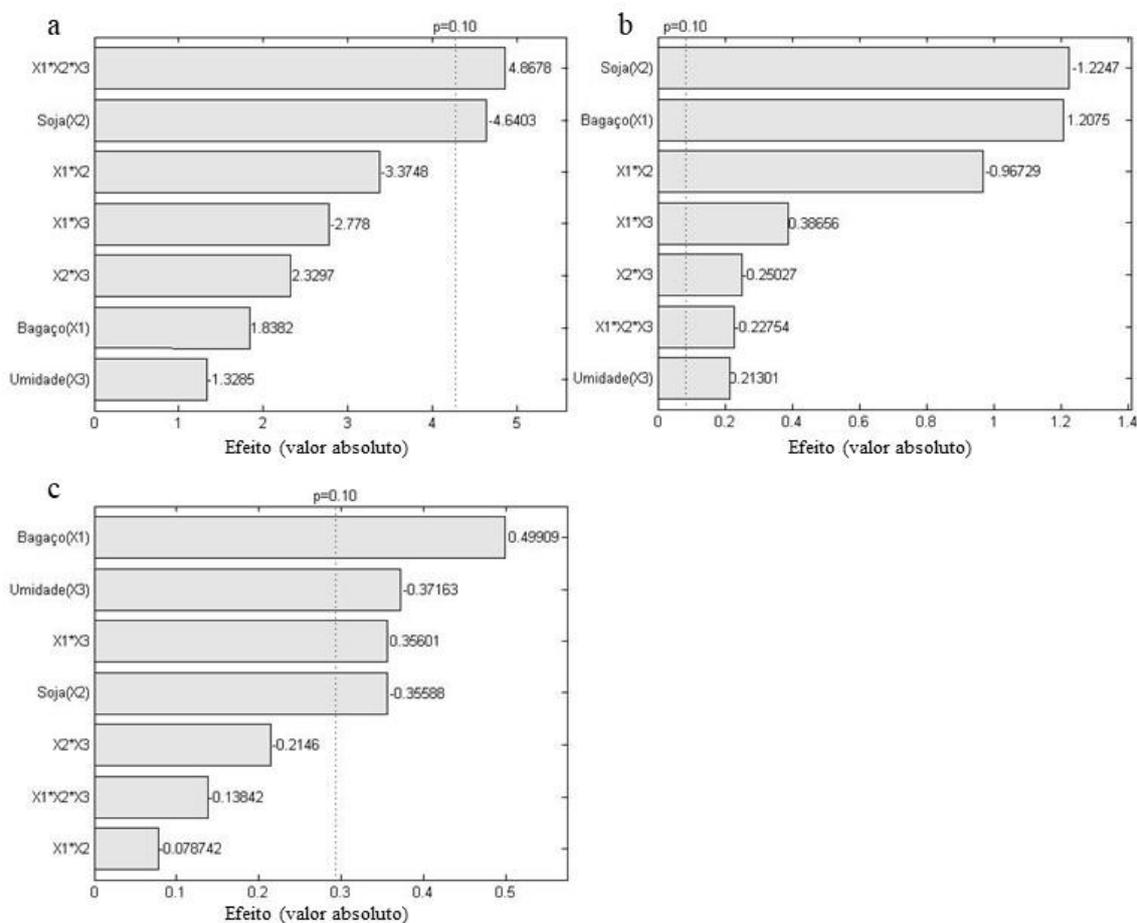
Assim como para atividade específica de endoglucanase, os cultivos b4s25h55, para *A. niger*, e b4s25h75, para *M. thermophila* e *T. reesei*, foram os que se destacaram em termos da atividade específica da β -glucosidase. Analisando o gráfico de Pareto (Figura 35), detectou-se que a fração de farelo de soja foi o fator que apresentou significância para os três fungos com efeito negativo, o que significa que, para aumentar a produção de β -glucosidase, o farelo de trigo é mais benéfico. O bagaço apresentou significância para *M. thermophila* e *T. reesei*. Da mesma forma que para endoglucanase, a massa de bagaço teve um efeito positivo na atividade específica de β -glucosidase em relação aos outros fatores. A fração de farelo de soja teve efeito contrário ao do bagaço, sendo que sua maior concentração diminuiu a atividade específica de β -glucosidase. No entanto, os cultivos em que havia baixa massa de bagaço de cana foram os que apresentaram maior atividade enzimática de β -glucosidase para *A. niger* e *T. reesei*, o que pode ser um indicativo de que esses fungos precisam das proteínas para crescer e produzir mais β -glucosidase.

Figura 34 – Gráficos de Pareto das atividades específicas de endoglucanase dos extratos enzimáticos oriundos dos cultivos em escala de frascos dos planejamentos experimentais com os fungos (a) *A. niger*, (b) *M. thermophila* e (c) *T. reesei*.



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 35 – Gráficos de Pareto das atividades específicas de β -glucosidase dos extratos enzimáticos oriundos cultivos em escala de frascos dos planejamentos experimentais com (a) *A. niger*, (b) *M. thermophila* e (c) *T. reesei*.



Fonte: Acervo pessoal.

5.2 CULTIVOS EM BIORREATOR

Para produzir uma maior quantidade de enzimas em um equipamento que pode ser escalonado, utilizou-se o biorreator de leito empacotado em multicamadas. O uso deste biorreator facilitaria a uma biorrefinaria produzir enzimas *in house*, pois os principais substratos da fermentação em estado sólido são materiais lignocelulósicos. As condições em pequena escala que foram reproduzidas no biorreator foram os experimentos b4s25h75 e b4s75h75 para o fungo *M. thermophila*, o primeiro por apresentar maior atividades absoluta e específica de endoglucanase e o segundo por apresentar maior seletividade de endoglucanase. No cultivo com o fungo *A. niger*, foi utilizada a condição b2s75h75, por ser a que proporcionou maior atividade de endoglucanase. Além disso, foi reproduzida a condição adicional isenta de farelo de trigo (b2s100h75), para verificar a influência do farelo de trigo sobre o cultivo. No cultivo com *T. reesei* foi utilizada a condição de maior seletividade de endoglucanase, que foi a

condição b2s75h75 e uma condição adicional isenta de farelo de trigo (b2s100h75), pelo mesmo motivo do caso anterior. Como durante os cultivos os fungos liberam calor, foi feito o monitoramento da temperatura com termopares em todas as condições.

5.2.1 Perfis de temperatura durante a fermentação

Para monitorar o comportamento térmico do biorreator de modo a se identificar as fases do cultivo, foi feito um gráfico com o perfil de temperaturas registradas ao longo dos cultivos. A Figura 36 mostra os dados de temperatura durante o cultivo com os três fungos. Nesses gráficos, foi possível detectar quedas pontuais de temperatura, que indicam os momentos nos quais estavam sendo trocadas as posições dos módulos fermentativos.

No cultivo com *A. niger* (Figura 36 - a), a temperatura da água da camisa do biorreator alcançou 30 °C. Observa-se que a temperatura começa a se elevar aproximadamente 9 h após o início do cultivo, indicando que a partir desse momento, maior quantidade de calor metabólico oriundo da fermentação começou a ser gerada. A temperatura se elevou rapidamente até aproximadamente 37 °C durante as primeiras 18 horas nos dois módulos fermentativos. Após esse primeiro intervalo houve a troca de posição dos módulos fermentativos, o que resultou em uma queda momentânea na temperatura. No entanto, assim que a troca foi finalizada, a temperatura mais elevada no interior do biorreator foi rapidamente restabelecida, indicando que a troca dos módulos de cultivo não prejudicou a fermentação. Após as 18 horas de cultivo, a temperatura dos módulos passou a diminuir, indicando uma redução da taxa de geração de calor, mas ainda se manteve acima de 30 °C, indicando que a taxa de geração se manteve superior à taxa de remoção do calor metabólico. A temperatura dos módulos de cultivo foi abaixando lentamente e só aproximadamente após 72 h de cultivo foi que a temperatura atingiu novamente 30 °C, o que significa que a geração de calor pelo cultivo ocorreu durante todo o tempo de processo. Nesse cultivo, não houve uma notável diferença de temperatura entre os módulos fermentativos.

A Figura 36 – b representa o perfil de temperatura durante o cultivo do fungo *M. thermophila* no biorreator. Nesse cultivo, a água da camisa encontrava-se a 45 °C, dado que o fungo é termofílico. O aumento de temperatura devido ao calor liberado foi detectado após aproximadamente 24 horas desde o início do cultivo, mesmo momento em que houve a mudança de posição dos módulos. Após a troca dos módulos, a

temperatura foi rapidamente restabelecida, tendo se mantido entre 46 e 47 °C até aproximadamente 48 horas. O cultivo se manteve até 72 horas, quando houve a última troca dos módulos. Pode-se notar que aproximadamente às 30 horas houve uma queda das temperaturas nos dois módulos. Tais quedas de temperatura podem estar associadas a resfriamento evaporativo, que pode ter ocorrido em decorrência do aquecimento do ar dentro do leito, levando a que o mesmo ficasse abaixo da saturação e, com isso, adquirisse potencial de secagem do substrato. No entanto, o ar recuperou rapidamente sua saturação e a temperatura ficou acima de 45 °C, indicando que o potencial de secagem não afetou o cultivo.

O perfil de temperatura da fermentação do *T. reesei* está representado no gráfico da Figura 36 – c. Nesse cultivo, no qual a água da camisa do biorreator circulava a 28 °C, o aumento de temperatura pela fermentação ocorreu após 12 horas desde o início da fermentação. Porém, foi notado que o módulo 1 estava se sobreaquecendo mais. Após 24 horas, depois da primeira troca dos módulos, passou a ser observado acúmulo do calor gerado no módulo 1. Pode ter ocorrido de o calor gerado no módulo 2 (que estava abaixo neste momento) passou a ser transportado pelo ar até o módulo 1 (que estava em cima) e esse acúmulo fez com que este módulo atingisse temperatura bastante alta. O módulo 1 teve um pico de temperatura de aproximadamente 38 °C, enquanto o módulo 2 teve pico de 35 °C. Após 48 horas de cultivo, a temperatura do biorreator foi estabilizada em 28 °C até as 72 horas, o que indicou o aparente término da fase exponencial da fermentação. Quando os módulos foram trocados novamente de posição às 72 horas, a temperatura do módulo 2 teve uma queda de temperatura, ao começar a receber ar fresco. Essa queda de temperatura fez com que fossem registradas temperaturas abaixo de 25 °C, sendo que a água na camisa do biorreator circulava a 28 °C. Após a próxima troca de módulos, às 96 horas, ocorreu um aumento de temperatura no módulo 2 e a temperatura se manteve em torno de 26 °C, ainda abaixo da temperatura da água da camisa do biorreator. Na última troca de módulos, às 136 horas, a temperatura do módulo 2 se estabilizou a 28 °C. Tais quedas de temperatura podem estar associadas a resfriamento evaporativo, que pode ter ocorrido em decorrência do aquecimento do ar dentro do leito, levando a que o mesmo ficasse abaixo da saturação e, com isso, adquirisse potencial de secagem do substrato. Das três fermentações apresentadas na Figura 36, esse foi o único cultivo no qual houve uma diferença de temperatura notável entre os módulos.

