

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

Mariane Molina Buffo

**INFLUÊNCIA DA MORFOLOGIA E DO CISALHAMENTO NA**  
**PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR *ASPERGILLUS NIGER***

**São Carlos - SP**

**2020**

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

**INFLUÊNCIA DA MORFOLOGIA E DO CISALHAMENTO NA PRODUÇÃO DE  
ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR *ASPERGILLUS NIGER***

**Mariane Molina Buffo**

Aluna de pós-graduação

**Alberto Colli Badino Júnior**

Orientador (PPG-EQ/UFSCar)

**Cristiane Sanchez Farinas**

Co-orientadora (EMBRAPA Instrumentação e PPG-EQ/UFSCar)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (PPG-EQ/UFSCar), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de **Doutora em Engenharia Química**, área de concentração em **Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos**.

Molina Buffo, Mariane

INFLUÊNCIA DA MORFOLOGIA E DO CISALHAMENTO NA  
PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR ASPERGILLUS  
NIGER / Mariane Molina Buffo. -- 2020.

166 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos,  
São Carlos

Orientador: Alberto Colli Badino Júnior

Banca examinadora: Cristiane Sanchez Farinas, Marcel Otavio Cerri,  
Mateus Nordi Esperança e Kaio César da Silva Rodrigues

Bibliografia

1. Biorreatores, impelidores e condições de agitação e aeração. 2. Fungos  
filamentosos, *Aspergillus niger* e produção de enzimas . 3. Morfologia e  
cisalhamento. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III.  
Título.

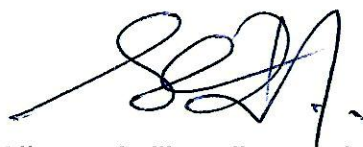
Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

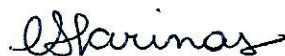
Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE MARIANE MOLINA BUFFO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 26 DE MARÇO DE 2020.

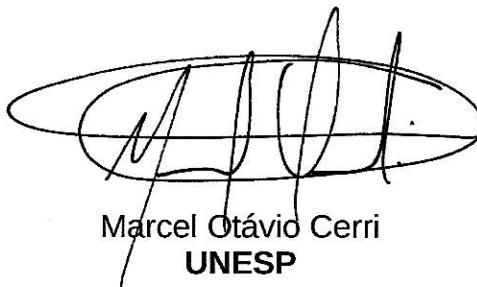
BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Junior  
**Orientador, UFSCar**



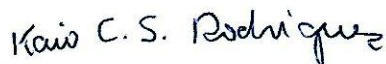
Cristiane Sanchez Farinas  
**EMBRAPA/UFSCar**



Marcel Otávio Cerri  
**UNESP**



Mateus Nordi Esperança  
**IFSP**



Kaio César da Silva Rodrigues  
**UFSCar**

# **DEDICATÓRIA**

Dedico o presente trabalho aos meus pais, Evaldo e Ana Luiza, e as minhas irmãs, Camila e Marina, por todo apoio e auxílio nos momentos difíceis.

*“Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando, refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar”.*

*Paulo Freire*

*“ Se nada ficar dessas páginas, algo, pelo menos, esperamos que permaneça: nossa confiança no povo. Nossa fé nos homens, na criação de um mundo em que seja menos difícil amar”.*

*(Pedagogia do Oprimido, 1968)*

*Paulo Freire*

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de São Carlos e toda a comunidade envolvida, por ter sido uma casa para mim por 11 anos. Dentro da universidade pública pude me desenvolver como profissional, e mais do que isso, como pessoa e cidadã. Deixo aqui registrado o meu compromisso, de sempre que possível retribuir a sociedade o dinheiro público investido em mim, mesmo que com pequenos gestos. Muito do que eu sou devo a tal Universidade, que levarei comigo para sempre, com muito amor.

Aos meus pais e minhas irmãs por serem minha base em todos os momentos difíceis. E particularmente ao longo do doutorado, por terem me ajudado a “renascer” em um dos momentos mais difíceis que já enfrentei, sem dúvida nenhuma essa tese não seria concluída sem o apoio incondicional deles.

Aos meus familiares que também quando necessário sempre demonstraram apoio e compreensão;

A todos os meus amigos de recente e longa data, que de perto ou de longe, sempre me apoiam e me ajudam, não vou citar nomes para não correr o risco de cometer injustiças, mas saibam que vocês sempre serão minha segunda família e muito obrigado por todo apoio, principalmente nos momentos mais difíceis;

Aos meus orientadores Prof. Alberto e Prof<sup>a</sup>. Cristiane pela orientação, ensinamentos e atenção ao longo de todo o período da minha formação. E mais do que isso, muito obrigada por toda a compreensão e empatia demonstrada, saibam que foi uma honra contar com vocês como orientadores e que sentirei muitas saudades das produtivas reuniões na Embrapa;

Aos meus orientadores no estágio no exterior, Prof. Eduardo e Prof. Ladisch, e a Purdue University, pela incrível oportunidade de aprendizado e por toda empatia e compreensão demonstrada. Foi um período extremamente importante para mim e sou feliz e grata que ele tenha ocorrido;

Aos professores Marcel e Mateus, por terem feito parte da minha formação profissional, o primeiro sempre com sugestões e boas ideias nas bancas da pós-graduação e o segundo pelo companheirismo e ótimo trabalho em equipe, desde a época de laboratório, e agora como membro da presente banca. Obrigada também ao Doutor Kaio, por ter aceitado o convite para banca e pelo agradável convívio na época de laboratório;

Aos técnicos de laboratório do DEQ, EMBRAPA e Purdue, em especial a Silviane e Amadeus, pela ajuda ao longo do projeto;

Aos colegas de laboratório (Embrapa, UFSCar e Purdue) pelo companheirismo, ajuda e apoio. Não citarei nomes aqui também, mas todos de certa forma foram importantes e contribuíram na minha formação. Alguns se tornaram mais do que colegas, são amigos (também inclusos nos agradecimentos anteriores) que espero levar para a vida;

Ao PPG-EQ e às instituições de fomento, em especial a CAPES, pelo apoio institucional e financeiro. É por meio de tais órgãos e com muito esforço, que a pesquisa científica é possível no Brasil. Espero que mesmo em tempos sombrios possamos juntos resistir, e que por meio da educação e da pesquisa possamos trazer maior desenvolvimento e

igualdade social ao país;

Ao laboratório de fermentação e a Embrapa Instrumentação pelo apoio institucional e infraestrutura ao projeto;

A todos, incluindo os já citados, que de alguma forma contribuíram para a realização do presente trabalho e para minha formação profissional e pessoal, deixo todo meu agradecimento, amor e respeito.



## RESUMO

Temas relacionados à sustentabilidade e ao desenvolvimento de processos renováveis e menos poluentes estão cada vez mais em evidência, devido às diversas crises ambientais e uma maior preocupação com a escassez de recursos não renováveis, como o petróleo. Assim, uma economia mundial de base biológica está emergindo em resposta a tais desafios globais e ambientais. Um exemplo de produto de base biológica são as enzimas celulolíticas produzidas principalmente por fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus*. Tais enzimas são importantes em diversos setores industriais e um deles é na produção de etanol de segunda geração, outro importante produto de base biológica, renovável e ambientalmente correto, uma vez que utiliza de resíduos agroindústrias na sua fabricação. Porém, um dos gargalos da produção de etanol de segunda geração que o torna ainda não competitivo frente ao etanol de primeira geração e à gasolina é o alto custo das enzimas celulolíticas. Assim, a presente tese buscou estudar duas importantes variáveis relacionadas com a produção de enzimas celulolíticas, a morfologia celular e as condições de cisalhamento, na tentativa de melhorar a produção dessas enzimas por *A.niger* em biorreatores. O cisalhamento sofrido pelo *A. niger* foi quantificado através da fragmentação sofrida por pellets do microrganismo em diferentes biorreatores, impelidores e condições de operação. Através de análises de imagens e medidas do diâmetro médio dos pellets ao longo do tempo foi possível propor uma cinética de fragmentação dos pellets. A fragmentação dos pellets foi dependente principalmente do tipo de biorreator e da velocidade de agitação. O biorreator *airlift* foi menos danoso ao microrganismo e maiores velocidades de agitação levaram a uma fragmentação mais abrupta. Os parâmetros cinéticos de cisalhamento também tiveram relação direta com a produção de enzimas celulolíticas, sendo que menores condições de cisalhamento favoreceram a produção de endoglucanase e condições mais intensas a produção de  $\beta$ -glicosidase. Com relação à morfologia, utilizou-se com sucesso técnica de mudança concomitante do pH e da concentração de esporos do inóculo para se obter diferentes morfologias de *A. niger*, desde pellets maiores à morfologia quase que totalmente dispersa. Tal mudança morfológica pôde ser quantificada através de um parâmetro morfológico proposto, que considera a frequência de cada classe morfológica e um fator de forma que representa uma dimensão característica de cada forma morfológica. Tais medidas foram possíveis através do tratamento das imagens dos fungos filamentosos obtidas em microscópio e estereoscópio a partir de *software* específico. Inóculos com morfologias de pellets, *clumps* e dispersa foram então testados na produção de enzimas celulolíticas, sendo que uma maior produção de endoglucanase foi obtida com inóculo na forma pelletizada, valor aproximadamente três vezes maior quando comparada a morfologia dispersa, para os resultados em shaker. Já uma maior produção de  $\beta$ -glicosidase foi obtida com inóculo na forma dispersa, valor esse 4 vezes maior nos ensaios em frascos e 160% maior em ensaios em biorreator. Tais resultados mostram a importância das variáveis cisalhamento e morfologia na produção de enzimas celulolíticas por *A. niger* e como tais influências podem ser diferentes dependendo do metabólito em estudo.

Palavras-chave: Biorreatores, impelidores, condições de agitação e aeração, cisalhamento, fungos filamentosos, *Aspergillus niger*, morfologia, enzimas, celulasas.

## ABSTRACT

Issues related to sustainability and development of renewable and less polluting processes are increasingly in evidence, due to the various environmental crises and a greater concern with the scarcity of non-renewable resources, such as oil. Therefore, a bio-based world economy is emerging in response to the global and environmental challenges. An example of a bio-based product are cellulolytic enzymes. These enzymes are produced mainly by filamentous fungi *Trichoderma* and *Aspergillus*. Such enzymes are important in several industrial sectors, how for example in the production of second generation ethanol, another important product of biological basis, renewable and environmentally friendly since it uses agro-industrial waste in its manufacture. However, one of the bottlenecks in the production of second generation ethanol, which makes it still uncompetitive compared to first generation ethanol and petrol oil, is the high cost of cellulolytic enzymes. The present thesis studied two important variables related to the production of cellulolytic enzymes, cell morphology and shear conditions, in an attempt to improve the production of cellulite enzymes by *A.niger* in bioreactors. The shear suffered by *A.niger* was quantified through the fragmentation suffered by the microorganism's pellets in different bioreactors, impellers and operating conditions. Through image analysis and measurements of the average diameter of the pellets over time it was possible to propose a kinetics for the pellet fragmentation. The fragmentation of the pellets was mainly dependent on the type of bioreactor and the agitation speed. The airlift bioreactor was less harmful to the microorganism and higher agitation speeds took to more abrupt fragmentation.

The shear kinetic parameters were directly related to the production of cellulolytic enzymes, with lower shear conditions favoring the production of endoglucanase and more intense conditions producing  $\beta$ -glucosidase. Regarding with the morphology, a technique of concomitant change of pH and spore concentration in the inoculum was successfully used to obtain different morphologies of *A. niger*, since larger pellets to almost completely dispersed morphology. Such morphological change was quantified through a proposed morphological parameter, which considered the frequency of each morphological class and a form factor that represents a characteristic dimension of each morphological form. The measures were possible through image treatment of the filamentous fungi, the images were obtained under a microscope and stereoscope using specific software to be treats. Inoculums with morphologies of pellets, clumps and dispersed were then tested in the production of cellulolytic enzymes, and a greater production of endoglucanase was obtained with inoculum in the pelletized form, value approximately three times higher when compared to dispersed morphology, for shaker results. In oposite a greater production of  $\beta$ -glucosidase was obtained with inoculum in the dispersed form, this value is four times higher in the flask assays and 160% higher in the bioreactors. Such results show the importance of the shear and morphology variables in the production of cellulolytic enzymes by *A. niger* and how such influences may be different, depending on the metabolite under study.

Keywords: Bioreactors, impellers, agitation and aeration conditions, shear, filamentous fungi, *Aspergillus niger*, morphology, enzymes, cellulases.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema de uma biorrefinaria ecologicamente sustentável para produção de biocombustíveis e outros produtos de segunda geração. ....	24
Figura 2.2. Esquema dos principais produtos que podem ser gerados a partir da biomassa lignocelulósica. ....	24
Figura 2.3. Ação sinérgica das principais enzimas do complexo enzimático de celulases. ....	28
Figura 2.4. Esquema das principais classificações morfológicas dos microrganismos filamentosos. ....	33
Figura 2.5. Esquema para os diferentes mecanismos de formação dos pellets. ....	35
Figura 2.6. Modelos de biorreatores utilizados em cultivos submersos: (a) convencional tipo tanque agitado e aerado, (b) coluna de bolhas, (c) <i>airlift</i> de cilindros concêntricos e (d) <i>airlift</i> tipo <i>split</i> . ....	55
Figura 2.7. Principais tipos de escoamento em biorreatores convencionais: radial, axial e misto. ....	56
Figura 2.8. Impelidores Rushton e “Orelha de Elefante” ....	57
Figura 3.1. Geometria e dimensões dos biorreatores e impelidores utilizados. (a) biorreator tanque agitado e aerado de 4 L. (b) biorreator <i>airlift</i> de cilindros concêntricos de 5 L. ....	64
Figura 3.2. Esquema e dimensão dos impelidores. (a) Orelha de elefante (EE). (b) Turbina de Rushton (RT). ....	65
Figura 3.3. Equipamentos utilizados para registrar a morfologia do fungo filamentoso <i>A. niger</i> , incluindo as faixas de área de observação. ....	66
Figura 3.4. Esquema das principais etapas realizadas nos ensaios com o fungo <i>A. niger</i> . ....	68
Figura 3.5. Tratamento das imagens dos pellets usando o software livre ImageJ: (a) Imagem obtida em estereoscópio. (b) Imagem binarizada. (c) Medida da área dos objetos. ....	72
Figura 3.6. Tratamento de imagem utilizando o programa ImageJ para determinar a fração ocupada por cada classe morfológica. (a) Imagem obtida em estereoscópio. (b) Imagem tratada para obtenção da área ocupada por pellets. (c) Imagem tratada para obtenção da área de pellets + fase dispersa. ....	73
Figura 3.7. Escala de morfologia proposta para quantificar as influências do pH e da concentração de esporos na morfologia do inóculo. ....	75

Figura 4.1. Comparação da dinâmica de fragmentação de pellets de <i>A. niger</i> em biorreatores TAA e ACC operados sob condições similares de transferência de oxigênio. (a) $k_{La} \approx 112 \text{ h}^{-1}$ e (b) $k_{La} \approx 77 \text{ h}^{-1}$ .....	85
Figura 4.2. Comparação da dinâmica de fragmentação de pellets de <i>A. niger</i> nos sistemas ACC e TAA operados sob condições de cisalhamento semelhantes. ....	89
Figura 4.3. Fragmentação dos pellets ( $\Delta_{frag}$ ) em função da taxa de cisalhamento média ( $\gamma_m$ ) (regressão linear com $R^2 = 0,97$ ). ....	91
Figura 4.4. Consumo específico de energia ( $P.V^{-1}$ ) em função de $k_{La}$ para os sistemas TAA e ACC operados com solução de goma xantana. (■) TAA: 400 a 1000 rpm e 0,4 vvm; (●) ACC: 1 a 5 vvm. ....	92
Figura 5.1. Efeito da velocidade de rotação (N) no diâmetro equivalente normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) de pellets de <i>A. niger</i> em biorreatores TAA equipados com diferentes configurações do impelidores e operados a uma vazão específica de alimentação de ar de 0,4 vvm: (a) RT-RT; (b) EEDP-EEUP. As barras de erro representam o erro padrão de duas amostras diferentes. ....	98
Figura 5.2. Efeito da vazão específica de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ) no diâmetro equivalente normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) de pellets de <i>A. niger</i> em biorreator TAA equipado com diferentes configurações de impelidores: (a) RT-RT; (b) EEDP-EEUP. ....	102
Figura 5.3. Efeito da configuração de impelidores no diâmetro equivalente normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) de pellets de <i>A. niger</i> em biorreator tanque agitado e aerado operado sob diferentes condições de agitação e aeração. ....	105
Figura 5.4. Perfil da fragmentação dos pellets ao longo do tempo para o ensaio com configuração de impelidores RT-RT operada a 0,4 vvm e em diferentes .....	108
Figura 5.5. Perfis temporais das distribuições percentuais de cada classe de pellets durante os ensaios de fragmentação em biorreator tipo tanque agitado e aerado (TAA). ....	109
Figura 5.6. Ajuste do modelo proposto aos pontos experimentais. ....	112
Figura 5.7. Relações entre os parâmetros de cisalhamento ( $k_1$ e $k_2$ ) e função de dissipação/circulação de energia (FDCE): (a) $k_1$ em função de FDCE; (b) $k_2$ em função de FDCE. (c) Atividade enzimática normalizada de endoglucanase e $\beta$ -glicosidase em função do parâmetro de cisalhamento $k_1$ . ....	115

Figura 6.1. Morfologias dos inóculos obtidos nas condições detalhadas na Tabela 6.1. ....	124
Figura 6.2. Análise dos efeitos das variáveis concentração de esporos ( $C_E$ ) e pH na morfologia fúngica (Y). .....	124
Figura 6.3. Concentrações de glicose (linha sólida e símbolo completo) e de células (linha tracejada e símbolo vazio) ao longo do tempo de crescimento do inóculo nas diferentes morfologias dos fungos.....	127
Figura 6.4. Atividades enzimáticas ao longo de cultivos de <i>A. niger</i> em frascos agitados a 32 °C e 200 rpm com diferentes morfologias de inóculo (pellets, clumps e dispersa): (a) endoglucanase, (b) $\beta$ -glicosidase, (c) amilase e (d) xilanase. ....	130
Figura 6.5. Atividades enzimáticas em cultivos de <i>A. niger</i> com diferentes morfologias de inóculo (pellets: P, <i>clumps</i> : C e dispersa: D) em biorreator convencional com diferentes associações de impelidores (RT-RT: impelidores turbinas de Rushton e EEDP-EEUP: impelidores orelha de elefante) em diferentes condições de agitação (N em rpm): (a) endoglucanase e (b) $\beta$ -glicosidase. As figuras à esquerda representam as morfologias em 12 h de cultivo.....	134
Figura 6.6. Produção de enzima como função da morfologia e previsão da produção combinada em cada condição (soma produção enzimática individual).....	136

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mecanismos utilizados para controle da morfologia.....	43
Quadro 2. Resumo dos trabalhos analisados, que mostram a morfologia do fungo filamentoso e a produção de celulase. ....	49
Quadro 3. Principais parâmetros de análise morfológica .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Condições de operação utilizadas nos ensaios para avaliação da fragmentação hidrodinâmica dos pellets .....	69
Tabela 3.2. Condições de concentração de esporos e pH para o crescimento do inóculo.....	74
Tabela 3.3. Condições de cultivos realizados em biorreator tipo tanque agitado e aerado (TAA).....	77
Tabela 4.1. Comparação entre as principais variáveis de desempenho dos sistemas TAA e ACC sob diferentes condições operacionais. ....	90
Tabela 5.1. Parâmetros cinéticos de cisalhamento ( $k_1$ e $k_2$ ), hidrodinâmicos ( $P.V^{-1}$ , $t_c$ e FDCE) e produção normalizada de enzimas (endoglucanase, EG, e $\beta$ -glicosidase, $\beta$ -G ) em função da configuração de impelidores e das condições de operação ( $N$ e $\phi_{ar}$ ).....	113
Tabela 6.1. Medidas características das principais classes morfológicas (pellets, clumps e disperso) e resposta quantitativa para morfologia (Y).....	122
Tabela 6.2. Crescimento celular do inóculo com diferentes morfologias. ....	128

## LISTA DE SÍMBOLOS

### Nomenclaturas

ACC: *Airlift* de cilindros concêntricos

CB: Coluna de bolhas

CBH: Exoglucanase

CFD: *Computational fluid dynamics* (Fluidodinâmica computacional)

EE: Impelidor orelha de elefante

EEDP: Impelidor orelha de elefante de escoamento descendente

EEDP-EEUP ou DP-UP: Associação de impelidores Orelha de elefante

EEUP: Impelidor orelha de elefante de escoamento ascendente

EG: Endoglucanase

FDCE: Taxa de dissipação e circulação de energia ( $\text{kW} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ )

FPase: Atividade enzimática em papel de filtro

HGU: Unidade de crescimento hifal

HI: Hifas isoladas

HR: Hifas ramificadas

HMF: Hidroximetilfurfural

RT: Impelidor Rushton

RT-RT: Associação de impelidores formada por duas turbinas Rushton

TAA: Tanque agitado e aerado

XGS: Solução de goma xantana

$\beta$ -G:  $\beta$ -glicosidase

### Símbolos Romanos

$A_i$ : Área projetada total de uma determinada forma morfológica ( $\text{mm}^2$ )

$A_m$ : Área molhada ( $\text{mm}^2$ )

$A_p$ : Área projetada ( $\text{mm}^2$ )

$A_T$ : Área total analisada nas imagens obtidas ( $\text{mm}^2$ )

$b$ : (braço/distância) entre o motor e o dinamômetro (m)

$C_e$ : Concentração de esporos em Elenmeyer para produção dos inóculos ( $\text{esporos} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

$C_0$ : Concentração inicial de oxigênio dissolvido ( $\text{mmol L}^{-1}$ )

$C_S$ : Concentração de saturação do oxigênio dissolvido com ar ( $\text{mmol L}^{-1}$ )



- $D_{eq,0}$ : Diâmetro equivalente inicial dos pellets (mm)
- $D_{eq}$ : Diâmetro equivalente dos pellets (mm)
- $d_h$ : Diâmetro médio das hifas (mm)
- $D_i$ : Diâmetro interno do biorreator (mm)
- $E_{TM}$ : Eficiência de transferência de massa ( $1.J^{-1}$ )
- F: Força (N)
- $f_i$ : fator de forma ( $mm^2$ )
- g: aceleração gravitacional ( $m.s^{-2}$ )
- K: Índice de consistência ( $Pa.s^n$ )
- $k_1$ : Parâmetro empírico das condições de cisalhamento, Equação 3.4 (-)
- $k_2$ : Parâmetro empírico das condições de cisalhamento, Equação 3.4 ( $s^{-1}$ )
- $k_e$ : Sensitividade do eletrodo ( $s^{-1}$ )
- $k_{La}$ : Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $s^{-1}$ )
- L: Comprimento das hifas ou tamanho característico de elementos morfológicos (mm)
- N: Velocidade de agitação ou frequência de rotação (rpm)
- n: Índice de comportamento de escoamento (-)
- $P_a$ : pressão atmosférica (Pa)
- P: Consumo de potência (W)
- $Q_g$ : vazão volumétrica do gás ( $m^3.s^{-1}$ )
- R: raio de pellets ou de hifas (mm)
- t: Tempo dos experimentos de fragmentação (s ou min)
- T: Torque (N.m)
- $t_c$ : Tempo de circulação (s)
- $t_m$ : Tempo de mistura (s)
- V: Volume de trabalho no biorreator ( $m^3$ )
- Y: Resposta quantitativa a morfologia, Equação 3.8 ( $mm^2$ )

## Letras gregas

$\phi_{ar}$ : Vazão específica de alimentação de ar (vvm)

$\Delta_{frag}$ : Variação do tamanho dos pellets (%)

$\dot{\gamma}_m$ : velocidade cisalhamento média ( $s^{-1}$ )

$\dot{\gamma}$ : velocidade cisalhamento ( $s^{-1}$ )

$\varepsilon$ : Taxa de dissipação de energia ( $W.kg^{-1}$ )

$\lambda$ : Escala de Kolmogorov ( $\mu m$ )

$\rho_d$ : densidade da mistura gás-líquido ( $kg.m^{-3}$ )

$\tau$ : tensão cisalhamento (Pa)

$\omega$ : Velocidade angular ( $rad.s^{-1}$ )

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO DA TESE.....</b>	<b>xiii</b>
<b>CAPÍTULO 1. Introdução e objetivos .....</b>	<b>14</b>
1.1. Introdução .....	14
1.2. Objetivos .....	16
<b>CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>18</b>
2.1. Energia renovável e o conceito de biorrefinaria .....	18
2.1.1. Biomassa lignocelulósica .....	20
2.2. Celulases .....	26
2.3. Fungos Filamentosos .....	31
2.3.1. Crescimento e Fisiologia.....	31
2.3.2. Morfologia celular e produção de metabólitos.....	32
2.3.3. Fatores que afetam a morfologia celular .....	36
2.3.4. Influência da morfologia celular na produção de celulases .....	44
2.3.5. Análise da morfologia fúngica .....	50
2.4. Biorreatores: definição, principais modelos e parâmetros de desempenho .....	54
<b>CAPÍTULO 3. Materiais e Métodos .....</b>	<b>63</b>
3.1. Materiais .....	63
3.1.1. Fluidos e meio de cultivo .....	63
3.1.2. Biorreatores .....	64
3.1.3. Microrganismo .....	65
3.1.4. Equipamentos para cultivo do microrganismo .....	65
3.2. Metodologia teórico-experimental .....	66
3.2.1. Etapas iniciais e resumo dos principais procedimentos do trabalho.....	66
3.2.2. Ensaio de fragmentação de pellets .....	68
3.2.3. Cinética da fragmentação de pellets .....	69
3.2.4. Análise quantitativa da morfologia fúngica .....	70
3.2.5. Planejamento de experimentos para obtenção diferentes morfologias de inóculo variando pH e concentração de esporos .....	73
3.2.6. Produção de enzimas .....	76
3.2.7. Metodologia analítica das atividades enzimáticas.....	78
3.2.8. Consumo de Potência (P).....	78
3.2.9. Coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $k_{La}$ ).....	79
3.2.10. Eficiência de transferência de massa ( $E_{MT}$ ).....	80
3.2.11. Taxa de cisalhamento média ( $\gamma m$ ).....	80
3.2.12. Taxa de dissipação de energia .....	80

<b>CAPÍTULO 4. Transferência de oxigênio e fragmentação de pellets de <i>Aspergillus niger</i> em biorreatores tanque agitado e <i>airlift</i> de cilindros concêntricos .....</b>	<b>82</b>
4.1. Introdução .....	83
4.2. Resultados e Discussão .....	84
4.3. Conclusões .....	93
<b>CAPÍTULO 5. Relação entre a cinética de fragmentação de pellets e a produção de enzimas celulolíticas por <i>Aspergillus niger</i> em biorreator convencional com diferentes impelidores.....</b>	<b>94</b>
5.1. Introdução .....	95
5.2. Resultados e Discussões .....	97
5.2.1. Efeito das condições de agitação na fragmentação de pellets .....	97
5.2.2. Efeito das condições de aeração na fragmentação de pellets .....	100
5.2.4. Mecanismo de fragmentação dos pellets .....	106
5.2.5. Cinética da fragmentação hidrodinâmica de pellets e relação com a produção de enzimas celulolíticas.....	111
5.3. Conclusões .....	118
<b>CAPÍTULO 6. Engenharia morfológica para expressão dirigida de enzimas celulolíticas por <i>Aspergillus niger</i> .....</b>	<b>119</b>
6.1. Introdução .....	120
6.2. Resultados e Discussão .....	122
6.2.1. Modificação do inóculo para obter diferentes morfologias .....	122
6.2.2. Produção de enzimas celulolíticas em frascos agitados.....	128
6.2.3. Produção de enzimas celulolíticas em biorreator com diferentes associações de impelidores.....	132
6.3. Conclusões .....	137
<b>CAPÍTULO 7. Considerações finais e perspectivas futuras .....</b>	<b>138</b>
<b>CAPÍTULO 8. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>140</b>
<b>APÊNDICE A. Viabilidade do uso de esporos congelados (criotubos) .....</b>	<b>155</b>
<b>APÊNDICE B. Outros métodos utilizados para alterar morfologia fúngica.....</b>	<b>156</b>

## APRESENTAÇÃO DA TESE

A presente tese está apresentada em forma de capítulos, incluindo capítulos iniciais gerais de Introdução e Objetivos, Revisão Bibliográfica e de Materiais e Métodos. Por fim, a tese conta com três capítulos de Resultados e Discussão relacionados com trabalhos publicados ou em processo de publicação na forma de artigos científicos, a saber:

Capítulo 4. Transferência de oxigênio e fragmentação de pellets de *Aspergillus niger* em biorreatores tanque agitado e *airlift* de cilindros concêntricos (artigo publicado no periódico Industrial Biotechnology - 2020).

Capítulo 5. Relação entre a cinética de fragmentação de pellets e a produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* em biorreator convencional com diferentes impelidores (artigo aceito no periódico Enzyme and Microbial Technology - 2020).

Capítulo 6. Engenharia morfológica para expressão dirigida de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* (em processo de submissão ao periódico Biotechnology and Bioengineering).

Por fim, a tese conta com o capítulo “Considerações Finais e Perspectivas Futuras”, seguido do capítulo de Referências Bibliográficas. Também foi inserido alguns resultados por meio de Apêndices. Tais resultados não foram apresentados em nenhum dos capítulos anteriores, mas julgamos importante o conhecimento dos mesmo para trabalhos futuros ou entendimento de algumas metodologias e escolhas realizadas na presente Tese.

# CAPÍTULO 1. Introdução e objetivos

## 1.1. Introdução

Temas relacionados à sustentabilidade e ao desenvolvimento de processos renováveis e menos poluentes estão cada vez mais em voga globalmente. Alguns dos motivos para tanto são as diversas crises ambientais e uma maior preocupação com a escassez de recursos não renováveis, como o petróleo. Com isso, de forma global, a sociedade clama por mais projetos dentro da chamada química verde (ALI et al., 2019).

Uma das alternativas aos combustíveis fósseis é o etanol. O de primeira geração, etanol 1G, advém de culturas de milho ou de cana de açúcar, possui um processo de produção bem estabelecido e seu preço é competitivo ao da gasolina. Porém, um dos entraves para o crescimento da produção de etanol 1G é a grande área plantada para esta monocultura, área esta que poderia servir para a produção de alimentos. Uma alternativa para solucionar tal questão é o etanol de segunda geração (2G), que utiliza resíduos agroindustriais, inclusive os do processo de etanol 1G para gerar uma maior quantidade de etanol, evitando a necessidade de aumento da atual área plantada destinada à produção de combustíveis (ZHAO e LIU, 2019).

Embora o desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol 2G tenha obtido significativos avanços, seu custo de produção ainda não é competitivo em relação ao etanol 1G e à gasolina. Algumas pesquisas mostram que esse custo de produção do etanol de segunda geração pode ser até 2,5 vezes maior que o do etanol 1G (CHANDEL et al., 2019). Uma parcela significativa desse custo é devido ao fato do material lignocelulósico ser altamente recalcitrante e, por isso, difícil de ser hidrolisado a açúcares simples (monômeros) passíveis de serem convertidos em etanol por fermentação. Uma das etapas mais críticas que fazem com que esse custo seja alto é justamente as enzimas usadas no processo de hidrólise do material lignocelulósico. Pesquisas apontam que o custo das (hemi)celulases contribuem significativamente (em torno de 20%) para o custo final de produção de bioetanol e de outros produtos da biomassa (CHOUDHARI; ODANETH e LALI, 2019).