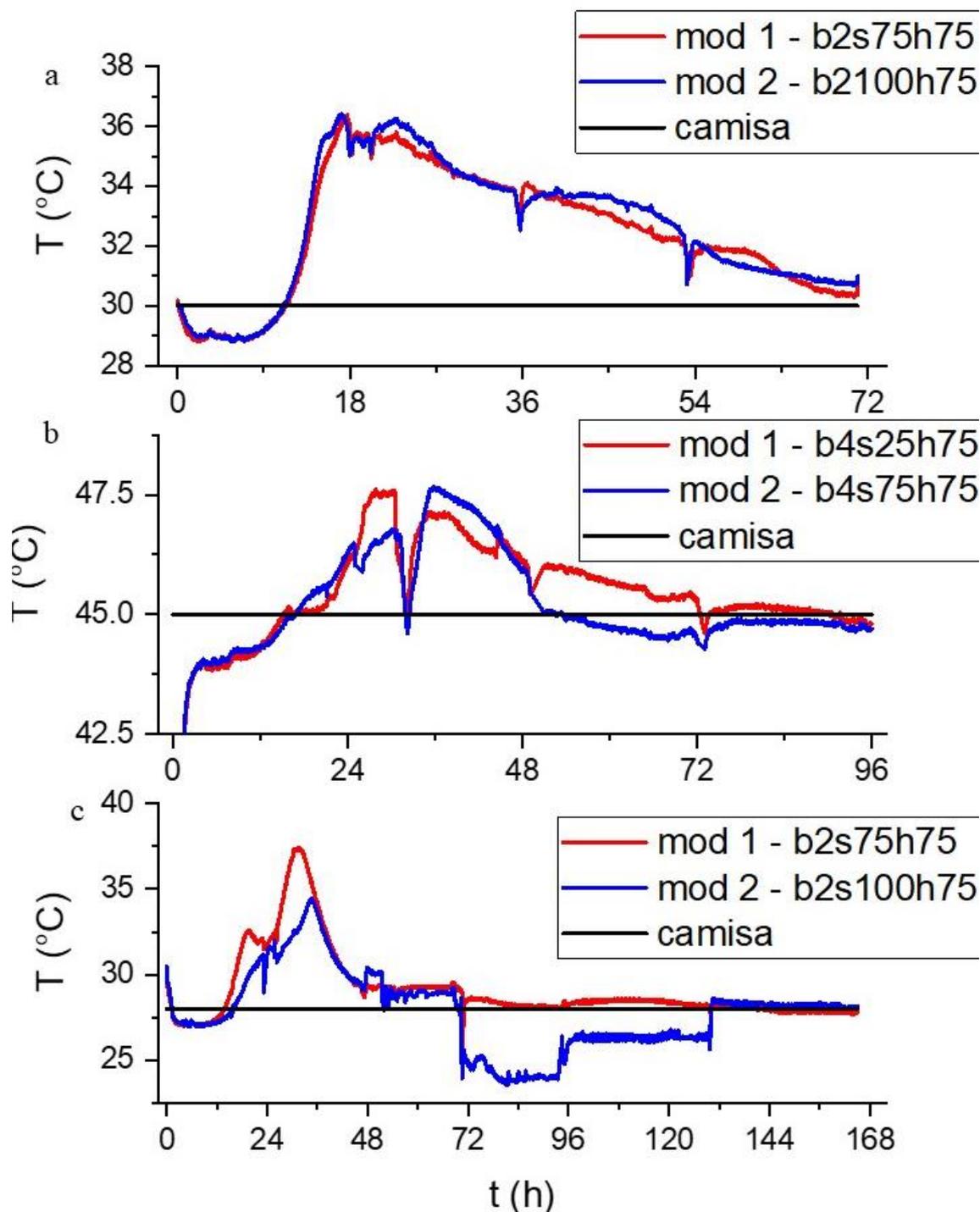
O trabalho de MITCHELL et al. (2010) apresenta perfis simulados de temperatura em 10 módulos fermentativos de um biorreator de leito empacotado. Nessas simulações,

a temperatura dos módulos aumenta com o tempo devido à fermentação e os módulos apresentaram temperaturas diferentes, sendo que a temperatura é crescente de acordo com a altura na qual os módulos estão posicionados na coluna. Esse aumento de temperatura no sentido axial é explicado pela advecção de calor metabólico, que é carregado pelo ar suprido ao biorreator no sentido ascendente de percolação. O único cultivo que apresentou um acúmulo de energia significativo foi o de *T. reesei*. No entanto, nesse modelo proposto, não ocorreu troca de posições dos módulos. MITCHELL et al. (2010) também apresentam simulações considerando a troca de posições dos módulos fermentativos. No entanto, como um biorreator mais longo é simulado, também é prevista a ocorrência de acúmulo de calor, mesmo com a movimentação cíclica dos módulos.

PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019) também monitoraram a temperatura em um biorreator de leito empacotado com diâmetro interno similar ao dos módulos do biorreator deste trabalho, mas trabalharam com altura de 80 cm com *M. thermophila*. A temperatura foi monitorada de acordo com altura e em uma altura próxima de 20 cm, altura próxima dos módulos fermentativos deste trabalho (25 cm), a temperatura máxima foi de 47 °C, próxima à temperatura máxima deste trabalho com o mesmo fungo (Figura 36 – b). No entanto, ainda no trabalho de PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019), em alturas maiores, a temperatura se elevou, atingindo um valor máximo próximo a 54 °C quando a altura do biorreator for acima de 60 cm.

Já DE OLIVEIRA et al. (2020) utilizaram o mesmo biorreator deste trabalho com altura próxima a 50 cm, também com o fungo *M. thermophila*, e a temperatura máxima foi de 47,9 °C. No trabalho de PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019) a temperatura do biorreator na altura de 40 cm foi em torno de 52 °C, o que indica que o biorreator deste trabalho, o de leito empacotado em multicamadas, tem uma troca térmica superior ao de PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019), o que possivelmente se explica pela, ainda que pequena, diferença entre diâmetros internos, favorecendo a remoção radial de calor pela camisa no caso do menor diâmetro.

Figura 36 – Perfis de temperatura no biorreator durante o cultivo com os fungos (a) *A. niger*, (b) *M. thermophila* e (c) *T. reesei*.



Fonte: Acervo pessoal.

5.2.2 Produção enzimática em biorreator

Após os términos dos cultivos no biorreator de leito empacotado, todo sólido fermentado era retirado dos módulos e era feita a extração das enzimas e proteínas produzidas e, em seguida, foram feitas as mesmas análises dos cultivos em embalagens plásticas.

Em termos de atividade enzimática de endoglucanase, a melhor produção em biorreator de leite empacotado foi com *M. thermophila* (Figura 37). Esse resultado já era esperado de acordo com o que já havia sido observado no cultivo em embalagens plásticas, nos quais esse fungo foi o que apresentou as melhores atividades enzimáticas de endoglucanase. Pode ser observado ainda, na Figura 37, que o cultivo nos módulos fermentativos foi ligeiramente melhor no biorreator (m1 e m2) que nos seus respectivos cultivos em embalagens plásticas (b4s24h75 e b4s75h75). No caso, o módulo 1 (m1), com atividade de 203 ± 6 U/g-substrato, tinha a mesma composição de substrato que o experimento b4s25h75, que apresentou atividade de 200 ± 4 U/g-substrato, e o m2, que apresentou atividade de 183 ± 5 U/g-substrato, tinha a mesma composição que o experimento b4s75h75, que teve atividade de 178 ± 14 U/g-substrato. Uma das possíveis explicações para essa melhora foi pelo fato de o biorreator fornecer ar fresco constantemente aos módulos fermentativos, através da convecção forçada, enquanto nas embalagens plásticas toda a troca de gases ocorria exclusivamente por difusão e convecção natural. Esse fornecimento de ar pode ter favorecido a rota metabólica para a produção de endoglucanase. Apesar de a temperatura do fermentador atingir 47°C , essa temperatura não é alta o suficiente para atrapalhar a produção de endoglucanase pelo fungo. No trabalho de PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019) com *M. thermophila* houve um aumento maior de temperatura em biorreator de leite empacotado, com altura de 80 cm, semelhante ao deste trabalho. No entanto, durante a fermentação, a temperatura atingiu 54°C , o que potencialmente diminuiu a produção de enzimas. No biorreator deste trabalho, apesar de se operar com uma altura menor (25 cm), o pico de temperatura foi de $47,5^\circ\text{C}$.

Apesar do biorreator apresentar pequena melhora da atividade de endoglucanase em relação ao cultivo em embalagens plásticas, segundo o teste de Tukey apresentado na Tabela 9, esses aumentos não são significativos ($P > \alpha$ ou sig=0). Isso significa que para a produção da enzima endoglucanase houve uma reprodutibilidade no experimento do biorreator com as embalagens plásticas. Alternativamente, o aumento de temperatura pode ter atrapalhado a produção de enzimas ou, ainda, pode-se sugerir que, tanto no cultivo em embalagens quanto em biorreator, a fração acessível do substrato foi quase igualmente consumida durante as 96 ou 120 h de cultivo, ou ainda que a área superficial para crescimento e penetração das hifas do fungo foi totalmente colonizada. Em ambas as hipóteses, os cultivos atingiriam a fase estacionária, tanto de produção de endoglucanase quanto de crescimento. O experimento b4s25h75 foi significativamente

melhor que o b4s75h75, assim como m1 foi significativamente melhor que m2 ($P < \alpha$ ou $\text{sig}=1$). Esse resultado mostra que, como iniciador da produção de endoglucanase, o farelo de trigo é mais benéfico que o farelo de soja.

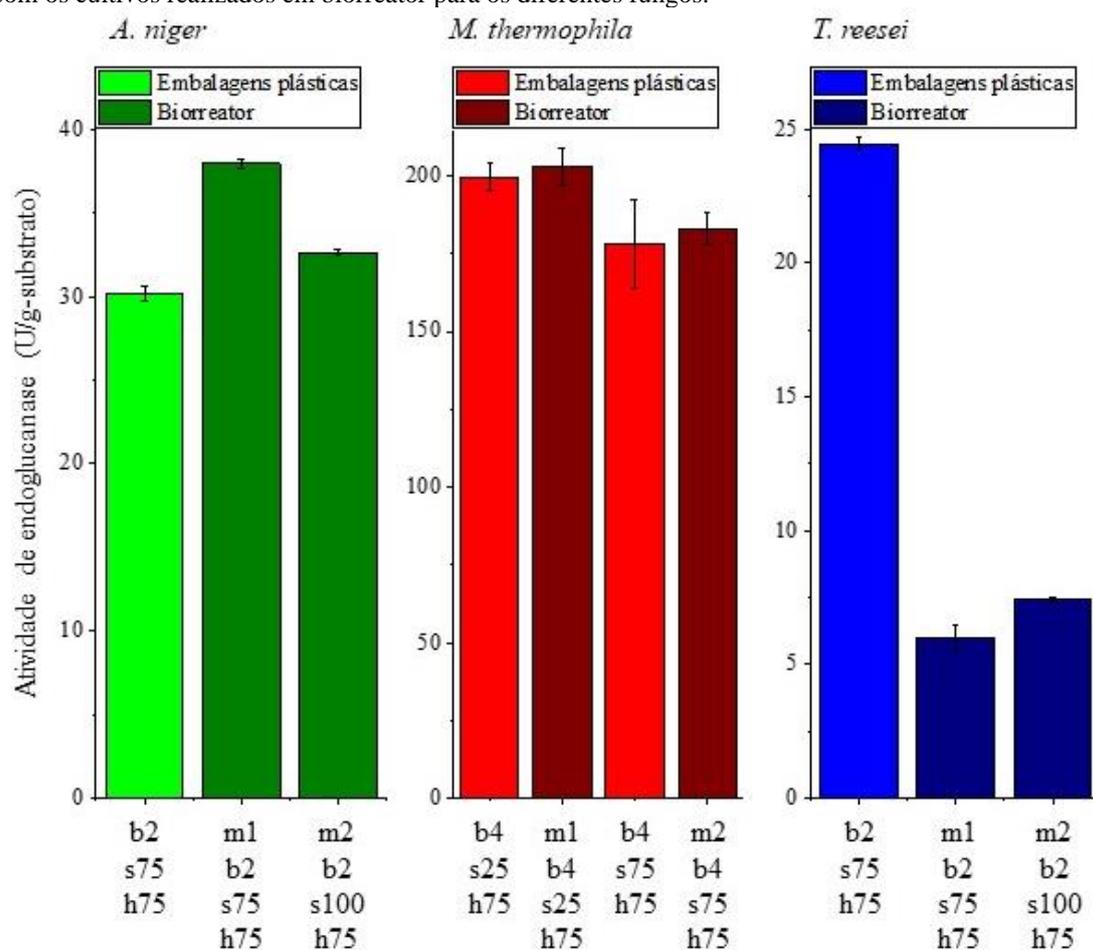
De forma semelhante ao cultivo de *M. thermophila*, o cultivo de *A. niger* no biorreator resultou em atividade enzimática de endoglucanase maior no biorreator (m1) que no cultivo em embalagens plásticas (b2s75h75) (Figura 37) com atividades de $37,9 \pm 0,3$ e $30,2 \pm 0,4$ U/g-substrato, respectivamente, o que foi confirmado por teste de Tukey (Tabela 8), que indicou diferença significativa ($P < \alpha$ ou $\text{sig}=1$). Essa melhora significativa, novamente, indica que o fornecimento de ar por convecção ajuda o fungo a consumir o substrato e crescer. O fato de a temperatura do cultivo no biorreator ter se aproximado de 37°C poderia ter interferido na produção de endoglucanase, já que JECU (2000) indica que há diminuição na atividade dessa enzima quando a temperatura é de 37°C . No entanto, JECU (2000) também menciona que, apesar de essa temperatura afetar na produção de endoglucanase, o fungo *A. niger* consegue crescer bem nesta temperatura. Logo, pode ter ocorrido que o efeito benéfico da aeração tenha se sobrepujado ao efeito negativo do aumento da temperatura.