Uma alternativa para reduzir o custo e tornar viável a implantação de processos de produção de etanol de segunda geração é o conceito de uma biorrefinaria integrada, que busca o refino da biomassa lignocelulósica em intermediários (celulose, hemicelulose e lignina) e posterior processamento para a obtenção de produtos de valor agregado e energia. Essencialmente, a biomassa é pré-tratada com agentes que resultam na liberação de celulose,

hemicelulose e lignina. Celulose e hemicelulose são convertidas por enzimas em açúcares que podem ser o produto final ou ser usados como matéria-prima na fermentação para a síntese de biocombustíveis (etanol, butanol e hidrogênio) e produtos químicos (álcoois, ácidos graxos e orgânicos e aminoácidos). Já a lignina e seus subprodutos podem ser utilizados na produção de energia (térmica e elétrica) e de produtos químicos, incluindo compostos e polímeros fenólicos. Dessa forma, ter-se-ia uma maior eficiência no aproveitamento da biomassa lignocelulósica, caracterizando o processo como social, econômico e ambientalmente sustentável (SILVA; VAZ e FILHO, 2018).

Uma vez que um dos entraves para que tal processo se torne economicamente viável é o alto custo das enzimas, pesquisas vêm destacando a importância de se produzir enzimas “*in house*” ou seja dentro da própria planta, já que, em escala industrial, o mercado de enzimas celulolíticas é dominado principalmente pela empresa dinamarquesa Novozymes. Nesse contexto é de extrema importância realizar pesquisas visando a produção de enzimas (hemi)celulolíticas e a busca de coquetéis enzimáticos customizados para a matéria prima disponível (CHANDEL; ALBARELLI et al., 2019)

Muitas das pesquisas relacionadas com a produção de celulasas estão focadas no uso de diferentes composições de meios de cultura e indutores, formas de cultivo e de biorreatores. A maioria dos estudos utiliza o fungo filamentosso *Trichoderma reesei*, fungo conhecido globalmente por ser um grande produtor de celulasas. Além disso, pesquisas recentes focam na engenharia genética como forma de melhorar a produção. Poucos estudos trabalham com o fungo filamentosso *Aspergillus niger* na perspectiva de analisar sua morfologia ou mudança morfológica e como isso influencia na produção de enzimas.

Biorreatores são equipamentos fundamentais em qualquer sistema produtivo. É por meio deles que se viabiliza uma produção em larga escala e economicamente mais viável de bioprodutos. Um dos parâmetros mais importantes na avaliação do desempenho de cultivos de microrganismos (fungos e bactérias) filamentosos em biorreatores é o cisalhamento. Quantificar o cisalhamento e avaliar seus efeitos é crucial para evitar, por exemplo, a morte celular do microrganismo. Por outro lado, um certo grau de cisalhamento é necessário para manter uma transferência de oxigênio suficiente para que microrganismos aeróbios possam desenvolver suas atividades metabólicas. Porém, tal parâmetro é por vezes subjetivo e difícil de ser quantificado. Na literatura existem diversas correlações que estimam a taxa de cisalhamento média em biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado e não convencionais pneumáticos (CAMPESI et al., 2009; CERRI e BADINO, 2012). Além das

correlações, a taxa de cisalhamento média em biorreatores vem sendo estimada por fluidodinâmica computacional (*computational fluid dynamics* ou CFD em inglês) (ESPERANÇA et al., 2019). Uma outra abordagem utilizada na literatura para avaliar o efeito do cisalhamento no cultivo de microrganismos filamentosos é observando as mudanças morfológicas que o microrganismo sofre ao longo do cultivo (JUSTEN et al., 1996).

Embora a literatura apresente trabalhos que avaliem individualmente os efeitos das condições de operação de biorreatores na transferência de oxigênio, nas condições de cisalhamento e na morfologia celular em cultivos de microrganismos filamentosos, ela é escassa no que se refere à análise conjunta desses efeitos na produção de diferentes celulases, bem como não há relatos de estudos que proponham a modelagem do fenômeno de forma a prever a cinética de fragmentação e surgimento de estruturas morfológicas (pellets, agregados miceliares, hifas ramificadas e isoladas) em função das condições de cisalhamento impostas, bem como a relação entre parâmetros cinéticos de fragmentação e a produção de diferentes enzimas celulolíticas. Em suma, há uma lacuna na literatura no que diz respeito a uma abordagem mais sistemática de engenharia de bioprocessos relacionada com o tema.

## 1.2. Objetivos

O objetivo da presente tese foi avaliar a produção de enzimas celulolíticas por *A. niger* em biorreatores convencional e *airlift*, analisando as condições de operação (agitação, aeração e impelidores), manipulando a morfologia do inóculo e analisando a transferência de oxigênio e fragmentação de estruturas morfológicas, através da modelagem da cinética do processo de fragmentação celular. Para tal, o trabalho foi desenvolvido cumprindo as seguintes etapas:

- Avaliação do efeito das condições de operação, associações de impelidores e diferentes biorreatores (convencional e pneumático) na fragmentação sofrida por pellets de *A. niger*. (Capítulo 4)
- Modelagem da cinética de fragmentação dos pellets. (Capítulo 5)
- Produção de enzimas celulolíticas em biorreatores convencionais utilizando diferentes associações de impelidores e condições de operação, análise das condições de fragmentação. (Capítulo 5)
- Obtenção de diferentes morfologias de inóculo de *A. niger*. (Capítulo 6)
- Produção de enzimas celulolíticas em biorreatores convencionais com diferentes morfologias iniciais (pelletizada, clumps e dispersa) de *A. niger*. (Capítulo 6)



- Avaliação das melhores condições para a produção de diferentes enzimas celulolíticas por *A. niger*. (Capítulo 7)

## **CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Energia renovável e o conceito de biorrefinaria**

Com a possibilidade do esgotamento dos recursos petrolíferos não renováveis, a exploração de energias renováveis e de baixo custo tem se tornado importante. Além disso, convivemos em todo o mundo com o constante aumento da demanda por energia, crises energéticas e problemas como poluição ambiental (ALI et al., 2019.). Nesse contexto, uma das alternativas é a transição do uso de combustíveis fósseis, derivados do petróleo, para combustíveis renováveis derivados principalmente de materiais lignocelulósicos conhecidos como biocombustíveis. Segundo estudos, tal mudança é uma necessidade para alcançar um melhor ambiente, saúde e status socioeconômico para todos os seres vivos.

Os biocombustíveis desempenham um papel importante na descarbonização do meio ambiente. Estima-se que a substituição dos combustíveis fósseis pelos biocombustíveis geraria uma redução de aproximadamente 43% das emissões de gases de efeito estufa. Dessa forma seria possível atingir a meta de redução de temperatura de 2 °C, estabelecida pela reunião da COP21 na França em 2015 (CHANDEL et al., 2019).

Portanto, a produção de biocombustíveis como o bioetanol, a partir de matérias primas renováveis como sacarose, amido e celulose tem sido considerada uma das formas mais promissoras de reduzir as emissões de CO<sub>2</sub> e a dependência por combustíveis fósseis. A produção de etanol à base de amido e sacarose (cana de açúcar) apresenta uma escala comercial considerável. Em 2017, foram produzidas 92,6 milhões de toneladas de etanol, das quais 78,1 milhões de toneladas foram utilizadas como combustível no mundo. A maior produção foi dos EUA, que produziram 47,2 milhões de toneladas, seguido pelo Brasil com 21,1 milhões de toneladas. Atualmente, a China tem uma produção total de etanol combustível de cerca de 2,5 milhões de toneladas (ZHAO; LIU, 2019). A maioria dessa produção mundial vem a partir de grãos como o milho e de caldo de cana-de-açúcar, conhecido como etanol de primeira geração (1G), enquanto o etanol celulósico ou de segunda geração (2G), ainda não atingiu produção comercial expressiva devido ao maior custo de produção. Estima-se que o custo mínimo de venda do etanol celulósico possa atingir US\$ 4,58/galão, sendo muito superior ao do etanol de milho (geralmente menos US\$ 2/galão) (ZHAO e LIU, 2019). Outra análise econômica revela que o custo de fabricação de etanol 2G em uma instalação brasileira anexada é próximo a US\$ 1,33/litro. O preço do etanol 1G seria de US\$ 0.56/litro, quase 2,5

vezes inferior. Nessa análise, os custos fixos e variáveis da produção contribuem com 57 e 24%, respectivamente, para o etanol 2G. Além disso, o período de retorno de investimento para o etanol 2G seria elevado, aproximadamente 31 anos, e o valor presente líquido negativo (CHANDEL et al., 2019).

Uma alternativa para sanar tal diferença de preço é o conceito de biorrefinaria e unidades integradas de produção de etanol 1G e 2G. Nesse conceito, busca-se através de uma economia circular, integrar e valorizar os materiais lignocelulósicos, que são resíduos principalmente do processo em primeira geração. A tendência é impulsionada por uma crescente conscientização ambiental, além de políticas e regulamentos nacionais e internacionais para processos de produção mais seguros e ambientalmente mais benignos. A biomassa lignocelulósica pode produzir até 50% mais etanol em comparação com o processo de primeira geração. O aproveitamento da biomassa lignocelulósica pode, assim, aumentar significativamente o rendimento global de etanol por unidade de terra em plantas integradas de produção de etanol de açúcar, sem expandir a área total de cultivo. As biorrefinarias integradas também oferecem mais benefícios do que as independentes, pois a opção integrada permite o uso compartilhado de equipamentos, utilidades e mão de obra, maximizando os benefícios ambientais e minimizando os custos de capital e de produção de biocombustíveis a partir da biomassa lignocelulósica (CHANDEL et al., 2019).

Além da biomassa lignocelulósica se apresentar como uma matéria-prima abundante e relativamente barata para as biorrefinarias, estão surgindo novas tecnologias para a conversão bioquímica da lignocelulose em produtos químicos e combustíveis de valor agregado. No entanto, existem desafios inerentes ao processo de conversão bioquímica que precisam ser abordados para poder implantar-se essas novas tecnologias em escala comercial (NOVY et al., 2019).

O próximo tópico aborda maneiras de se utilizar a biomassa lignocelulósica bem como os principais problemas e possíveis soluções de cada etapa do processo.

### **2.1.1. Biomassa lignocelulósica**

A biomassa lignocelulósica, matéria prima da produção de etanol 2G, é composta de polímeros de hidratos de carbono (celulose e hemicelulose), lignina e uma pequena quantidade de extrativos e cinzas. A celulose é um homopolissacarídeo com ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas internas, a hemicelulose um heteropolissacarídeo com açúcares aleatoriamente ramificados e ácidos urônicos e a lignina um heteropolímero de álcoois aromáticos. A celulose e a hemicelulose estão presentes juntamente com a lignina formando uma matriz forte e rígida de biomassa da planta, sendo um material bastante recalcitrante (GUO; CHANG e LEE, 2018). Além disso, os principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) podem ter variações nas suas proporções e disposições estruturais, dependendo do tipo e idade da planta. Tipicamente, a celulose e hemicelulose compreendem até dois terços da biomassa e são as frações de onde são extraídas as pentoses e hexoses (glicose), que são utilizadas na fermentação para produção dos combustíveis de segunda geração (GIRIO et al., 2010). Devido à recalcitrância, tem-se a dificuldade em se processar materiais lignocelulósicos, o que eleva o custo do processo.

Como formas de melhorar o rendimento, produtividade e gerar menores custos operacionais de capital, a produção de etanol 2G consiste na integração de pelo menos três etapas principais de processamento da biomassa nas biorrefinarias: pré-tratamento, hidrólise e fermentação (GIRIO et al., 2010).

O pré-tratamento tem a função de quebrar estruturas de lignina e hemicelulose, para separar os três biopolímeros (lignina, celulose e hemicelulose), melhorando a digestibilidade das enzimas em relação à fração de hemicelulose e celulose e visando a recuperação total da matéria-prima através de uma ótima utilização de todos os componentes lignocelulósicos. Busca-se reduzir a cristalinidade da hemicelulose e celulose e aumentar a porosidade desses materiais, o que facilitaria a etapa de hidrólise subsequente (SUN e CHENG, 2002). Vários pré-tratamentos têm sido propostos e desenvolvidos, sendo os métodos classificados de diferentes formas, por exemplo, pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes no intuito de reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica. Em alguns métodos como a explosão a vapor, a maioria da hemicelulose (70%) é hidrolisada a pentoses, com pequenas perdas de celulose e nenhuma solubilização de lignina (DIAS et al., 2012).

A etapa de pré-tratamento, no entanto, também apresenta algumas desvantagens, como

o aumento do custo do processo e liberação de produtos indesejáveis. Dependendo do processo e das condições utilizadas durante o pré-tratamento, açúcares da hidrólise da hemicelulose podem ser degradados a ácidos fracos e derivados de furano, que potencialmente atuam como inibidores microbianos durante a etapa de fermentação a etanol. Também, produtos derivados de lignina, como fenólicos, podem ser formados e interferir no processo, inibindo ou desativando as celulases. Devido a esses fatores, há um interesse no desenvolvimento de pesquisas que propiciem a eliminação desta etapa do processo, sem prejuízo dos resultados já obtidos (XIMENES et al., 2011; KIM et al., 2017).

A hidrólise é uma etapa importante do processo, onde se busca a conversão da biomassa em açúcares redutores, estabelecendo uma “plataforma de açúcar” que possa formar a base de um setor sustentável de produção de biocombustíveis e outros bioprodutos (HU; MOK e SADDLER, 2018). Entre as tecnologias disponíveis de hidrólise de materiais lignocelulósicos, a conversão enzimática surgiu como um candidato promissor, uma vez que representa uma abordagem de gerenciamento de biomassa ambientalmente amigável. Porém, como será abordado mais adiante, ainda são necessárias muitas pesquisas para melhorar a viabilidade operacional e financeira desse processo (SILVA; VAZ e FILHO, 2018).

A hidrólise é realizada por várias enzimas em proporções definidas, que convertem os poli em monossacarídeos. As enzimas atuam de uma maneira sinérgica para degradar o substrato, o que significa que a atividade conjunta das enzimas é superior à soma das suas atividades individuais, sendo a proporção das enzimas um fator importante a se considerar (GUO; CHANG e LEE, 2018).

Um dos grandes obstáculos para as biorrefinarias avançarem para a escala comercial é justamente o alto custo dessas enzimas e o monopólio de algumas empresas em relação a comercialização das mesmas (NOVY et al., 2019). Pesquisas apontam que (hemi)celulases contribuem significativamente (~20%) no custo do processo de produção de bioetanol e derivados de biomassa (CHOUDHARI; ODANETH e LALI, 2019). Além disso, a comercialização de enzimas vem sendo monopolizada pela empresa Norueguesa Novozymes, que possui uma celulase que pode potencialmente hidrolisar o material lignocelulósico com um rendimento satisfatório em escala industrial. Dois outros participantes, Dupont e Abengoa, também desenvolveram um coquetel de celulase para hidrólise de biomassa em larga escala, mas seu suprimento comercial é incerto. Recentemente, a startup finlandesa Metgen também desenvolveu um coquetel de celulases, "MetZyme® SUNO™", mas sua produção e suprimento comercial ainda estão em estágio de desenvolvimento (CHANDEL et al., 2019).

Sendo assim, na produção de etanol 2G é necessária uma mistura de proteínas celulolíticas, hemicelulolíticas e acessórios, sendo que tais coquitéis geralmente são adquiridos em formulações padronizadas, de fornecedores externos e distribuídos em locais de produção centralizados. No entanto, tem-se tornado cada vez mais claro que as formulações padronizadas “tipo único” têm limitações, pois seu desempenho varia de acordo com o tipo de biomassa usada no processo de conversão. A razão para isso é que, dependendo da matéria-prima utilizada, é necessária uma ampla variedade de atividades enzimáticas diferentes para uma degradação eficiente, sendo necessário customizar as misturas de enzimas para maximizar a eficiência hidrolítica e a relação custo-benefício nos diferentes processos de conversão (NOVY et al., 2019). Esse fato, juntamente com outros fatores que serão apontados posteriormente demonstram possíveis vantagens na fabricação de enzimas “*in house*”, ou seja, integrar a produção de enzimas com biorrefinarias lignocelulósicas.

Tal produção conjunta oferece vários argumentos convincentes em relação à logística, relação custo-benefício e impacto ambiental. Reduções de custo são alcançadas através do compartilhamento de recursos como terrenos e edifícios, tratamento de resíduos e infraestrutura de serviços públicos, reduzindo assim a contribuição do investimento de capital no custo de produção. Além disso, tem-se vantagens em relação à produção de extratos enzimáticos mais específicos para necessidade desejada. As enzimas celulolíticas podem ser produzidas e aplicadas diretamente na hidrólise enzimática utilizando integralmente o caldo de cultivo de produção das enzimas, evitando etapas dispendiosas de remoção de células, separação e concentração das enzimas e formulação do extrato enzimático. Reduções de custo de 5 a 25% são obtidas na fabricação de enzimas *in house* e projeções otimistas da fabricação integrada propõem uma redução de até 70% nos custos operacionais (NOVY et al., 2019).

As enzimas celulasas e hemicelulasas são produzidas por um certo número de microrganismos. Tais enzimas convertem, respectivamente, a biomassa em hexoses e pentoses. A conversão da fração de hemicelulose, quer na forma monomérica ou na forma oligomérica, é essencial para aumentar a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Dessa forma, pesquisas focam cada vez mais na utilização de ambas, hexoses e pentoses na fermentação, uma vez que aumentaria o rendimento e melhoraria substancialmente a economia do processo (GIRIO et al., 2010).

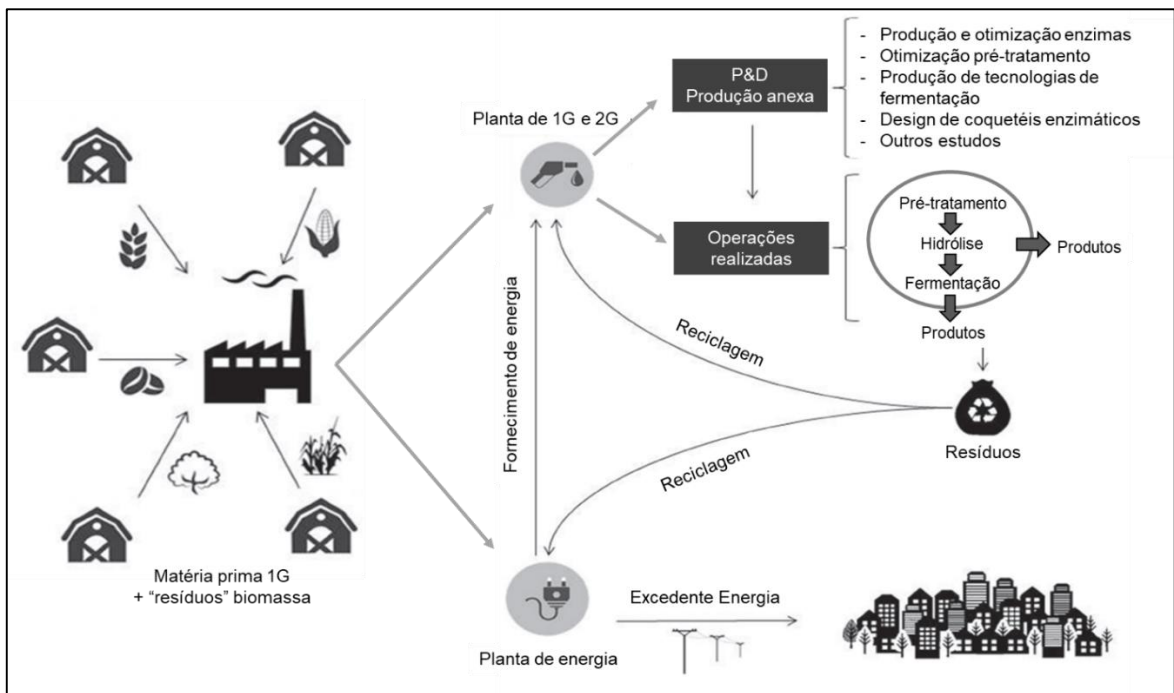
Dessa forma, melhorias e estudos relacionados com a produção enzimática são cruciais para o melhor processamento e diminuição dos custos da produção de enzima e, conseqüentemente, custos dentro do contexto de biorrefinaria. Alguns estudos focam na

melhoria da cepa microbiana, na adoção de coquetéis enzimáticos aprimorados e específicos e em condições mais favoráveis de produção (ALI et al., 2019). Além disso, estratégias vêm sendo aplicadas no sentido de diminuir a quantidade de enzima utilizada, por exemplo, aumentando as atividades específicas das celulases por meio de ferramentas de engenharia genética, suplementação com  $\beta$ -glicosidase, co-cultivos e modificação das proporções de cada enzima nos coquetéis enzimáticos (CHOUDHARI; ODANETH e LALI, 2019). Portanto, melhorar a produtividade enzimática dos microrganismos, aumentar a capacidade hidrolítica das celulases e otimizar a tecnologia de produção de enzimas são essenciais para melhorar a relação custo-benefício dos processos de produção à base de materiais lignocelulósicos.

A terceira etapa de produção seria a fermentação, etapa comum do processo de primeira e segunda geração. Assim, com as conversões de hemicelulose e celulose em açúcares redutores, esses seguem para o processo de fermentação em rota similar ao processo de primeira geração. A ideia da biorrefinaria é que cada fração separada de lignina, hemicelulose e celulose gerem preferencialmente um determinado produto e esses produtos agreguem valores à biorrefinaria e ao material lignocelulósico.

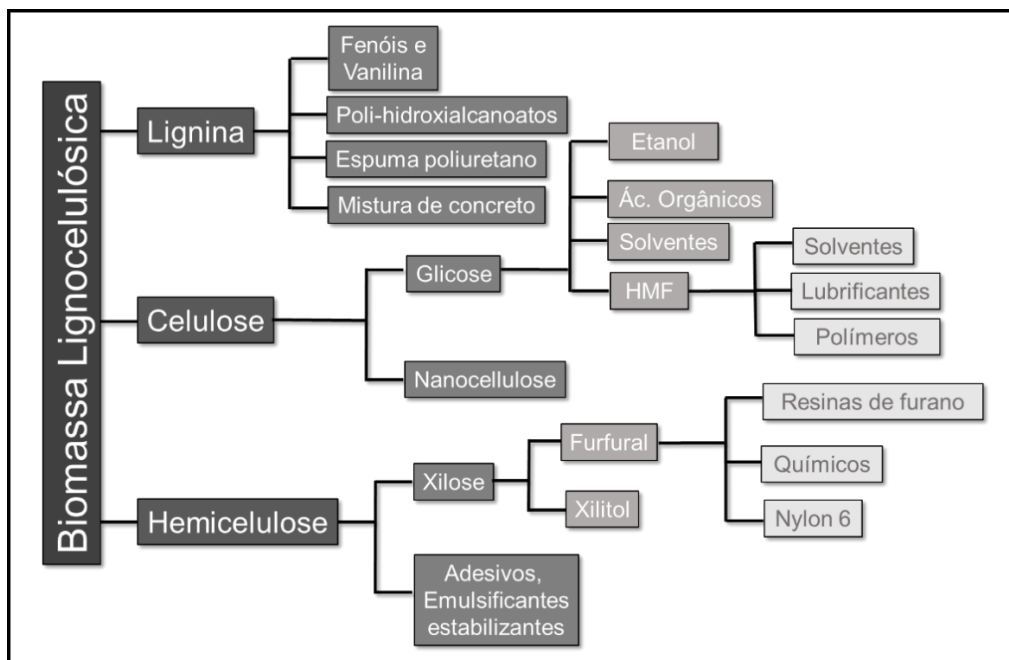
A Figura 2.1 mostra um esquema resumido de uma ideia de biorrefinaria ambientalmente sustentável e com produção circular. A Figura 2.2 mostra os principais bioprodutos que podem ser gerados dentro dessa biorrefinaria com cada fração da biomassa lignocelulósica.

Figura 2.1. Esquema de uma biorrefinaria ecologicamente sustentável para produção de biocombustíveis e outros produtos de segunda geração.



Fonte: Adaptado (SILVA; VAZ e FILHO, 2018)

Figura 2.2. Esquema dos principais produtos que podem ser gerados a partir da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado (DE PAULA et al., 2019)



A fração de celulose é hidrolisada principalmente em glicose e posteriormente convertida em produtos fermentáveis como etanol, ácido lático, propanol, acetona e ácido succínico, entre outros (Figura 2.2). Hidroximetilfurfural (HMF) e furfural também são produzidos a partir de frações de celulose e hemicelulose, respectivamente. O furfural é um material básico para resinas de furano e síntese de Nylon 6, enquanto que o HMF é usado na fabricação de solventes, lubrificantes e outros polímeros (Figura 2.2). Outro produto promissor da celulose é a nanocelulose, um produto de hidrólise enzimática controlada. Nanocelulose e nanofibras têm sido usadas principalmente como cargas nanocompósitas devido às suas propriedades características; biodegradável, renovável, acessível, de baixo custo, biocompatível, hidrofílico, alta resistência mecânica, baixa densidade e ampla área de superfície. A nanocelulose também é biomedicamente importante, com aplicações na reposição de pele em queimaduras e feridas, administração de medicamentos, engenharia de tecidos e reconstrução óssea (DE PAULA et al., 2019).

A hemicelulose é um polissacarídeo complexo encontrado nas paredes celulares das plantas. O conteúdo de hemiceluloses inclui arabinoxilano, xiloglucano, xilano, glucomanano e glucuronoxilano. A conversão da hemicelulose libera açúcares simples como a xilose, que pode ser convertida em xilitol, um substituto do açúcar, ou usado na geração de combustíveis como o bioetanol e o biohidrogênio. A arabinose, outra pentose da hemicelulose, também pode ser utilizada para produzir produtos químicos de valor agregado como o furfural (DE PAULA et al., 2019).

Além disso, para o sucesso geral da biorrefinaria, estudos mostram que é necessário aumentar o potencial de transformar a lignina em produtos de alto valor agregado. A maioria dos componentes celulósicos da matéria-prima lignocelulósica é consumida, deixando uma quantidade significativa de lignina gerada como subprodutos. Portanto, encontrar uma rota alternativa para essa utilização excedente de lignina tornou-se a chave para a sustentabilidade de qualquer indústria de bioprocessamento (SILVA; VAZ e FILHO, 2018). A Borregard Lignotech desenvolveu alguns produtos químicos especiais a partir da lignina. O uso da lignina requer um conjunto complexo de catalisadores para decompô-la por despolimerização e remoção de oxigênio, levando a seus monômeros que podem ser metabolizados por organismos para sintetizar ácidos mucônicos, poli-hidroxicanoatos, polímeros fenólicos, metano e outros produtos de alto valor (KUMAR et al., 2019).

Basicamente, as biorrefinarias buscam trabalhar com a biomassa lignocelulósica residual, tratando de transformá-la em açúcares solúveis (frações C5 e C6) que podem ser

fermentados a biocombustíveis de segunda geração (2G) e uma variedade de subprodutos de maior valor agregado, inclusive usando a fração da lignina. Sendo assim, busca-se adicionar valor aos produtos e reduzir cada vez mais os custos ou o saldo não tão positivo da segunda geração de biocombustíveis (CHANDEL et al., 2019).

Como visto, as enzimas que de forma global são tratadas como celulases, são de crucial importância para o sucesso das biorrefinarias, além de serem utilizadas em outros setores industriais, como têxtil, alimentício e papel e celulose. O próximo tópico abordará como essas enzimas agem nos materiais lignocelulósicos e estudos que buscam melhorar a produção de tais enzimas.

## 2.2. Celulases

As enzimas conhecidas como celulases são um conjunto de enzimas importantes em diversas indústrias químicas. Muitas vezes elas são tratadas de forma geral, mas são uma gama de enzimas específicas. Na indústria de papel e celulose, misturas de celulases e hemicelulases têm sido usadas para aumentar a drenagem e a suportabilidade da polpa. Além disso, elas também são utilizadas na fabricação de cartões biodegradáveis, papel macio, toalhas de papel e papel higiênico. Nas indústrias têxteis, as celulases são usadas para o processamento e acabamento úmido dos têxteis. Na indústria de vinho e cervejaria, as celulases têm sido usadas principalmente para fermentar polissacarídeos para produzir bebidas alcoólicas. Na indústria de alimentos,  $\beta$ -glicosidase e pectinases são adicionadas para reduzir o amargor das frutas cítricas, aumentar a textura, o sabor e o aroma das frutas e legumes. Na indústria de ração, as celulases são usadas para melhorar a qualidade, digestibilidade e valor nutricional da ração animal. No campo das indústrias agrícolas, celulases, hemicelulases e outras enzimas como as pectinases são empregadas para proteger plantações de patógenos vegetais, degradando sua parede celular. Além das tradicionais indústrias citadas, o uso de celulases para a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica na produção de biocombustíveis e açúcares simples tem aumentado nos últimos anos ao redor do mundo (MANISHA e YADAV, 2017).

Idealmente, coquetéis de enzimas compreendem um número mínimo de tipos de enzimas nas menores concentrações possíveis e em proporções ideais. O projeto racional de coquetéis enzimáticos requer conhecimento preciso da sinergia entre cada membro enzimático e também conhecimento das condições de bioprocessamento que devem ser configuradas para

otimizar o sinergismo enzimático.

Celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre a celulose, promovendo sua hidrólise em glicose, que desperta maior interesse industrial, devido à sua conversão mais fácil em biocombustíveis. Microrganismos que fermentam glicose já são bem conhecidos e estudados. Três principais celulases conferem a hidrólise sinérgica da celulose, as endoglucanases (EC 3.2.1.4, CMCase ou EG), exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.74, CBH ou Avicelase) e  $\beta$ -glicosidases (EC 3.2.1.91 ou celobiase ou BG). Elas pertencem à família das glicosídeos hidrolases (GH), catalisando a hidrólise de ligações glicosídicas (JUTURU e WU, 2014).

Endoglucanase é a enzima do complexo responsável por iniciar a hidrólise quebrando ligações glicosídicas nas regiões internas da estrutura amorfa da celulose e gerando oligossacarídeos de cadeia longa de terminais livres redutores ou não redutores (JUTURU e WU, 2014). Elas trabalham rompendo as fibras de celulose e criando extremidades acessíveis, além disso são responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico, o que permite por exemplo, obter extrato líquido, mas não ainda concentrado em glicose.