Outro resultado interessante foi o fato de m1 apresentar uma atividade significativamente melhor que m2, condição isenta de farelo de trigo, que apresentou atividade de $32,6 \pm 0,2$ U/g-substrato, segundo o teste de Tukey ($\text{sig}=1$) (Tabela 8). Esse resultado mostra que foi possível obter endoglucanase na ausência do farelo de trigo, mas mostra que esse substrato contribui significativamente na produção da enzima, sendo que a ausência de farelo de trigo diminuiu a atividade de endoglucanase em 14,0%. Pelo fato de o farelo de trigo ser mais rico em gorduras e carboidratos facilmente assimiláveis que o farelo de soja, esse resultado indica que o amido e as gorduras adicionais do farelo de trigo ajudam na produção da endoglucanase e/ou no crescimento do fungo.

Diferentemente dos cultivos com os fungos *M. thermophila* e *A. niger*, o *T. reesei* apresentou menor valor de atividade de endoglucanase no cultivo em biorreator, m1 com atividade de $6,0 \pm 0,5$ U/g-substrato, comparando com o cultivo em embalagens plásticas, b2s75h75 com atividade de $24,4 \pm 0,2$ U/g-substrato; segundo o teste de Tukey (Tabela 10), essa diminuição foi significativa. A hipótese mais provável é que isso tenha decorrido do sobreaquecimento observado no biorreator, já que as temperaturas máximas nos módulos fermentativos foram de 38°C no m1 e 35°C no m2. Segundo LATIFIAN; HAMIDI-ESFAHANI; BARZEGAR (2007), temperaturas acima de 35°C podem inativar o fungo *T. reesei*, levando à baixa produção de endoglucanase.

Comparando os módulos fermentativos m1 e m2, pelo teste de Tukey (Tabela 10), houve diferença significativa na atividade de endoglucanase entre os módulos. O módulo no qual o substrato estava isento de farelo de trigo (m2) apresentou maior atividade com o valor de $7,4 \pm 0,1$ U/g-substrato. No entanto, devido às diferenças nos perfis de temperatura, não foi possível afirmar se a isenção do farelo de trigo foi definitivamente melhor para a produção de endoglucanase pelo fungo em questão.

Figura 37 – Atividade enzimática da endoglucanase comparando os cultivos realizados em pequena escala com os cultivos realizados em biorreator para os diferentes fungos.



Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 8 – Teste de Tukey comparando médias dois a dois entre os módulos ou entre os módulos e o experimento 4 do cultivo de *A. niger* para a atividade enzimática de endoglucanase.

	Diferença das médias	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
Módulo 1 Experimento 4	7,76	0,27	40,43	$2,54 \times 10^{-7}$	0,1	1
Módulo 2 Módulo 1	-5,31	0,27	27,67	$2,82 \times 10^{-6}$	0,1	1

Tabela 9 – Teste de Tukey comparando médias dois a dois de atividade de endoglucanase entre os módulos do fermentador e seus respectivos cultivos em embalagens plásticas para *M. thermophila*.

	Diferença das médias	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
Módulo 1 Experimento 6	3,32	6,82	0,69	0,96	0,1	0
Módulo 2 Experimento 8	4,74	6,82	0,98	0,90	0,1	0
Módulo 1 Módulo 2	-19,97	6,82	4,14	0,07	0,1	1
Experimento 6 Experimento 8	-21,38	6,82	4,43	0,06	0,1	1

Tabela 10 – Teste de Tukey entre as médias da atividade de endoglucanase para o *T. reesei* comparando os módulos do fermentadores entre si e com o experimento de pequena escala.

	Diferença das médias	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
Módulo 1 Experimento 4	-18,45	0,28	94,87	0	0,1	1
Módulo 2 Módulo 1	1,41	0,31	6,47	0,01	0,1	1

Para a produção da enzima β -glicosidase em biorreator, assim como no cultivo em embalagens plásticas, destacou-se o fungo *A. niger* (Figura 38). Similarmente à endoglucanase, foi produzida maior atividade de β -glicosidase no biorreator do que nos frascos, também devido ao fornecimento de ar por convecção.

Pela Tabela 11, o teste de Tukey indicou que, assim como para endoglucanase, a atividade de β -glicosidase em m1 foi significativamente melhor que a atividade em b2s75h75, com atividades de $47,9 \pm 4,9$ e $39,8 \pm 4,2$ U/g-substrato, respectivamente, confirmando que o cultivo em biorreator foi melhor que em embalagens plásticas. Outra semelhança foi que a atividade de β -glicosidase em m1 foi significativamente melhor que em m2 ($37,1 \pm 0,8$ U/g-substrato), indicando que a ausência do farelo de trigo em m2 diminuiu em torno de 23% a quantidade de β -glicosidase produzida.

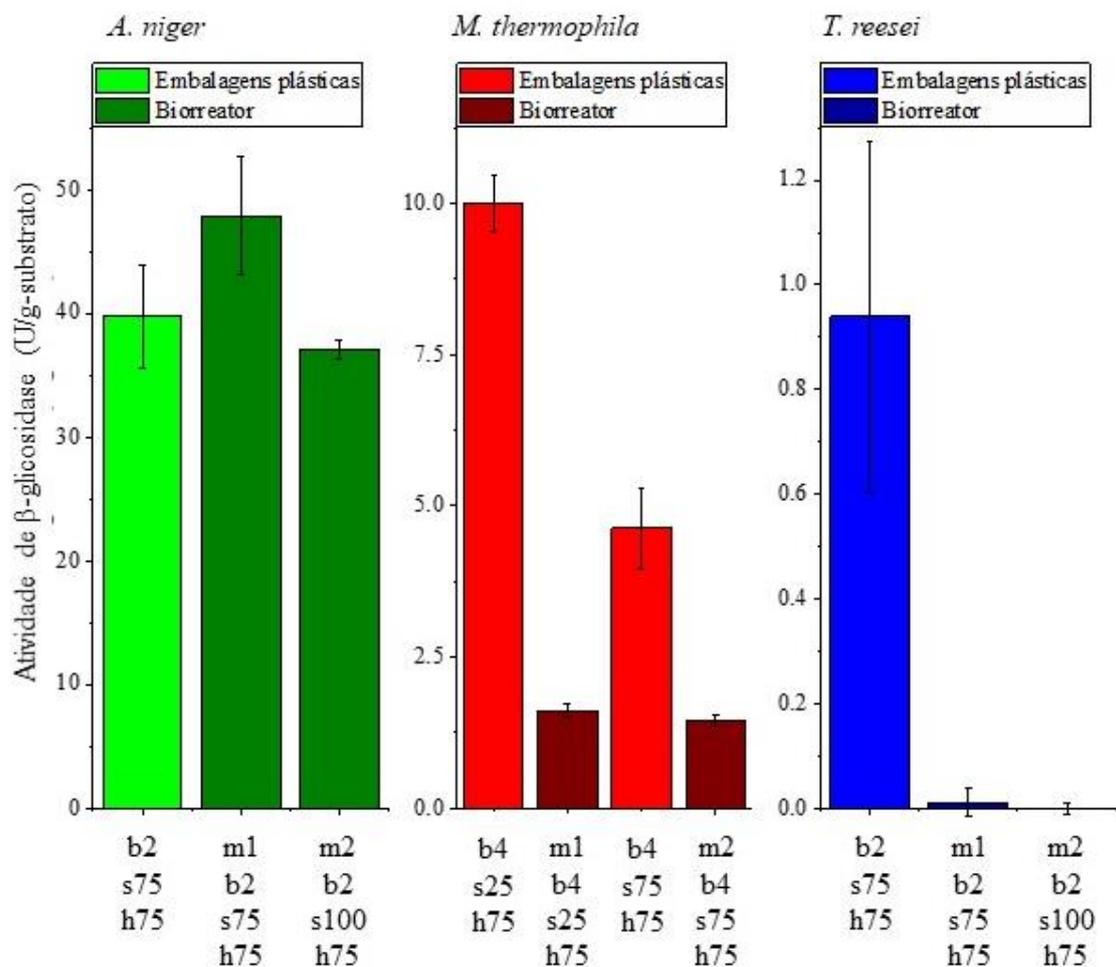
No cultivo de *M. thermophila*, a atividade de β -glicosidase foi menor no biorreator do que nos cultivos em embalagens plásticas (Figura 38). Avaliando os dados juntamente com o teste de Tukey da Tabela 12, tem-se que m1 e m2, com atividade de $1,6 \pm 0,1$ e $1,4 \pm 0,1$ U/g-substrato, respectivamente, renderam atividades de β -glicosidase significativamente menores que as dos extratos oriundos de seus respectivos cultivos em embalagens plásticas b4s25h75 e b24s75h75, com atividades de $10,0 \pm 0,4$ e $4,6 \pm 0,7$ U/g-substrato, respectivamente. Apesar de os experimentos b4s25h75 e b24s75h75

apresentarem diferença significativa, seus respectivos cultivos em biorreator m1 e m2 não apresentaram diferença significativa mesmo com diferente composição nos substratos.

Por fim, no cultivo de *T. reesei* em biorreator, a enzima β -glicosidase apresentou atividade muito próxima de zero no m1 ($0,01 \pm 0,02$ U/g-substrato) e zero no m2 (Figura 38). Apesar de a diferença de atividade de β -glicosidase ser significativa (Tabela 13), a atividade apresentada no cultivo em embalagens plásticas já era baixa, não sendo uma redução muito elevada. Apesar de o m2 não ter apresentado atividade de β -glicosidase, não houve diferença significativa entre m1 e m2. O motivo da baixa atividade de β -glicosidase no biorreator pode estar associado às altas temperaturas que o biorreator atingiu durante a fermentação, como já discutido para atividade de endoglucanase produzida por este fungo em maior escala.

Um dos motivos para a baixa produção de β -glicosidase no cultivo de *M. thermophila* em biorreator pode estar relacionado com a enzima celobiose desidrogenase. A celobiose desidrogenase é uma enzima oxidativa que catalisa a reação da celobiose junto com um aceptor para formar celobiono-1,5-lactona e que pode ser produzida por *M. thermophila* (DOS SANTOS et al., 2016). Como a β -glicosidase e a celobiose desidrogenase competem pelo mesmo substrato, é possível que, devido ao excesso de oxigênio, o fungo tenha alterado sua rota metabólica, favorecendo a produção de celobiose desidrogenase, já que fungos filamentosos são capazes de mudar a rota metabólica de acordo com os nutrientes disponíveis (BENOCCI et al., 2017). Além disso, há relatos que essa enzima trabalha sinergicamente com a endoglucanase e a β -glicosidase e oxida regiões cristalinas da celulose (HORN et al., 2012; JOHANSEN, 2016; KADOWAKI et al., 2018). Segundo HU et al. (2018), enzimas monooxigenase polissacarídeo lítico podem agir junto com endoglucanase e xilanase durante a hidrólise sem adição de oxigênio.

Outro motivo para a diferença na produção de β -glicosidase entre os cultivos em embalagens plásticas e em biorreator pode estar na morfologia do fungo. Já que no biorreator o fungo hipoteticamente cresceu mais devido a maior disponibilidade de oxigênio, é possível que haja diferença na morfologia do fungo. BUFFO et al. (2021) mostraram através de fermentação submersa, que o fungo *A. niger* produzia mais endoglucanase na forma peletizada e mais β -glicosidase na forma dispersa. A produção menor β -glicosidase em biorreator por *M. thermophila* pode então estar associada à morfologia, à enzima oxidativa celobiose desidrogenase ou até mesmo a uma combinação de ambos os fatores.

Figura 38 – Atividade da enzima β -glicosidase comparando os cultivos feitos no fermentador e nas embalagens plásticas.Tabela 11 – Teste de Tukey comparando as médias de atividade de β -glicosidase de *A. niger* dos módulos fermentativos com experimento equivalente em pequena escala.

	Diferença das médias	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
Módulo 1 Experimento 4	8,14	3,01	3,82	0,08	0,1	1
Módulo 2 Módulo 1	-10,85	3,01	5,09	0,03	0,1	1

Tabela 12 – Teste de Tukey comparando os módulos fermentativos e os experimentos em embalagens plásticas equivalentes do cultivo de *M. thermophila* para a atividade de β -glicosidase.

	Diferença das médias	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
Módulo 1 Experimento 6	-8,38	0,33	35,46	0	0,1	1
Módulo 2 Experimento 8	-3,17	0,33	13,43	5,78x10 ⁻⁵	0,1	1
Módulo 1 Módulo 2	-0,16	0,33	0,68	0,96	0,1	0

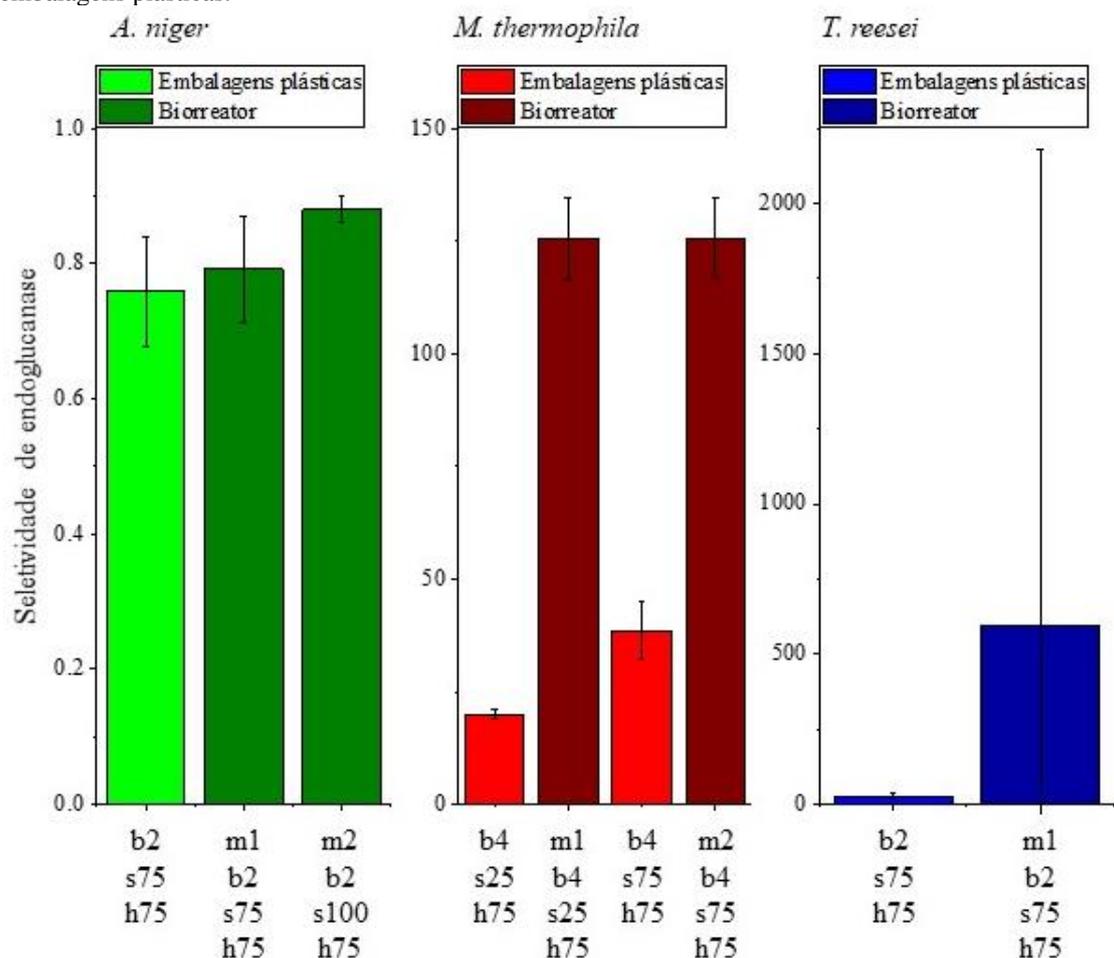
Experimento 6	-5,37	0,33	22,72	9,25x10 ⁻⁷	0,1	1
Experimento 8						

Tabela 13 – Teste de Tukey para comparação das médias da atividade de β -glicosidase do cultivo de *T. reesei* dos experimentos no fermentador e do cultivo em pequena escala.

	Diferença das médias	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
Módulo 1						
Experimento 4	-0,92	0,1581	8,25	0,00	0,1	1
Módulo 2						
Módulo 1	-0,02	0,1581	0,15	0,99	0,1	0

A Figura 39 mostra a seletividade em endoglucanase em relação a β -glicosidase dos cultivos com os três fungos testados em biorreator e seus respectivos representantes no cultivo em embalagens plásticas. Em todos os cultivos com um determinado fungo, houve aumento desta razão no biorreator, comparando-os com os cultivos em embalagens plásticas. No caso do cultivo com *A. niger*, tanto atividade enzimática da endoglucanase quanto da β -glicosidase foram maiores no cultivo em biorreator do que no cultivo em embalagens plásticas. Portanto, esse aumento de razão indica que o aumento de endoglucanase foi maior que o de β -glicosidase. No caso do cultivo de *M. thermophila* no biorreator houve um aumento na atividade de endoglucanase e uma diminuição na atividade de β -glicosidase, portanto um aumento na seletividade de endoglucanase. De maneira semelhante, no cultivo com *T. reesei* também houve um aumento de atividade da endoglucanase e diminuição da β -glicosidase, porém a atividade de β -glicosidase foi muito próxima de zero em m1 e zero em m2. Por esse motivo, o erro propagado em m1 foi alto, como pode ser verificado na Figura 39. Como no cultivo com *A. niger* houve muita produção de β -glicosidase, todos os valores de seletividade foram menores que 1. Para o *T. reesei*, houve uma alta seletividade de endoglucanase; no entanto, o erro também foi alto devido a problemas de temperatura no cultivo, de forma que a seletividade teve o valor de 598 ± 1581 . No cultivo com o fungo *M. thermophila* foram obtidos valores semelhantes de seletividade, sendo que tanto em m1 quanto em m2 o valor foi de 126 ± 9 . Isso é um indício de que o coquetel de enzimas termoestáveis de *M. thermophila* seja o mais adequado para uma hidrólise para obtenção de nanocelulose.

Figura 39 – Comparação da razão entre as enzimas endoglucanase e β -glicosidase no fermentador e nas embalagens plásticas.

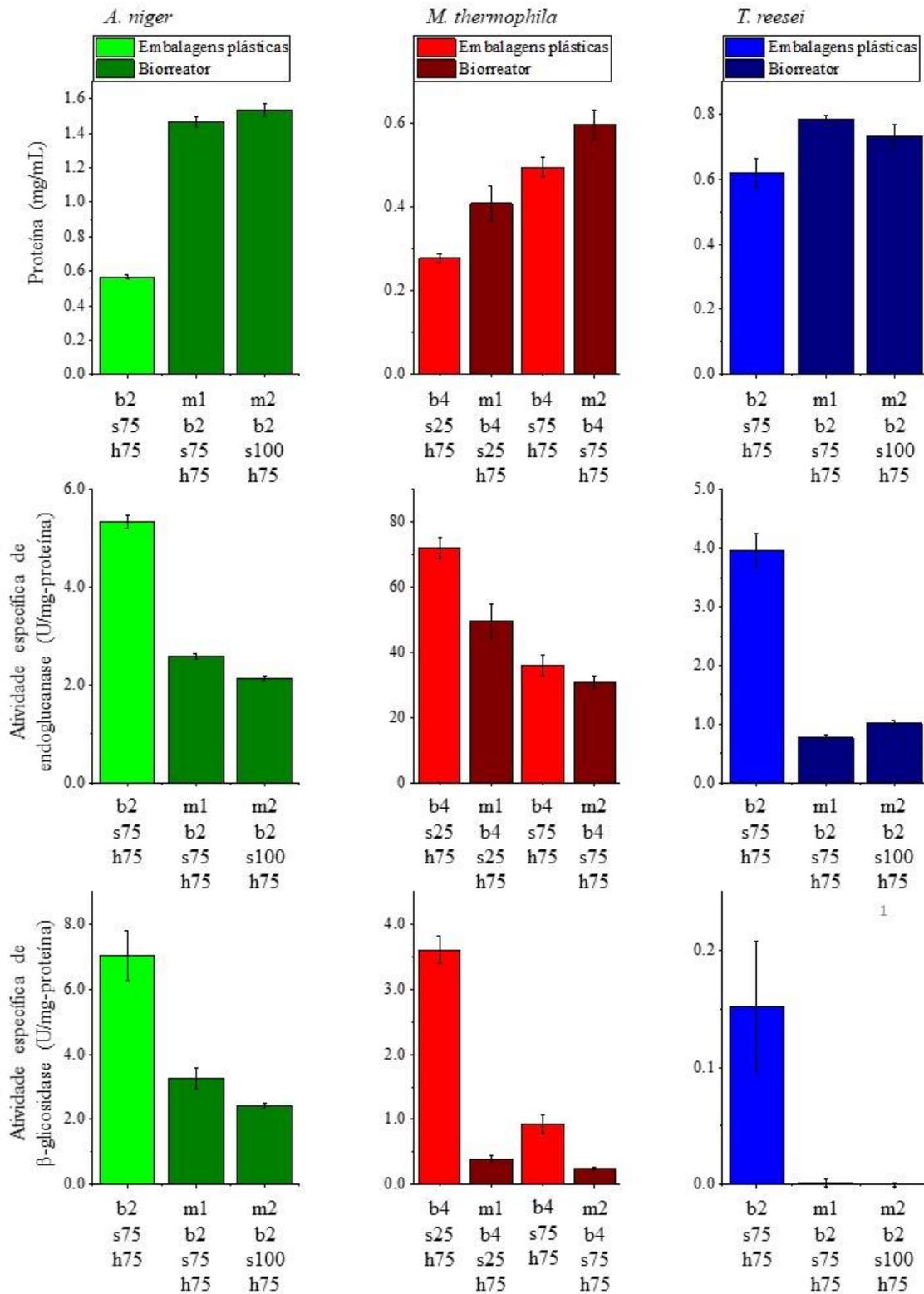


Fonte: Acervo pessoal.

A concentração de proteínas solúveis e as atividades específicas das enzimas endoglucanase e β -glicosidase nos extratos obtidos a partir do biorreator e de seus respectivos experimentos em pequena escala estão representados na Figura 40. Em todos os cultivos no biorreator, foi produzida significativamente maior quantidade de proteína do que nos cultivos em embalagens plásticas, e os testes de Tukey (Tabela 14, Tabela 15 e Tabela 16) indicaram que esses aumentos de concentração de proteínas nos extratos do biorreator foram significativos. Isso pode ser explicado pelo constante fornecimento de ar fresco por convecção forçada. O fornecimento de ar por convecção promoveu um maior crescimento do fungo e esse aumento de proteína pode estar associado à maior produção de biomassa fúngica, ou seja, foram extraídas proteínas próprias do fungo. Essa maior produção de proteínas, no entanto, reduziu as atividades específicas da endoglucanase e da β -glicosidase. Isso pode indicar que o fornecimento constante de ar pode ter direcionado o metabolismo do fungo mais ao crescimento do que à produção das enzimas endoglucanase e β -glicosidase, já que em todos os cultivos em biorreator as

atividades específicas das duas enzimas foram menores que em seus respectivos experimentos em pequena escala. Se adotada a hipótese de que todos os substratos acessíveis foram consumidos nos cultivos, isso pode explicar a diminuição de atividade β -glicosidase nos cultivos dos fungos *M. thermophila* e *T. reesei* em biorreator.

Figura 40 – Concentração de proteínas solúveis e atividades específicas de endoglucanase e β-glicosidase comparando os cultivos feitos no fermentador e nas embalagens plásticas.



Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 14 – Teste de Tukey comparando a média das proteínas produzidas entre os módulos fermentativos e os cultivos em embalagens plásticas para *A. niger*.

	Diferença das médias	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
Módulo 1 Experimento 4	0,90	0,02	56,10	0,00	0,1	1
Módulo 2 Experimento 4	0,97	0,02	60,12	0,00	0,1	1
Módulo 2 Módulo 1	0,06	0,02	4,03	0,06	0,1	1

Tabela 15 – Teste de Tukey da produção de proteína do cultivo de *M. thermophila* comparando as médias dos cultivos de pequena escala e o cultivo no fermentador.

	Diferença das médias	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
Módulo 1 Experimento 6	0,13	0,02	7,65	0,00	0,1	1
Módulo 2 Experimento 8	0,10	0,02	5,91	0,01	0,1	1
Módulo 1 Módulo 2	0,19	0,02	10,95	2,54x10 ⁻⁴	0,1	1
Experimento 6 Experimento 8	0,22	0,02	12,69	8,77x10 ⁻⁵	0,1	1

Tabela 16 – Teste de Tukey da produção de proteína do cultivo de *T. reesei* comparando as médias nos cultivos de pequena escala e o cultivo no fermentador.

	Diferença das médias	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig
Módulo 1 Experimento 4	-0,92	0,16	8,25	0,00	0,1	1
Módulo 2 Experimento 4	-0,94	0,16	8,40	0,00	0,1	1
Módulo 2 Módulo 1	-0,02	0,16	0,15	0,99	0,1	0

No trabalho de PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO (2019), foi obtida atividade de endoglucanase de 190 U/g-substrato em um biorreator em escala de bancada e 90 U/g-substrato no biorreator em escala piloto, similar à do presente trabalho. Segundo os autores, esta diferença podia estar relacionada com o fato de que o biorreator de escala de bancada teve uma troca térmica melhor do que o de escala piloto, apresentado melhor resultado. No presente trabalho, não houve diferença significativa na produção de endoglucanase nos cultivos em biorreator de leito empacotado e em embalagens plásticas. Isso pode indicar que o biorreator de leito empacotado em multicamadas teve uma melhor troca térmica se comparado com o biorreator de PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO

(2019) ou até mesmo que a movimentação dos módulos tenha contribuído na distribuição de calor e de oxigênio por todo o leito.