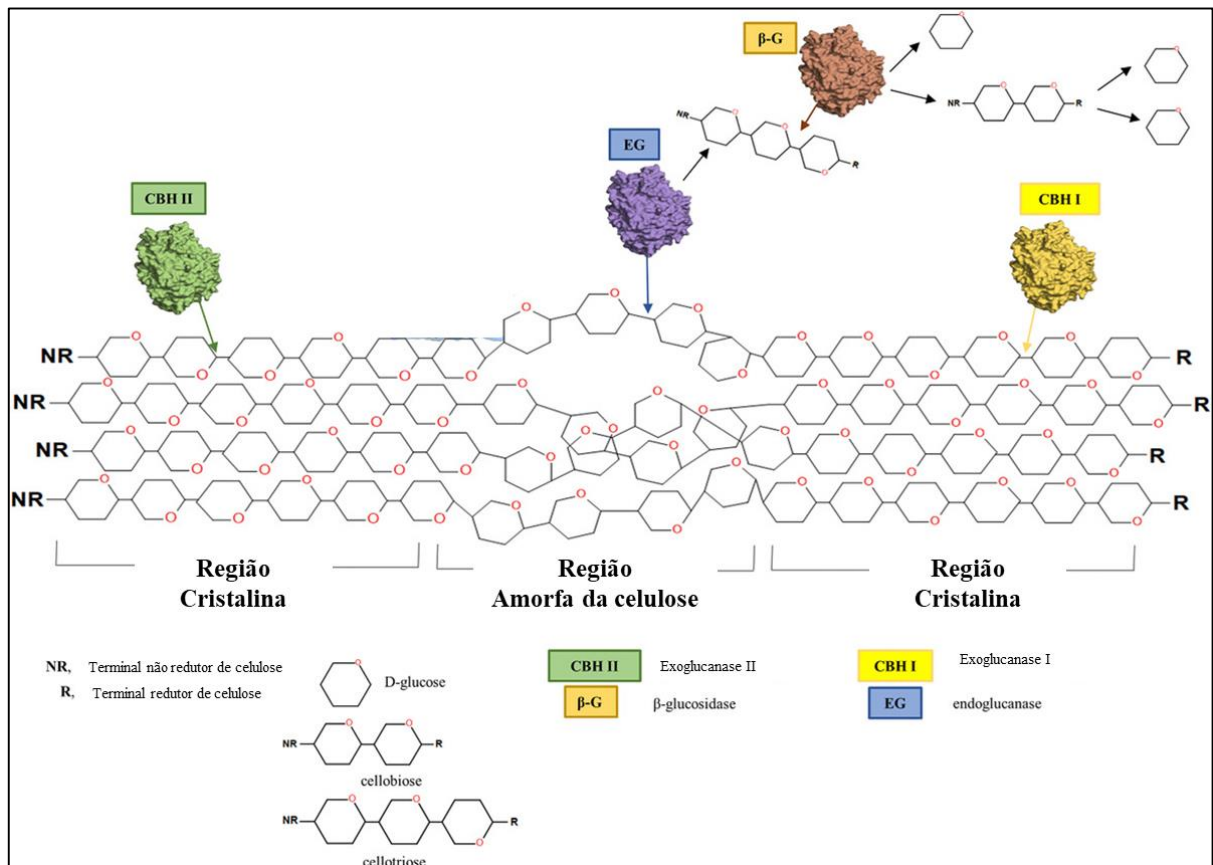
As exoglucanases são subdivididas em celobiohidrolases e glucanohidrolases. As primeiras são responsáveis por agir unidirecionalmente nas cadeias longas de oligossacarídeos redutores (CBH I) e não-redutores (CBH II) gerados pela endoglucanase, e liberam celobiose. Já as glucanohidrolases são capazes de liberar moléculas de glicose diretamente dos terminais do polímero, o que as tornam de elevada importância, apesar de pouco reportadas (MANISHA e YADAV, 2017).

A  $\beta$ -glicosidase hidrolisa a celobiose para gerar glicose. Um alto nível de  $\beta$ -glicosidase é importante para evitar a acumulação de celobiose, que é um forte inibidor das atividades de endoglucanase e exoglucanase (LI et al., 2013).

A ação das enzimas celulolíticas ocorre através de três etapas: adsorção, biodegradação e dessorção. A atividade da celulase diminui durante a hidrólise e acredita-se que a adsorção irreversível da enzima sobre a celulose é parcialmente responsável por esta desativação. Existem dois tipos comuns de sítios ativos de celulase: (1) sítios ativos abertos (com ranhuras, fendas) que apresentam tipicamente atividade endocelulolítica (endocelulases), ligando-se em qualquer lugar ao longo do comprimento da molécula de celulose e hidrolisando a ligação glicosídica. (2) sítios ativos com túnel que exibem atividade exocelulolítica (celobiohidrolases), ligando-se as extremidades das moléculas de celulose (SUKHARNIKOV et al., 2011).

A Figura 2.3 ilustra e resume as ações das principais enzimas celulolíticas na molécula de celulose.

Figura 2.3. Ação sinérgica das principais enzimas do complexo enzimático de celulases.



Fonte: Adaptado (ANDLAR et al., 2018)

As hemicelulases também são enzimas essenciais na hidrólise de materiais lignocelulósicos. Elas promovem a hidrólise da hemicelulose em pentoses, o que acaba por aumentar o rendimento do etanol de segunda geração, caso microrganismos capazes de fermentar pentoses sejam utilizados, ou constitui matéria prima para geração de outros produtos importantes (BHARDWAJ; KUMAR e VERMA, 2019). Similarmente, o complexo de hemicelulases envolve entre outros endo-1,4-bD-xilanase (EC 3.2.1.8), que cliva ligações internas da cadeia de xilano e xilosidase (CE 3.2.1.37) que hidrolisa xilo-oligossacarídeos para produzir xilose (SONG e WEI, 2010).

As amilases, outra classe importante de hidrolases, contribuem para aproximadamente

25% do mercado de enzimas industriais. As amilases estão em crescente demanda devido ao seu papel crucial na hidrólise do amido e às aplicações que essa ação gera, como na produção de bebidas como cerveja, tratamento de distúrbios digestivos, produção de queijo a partir de leite e produção de álcoois. A hidrólise do amido envolve duas etapas: liquefação e sacarificação. Similarmente às celulases, o modo de ação das amilases pode ser dividido em enzimas tipo endo- ou exo ativas. Tais enzimas clivam aleatoriamente as ligações  $\alpha$ -1,4 entre as unidades de glicose adjacentes na cadeia linear de amilose e amilopectina do amido e eventualmente geram glicose, maltose, maltotriose e pequenas dextrinas (SINDHU; BINOD et al., 2017).

As celulases e hidrolases podem ser produzidas por fungos, entre eles *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* e bactérias como *Clostridium cellulovorans*. A maioria das pesquisas para a produção de celulases comerciais centrou-se sobre os fungos, pois a maioria das bactérias relevantes são anaeróbias, com uma baixa velocidade de crescimento celular (TALEBNIA; KARAKASHEV e ANGELIDAKI, 2010). As celulases de fungos são comercialmente importantes, pois estas enzimas são secretadas pelas células. Geralmente, considera-se que as celulases termófilas têm aplicações comerciais, pois são robustas e capazes de resistir a altas temperaturas e valores extremos de pH (JUTURU e WU, 2014).

*T. reesei* tem sido o fungo filamentoso mais amplamente utilizado para a produção de celulases desde a década de 1950 (BISCHOF; RAMONI e SEIBOTH, 2016), porém seu rendimento na produção de  $\beta$ -glicosidases é muito baixo. Isso por que a maioria das  $\beta$ -glicosidases produzidas por *T. reesei* são encontradas na parede celular durante o crescimento de fungos, tendo esse uma baixa quantidade de  $\beta$ -glicosidase secretada no meio. Um exemplo de microrganismo que é bem relatado em relação a produção de  $\beta$ -glicosidase é o gênero *Aspergillus*, como *A. niger* e *A. Phoenicus* (SRIVASTAVA et al., 2019).

Pesquisas recentes buscam melhorar geneticamente ou utilizar co-cultivos para produção de coquetéis enzimáticos mais completos e sanar os problemas citados anteriormente. Por exemplo, Zhao, Deng e Fang (2018) buscaram otimizar a produção de celulases utilizando conjuntamente engenharia genética e co-cultivo de *T. reesei* e *A. niger*. Isso por que, *T. reesei* apresenta deficiência em produzir  $\beta$ -glicosidase e celobiohidrolase II, enzimas que *A. niger* produz em maiores quantidades. Os autores conseguiram a produção de coquetel enzimático com atividade em papel de filtro (FPU) de  $12,17 \pm 1,18$  U/mL, atividade de celobiohidrolase II de  $53,10 \pm 2,95$  U/mL, atividade de endoglucanase  $716,11 \pm 41,16$  U/mL e  $\beta$ -glicosidase  $1,93 \pm 0,28$  U/mL. O trabalho utilizou *T. reesei* modificado geneticamente para

produção de CBH II e *A. niger* em co-cultivo para produção de  $\beta$ -glicosidase ( $\beta$ -G). Além disso, os resultados de hidrólise enzimática mostraram que a deficiência de  $\beta$ -G pode ser mais sentida que a de CBH II. Fang et al. (2019) também trabalharam com co-expressão e engenharia genética para melhorar a produção de  $\beta$ -glicosidase, chegando a produção de 10 UI/mL em 4 dias de cultivo, porém a produção de CBH II foi baixa.

Já Geberekidan et al. (2019) buscaram sanar a deficiência dos coquetéis enzimáticos através do uso da levedura *Clavispora sp.* que é produtora natural de  $\beta$ -glicosidase. Tal fato acabou proporcionando à levedura capacidade de fermentar a glicose e celobiose ainda presente, não sendo necessária adição de  $\beta$ -glicosidase extra. A maioria dos coquetéis enzimáticos é deficiente em  $\beta$ -glicosidase, sendo necessário muitas vezes a suplementação.

Outro ponto importante relacionado à produção de enzimas é que essas podem sofrer influência do cisalhamento, levando a possíveis prejuízos em sua produção. Tais prejuízos podem afetar a viabilidade do microrganismo, que diminui em altas condições de cisalhamento, levando à diminuição da produção de enzimas (AMANULLAH et al. 2002). Porém, é importante destacar que a diminuição da produção pode ocorrer também por possíveis desativações das enzimas após as mesmas serem produzidas, em função da ação do cisalhamento. Ghadge et al. (2005) investigaram a desativação da celulase em reatores de tanque agitado de diferentes dimensões e com diferentes configurações de impelidores. Os autores notaram uma redução da taxa de cisalhamento com o aumento do diâmetro do tanque e diminuição do número de pás dos impelidores, o que levou a menores graus de desativação da celulase, avaliadas por meio de testes em papel de filtro utilizando coquetéis enzimáticos comerciais. Com relação aos sistemas de impelidores, esses também afetam de formas diferentes a desativação enzimática. Maior desativação foi observada quando empregadas as configurações turbina Rushton e *pitched blade*, enquanto menores graus de desativação foram observados na configuração com impelidor *hydrofoil*.

A maioria das pesquisas recentes em relação a produção de celulasas busca uma melhoria genética da cepa, como relatado anteriormente. Pesquisas recentes e não tão recentes também abordaram diversos pontos tais como o uso de diferentes resíduos industriais (FREITAS et al., 2015), uso de íons metálicos (VASCONCELLOS et al., 2016), diferentes formas de cultivo (FLORENCIO et al., 2015; CUNHA et al., 2015; CUNHA et al., 2012) e diferentes microrganismos e co-cultivos (FREITAS et al., 2016). Já a presente tese buscou a melhoria da produção de enzimas celulolíticas por meio da análise da morfologia do fungo e das condições de cisalhamento dos biorreatores.

## 2.3. Fungos Filamentosos

### 2.3.1. Crescimento e Fisiologia

Os fungos filamentosos são microrganismos heterotróficos eucarióticos que dependem de fontes externas de carbono para sua nutrição. A reprodução pode ser tanto sexuada como assexuada, normalmente por meio de esporos (conídios). Tais microrganismos são em sua maioria aeróbios estritos (RAVEN, 1978).

Uma característica importante desses microrganismos é a formação de micélio, sendo esse composto de filamentos ramificados vegetativos (hifas) com paredes celulares rígidas e espessas (SERRANO-CARREON et al., 2015). Ascomycota, grupo dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus*, têm hifas que são divididas em compartimentos por paredes transversais internas chamados septos. Cada septo possui um poro suficientemente grande para permitir que organelas celulares fluam entre os compartimentos (QUINTANILLA et al., 2015).

As paredes celulares são estruturas complexas e dinâmicas, sendo o local de diversas atividades enzimáticas. São compostas por polissacáridos fibrosos (quitina e  $\beta$ -glucano) e glicoproteínas que determinam sua estrutura fibrilar (SERRANO-CARREON et al., 2015). O equilíbrio entre a síntese e a quebra (“lise”) da parede é um ponto crítico. Por exemplo, a síntese da parede na ausência de “lise” pode provocar um excessivo espessamento da parede e prejudicar o crescimento. Por outro lado, a “lise” na ausência da síntese pode levar ao rompimento da célula (COLIN; BAIGORII e PERA, 2013).

O crescimento de hifas ocorre apenas na região apical, por meio de um alongamento das pontas e expansão da parede, sendo máximo na extremidade das pontas (QUINTANILLA, et al., 2015). Quando uma nova ponta é formada, ela cresce até um determinado comprimento e um septo com um poro é criado na parte de trás da ponta, criando uma ponta de não crescimento. Tal processo de crescimento envolve o crescimento da ponta, divisão do núcleo, divisão dos septos e ramificação (MCINTYRE, 2001). A estrutura do micélio é complexa, multicelular e multinuclear, tendo as células uma ampla distribuição de idades. Portanto, diferentes hifas podem existir em diferentes estados fisiológicos e mostram diferentes características estruturais, como o crescimento de células apicais, regiões de vacuolização e células que são metabolicamente inativas (SERRANO-CARREON et al., 2015).

Os fungos filamentosos apresentam no interior das hifas, além da membrana que delimita externamente o citoplasma, um sistema similar de membranas que demarcam certas

estruturas morfológicamente distinguíveis (espécie de organelas) com funções conhecidas na maioria das vezes. Essas estruturas de diversas aparências e diferentes porções do micélio são representadas pelo retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vacúolos. Tais estruturas são parte de um sistema integrado para a produção, separação e distribuição de enzimas para a superfície hifal (secreção) e para os vacúolos (armazenamento) (LEITE E ESPOSITO, 2010).

As excreções de proteínas por fungos filamentosos são, em sua maioria, restritas às pontas de crescimento das hifas. As pontas de hifas são livres de qualquer organela, exceto de um número de vesículas de tamanho variável, sendo que algumas delas parecem estar no processo de fusão com a membrana plasmática. O crescimento e a secreção de proteínas são processos polarizados, envolvendo o movimento de proteínas através de vesículas até às pontas de hifas crescentes onde a parede da célula é mais porosa do que em paredes mais velhas, permitindo uma mais rápida difusão das proteínas. As vesículas secretoras parecem estar associadas com microtúbulos e eles provavelmente se movem em conjunto por meio de um processo dependente de ATP (EL-ENSHASY, 2007).

### **2.3.2. Morfologia celular e produção de metabólitos**

Em geral, a morfologia dos fungos filamentosos em culturas submersas é dividida em dois níveis. Um nível microscópico, conhecido como micromorfologia e outro nível macroscópico, denominado macromorfologia (MCINTYRE, 2001).

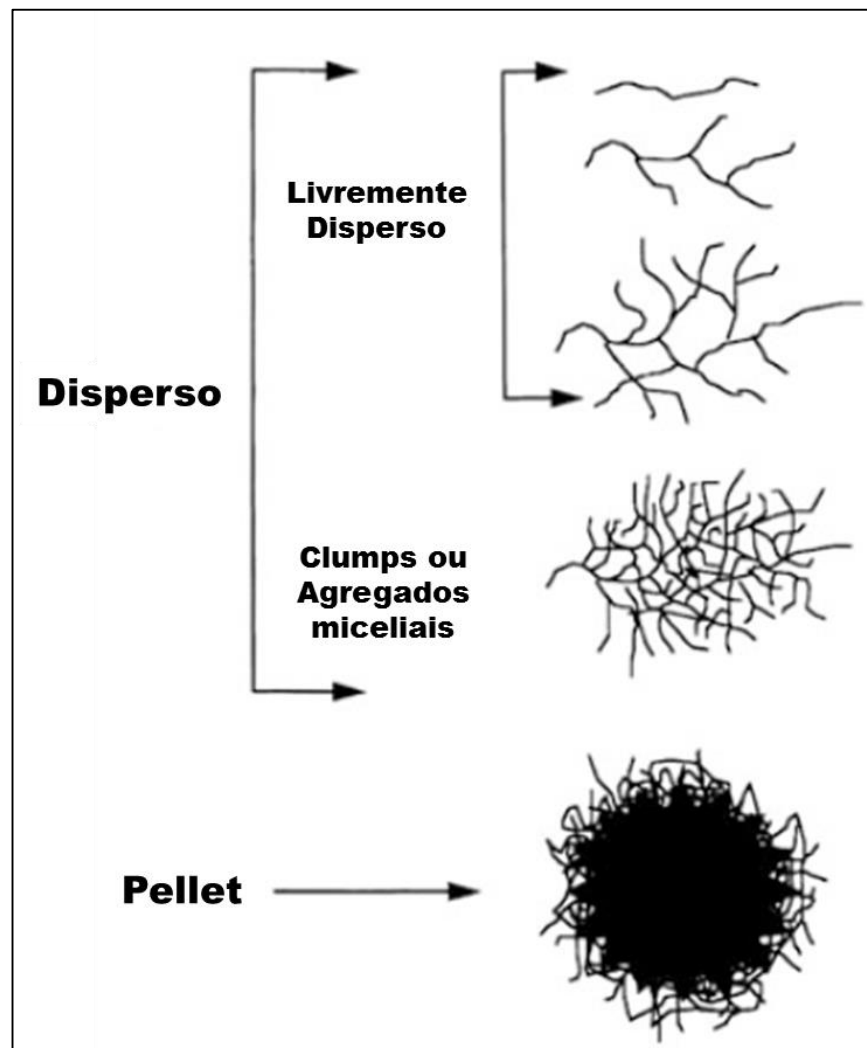
A caracterização micromorfológica inclui o processo de crescimento de esporos, germinação e alongamento do tubo germinativo (EL-ENSHASY, 2007). Além disso, a micromorfologia pode ser utilizada para descrever propriedades da macromorfologia, como a frequência de ramificações, dimensões das hifas e distribuição da população (MCINTYRE, 2001).