O trabalho de SIQUEIRA; DIAS; ARANTES (2019) apresenta dois casos nos quais nanocelulose foi produzida através da hidrólise com as enzimas endoglucanase e β -glicosidase. Em um deles, foi utilizada apenas a endoglucanase na hidrólise; em outro, foi empregada uma combinação das enzimas endoglucanase e β -glicosidase. Os autores conseguiram um melhor resultado apenas com endoglucanase, no entanto a origem desta endoglucanase não foi revelada. Outro resultado obtido foi utilizando uma endoglucanase produzida através de um fungo não revelado, sendo possível apenas produzir a nanocelulose com a combinação da endoglucanase à β -glicosidase. Nesse caso, foi mencionado que a β -glicosidase possivelmente evitava a inibição da endoglucanase, motivo pelo qual se produziu nanocelulose com a combinação das duas enzimas. No atual trabalho foram obtidos extratos isentos ou quase isentos de endoglucanase nos cultivos de *T. reesei* e extratos com alta atividade de endoglucanase e baixa atividade de β -glicosidase, no caso do cultivo com *M. thermophila*. Ambos os casos tem potencial de produzir nanocelulose através da hidrólise enzimática segundo SIQUEIRA; DIAS; ARANTES (2019). O fato de o biorreator produzir mais endoglucanase do que β -glicosidase indica que os coquetéis enzimáticos obtidos a partir do cultivo em biorreator pode ser mais adequado para a produção de extratos para serem aplicados na hidrólise enzimática visando produzir nanocristais de celulose, produto de valor agregado muito superior ao do etanol de segunda geração, sendo importante para garantir a viabilidade econômica das biorrefinarias.

5.3 OBTENÇÃO DE NANOCELULOSE

O coquetel de celulase escolhido para hidrólise enzimática foi o produzido pelo fungo *M. thermophila* no cultivo no m1 (b4s25h75), pois este coquetel enzimático apresentou seletividade de endoglucanase similar ao do m2 (b4s75h75), além de ter apresentado a melhor atividade de endoglucanase, de 203 ± 6 U/g-substrato e a maior atividade específica da mesma enzima, de 50 ± 5 U/g-proteína. As enzimas do fungo *A. niger* apresentaram uma baixa seletividade de endoglucanase devido à alta atividade de β -glicosidase apresentada, enquanto o cultivo de *T. reesei* foi sujeito a problemas operacionais que tornaram o coquetel enzimático extraído duvidoso em relação a reprodutibilidade.

A hidrólise enzimática foi realizada com o coquetel do cultivo no biorreator m1 (b4s25h75) de *M. thermophila* após a filtração deste. Esse coquetel foi filtrado em membranas de poliestireno e as atividades após a filtração foram de 233 U/g-substrato para endoglucanase, 3 U/g-substrato para a β -glicosidase e 344 U/g-substrato para a xilanase. As atividades específicas foram de 86 U/g-proteína para a endoglucanase, 1,1 U/g-proteína para a β -glicosidase e 124 U/g-proteína para a xilanase. Apesar da xilanase não hidrolisar a celulose, ela pode auxiliar na hidrólise removendo parcelas de xilana presentes na hemicelulose que está junto com a celulose, auxiliando assim na hidrólise da celulose e auxiliando na obtenção de nanocelulose (HU et al., 2018; MEESUPHONG et al., 2021).

Por se tratarem de enzimas termoestáveis, foram avaliadas três temperaturas de hidrólise para verificar a liberação de glicose. Além da hidrólise enzimática com o coquetel em questão, foi avaliada em conjunto a estabilidade enzimática da enzima endoglucanase.

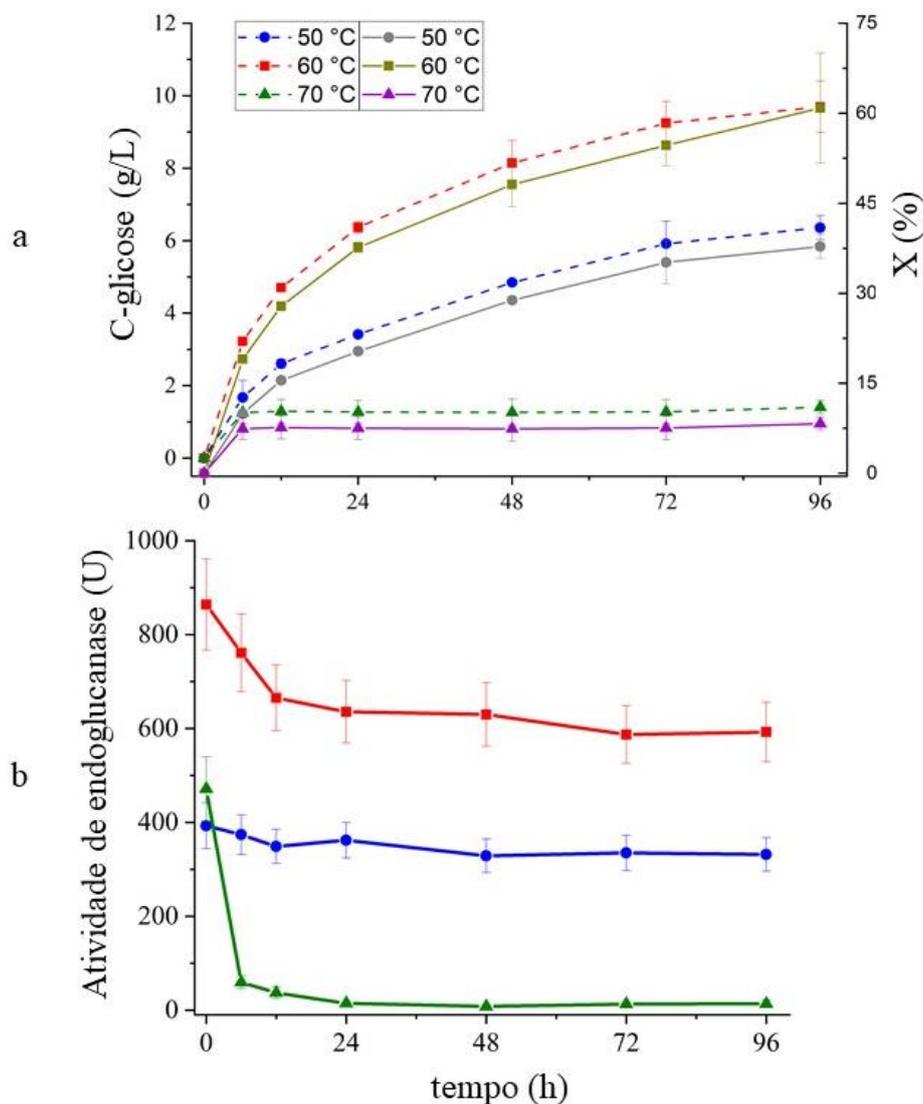
A curva de liberação de glicose e de conversão de celulose podem ser visualizadas na Figura 41 – a. Em todos os casos, pode ser verificado que as curvas são similares devido ao fato de a única variável utilizada para mensurar a conversão de celulose ser a concentração de glicose (Equação 4). A condição na qual houve maior conversão da celulose foi a condição de 60 °C, na qual a concentração média de glicose a 96 h foi de $9,7 \pm 0,7$ g/L com a conversão de $61 \pm 9\%$. O principal motivo pelo qual essa condição foi melhor que as outras está relacionado com o fato de a enzima se manter com maior atividade, se comparado com outras condições, como pode ser visualizado na Figura 41 – b. Nesta, nota-se que, em todo o tempo de hidrólise, a atividade de endoglucanase foi mais alta em comparação às outras condições, mesmo com a desnaturação devido à temperatura, que levou a uma diminuição de 31% de atividade. A 50 °C, a produção de glicose em 96 horas de hidrólise foi de $6,4 \pm 0,3$ g/L com uma conversão de $38 \pm 2\%$, com o padrão de curva similar à da hidrólise a 60 °C (Figura 41-a). Esse resultado, em conjunto com a atividade de endoglucanase (Figura 41-b) mostra que durante todo o tempo de hidrólise a atividade em 50° C foi inferior que a 60 °C, porém com uma menor desnaturação, com a enzima perdendo 16% de atividade. A 70 °C, a hidrólise produziu $1,4 \pm 0,2$ g/L com conversão de $8 \pm 1\%$ com 96 horas de glicose. Pela Figura 41 – b foi possível verificar que nessa temperatura a atividade de endoglucanase diminui rapidamente, sendo que nas primeiras 6 horas há uma queda de 87% e após 96 horas, a queda de atividade foi de 97 %.

Uma das vantagens por se utilizar enzimas termostáveis durante o processo de hidrólise é de evitar contaminações de microrganismos que podem consumir a glicose; ao se realizar a reação a temperaturas mais elevadas, reduz-se a chance do microrganismo se manter viável (BALA; SINGH, 2019; BRUINS; JANSSEN; BOOM, 2001; COWAN, 1997). De acordo com BRUINS; JANSSEN; BOOM (2001), 70 °C é uma boa temperatura para se realizar hidrólise porque quase todas as bactérias patogênicas não se mantêm viáveis a essa temperatura; no entanto, a enzima termoestável deste trabalho é rapidamente desnaturada nesta temperatura.

Outra vantagem em se realizar o processo de hidrólise a temperaturas elevadas é que os sólidos, no caso a polpa Kraft, pode ter aumentada sua porosidade, aumentando a área superficial exposta, facilitando assim a penetração de enzimas e potencialmente aumentando a conversão de celulose (BALA; SINGH, 2019; PAËS; O'DONOHUE, 2006), podendo aumentar a liberação de glicose e de nanomateriais.

Na Tabela 17, está indicado o rendimento de nanomateriais, calculado em cada uma das condições de hidrólise. A 60 °C, houve maior liberação de nanomateriais no tempo de 96 horas. Foi possível notar um aumento significativo de rendimento nessa temperatura quando se aumenta o tempo de hidrólise, mesmo com a queda de atividade de endoglucanase. Esse aumento pode ser devido à própria atividade de endoglucanase ainda estar alta, e pode ser também devido ao fato de a temperatura estar ajudando a enzima a acessar maiores regiões de celulose. A 50 °C, o rendimento de nanocelulose foi menor do que na hidrólise a 60 °C, porém também houve aumento de rendimento com o tempo, indicando que ainda assim estava havendo conversão de celulose ao longo do decurso da reação, aumentando o teor de nanomateriais. A 70 °C, não houve grande diferença na liberação de nanocelulose entre 48 e 96 horas, outro indicativo de que nesta temperatura as enzimas foram desnaturadas rapidamente, não sendo essa temperatura adequada para a realização de hidrólise.

Figura 41 – Curvas representativas da hidrólise enzimática da polpa de celulose Kraft onde (a) representa a concentração de glicose e a conversão de celulose durante o tempo e (b) representa a atividade de endoglucanase total durante a hidrólise.



Fonte: Acervo pessoal.

Tabela 17 – Índice de cristalinidade e rendimento de nanomateriais liberados durante a hidrólise nas correspondentes temperaturas e tempos de hidrólise.

Polpa	48 h			96 h			
	50 °C	60 °C	70 °C	50 °C	60 °C	70 °C	
DRX (%)	73,5	70,4	76,7	73,9	75,4	77,4	73,7
Y (%)		3,9	4,9	3,4	5,9	16,2	3,5

5.3.1 Índice de cristalinidade

Os valores absolutos dos índices de cristalinidade em todas as condições são visualizados na Tabela 17. No geral, houve aumento de cristalinidade dos nanomateriais em relação à polpa, com exceção da condição de 50 °C a 48 horas. Isso é um indicativo de que as regiões amorfas da celulose foram hidrolisadas, remanescendo assim as regiões cristalinas.

Os nanomateriais obtidos na condição de hidrólise com 96 h de reação a 60 °C apresentaram maior cristalinidade, devido ao fato de que a enzima manteve maior atividade a esta temperatura. É possível que, nessa temperatura, houve uma facilidade de as enzimas entrarem em contato com as regiões amorfas em decorrência do possível aumento da área superficial e aumento de porosidade em temperaturas elevadas. A 50 °C, também houve aumento de cristalinidade; porém, com 48 h de hidrólise, houve uma redução de cristalinidade em relação à da polpa de eucalipto, sendo que somente após 96 h de hidrólise o índice de cristalinidade foi maior que o da polpa. A 70 °C, houve um aumento de cristalinidade dos nanomateriais obtidos tanto com 48 quanto com 96 h de hidrólise, o que significa que mesmo com a rápida desnaturação da enzima, houve liberação de nanocelulose e aumento de cristalinidade.