Um elemento de hifa surge da excrescência de um único esporo, que após a germinação passa a ter um crescimento rapidamente polarizado, resultando na formação de um tubo germinativo que se estende em comprimento pelo crescimento da sua ponta. O tubo germinativo se desenvolve em uma hifa, que após exceder um determinado comprimento forma novas pontas (ou ramos), resultando em uma rede ramificada de hifas (NIELSEN, 1996). As etapas de crescimento micromorfológico podem influenciar no crescimento macromorfológico, como será visto adiante.



A macromorfologia pode ser classificada em dois grupos principais: pellets ou crescimento disperso. O crescimento disperso engloba outras formas morfológicas, como os agregados miceliais (*clumps*), hifas ramificadas e hifas isoladas. A Figura 2.4 mostra um esquema dessas principais formas morfológicas.

Figura 2.4. Esquema das principais classificações morfológicas dos microrganismos filamentosos.



Fonte: Adaptado (QUINTANILLA et al., 2015)

Os pellets podem ser descritos como estáveis aglomerados esféricos compostos por uma rede ramificada de hifas. A sua forma pode variar de lisa e esférica a alongada e “cabeluda”. Eles crescem exponencialmente com uma velocidade específica de crescimento constante até que um raio crítico seja alcançado e as limitações de transporte de massa levem

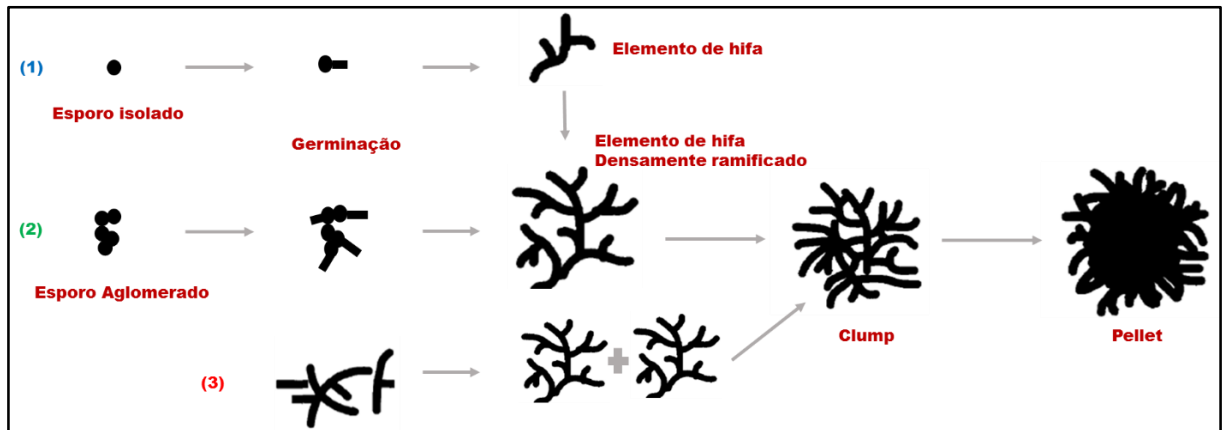
a uma depleção de nutrientes no núcleo do pellet (KRULL et al., 2013). O cultivo com a morfologia em forma de pellets tem a vantagem de diminuir a viscosidade do caldo, tornando as propriedades reológicas mais newtonianas e facilitando a mistura e transferência de oxigênio. Além disso, a formação dos pellets facilita a separação do fluido a jusante do processo. A grande desvantagem da morfologia de pellets é a limitação na difusão interna de nutrientes, incluindo o oxigênio, do caldo de cultivo para o centro do biopellet. Tal limitação provoca alterações fisiológicas significativas no organismo, levando a núcleos densos e inativos e, em alguns casos, a núcleos sem estrutura interior (EL-ENSHASY, 2007; KRULL et al., 2013; SERRANO-CARREON et al., 2015).

O mecanismo de formação dos pellets varia de microrganismo para microrganismo, mas pode-se destacar três tipos (NIELSEN, 1996):

- (1) Sem coagulação de esporos: um simples esporo se desenvolve gerando um pellet.  
Ex: *Streptomyces sp.*
- (2) Com coagulação de esporos: os esporos se aglomeram e germinam formando um pellet. Ex: várias espécies de *Aspergillus* incluindo o *A. niger*.
- (3) Aglomerado de elementos de hifas: elementos de hifas se aglomeram formando *clumps* e eventualmente pellets. Ex: *Penicillium chrysogenum*.

Um esquema da germinação dos esporos e da formação dos pellets pode ser visto no esquema da Figura 2.5.

Figura 2.5. Esquema para os diferentes mecanismos de formação dos pellets.



Fonte: Adaptado (NIELSEN, 1996).

Na forma de cultivo de micélio, os microrganismos crescem de maneira altamente dispersa, provocando emaranhamento e criando um caldo de cultivo altamente viscoso e reologicamente complexo. O comportamento reológico é geralmente não-newtoniano e se altera com o tempo de cultivo. A viscosidade aparente do caldo aumenta com o crescimento micelial e diminui com o aumento do gradiente de deformação ou taxa de cisalhamento. Em cultivos com agitação mecânica isso pode gerar graves problemas, conduzindo a viscosidades relativamente baixas em regiões próximas aos impelidores (zona com elevadas taxas de cisalhamento) e altas viscosidades em regiões próximas à parede do biorreator (região com menor taxa de cisalhamento). Cultivos envolvendo caldos não homogêneos apresentam problemas como a existência de áreas mortas ou não homogêneas com formação de gradientes de concentração, diminuição das transferências de calor e de massa e limitação no fornecimento de nutrientes (KRULL et al., 2013; SERRANO-CARREON et al., 2015).

As diferentes formas morfológicas dos microrganismos filamentosos podem estar relacionadas a agregação ou não dos esporos. Wucherpennig, Hestler e Krull (2011) verificaram que a morfologia do fungo filamentoso *A.niger* é definida nas primeiras 8 horas de cultivo e após esse período fica mais difícil mudar a morfologia fúngica abruptamente. Dependendo de vários fatores, fungos filamentosos podem crescer na forma pelletizada ou dispersa.

Fungos filamentosos têm sido utilizados em processos biotecnológicos por décadas. Em processos de cultura submersa, eles normalmente exibem um complexo ciclo de vida morfológica, como exposto anteriormente, e a morfologia está relacionada com o desempenho da produção de um determinado metabólito (KRULL et al., 2013).

Dessa forma, um dos aspectos industriais mais importantes da morfologia dos fungos é sua relação com a produtividade. Seria conveniente poder selecionar os níveis de produtividade dos cultivos com base apenas na sua aparência morfológica ou adotar desde o início e manter uma morfologia favorável a um produto específico (WALISKO et al., 2015).

Algumas revisões da literatura, El-Enshasy (2007), Robson et al. (2008) e Walisko et al. (2015) colocam a morfologia micelial dispersa como favorável para a produção de proteínas (metabólitos primários), enquanto outros produtos como o ácido cítrico ou outros metabólitos secundários seriam produzidos em níveis mais elevados em culturas pelletizadas

Muitas vezes a macromorfologia determina o ambiente da micromorfologia (hifas), através de efeitos na mistura, cisalhamento, transferência de massa e reologia da cultura. A micromorfologia, por sua vez, também tem mostrado efeitos importantes na produtividade, como as dimensões das hifas afetando a via secretora. No caso de proteínas e enzimas, por exemplo, a secreção acontece principalmente nas pontas das hifas, portanto parâmetros que poderiam aumentar o número de pontas ativas, como por exemplo as ramificações, melhoraria o rendimento da produção de proteína (EL-ENSHASY, 2007).

Apesar dessa tendência geral encontrada na literatura, ainda existem controvérsias, sendo difícil deduzir uma relação geral e inequívoca entre morfologia e produto, uma vez que diversos outros parâmetros de cultivo podem interferir na produção.

### **2.3.3. Fatores que afetam a morfologia celular**

Como visto anteriormente, os fungos são organismos complexos morfológicamente, diferindo em sua estrutura em vários momentos do seu ciclo de vida. Um número de fatores contribui para o desenvolvimento de formas morfológicas específicas. Em geral, esses fatores podem ser divididos em três categorias principais (PAPAGIANNI, 2004):

- Fatores relacionados à linhagem e ao inóculo: espécie do fungo (ligada a cinética de crescimento e sua fisiologia), tipo e concentração do inóculo.

- Fatores relacionados à nutrição (meio de cultivo): composição do meio de cultivo, adição de surfactantes, presença de partículas sólidas.

- Condições de cultivo: quantidades de oxigênio e dióxido de carbono dissolvidos, pH, temperatura, sistemas e condições de agitação, reologia, cisalhamento e tipos de biorreatores.

Diversos trabalhos na literatura vêm monitorando tais fatores como forma de controlar melhor a morfologia e assim produzir um determinado metabólito de maneira mais eficaz.

Papagianni e Matthey (2006) avaliaram como a concentração de esporos afetou o desenvolvimento morfológico de *A. niger* em cultivo submerso e qual a influência da morfologia na produção de ácido cítrico. Os cultivos foram realizados em biorreator convencional de 3 litros. A concentração de esporos variou entre  $10^4$  e  $10^9$  esporos/mL, sendo esses inoculados diretamente nos biorreatores. Os autores avaliaram a morfologia em 70 horas de cultivo, tempo suficiente para o mesmo se estabilizar. O estudo permitiu uma detalhada quantificação da transição entre as duas formas morfológicas extremas, de pellets para micélio livremente disperso, sendo a quantidade de pellets maior em inóculo de  $10^4$  esporos/mL e decaindo gradativamente até uma morfologia totalmente dispersa, a partir da concentração de inóculo de  $10^8$  esporos/mL. Os autores não mostraram uma relação direta entre morfologia e produção de ácido cítrico, apenas supuseram que a melhor morfologia para sua produção seria a pelletizada. Nessas condições houve uma menor produção de íons amônio, inibidor da produção de ácido cítrico, enquanto em cultivo disperso o consumo de oxigênio dissolvido foi menor. Resultado similar havia sido obtido anteriormente por Tucker e Thomas (1992), que em cultivo de *Penicillium chrysogenum* em Erlenmeyers de 500 mL e por 72 horas, obtiveram morfologia pelletizada ou com *clumps* mais compactos com uma concentração de inóculo de  $5 \times 10^4$  esporos/mL e uma morfologia mais dispersa em concentração de  $5 \times 10^5$  esporos/mL. Em ambos os casos, o aumento da concentração de esporos levou a uma morfologia mais dispersa, porém como pode ser notado, a sensibilidade à mudança morfológica com a concentração de esporos é fortemente dependente do microrganismo.

A influência da concentração de esporos na morfologia dos fungos filamentosos não pode ser generalizada. Deve-se analisar cada fungo individualmente, por exemplo, em estudo de Liu, Liao e Chen (2008) o efeito do inóculo em *Rhizopus oryzae* foi de produção de *pellets* em altas concentrações de inóculo ( $>10^9$  esporos/mL). Nielsen et al. (1995) também obtiveram, em seus estudos com *Penicillium chrysogenum*, morfologia pelletizada com concentração de esporos na ordem de  $10^7$  esporos/mL. Além disso, foi observado um aumento do diâmetro dos *pellets* quando aumentada a concentração de inóculo, fato justificado pela formação de *pellet* em *P. chrysogenum* ocorrer pela aglomeração de elementos de hifas.

Grimm et al. (2005) estudaram a influência da agitação e pH na agregação de esporos (conídios) de *A. niger* durante as primeiras 15 horas de cultivo. A inoculação de  $2 \times 10^6$  esporos/mL foi feita diretamente em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado com duas turbinas Rushton, sendo o tamanho das partículas analisadas *online*. Os autores variaram as condições do cultivo, pH de 4 e 7, agitação de 100 e 300 rpm e utilizaram aeração de 0,5

vvm. Foram avaliadas duas etapas distintas de agregação. A primeira logo nas primeiras horas de cultivo, onde foi observado que a colisão dos esporos foi a responsável pela agregação. A segunda depois de 7 horas, quando os esporos já começavam a germinar e as hifas a crescerem. Os efeitos do pH foram verificados nos dois momentos de agregação, onde a concentração de pellets aumentou e o diâmetro dos pellets diminuiu com a diminuição do pH, ou seja, a agregação foi menor em pH menor. A justificativa dada para tais efeitos é a influência do pH no potencial elétrico das superfícies dos esporos. Os potenciais zeta medidos foram negativos para todos os valores de pH, tornando-se ainda mais negativos conforme o pH diminuía, o que acaba por aumentar a repulsão. Já a agitação e aeração afetaram somente a segunda etapa de agregação. Nessa etapa, o tamanho das partículas era maior permitindo que essas sentissem o efeito dos microturbilhões. Além disso, constatou-se que o efeito da agitação foi maior que o da aeração. Para a produção da enzima glucoamilase, resultados melhores foram observados em cultivo com menor pH e maior agitação.

Colin, Baigorii e Pera (2013) avaliaram quantitativamente a morfologia das hifas e a adesão de esporos de *A. niger* sob diferentes condições de cultivo e como esses parâmetros afetaram a macro morfologia fúngica. Os cultivos foram realizados em frascos de 50 e 500 mL, com 20% de volume de meio de cultura, concentração de  $10^5$  esporos/mL e agitação de 200 rpm. As variáveis alteradas foram pH, temperatura e adição de dois sais. O pH inicial das culturas alterou fortemente a adesão dos esporos. Em pH igual a 2 observou-se uma menor adesão de esporos no início e ao longo do cultivo, o que resultou em uma morfologia dispersa. Por outro lado, conforme o pH inicial foi aumentado a adesão dos esporos ao longo do tempo aumentou, o que resultou em morfologia pelletizada. Nesse caso, o tamanho e a concentração dos pellets variaram de pequenos e em grande número, em pH=3, até grandes e em pequeno número em pH=8. Os íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  também influenciaram a adesão dos esporos, reduzindo 26% da capacidade de adesão, porém ficando com maior adesão do que em pH=3. O resultado na morfologia foi micélio disperso com o íon  $\text{Fe}^{+3}$  e a maior concentração de pellets de menor tamanho com o íon  $\text{Ca}^{+2}$ . A temperatura teve pouca influência na adesão dos esporos, porém em temperatura de 37°C os pellets se apresentaram em maior concentração e menor tamanho. Com relação à micromorfologia observada, o pH pouco alterou a morfologia das hifas, em contraste, essa foi bastante alterada com a temperatura. Em temperatura de 25°C imagens revelaram os compartimentos de hifas longos e regulares, já em temperatura de 30°C a frequência de ramificações das hifas foi aumentada e em 37°C houve inchaço e anomalias nas hifas. O íon  $\text{Ca}^{+2}$  alterou bastante a morfologia das hifas, estas se mostraram em forma de

“bolhas”, com grandes vacúolos. Com o íon  $\text{Fe}^{+3}$  a morfologia se apresentou semelhante a temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . A maior atividade específica de Mb-NAGase foi obtida na presença do íon  $\text{Ca}^{+2}$ , seguida pela obtida em temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . A justificativa para as maiores atividades foram a morfologia já relatada, que se relaciona com menores unidades de crescimento das hifas e maiores diâmetros das mesmas.

Wongwicharn, Mcneil e Harvey (1999) avaliaram como a variação no enriquecimento de oxigênio dissolvido (OD) no caldo de cultivo afeta a morfologia de *A. niger* mutante e a produção de duas enzimas, a glicoamilase e uma enzima heteróloga “Hen Egg White Lysozyme [HEWL]”. Os cultivos foram realizados em reator convencional de 15 L, com agitação de 500 rpm. A vazão de aeração utilizada foi de 1 vvm, sendo esta enriquecida pela adição de oxigênio puro nas porcentagens de 0 (controle), 10, 30 e 50 % v/v. Em condições de limitação de oxigênio (0 e 10% de OD em relação à saturação), a principal morfologia observada foi a dispersa, com hifas de maior comprimento e longas zonas de vacúolo. Já em 30 e 50% observou-se elementos de hifas mais curtos e ramificados, com zonas menos vacuolizadas e mais ativas. Em 50% de OD também foi verificada uma maior adesão das hifas, como resposta de um estado hiperoxidado. Em estudo semelhante CUI et al. (1998) verificaram que em valores altos de OD, a morfologia de *A. awamori* se mostrou predominantemente pelletizada, sendo que os pellets se apresentaram mais densos do que em faixas menores de oxigênio dissolvido.

Justen et al. (1996) reportaram como a morfologia micelial (livremente dispersa e *clumps*) de *P. chrysogenum* pode variar com o tipo de impelidor e intensidade de agitação. Os experimentos foram realizados em biorreator convencional tipo tanque agitado não aerado, com 1,4 L de volume útil, sendo testados 6 tipos de impelidores (de escoamento radial e axial). Amostras de caldo de cultivo contendo *P. chrysogenum* na morfologia dispersa foram transferidas para os reatores e submetidas a testes de 30 minutos, com entrada de energia variando de 0,6 a 6  $\text{kW/m}^3$ . Os resultados mostraram que o comprimento das hifas e a área projetada dos *clumps* diminuíram com o aumento da entrada de energia, fato atribuído ao cisalhamento sofrido. Com relação aos impelidores, os autores concluíram que os impelidores Rushton e “*paddle*” produziram menos danos, na mesma potência específica de entrada, que os impelidores “*pitched blade*”. Justen et al. (1998) confirmaram os resultados anteriores também em cultivos em batelada alimentada de *P. chrysogenum* em reator de 6 litros, onde a maior produtividade de penicilina foi obtida utilizando impelidores Rushton e em menores agitações.

Estudo realizado por Amanullah et al. (2002) buscou verificar a influência da velocidade de agitação na morfologia do fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* e como essa morfologia afetava a produção de proteínas (amilase e amiloglicosidase). Foram realizados cultivos em batelada alimentada utilizando dois impelidores turbina de Rushton para promover a agitação. Para avaliar a morfologia foi utilizada análises de imagens e também uma metodologia de análise das pontas das hifas, onde foi possível verificar se essas estavam ativas ou não. Os autores concluíram que as quantidades de hifas ativas foram maiores na menor condição de agitação (525 rpm) e que a intensidade da agitação teve efeito sobre a morfologia, cisalhando mais o microrganismo e gerando hifas de menores comprimentos. Como em trabalho anterior, de Amanullah et al. (1999), a intensidade de agitação afetou significativamente a morfologia micelial, porém essa mudança não influenciou na produção das enzimas.

Em estudo mais recente de Lin, Scholz e Krull (2010), os autores caracterizaram a morfologia de *A. niger* para produção da enzima amiloglicosidase. A morfologia foi estudada nas mesmas condições de entrada de energia, porém com diferentes velocidades de agitação e aeração, que como citado são fatores considerados determinantes para morfologia do fungo. Os cultivos foram realizados em biorreator convencional de 28 L com impelidores turbina de Rushton, sendo os esporos inoculados diretamente no biorreator com concentração final de  $10^6$  esporos/mL. A entrada de energia foi mantida em  $143 \text{ W.m}^{-3}$ , variando os valores de agitação de 173 a 224 rpm e de aeração de 9,2 a  $18,4 \text{ L.min}^{-1}$ , o que proporcionou concentração constante de OD. A principal morfologia observada nos cultivos foi a pelletizada, sendo os pellets analisados em relação ao seu diâmetro e concentração. Após as 50 horas de cultivo, a morfologia dos pellets apresentou-se mais diferenciada de acordo com as condições de cultivo. Em vazão de aeração mais alta e menor agitação, os pellets cresceram menos (menor diâmetro), mas foram observados em maior número, enquanto que em maior agitação e menor aeração foi observado o inverso, pellets maiores e em menor número. Em estudos preliminares os autores já tinham observado que tanto a aeração como a agitação provocavam um efeito de diminuição do tamanho dos pellets e aumento da concentração. Os autores justificaram o efeito maior da aeração devido a um maior cisalhamento, que levou a uma maior erosão na periferia das hifas e a pellets de tamanho menores. A ocorrência de maior concentração foi devido a novos pellets formados a partir das hifas fragmentadas. Além disso, os pellets em maior aeração foram mais irregulares nas bordas, com uma estrutura mais homogênea e menos compactos. Com relação à produção, a atividade de amiloglicosidase foi maior com pellets



menores, ou seja, em cultivos com maior aeração e maior consumo de potência.

Outro fator que mostrou ter efeitos na morfologia fúngica é o ultrassom. Herran et al. (2008) verificaram o efeito de diferentes intensidades de ultrassom na morfologia e produção de lovastatina pelo fungo filamentoso *Aspergillus terreus*. O cultivo foi realizado em biorreator coluna de bolhas de 25 litros com um sistema de sonicação (sonotrodo de titânio). Majoritariamente, *pellets* produzidos em shaker nos estágios preliminares da fermentação foram utilizados como inóculo. Os pellets foram analisados por imagens e as hifas dispersas foram quantificadas por medida de massa seca, depois dessas terem sido separadas dos *pellets*. Os resultados mostraram que em altos e médios valores de sonicação, os *pellets* passaram a se extinguir levando a uma maior concentração de biomassa na forma dispersa. A desintegração dos *pellets* não significou a morte fúngica, visto que a velocidade de crescimento da biomassa seguiu a mesma tendência do ensaio controle. Portanto, a concentração de biomassa e o crescimento não foram afetadas pela sonicação. A produção de lovastatina, um metabólico secundário, foi menor em ensaios com alta e média sonicação, fato justificado pela morfologia mais dispersa formada nesses meios. Em baixa sonicação, onde a morfologia sofreu menor influência, a produção também não foi maior que o controle.

Estudos realizados por Driouch, Sommer e Wittmann (2010) e Driouch et al. (2012) mostraram como a suplementação com micropartículas é uma promissora abordagem para controlar o desenvolvimento morfológico de *Aspergillus niger*. Em ambos os estudos, as micropartículas foram adicionadas em diferentes concentrações na etapa de crescimento, antes da inoculação de  $10^6$  esporos/mL. No primeiro estudo, os autores obtiveram diferentes morfologias, de diferentes tamanhos de pellets a micélio disperso, com a suplementação do meio de crescimento com micropartículas de silicato e alumínio. No segundo, os autores obtiveram pellets de diferentes tamanhos com a suplementação de titanato ( $\text{TiSO}_4$ ), não sendo obtido micélio disperso. Os cultivos foram realizados com metodologia semelhante, em Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo, sendo verificada a produção de enzimas (frutofuranosidase e glucoamilase). A produção máxima no primeiro estudo foi de 88 U/mL de glucoamilase e 77 U/mL de frutofuranosidase, obtidas com morfologia totalmente dispersa com concentração de 10 g/L de silicato e diâmetro da partícula de 6  $\mu\text{m}$ . No segundo os valores chegaram a 190 e 170 U/mL de amiloglicosidase e frutofuranosidase, respectivamente, obtidos com pellets altamente ativos de diâmetro menor que 500  $\mu\text{m}$  em concentração de 25 g/L de titanato (diâmetro da partícula de 8  $\mu\text{m}$ ). A justificativa para as mudanças na morfologia é a perturbação, pelas micropartículas, da fase inicial da agregação

de esporos. De forma geral, os estudos mostraram que o uso de micropartículas permite o controle bastante preciso de morfologia celular e cria novas possibilidades de projeto e otimização de bioprocessos com *A. niger* e também outros fungos.

A influência da osmolaridade na morfologia e produtividade de *A. niger* foi estudada por Wucherpfennig, Hestler e Krull (2011). Os cultivos foram realizados com duas cepas de *A. niger*, sendo verificada a produção de enzimas (frutofuranosidase e amiloglicosidase) em biorreatores convencional de 3 litros (agitado a 200 rpm por 2 turbinas Rushton). A inoculação de uma concentração de  $10^6$  esporos/mL foi realizada diretamente no reator, que já se apresentava com a osmolaridade alterada pela adição de cloreto de sódio. As melhores produções foram de 220 U/mL para frutofuranosidase, em osmolaridade de 3 osmol/kg (adição de 1,5 M de cloreto de sódio), e 23 U/mL para amiloglicosidase, em osmolaridade de 2,4 osmol/kg. A justificativa apresentada pelos autores é que o aumento da pressão osmótica altera o transporte de substratos, além de um aumento na permeabilidade da membrana que leva a uma maior secreção. Com relação a macromorfologia, o tamanho dos pellets tendeu a diminuir e se tornarem mais homogêneos com o aumento da osmolaridade, tal comportamento pode ser observado para as duas cepas estudadas sendo outra justificativa para melhor produtividade. Os autores verificaram que quanto maior a osmolaridade maior foi o tempo de germinação dos esporos, o que levou ao crescimento mais disperso.

O Quadro 1 mostra um resumo das abordagens mais relevantes mostradas para controlar a morfologia de fungos filamentosos em bioprocessos.

Quadro 1. Mecanismos utilizados para controle da morfologia.

Abordagem para mudança morfológica	Microrganismo	Comentários	Referências
Concentração esporo	<i>A. niger</i> <i>P. chrysogenum</i>	Morfologia depende do fungo. Para <i>A. niger</i> aumento esporos leva a morfologia dispersa.	(PAPAGIANNI e MATTEY, 2006); (TUCKER e THOMAS, 1992); (LIU; LIAO e CHEN, 2008); (NIELSEN et al., 1995)
pH	<i>A. niger</i>	pH menor leva a menor agregação dos esporos e morfologia dispersa ou com pellets menores.	(COLIN; BAIGORII e PERA, 2013) (GRIMM et al., 2005)
Oxigênio dissolvido	<i>A. niger</i> <i>A. awaori</i>	A deficiência de OD leva hifas mais compridas e menos densas. Uma maior taxa OD aumenta a ramificação e adesão das hifas.	(WONGWICHARN; MCNEIL; HARVEY, 1999) (CUI; VAN DER LANS; LUYBEN, 1998)
Stress Mecânico Agitação/Aeração	<i>A. niger</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>A. oryzae</i>	Agitação e aeração normalmente promovem o cisalhamento das formas morfológicas o que leva diminuição do tamanho e aumento da concentração.	(GRIMM et al., 2005); (JUSTEN et al., 1996); (AMANULLAH et al., 2002); (LIN; SCHOLZ e KRULL, 2010)
Ultrassom	<i>A. terreus</i>	Sonicação do meio provoca desintegração dos pellets, levando a uma morfologia dispersas	(HERRAN et al., 2008)
Micropartículas	<i>A. niger</i>	Uso de micropartículas leva a morfologia dispersa com pellets menores	(DRIOUCH; SOMMER e WITTMANN, 2010) (DRIOUCH et al., 2012)
Osmolaridade	<i>A. niger</i>	Aumento osmolaridade leva formação de pellets menores e mais homogêneos.	(WUCHERPFENNIG; HESTLER e KRULL, 2011)

### 2.3.4. Influência da morfologia celular na produção de celulases

Quando tratamos especificamente da produção de enzimas celulolíticas, são poucos os trabalhos da literatura que focam a morfologia como uma variável a ser manipulada. E muitas das vezes a morfologia é difícil de ser trabalhada separadamente. A seguir serão descritos os principais trabalhos encontrados na literatura que abordam de alguma forma a morfologia para produção de celulases.

Em estudo realizado por Ahamed e Vermette (2009), os autores analisaram quatro diferentes meios de cultura para a produção de celulases, verificando através de análises de imagens como os meios afetaram a morfologia do fungo *Trichoderma reesei*. Os experimentos visando a produção das enzimas celulolíticas foram realizados em batelada alimentada, em biorreator convencional de 7 L. A vazão de aeração utilizada foi de 5 L min<sup>-1</sup> e agitação de 250 rpm. Micélio disperso foi observado em todos os cultivos, não sendo encontrados pellets. Os melhores resultados foram obtidos em cultivos com extrato de levedura e celulose, onde obteve-se a maior biomassa fúngica (14,7 g.L<sup>-1</sup>) e atividade volumétrica em papel de filtro de 69,8 U.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Em tal meio a morfologia apresentou hifas mais alongadas, ramificadas e ativas, com maior área superficial do fungo, melhorando a interação com o substrato e conseqüentemente a produtividade da enzima. De forma geral o micélio apresentou as seguintes características: 98% da área total média projetada, hifas com 10 mm de comprimento e 7,9 µm de diâmetro médio, volume médio de 45,1 mm<sup>3</sup> e número de ramos entre 9 e 29 pontas por hifa. Os autores ainda realizaram regressões e identificaram que as características morfológicas que mais afetaram a produtividade das enzimas foram o micélio total e o número de pontas de hifas, sendo que na equação desenvolvida, a produtividade enzimática aumenta com o aumento do micélio total e do número de pontas.

Callow e Ju (2012) promoveram o crescimento de *T. reesei* em forma de pellet pela adição de surfactantes (“rhamnolipid” e Triton X-100). Os experimentos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de volume útil. Os autores conseguiram uma atividade máxima de celulase de 1,6 U/mL em papel de filtro, com o surfactante Triton X-100, que se mostrou melhor por não afetar o crescimento celular. Os autores também destacaram a vantagem do cultivo em forma de pellets, onde tem-se uma separação mais fácil da biomassa dos produtos de interesse (celulases). Em trabalho posterior, Callow et al. (2016) conseguiram uma produtividade de celulase de 7 U.g.<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, utilizando *T. reesei* na forma pelletizada, baixas condições de cisalhamento (reator *airlift* de 1,5 L) e limitação de nutriente (fósforo) para prolongar a fase estacionária do cultivo.

Ferreira et al. (2009) avaliaram como o uso de tampões influencia a produção de celulase em cultivo de *T. reesei*. O cultivo controle foi preparado em pH 4,8 e sem o uso de tampão, levando a uma morfologia dispersa. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyer, sendo suplementados com quatro diferentes tampões: citrato, formato, succinato e ftalato. *T. reesei* respondeu ao pH e ao uso dos tampões com diferentes morfologias e produtividades em celulasas. Sem o uso de tampão, a morfologia permaneceu dispersa e o pH chegou a 2,2. A suplementação com os diferentes tampões em concentração de 50 mM manteve o pH acima de 3 e favoreceu a agregação micelial. Supostamente, o tampão influenciou nas forças de coesão e/ou repulsão entre as células. Porém, quando as concentrações de tampões citrato e succinato foram aumentadas para 100 mM, houve uma diminuição da agregação micelial, passando da morfologia de pellets compactos para *clumps* com micélio livre. Os cultivos com tampão apresentaram maior produtividade que o realizado sem tampão. A maior atividade em papel de filtro (1,9 U/mL) foi obtida em cultura com suplementação de 100 mM de tampão succinato, onde prevaleceu o crescimento disperso.

Estudo de Yu et al. (2012), os autores verificaram as influências da hidrodinâmica na cinética da produção de celulasas por *T. reesei* em morfologia pelletizada. Os experimentos foram realizados em reator de 7,5 litros com 4 litros de meio de cultivo, com dois impelidores tipo turbina de Rushton e aeração de 0,5 vvm. O inóculo foi preparado com uma concentração de  $10^5$  esporos/mL. Os resultados mostraram que dentro da faixa de agitação estudada (100-400 rpm) o aumento da agitação levou ao um aumento no tamanho dos pellets e estes foram melhor formados. Os autores concluíram que a baixo de um valor crítico de cisalhamento, a agitação favorece a formação de pellet e essa pode ser uma forma de controle da morfologia do fungo. A máxima produção de celulasas (FPU) foi de 3,5 IU/mL obtida a 400 rpm.