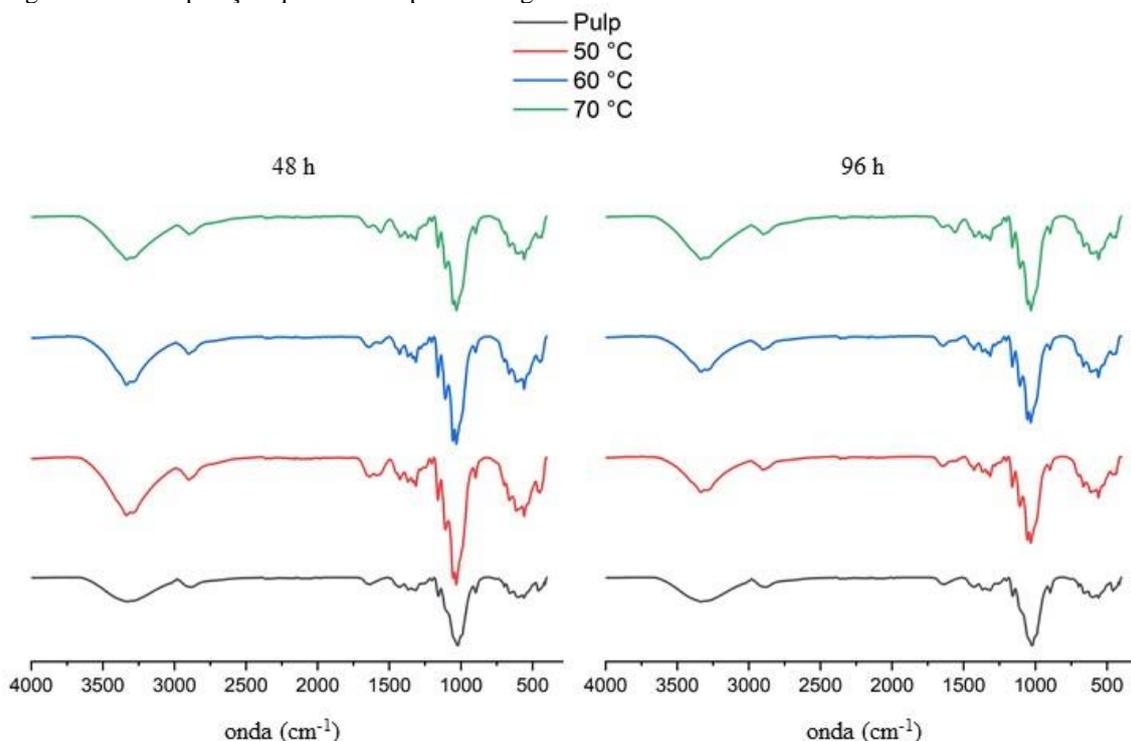
Na maioria dos casos, espera-se um aumento do índice de cristalinidade dos nanomateriais em relação à polpa de celulose, pois durante a reação enzimática a endoglucanase hidrolisa as regiões amorfas, restando apenas as regiões cristalinas (BERTO et al., 2021; SQUINCA et al., 2020). Porém, há casos nos quais há diminuição da cristalinidade dos nanomateriais, o que acontece, segundo SIQUEIRA; DIAS; ARANTES (2019), quando as regiões cristalinas e amorfas são consumidas em velocidades semelhantes.

5.3.2 Composição química dos nanomateriais

Para determinar algumas das composições químicas dos nanomateriais produzidos na hidrólise enzimática com 48 e 96 h de hidrólise, foi utilizado o espectro FTIR. As bandas características da celulose, indicados na Figura 42, são representados pelas vibrações de O-H, que estão entre 3500 e 3000 cm^{-1} , vibração de C-H, que está localizada na região 2750 cm^{-1} da onda, CH_2 simétrico a 1500 cm^{-1} , CH_2 da celulose a 1300 cm^{-1} , grupo C-O-C entre 1161 e 1025 cm^{-1} e grupos C-1 na vibração a 890 cm^{-1} . As bandas são semelhantes aos da polpa de celulose, com diferença nos valores de

reflectância, o que indica que os nanomateriais obtidos através da hidrólise possuem os mesmos componentes da celulose (BONDANCIA et al., 2017; SQUINCA et al., 2020).

Figura 42 – Composição química das partículas geradas durante a hidrólise a 48 e 96 horas.



Fonte: Acervo pessoal.

5.3.3 Característica térmica

A análise de TGA indica a estabilidade térmica dos nanomateriais extraídos da hidrólise, degradando a massa de nanocelulose ou lignocelulósica (polpa de eucalipto) termicamente. Como uma das utilizações da nanocelulose é melhorar as propriedades térmicas de polímeros, a análise por TGA permite avaliar uma das características essenciais da nanocelulose.

Na Figura 43 – a, indica-se a perda de massa das amostras de acordo com a temperatura. A perda de massa em temperaturas abaixo de 100 °C pode estar associada às moléculas de água que estavam nas partículas ou na polpa de eucalipto (ABRAHAM et al., 2011). Na polpa especialmente, é mais notável essa perda de massa abaixo de 100 °C pois foi a única amostra que não foi liofilizada. A grande perda significativa de massa ocorre em torno de 200 °C, que é o momento no qual a hemicelulose começa a se decompor, que tem o intervalo de decomposição na faixa entre 200 e 315 °C. A celulose começa a se degradar em 310 °C e termina a degradação em torno de 400 °C. A lignina tem uma ampla faixa de degradação, começando a 200 °C e terminando a degradação a

500 °C, sendo o composto mais difícil de decompor termicamente (MARTELLI-TOSI et al., 2016). Essas características de degradação são o resultado da característica e estrutura desses três componentes. Pela termogravimetria derivativa (Figura 43 – b), é possível observar que há uma alta perda de massa em torno de 300 °C. O motivo dessa alta perda de massa é que nessa temperatura a celulose, a hemicelulose e a lignina estão sendo degradadas simultaneamente.

Na Tabela 18, estão indicadas as temperaturas nas quais a biomassa começa a se degradar (T_{onset}), a temperatura nas quais a maior quantidade de massa está sendo degradada (T_{max}) e os resíduos da massa na temperatura de 600 °C, após a decomposição da biomassa. Todos os nanomateriais de celulose tiveram uma T_{onset} similar aos da polpa, porém os nanomateriais resultantes da hidrólise a 50 e 60 °C apresentaram uma temperatura ligeiramente superior. O motivo desses nanomateriais apresentarem um valor maior de T_{onset} se deve a hidrólise da hemicelulose por enzimas como xilanase em conjunto com a hidrólise de regiões amorfas da celulose pela enzima endoglucanase que aumentou a cristalinidade do nanomaterial. Os valores de T_{max} foram todas próximas, com os nanomateriais resultante da hidrólise a 60 °C apresentando os maiores valores por estes possuírem uma maior cristalinidade. Apesar de os nanomateriais possuírem menos lignina que a polpa em sua composição, T_{onset} é menor que 310 °C, o que significa que ainda há hemicelulose nos nanomateriais.

Comparando com os casos de nanomateriais obtidos por hidrólise enzimática no trabalho de SQUINCA et al. (2020), que utilizaram enzimas *in house* de *A. niger* e polpa de celulose de eucalipto como substrato, os nanomateriais deste trabalho apresentaram T_{onset} menor, no valor de 300,5 °C. Assim como neste trabalho, SQUINCA et al. (2020) produziram enzimas *in house* para a obtenção de nanocelulose. No entanto, as enzimas foram produzidas em escala de bancada, enquanto neste trabalho foram produzidas em biorreator. A grande diferença foi o fungo utilizado e a maneira com que as enzimas aplicadas foram obtidas, já que neste trabalho as enzimas foram obtidas em biorreator de leite empacotado em multicamadas, no qual houve constante fornecimento de oxigênio aos fungos. Esse fornecimento possivelmente induziu os fungos a produzirem enzimas oxidativas que auxiliaram na degradação da biomassa (DOS SANTOS et al., 2016).

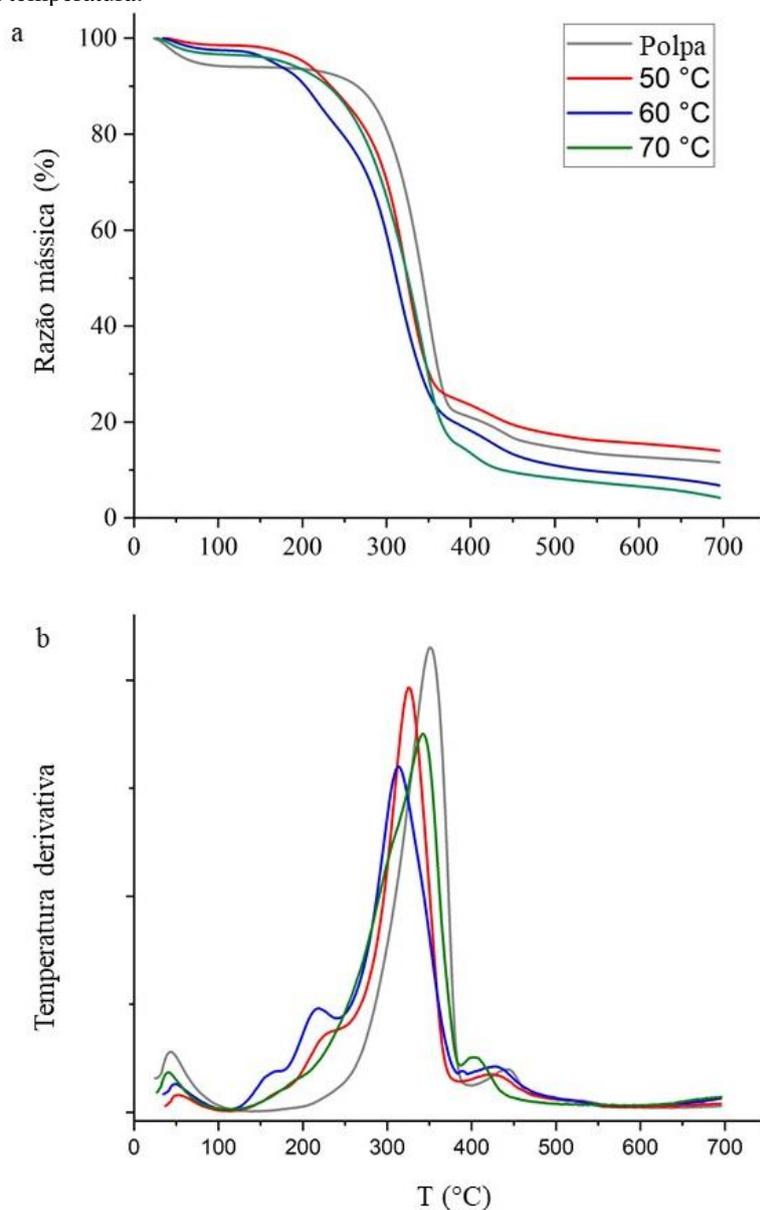
XU; CHEN (2019) investigaram a estabilidade de nanocristais de celulose com alta pureza (99,99%) e os nanomateriais apresentaram o valor de T_{onset} a 260 °C, que é um valor próximo ao obtido nesse trabalho. No trabalho deles, foi feita hidrólise com polpa de celulose de eucalipto como substrato e enzimas comerciais de celulase do fungo

A. niger e xilanase do fungo *Trichoderma Viride* G do Ningxia Xiasehgn industrial Group. Isso indica que foram obtidos nanocristais de celulose neste trabalho e que eles têm características térmicas próximas à dos obtidos por XU; CHEN (2019).

Tabela 18 – Degradação mássica da polpa de celulose dos nanomateriais obtidos após a hidrólise de 96 horas. A tabela indica a temperatura na qual a massa começa a degradar (T_{onset}), a temperatura na qual a maior quantidade de massa está sendo decomposta (T_{max}) e os resíduos resultantes a 600 °C.

Condição de hidrólise	T_{onset} (°C)	T_{max} (°C)	Resíduos a 600 °C (%)
Polpa	276	357	12,7
50 °C	285	336	23,6
60 °C	316	353	13,0
70 °C	259	320	5,95

Figura 43 – Termogravimetria das amostras de nanocelulose e da polpa de celulose sendo que (a) representa a perda de massa das amostras de acordo com a temperatura e (b) representa a degradação térmica derivativa de acordo com a temperatura.



Fonte: Acervo pessoal.

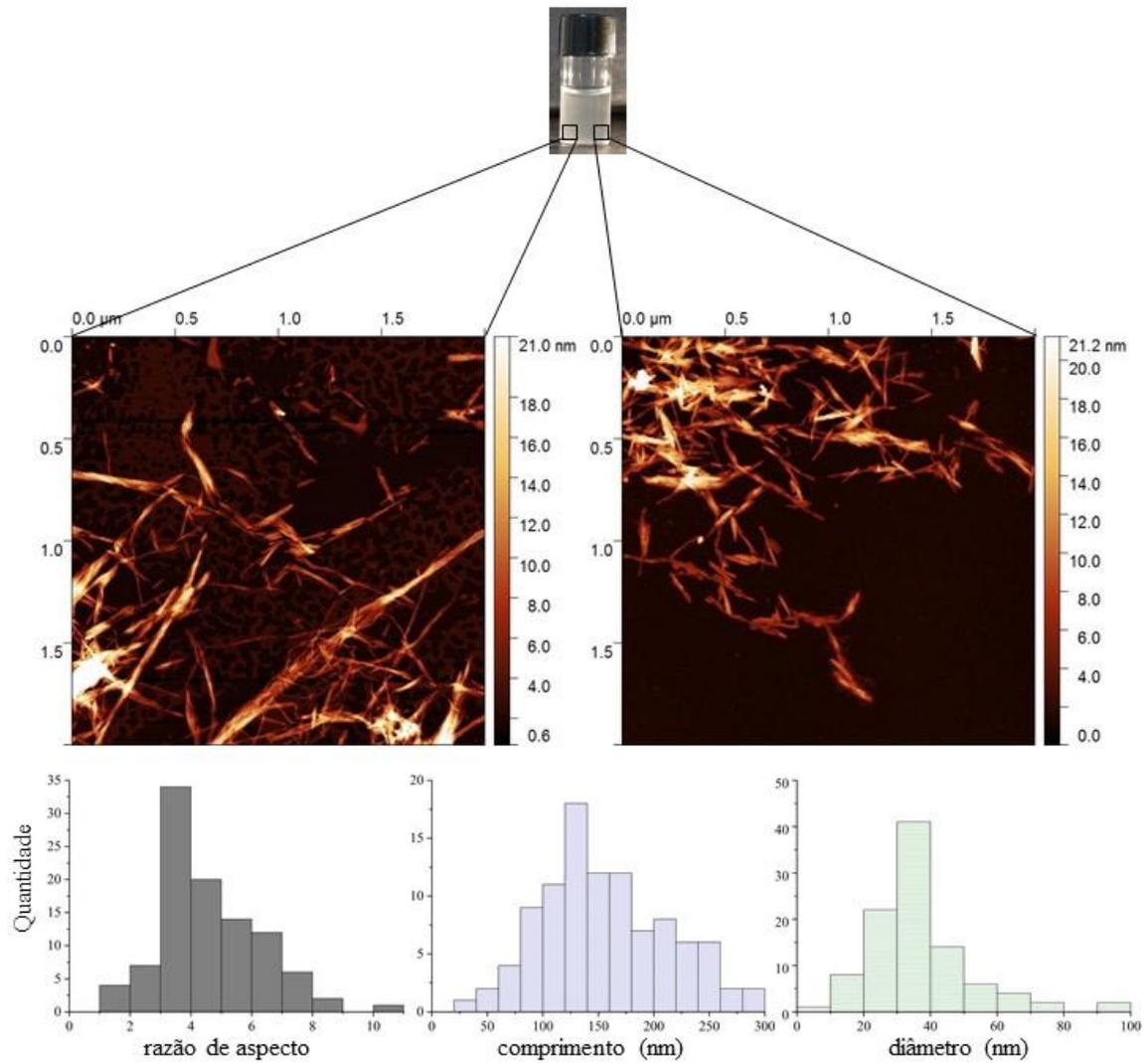
5.4 NANOCELULOSE OBTIDA

Segundo os resultados das caracterizações de DRX e de rendimento (%), a melhor condição de obtenção de nanomateriais foi na hidrólise a 60 °C com duração de 96 horas, que proporcionou os melhores resultados. Essa condição foi considerada, portanto, a mais adequada para se fazer a microscopia de força atômica. Na Figura 44, pode ser observada a nanocelulose e o histograma das dimensões dos cristais. A média dos diâmetros é de 37 ± 15 nm e comprimento de 157 ± 57 nm com razão aspecto de $4,6\pm 1,7$. De acordo com definição de CHAKRABARTY; TERAMOTO (2018), quando os comprimentos dos nanomateriais estiverem na faixa de 100 a 2000 nm, podem ser considerados nanocristais de celulose. O formato de bastonetes também indica que os nanomateriais obtidos são cristais de nanocelulose (BÖRJESSON; WESTMAN, 2015; CHAKRABARTY; TERAMOTO, 2018).

BONDANCIA et al. (2017), SIQUEIRA; DIAS; ARANTES (2019b) e SQUINCA et al. (2020) também obtiveram nanocristais através de hidrólise enzimática utilizando polpa de eucalipto kraft de celulose. BONDANCIA et al. (2017), com o complexo enzimático comercial Cellic Ctec3, obtiveram nanocristais com diâmetro de 15 ± 6 nm de diâmetro e comprimento de 216 ± 86 nm com razão de aspecto médio de 15. SIQUEIRA; DIAS; ARANTES (2019b) utilizaram endoglucanase com a origem do microrganismo não revelada e obtiveram nanocristais com diâmetros na faixa de 4 a 30 nm e comprimento na faixa de 200 a 1500 nm. SQUINCA et al. (2020) utilizaram enzimas obtidas por fermentação em estado sólido pelo fungo *A. niger* e os nanocristais apresentaram com diâmetros na faixa de $24,0\pm 4,3$ nm e comprimento de $297,0\pm 66,8$ nm. Os nanocristais desse trabalho estão com valores de diâmetros superiores aos demais, mas o comprimento dos nanocristais estão com valores semelhantes aos obtidos por BONDANCIA et al. (2017) e SQUINCA et al. (2020).

Dessa forma, pode-se dizer que foi possível obter cristais de nanocelulose a partir de um complexo enzimático de celulase obtido através da fermentação em estado sólido utilizando um biorreator de leito empacotado em multicamadas.

Figura 44 – Imagem obtida por AFM da solução dos nanomateriais e distribuição de diâmetro, largura e razão de aspecto dos cristais de nanocelulose.



Fonte: Acervo pessoal

6 CONCLUSÕES

Através de uma combinação de fermentação em pequena escala, planejamento experimental e cultivo em biorreator de leito empacotado, foi possível determinar uma condição de produção de coquetel enzimático rico em endoglucanase. O fungo termófilo *M thermophila* foi o que apresentou o melhor coquetel enzimático com alta atividade de endoglucanase, no valor de 203 ± 6 U/g-substrato, e baixa atividade de β -glicosidase, no valor de $1,6 \pm 0,1$ U/g-substrato. O cultivo em biorreator, em comparação à escala de frascos, apresentou reprodutibilidade para a enzima endoglucanase, mas o mesmo não se pode afirmar para a enzima β -glicosidase, já que em biorreator o fungo possivelmente mudou sua rota metabólica para a biossíntese de outras enzimas.

O coquetel termoestável foi utilizado na hidrólise enzimática da polpa de celulose kraft para a obtenção de nanocelulose e apresentou melhores resultados quando a hidrólise ocorreu na temperatura de 60 °C. Nessas condições, foi possível obter um rendimento de nanocelulose de 16,2%, com índice de cristalinidade 77,4%, maior que da polpa Kraft, e uma conversão de nanocelulose de $61 \pm 9\%$. Imagens de microscopia de força atômica mostraram que foram obtidos nanocristais de celulose com diâmetro na faixa de 34 ± 15 nm, comprimento 157 ± 57 nm e razão de aspecto de $4,6 \pm 1,7$.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Uma das possíveis sugestões para trabalhos futuros seria estudar melhor a produção de enzimas oxidativas pelo fungo *M. thermophila* e também verificar como essas enzimas influenciam na reação de hidrólise do material lignocelulósico. A variação da produção da enzima oxidativa pelo fungo pode ser verificada variando a vazão de entrada de ar no biorreator durante o cultivo. Para verificar como essas enzimas podem influenciar na hidrólise, pode-se realizar uma reação com alimentação de ar. É possível que a alimentação de ar durante a reação possa influenciar na liberação de açúcar solúveis e também na extração de nanomateriais com as enzimas oxidativas. Outra maneira de realizar a reação de hidrólise é utilizando água oxigenada para suplementar oxigênio ao meio reacional podendo alterar a liberação de nanomateriais.

Um possível estudo que pode contribuir na separação de nanomateriais é a utilização de equipamentos específicos para a reação de hidrólises. Um dos equipamentos em questão é o biorreator de vórtice de Taylor. Com esse equipamento é possível fazer com que as partículas menores (com menor massa) fiquem suspensas na parte de cima do biorreator enquanto que as partículas maiores (mais pesadas) fiquem na parte de baixo do biorreator. Esse controle pode ser realizado através da velocidade do impelidor.

Outro possível trabalho seria sobre uma análise econômica da produção de enzimas através do cultivo submerso e em estado sólido de microrganismos. As enzimas comerciais são produzidas majoritariamente através do cultivo submerso de microrganismos. O cultivo em estado sólido apresenta algumas vantagens por permitir que microrganismos como fungos cresçam em ambiente similar ao habitat natural do fungo o que pode contribuir com a produção de enzimas.

8 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. et al. Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: A novel approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1468–1475, 2011.

ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 844–856, 2012.

ACUÑA-ARGÜELLES, M. E. et al. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 808–814, 1995.

AKHTAR, N. et al. Biodiversity of Cellulase Producing Bacteria and Their Applications. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 50, n. 9–10, p. 983–995, 2016.

ALI, H. K. Q.; ZULKALI, M. M. D. Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: A review. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 25, n. 2, p. 255–266, 2011.

ARORA, S. et al. Determination of critical shear stress for maturation of human pluripotent stem cell-derived endothelial cells towards an arterial subtype. **Biotechnology and Bioengineering**, p. 1–12, 2018.

ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 269, p. 16–34, 2018.

ASHTER, S. A. Chemistry of cellulosic polymers. **Technology and Applications of Polymers Derived from Biomass**, p. 57–74, 1 jan. 2018.

AULIN, C.; STRÖM, G. Multilayered alkyd resin/nanocellulose coatings for use in renewable packaging solutions with a high level of moisture resistance. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 7, p. 2582–2589, 2013.

AWANO, T.; TAKABE, K.; FUJITA, M. Xylan and Lignin Deposition on the Secondary Wall of *Fagus Crenata* Fibers. **Progress in Biotechnology**, v. 18, n. C, p. 137–142, 1 jan. 2001.

BAJPAI, P. Wood and Fiber Fundamentals. **Biermann's Handbook of Pulp and Paper**, p. 19–74, 1 jan. 2018.

- BAKRI, Y.; JACQUES, P.; THONART, P. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 108, p. 737–748, 2003.
- BALA, A.; SINGH, B. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. **Renewable Energy**, v. 136, p. 1231–1244, 2019.
- BENOCCI, T. et al. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 152, 12 dez. 2017.
- BERGMANS, M. E. F. et al. Optimisation of the selective extraction of (glucurono)arabinoxylans from wheat bran: Use of barium and calcium hydroxide solution at elevated temperatures. **Journal of Cereal Science**, v. 23, n. 3, p. 235–245, 1996.
- BERTO, G. L. et al. Single-Step Fiber Pretreatment with Monocomponent Endoglucanase: Defibrillation Energy and Cellulose Nanofibril Quality. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 9, n. 5, p. 2260–2270, 2021.
- BHATI, N.; SHREYA; SHARMA, A. K. Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. **Journal of Food Process Engineering**, v. 44, n. 2, 2021.
- BHUTTO, A. W. et al. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 122, p. 724–745, 2017.
- BILATTO, S. et al. Lignocellulose nanocrystals from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 157, p. 1–10, 2020.
- BLANCO, A.; BLANCO, G. Enzymes. **Medical Biochemistry**, p. 153–175, 1 jan. 2017.
- BONDANCIA, T. J. et al. A new approach to obtain cellulose nanocrystals and ethanol from eucalyptus cellulose pulp via the biochemical pathway. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 4, p. 1085–1095, 2017.
- BÖRJESSON, M.; WESTMAN, G. Crystalline Nanocellulose — Preparation, Modification, and Properties. In: **Intech**. [s.l: s.n.].
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their

applications: A review of recent literature and patents. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 90, n. 2, p. 155–186, 2001.

BUFFO, M. M. et al. Cellulolytic enzymes production guided by morphology engineering.pdf. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 149, p. 1–8, 2021.

CASCIATORI, F. P. et al. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 255, p. 214–224, 2014.

CASCIATORI, F. P. et al. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 103–116, 2016.

CASCIATORI FRASSATTO, P. A. et al. **Fungal cellulases: production by solid-state cultivation in packed-bed bioreactor using solid agro-industrial by-products as substrates and application for hydrolysis of sugarcane bagasse** *Semina: Ciências Agrárias*, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n5Supl1p2097>>

CASCIATORI, P. A. et al. Ph E Temperatura Ótimos Para Atividade Endoglucanase De Fungos Em Cultivo Sólido. n. February, p. 2202–2209, 2015.

CHAHAL, D. S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 205–210, 1985.

CHAKRABARTY, A.; TERAMOTO, Y. Recent advances in nanocellulose composites with polymers: A guide for choosing partners and how to incorporate them. **Polymers**, v. 10, n. 5, p. 1–47, 2018.

CHENG, J.; PARK, M.; HYUN, J. Thermoresponsive hybrid hydrogel of oxidized nanocellulose using a polypeptide crosslinker. **Cellulose**, v. 21, n. 3, p. 1699–1708, 2014.

CHERUBINI, F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 7, p. 1412–1421, 2010.

COSTA, C. E. et al. Resveratrol Production from Hydrothermally Pretreated Eucalyptus Wood Using Recombinant Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Strains. **ACS Synthetic Biology**, v. 10, n. 8, p. 1895–1903, 2021.

COWAN, D. A. Thermophilic proteins: Stability and function in aqueous and organic solvents. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 118, n. 3, p. 429–438, 1997.

DE ALBUQUERQUE, M. F. G.; GUIMARÃES, V. M.; DE REZENDE, S. T. Use of Sugar Beet Flour and Wheat Bran as Carbon Source Improves the Efficiency of *Chrysosporthe cubensis* Enzymes in Sugarcane Bagasse Saccharification. **Bioenergy Research**, 2020.

DE ALMEIDA, M. N. et al. Study of gamba grass as carbon source for cellulase production by *Fusarium verticillioides* and its application on sugarcane bagasse saccharification. **Industrial Crops and Products**, v. 133, n. March, p. 33–43, 2019.

DE OLIVEIRA, F. et al. Biosynthesis of natural colorant by *Talaromyces amestolkiae*: Mycelium accumulation and colorant formation in incubator shaker and in bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 1–11, 2020a.

DE OLIVEIRA, S. P. et al. Solid-liquid extraction of cellulases from fungal solid-state cultivation in a packed bed bioreactor. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 9, p. 1530–1540, 2020b.

DOS SANTOS, H. B. et al. *Myceliophthora thermophila* M77 utilizes hydrolytic and oxidative mechanisms to deconstruct biomass. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

ESPINO-PÉREZ, E. et al. Green process for chemical functionalization of nanocellulose with carboxylic acids. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 12, p. 4551–4560, 2014.

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.

FARINAS, C. S.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Enzymatic Conversion of Sugarcane Lignocellulosic Biomass as a Platform for the Production of Ethanol, Enzymes and Nanocellulose. **Journal of Renewable Materials**, v. 6, n. 2, p. 203–216, 1 mar. 2018.

FERREIRA, R. D. G.; AZZONI, A. R.; FREITAS, S. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: The case of recombinant β -glucosidase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.

FOLAN, M. A.; COUGHLAN, M. P. The cellulase complex in the culture filtrate of the

thermophilic fungus, *Talaromyces emersonii*. **International Journal of Biochemistry**, v. 9, n. 10, p. 717–722, 1 jan. 1978.

GAN, P. G. et al. Thermal properties of nanocellulose-reinforced composites: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 11, 2020.

GARCÍA, A. et al. Industrial and crop wastes: A new source for nanocellulose biorefinery. **Industrial Crops and Products**, v. 93, p. 26–38, 2016.

GHODRAT, A. et al. In vitro binding capacity of organic (wheat bran and rice bran) and inorganic (perlite) sources for Mn, Zn, Cu, and Fe. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 80–84, 2017.

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

GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities Part 1: Xylanases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 1739–1752, 1987.

GLEESON, D.; O'CONNELL, A.; JORDAN, K. Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 52, n. 2, p. 217–227, 2013.

GOMORI, G. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. **Methods in enzymology**, v. 1, p. 138–146, 1955.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 231–234, 2019.

HEISE, K. et al. Nanocellulose: Recent Fundamental Advances and Emerging Biological and Biomimicking Applications. **Advanced Materials**, v. 33, n. 3, 2021.

HOLDEN, J. F. Extremophiles: Hot Environments. **Encyclopedia of Microbiology**, p. 127–146, 1 jan. 2009.

HORN, S. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

HU, J. et al. Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monoxygenase (LPMO) and xylanase. **Scientific Reports**, v. 8, n. 3195, p. 1–8, 2018.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production.

Industrial crops and products, v. 11, p. 1–5, 2000.

JOHANSEN, K. S. Discovery and industrial applications of lytic polysaccharide mono-oxygenases. **Biochemical Society Transactions**, v. 44, n. 1, p. 143–149, 15 fev. 2016.

KADOWAKI, M. A. S. et al. Functional characterization of a lytic polysaccharide mono-oxygenase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. 1–16, 20 ago. 2018.

KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOU, V.; CHRISTAKOPOULOS, P. Optimization of xylanase production by *Sporotrichum thermophile* using corn cobs and response surface methodology. **Engineering in Life Sciences**, v. 6, n. 4, p. 410–415, 2006.

KHOOTAMA, A.; PUTRI, D. N.; HERMANSYAH, H. Techno-economic analysis of lipase enzyme production from *Aspergillus Niger* using agro-industrial waste by solid state fermentation. **Energy Procedia**, v. 153, p. 143–148, 2018.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D. et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083–1087, 2012.

KRISHNAN, S. et al. Bioethanol production from lignocellulosic biomass (water hyacinth): a biofuel alternative. **Bioreactors**, p. 123–143, 1 jan. 2020.

KRONTIRAS, P.; GATENHOLM, P.; HAGG, D. A. Adipogenic differentiation of stem cells in three-dimensional porous bacterial nanocellulose scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 103, n. 1, p. 195–203, 2015.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 18, p. 3634–3637, 2007.

LEANG, Y. H.; SAW, H. Y. Proximate and functional properties of sugarcane bagasse. **Agro Food Industry Hitech**, v. 22, n. 2, p. 5–8, 2011.

LEITE, L. S. F. et al. Eco-friendly gelatin films with rosin-grafted cellulose nanocrystals for antimicrobial packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2974–2983, 2020.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products.

Bioresource Technology, v. 165, p. 3–8, 2014.

LI, L. et al. An Introduction to Pyrolysis and Catalytic Pyrolysis: Versatile Techniques for Biomass Conversion. **New and Future Developments in Catalysis: Catalytic Biomass Conversion**, p. 173–208, 1 jan. 2013.

MACHMUDAH, S. et al. Hydrolysis of Biopolymers in Near-Critical and Subcritical Water. **Water Extraction of Bioactive Compounds: From Plants to Drug Development**, p. 69–107, 1 jan. 2017.

MALO, P. M.; URQUHART, E. A. Fermented Foods: Use of Starter Cultures. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 681–685, 1 jan. 2016.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Using Commercial Enzymes to Produce Cellulose Nanofibers from Soybean Straw. **Journal of Nanomaterials**, v. 2016, 2016.

MEESUPHONG, R. et al. Xylanase pretreatment of energy cane enables facile cellulose nanocrystal isolation. **Cellulose**, v. 28, n. 2, p. 799–812, 2021.

MITCHELL, D. A. et al. A model-based investigation of the potential advantages of multi-layer packed beds in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p. 195–203, 2010.

MORAES, Â. M. et al. Drosophila melanogaster S2 cells for expression of heterologous genes: from gene cloning to bioprocess development. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 613–628, 2012.

PAËS, G.; O'DONOHUE, M. J. Engineering increased thermostability in the thermostable GH-11 xylanase from *Thermobacillus xylanilyticus*. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 3, p. 338–350, 2006.

PALUZAR, H.; TUNCAY, D.; AYDOGDU, H. Production and characterization of lipase from *Penicillium aurantiogriseum* under solid-state fermentation using sunflower pulp. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 39, n. 4, p. 333–342, 2021.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003.

PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Strategies for scaling-up packed-bed bioreactors for solid-state fermentation: The case of cellulolytic enzymes production by a thermophilic fungus. **Chemical Engineering Journal**, v. 361, n. July 2018, p. 1142–1151, 2019.

- POTRICH, E. et al. Replacing hexane by ethanol for soybean oil extraction: Modeling, simulation, and techno-economic-environmental analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, p. 118660, 2020.
- PRIEUR, B. et al. Phosphorylation of lignin: characterization and investigation of the thermal decomposition. **RSC Advances**, v. 7, n. 27, p. 16866–16877, 2017.
- RAJA, S. et al. Functionalized Cellulose Nanocrystals for Cellular Labeling and Bioimaging. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 2, p. 454–466, 2021.
- RAWAT, R. et al. Generating fermentable sugars from rice straw using functionally active cellulolytic enzymes from aspergillus niger HO. **Energy and Fuels**, v. 28, n. 8, p. 5067–5075, 2014.
- RIBEIRO, R. S. A. et al. Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: trends and challenges. **Engineering in Life Sciences**, v. 19, n. 4, p. 279–291, 2019.
- RITTER, S. K. Lignocellulose: A Complex Biomaterial. *Materials* v.86, n. 49; 2008
- ROSALES-CALDERON, O.; PEREIRA, B.; ARANTES, V. Economic assessment of the conversion of bleached eucalyptus Kraft pulp into cellulose nanocrystals in a stand-alone facility via acid and enzymatic hydrolysis. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, p. 1–14, 2021.
- SAHIR, A. H.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Modelling of a packed bed solid-state fermentation bioreactor using the N-tanks in series approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, n. 1, p. 20–28, 2007.
- SALES, J. C. S. et al. Supplementation of watermelon peels as an enhancer of lipase and esterase production by *Yarrowia lipolytica* in solid-state fermentation and their potential use as biocatalysts in poly(ethylene terephthalate) (PET) depolymerization reactions. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 6, p. 457–468, 2020.
- SEGAL, L. et al. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786–794, 1959.
- SHANKARAN, D. R. Cellulose Nanocrystals for Health Care Applications. **Applications of Nanomaterials**, p. 415–459, 1 jan. 2018.
- Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess engineering: Basic concepts*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall.

SINGH, B. Myceliophthora thermophila syn. Sporotrichum thermophile: A thermophilic mould of biotechnological potential. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 59–69, 2016.

SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010.

SIQUEIRA, G. A.; DIAS, I. K. R.; ARANTES, V. Exploring the action of endoglucanases on bleached eucalyptus kraft pulp as potential catalyst for isolation of cellulose nanocrystals. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1249–1259, 2019a.

SIQUEIRA, G. A.; DIAS, I. K. R.; ARANTES, V. Exploring the action of endoglucanases on bleached eucalyptus kraft pulp as potential catalyst for isolation of cellulose nanocrystals. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1249–1259, 2019b.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. New process of chemical grafting of cellulose nanoparticles with a long chain isocyanate. **Langmuir**, v. 26, n. 1, p. 402–411, 2010.

SOCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017.

SQUINCA, P. et al. Nanocellulose Production in Future Biorefineries: An Integrated Approach Using Tailor-Made Enzymes. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 5, p. 2277–2286, 2020.

SRIVASTAVA, N. et al. Applications of fungal cellulases in biofuel production: Advances and limitations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. 3, p. 2379–2386, 2018.

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

SZCZERBOWSKI, D. et al. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95–101, 2014.

TANG, A. et al. Nanocellulose/PEGDA aerogels with tunable poisson's ratio fabricated

by stereolithography for mouse bone marrow mesenchymal stem cell culture. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, p. 1–18, 2021.

WRIGHT, J. D.; WYMAN, C. E.; GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose: Process evaluation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 75–90, 1988.

XU, J. T.; CHEN, X. Q. Preparation and characterization of spherical cellulose nanocrystals with high purity by the composite enzymolysis of pulp fibers. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 1–6, 1 nov. 2019.

XU, W. et al. On Low-Concentration Inks Formulated by Nanocellulose Assisted with Gelatin Methacrylate (GelMA) for 3D Printing toward Wound Healing Application. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 11, n. 9, p. 8838–8848, 2019.

YAMATO, K. et al. Surface modification of TEMPO-oxidized cellulose nanofibers, and properties of their acrylate and epoxy resin composite films. **Cellulose**, 2021.

YANG, S. T.; LIU, X.; ZHANG, Y. Metabolic Engineering – Applications, Methods, and Challenges. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, p. 73–118, 1 jan. 2007.

YOON, L. W. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, v. 67, p. 319–338, 2014.

ZANELATO, A. I. et al. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1536–1544, 2012.

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

ZHU, H. et al. Wood-Derived Materials for Green Electronics, Biological Devices, and Energy Applications. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 16, p. 9305–9374, 2016.

ZHU, Y.; TRAMPER, J. Koji - where East meets West in fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1448–1457, 2013.