Patel et al. (2009) analisaram o crescimento do fungo filamentosso *T. reesei* e a produção de celulasas em biorreator convencional com impelidores turbina de Rushton e de placa em movimento, com diferentes condições de agitação. O intuito do trabalho foi entender a relação entre o cisalhamento, morfologia, reologia e o desempenho do processo. O processo foi realizado em batelada alimentada (com a adição de lactose) e os reatores possuíam 22 litros, sendo 17 litros de volume de trabalho. A concentração do inóculo foi de  $5 \times 10^3$  esporos/mL, sendo que a morfologia predominante nos experimentos foi a dispersa. Os autores verificaram maior concentração de biomassa em agitações mais altas, 400 rpm para o tanque agitado e 160 rpm para o biorreator de placa, porém o cisalhamento nessas agitações também foi maior, o número de *clumps* decresceu mais rapidamente. As maiores atividades

enzimáticas em papel de filtro foram obtidas nas menores agitações, com um valor de aproximadamente  $5 \text{ U.mg}^{-1}$ .

Ahamed e Vermette (2010) verificaram o efeito da agitação mecânica na morfologia de *T. reesei* e na produção de celulasas. Foram utilizados biorreatores *airlift* de 35 L sem e com e agitação mecânica por impelidor axial a 400 rpm, operados em batelada alimentada. Em todas as culturas, a morfologia predominante foi a de micélio livremente disperso, sendo que a área total projetada de micélio foi ligeiramente menor nos cultivos com agitação mecânica. O comprimento das hifas no sistema com agitação foi menor e o número de ramificações e pontas de hifas foi maior no sistema sem agitação. O autor atribuiu tal fato a um ambiente com menos dano à estrutura celular no sistema sem agitação. Com relação à produção de enzimas, os resultados mostraram que o sistema sem agitação apresentou um desempenho superior com produtividade de  $200 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , atividade em papel de filtro de  $17 \text{ U.mL}^{-1}$  e atividade em CMC de  $11,8 \text{ U.mL}^{-1}$ .

Li et al. (2013) avaliaram o efeito do pH na morfologia de *T. reesei* e como estas variáveis afetavam a produção e a qualidade das celulasas. Os autores problematizaram o fato de cada grupo de enzimas (endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases) terem um pH ótimo diferente para produção, sendo necessário uma estratégia de controle de pH mais elaborada. As condições de agitação e aeração iniciaram-se em 300 rpm e  $3 \text{ L.min}^{-1}$ , respectivamente, porém foram controladas durante o cultivo para manter uma OD acima de 30%. Cultivos foram realizados em pHs de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0. Os autores verificaram maior produção de exoglucanase no período entre 20-40 h e pH igual a 5. Maior produção de endoglucanase entre 40-60 h e pH igual a 4,5, enquanto que a maior produção de  $\beta$ -glicosidade foi entre 60-90 h e em pH igual a 5,5. Porém, quando verificada a eficiência total das enzimas em papel de filtro não se viu destaque em nenhum pH específico. Os cultivos apresentaram morfologia dispersa, sendo que em pH=5 teve-se um valor ótimo para ramificação do micélio e produção de celulase na fase final do processo. Em pH=4 o micélio se apresentou menos ramificado e em pH=6 a autólise do micélio foi mais rápida e influenciou a síntese de proteína. O resultado em papel de filtro utilizando batelada alimentada e um controle de pH que variava com o tempo foi de  $16,32 \text{ U.mL}^{-1}$ .

Domingues et al. (2000) examinaram a morfologia de *T. reesei* e a produção de celulase em diferentes concentrações de inóculo e meios de cultura. O inóculo foi preparado em concentrações de  $10^2$ - $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 250 mL sem controle de pH (pH inicial 4,8). Os resultados das análises morfológicas

mostraram que utilizando uma concentração de inóculo de  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> o crescimento foi filamentosos em todos os meios testados. Na concentração de inóculo de  $10^2$  esporos.mL<sup>-1</sup> os meios que não continham tween 80 apresentaram crescimento em forma de pellet, enquanto os meios que continham tween 80 e eram suplementados apresentaram crescimento disperso. A atividade enzimática foi maior na maior concentração de esporos, que induziu o crescimento disperso. Por outro lado, comparando o crescimento disperso em concentração de inóculo de  $10^4$  com o crescimento disperso em meio de cultura suplementado e concentração de esporos de  $10^2$ , a produção foi maior quando utilizada uma menor concentração de esporos, pois preveniu um alto crescimento inicial e um esgotamento dos nutrientes logo no início do cultivo.

Peciulyte et al. (2014) procuraram compreender como as propriedades físicas e estruturais de substratos ricos em celulose influenciavam a produção de celulase e a morfologia do fungo *T. reesei*. Os autores testaram cinco diferentes substratos: celulose comercial (Avicel); três substratos industriais contendo celulose, resquícios de hemicelulose e lignina de pré-tratamento e celulose nanocristalina (obtidas dos substratos industriais). Com relação a morfologia, em cultivos com Avicel e celulose nanocristalina, a morfologia do fungo foi similar, com hifas homogêneas, finas, sem diferença entre os septos e crescimento na forma dispersa. Em contraste, nos cultivos com polpas industriais as hifas se mostraram bastante espessas, com septos formados acidentalmente ao longo das hifas. Além disso, houve mudanças na morfologia ao longo do cultivo. No início, em maior presença das fibras, foi observado pellets que consistiam em hifas e fibras da polpa. Conforme as fibras foram sendo hidrolisadas, a morfologia foi ficando dispersa e as hifas mais homogêneas. Os melhores resultados em produção foram observados em cultivo utilizando Avicel como substrato, com concentração de proteínas de até 2 g.L<sup>-1</sup>, atividade máxima em papel de filtro de 3,5 U.mL<sup>-1</sup> e atividade máxima de endoglucanase de 21,7 U.mL<sup>-1</sup>. Os autores atribuíram a baixa produção nas polpas industriais à alta viscosidade do caldo no início do cultivo o que dificultou a transferência de oxigênio e levou a morfologia irregular do fungo.

Novy et al. (2016) analisaram a morfologia e a produção de enzimas celulolíticas de duas cepas de *T. reesei* ( $\Delta cre$  e QM9414) em diferentes substratos, maneiras de inoculação e velocidade de agitação. Com relação a macromorfologia, os autores observaram diferenças entre as duas cepas de *T. reesei* em meio com lactose. Enquanto a linhagem  $\Delta cre$  apresentou pellets menores e mais compactos, a linhagem QM9414 apresentou pellets maiores e mais soltos. Em meio com palha de trigo, a morfologia observada foi a dispersa para ambas as

cepas. Quanto à micromorfologia, comparando primeiramente as duas cepas de *T. reesei*, os autores constataram que a  $\Delta$ crel formou células mais curtas, mais largas e mais ramificadas que a QM9414 em meio de palha, sendo os resultados de produtividade em papel de filtro sempre maior com  $\Delta$ crel, apesar da quantidade de  $\beta$ -glicosidase e concentração de proteínas da QM9414 ser praticamente a mesma ou um pouco superior. Com relação ao meio indutor, responsável por induzir a produção das enzimas, a palha de trigo apresentou melhores resultados de produtividade, associado a células menores e mais largas em ambos microrganismos. O tipo de inoculação utilizada também teve influência na micromorfologia. Apesar do inóculo com o ágar apresentar maior formação de biomassa, as hifas se apresentaram mais alongadas e menos ramificadas. No inóculo a partir da solução de esporos, as células se apresentaram mais ramificadas o que resultou em maiores produções. De forma geral, os autores notaram que hifas de menores comprimento e mais largas apresentaram maior produção de celulase.

Mais recentemente, Dong et al. (2018) usaram a técnica de micropartículas apresentadas por Driouch et al. (2010), e com óxido de alumínio alteraram a morfologia do fungo *Trichoderma viride*, reduzindo o diâmetro do tamanho de pellets em três vezes, tal fato resultou em um aumento de 17% na produção de celulase medida em papel de filtro (607,4 U.mL<sup>-1</sup>) e 13% de aumento em relação a atividade medida de endoglucanase (917,6 U.mL<sup>-1</sup>). Além disso, os autores propuseram um modelo de decaimento exponencial modificado, que poderia prever o tamanho do pellet controlando a concentração de óxido de alumínio.

Um resumo dos estudos apresentados acima, que relacionam a morfologia do microrganismo filamentosos com a produção de enzimas celulolíticas é mostrado no Quadro 2, onde são informados o microrganismo utilizado, as morfologias obtidas e a produção de enzima alcançada.



Quadro 2. Resumo dos trabalhos analisados, que mostram a morfologia do fungo filamentoso e a produção de celulase.

<b>Microrganismo</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Observações</b>	<b>Produção</b>	<b>Referência</b>
<i>T. reesei</i>	Dispersa	Avaliação inóculo e meio: frasco de 250 mL	2,2 U.mL <sup>-1</sup> (FPU)	(DOMINGUES et al., 2000)
<i>T. reesei</i>	Dispersa/ Pellet	Uso de tampão: frasco de 250 mL	1,9 U.mL <sup>-1</sup> (FPU)	(FERREIRA et al., 2009)
<i>T. reesei</i>	Dispersa	Diferentes meios: batelada alimentada/convenção- nal: 7 L	69,8 U.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> (FPU)	(AHAMED e VERMETTE, 2009)
<i>T. reesei</i>	Dispersa	Diferentes reatores: convencional e placa	5,0 U.mg <sup>-1</sup> (FPU)	(PATEL et al., 2009)
<i>T. reesei</i>	Dispersa	Efeito agitação: <i>Airlift</i> com/sem agitador	200,0 U.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> (FPU) 17,0 U.mL <sup>-1</sup> (FPU) 11,8 U.mL <sup>-1</sup> (CMC)	(AHAMED e VERMETTE, 2010)
<i>T. reesei</i>	Pellet	Promoção pellet: Erlenmeyer	1,6 U.mL <sup>-1</sup> (FPU)	(CALLOW e JU, 2012)
<i>T. reesei</i>	Pellet	Hidrodinâmica e cinética: biorreator convencional	3,5 U.mL <sup>-1</sup> (FPU)	(YU et al., 2012)
<i>T. reesei</i>	Dispersa	Efeito pH: biorreator convencional	13,0 U.mL <sup>-1</sup> (FPU)	(LI et al., 2013)
<i>T. reesei</i>	Dispersa	Diferentes substratos: biorreator convencional	3,5 FPU. mL <sup>-1</sup> (FPU) 21,7 IU. mL <sup>-1</sup> (CMC)	(PECIULYTE et al., 2014)
<i>T. reesei</i>	Pellet	Controle Nutriente (limitação N): biorreatores convencional e <i>airlift</i>	9 U.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> (FPU) 27,3 U.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> (FPU)	(CALLOW et al., 2016)
<i>T. reesei</i>	Dispersa	Palha trigo indutor: Erlenmeyer	2,4 U.mL <sup>-1</sup> (FPU)	(NOVY et al., 2016)
<i>T. viride</i>	Pellet	Uso micropartículas: Erlenmeyer	917,6 U.mL <sup>-1</sup> (CMC) 607,4 U.mL <sup>-1</sup> (FPU)	(DONG et al., 2018)

De forma geral, pode-se observar que a literatura não apresenta um consenso de qual a morfologia mais vantajosa para a produção de celulases. Observa-se boa produção tanto com morfologia pelletizada, como com a dispersa. Além disso, alguns trabalhos comparam apenas um tipo de macro morfologia, destacando vantagens em algumas características micro

morfológicas. Outros trabalhos mostraram influências de outros fatores, como o meio indutor, pH e não apenas da morfologia isoladamente o que dificulta para se chegar a uma conclusão. De qualquer forma, isolar o fator morfologia e abordar qual a melhor para produção de celulases não é uma tarefa fácil de ser realizada.

Além disso, a maioria dos trabalhos avalia apenas a atividade global de celulases utilizando papel de filtro, não fazendo uma triagem (*screening*) da produção enzimática. Outro fato que pode ser observado é que a maioria dos trabalhos reportados na literatura relacionados com a produção de celulases que analisam a morfologia celular são trabalhos realizados com o fungo filamentosso *T. reesei*, sendo raros ou inexistentes os trabalhos que fazem uma abordagem da influência da morfologia do fungo *A. niger* para produção de celulases.

### **2.3.5. Análise da morfologia fúngica**

A caracterização da morfologia fúngica pode ser realizada em níveis microscópicos ou macroscópicos. O nível microscópico trata-se da obtenção de informações relacionadas aos esporos, tais como informações sobre sua superfície através de medidas do potencial de zeta ou sobre suas propriedades (imagem de tempo de vida fluorescência ou microscópio de força atômica) (KRULL et al., 2013). Com relação ao nível macroscópico, relacionado mais ao microrganismo já crescido, utiliza-se diversas técnicas tais como medidas de reologia, medidas de refletância, difração a laser, etc. com destaque maior para análise de imagens digitais (KRULL et al., 2013). Tais imagens podem ser obtidas por diversos equipamentos, desde simples microscópicos óticos a avançados microscópios confocais ou de fluorescência.

A análise de imagens é uma maneira mais clara e direta de se verificar a morfologia ou o que está ocorrendo com o microrganismo, seu crescimento ou cisalhamento ao longo do cultivo (BARRY e WILLIAMS, 2011). As técnicas tanto de captura de imagem como de tratamento de imagem vem se tornando mais qualificadas e eficazes com o passar dos anos.

Um dos primeiros trabalhos a desenvolver e utilizar a técnica de tratamento de imagens para quantificar a morfologia de microrganismo, no caso o fungo filamentosso *Penicillium chrysogenum*, foi o proposto por Metz, Debruijn e Vansuijdam (1981). Os autores utilizaram pela primeira vez um método semiautomático, em que fotografias eram projetadas em uma mesa digital. Além disso, vários parâmetros morfológicos foram definidos, sendo que a maioria dos parâmetros utilizados pelos autores ainda é utilizado atualmente para classificação morfológica e podem ser encontrados no Quadro 3. Posteriormente, Thomas (1992) também

abordou a importância da análise de imagem para classificar a morfologia fúngica e definiu alguns outros parâmetros (Quadro 3).

Quadro 3. Principais parâmetros de análise morfológica

Unidades Morfológicas	Parâmetro	Símbolo
<b>Pellets</b>	Área micelial total projetada	$A_p$
	Área core	$A_c$
	Perímetro	$P$
	Diâmetro equivalente	$D_{eq} = 2\sqrt{A/\pi}$
<b>Clumps</b>	Área micelial total	$A$
	Compacidade	$C$
	Esfericidade	$e$
<b>Hifas</b>	Área micelial	$A$
	Comprimento da hifa principal	$L_h$
	Comprimento da ramificação	$L_{rh}$
	Diâmetro da hifa	$d_h$
	Comprimento total	$L = L_h + L_{hr}$
	Número ramificações	$N_h$
	Número de pontas	$N_p$
	Número de crescimento da hifa	$L_{hgu} = L/N_p$

A aplicação de análise de imagens no estudo de microrganismos filamentosos era, até recentemente, limitada pelo *hardware* disponível. A análise de imagens apresenta vantagens claras em termos de velocidade, precisão, menor intensidade de trabalho e avaliação quantitativa. Os sistemas de imagem também têm o potencial de serem automatizados, reduzindo cada vez mais a carga de trabalho. Um sistema de imagem típico utilizado na quantificação da morfologia de fungos pode consistir em um microscópio de campo claro padrão no qual uma câmera digital é montada. Depois que a imagem é obtida é necessário um

software de análise de imagem para extrair os dados relevantes. Existem pacotes de análise de imagem disponíveis comercialmente como Optimas (Meyer Instruments, Houston, TX, EUA), MetaMorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) e Volocity (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA), mas muitos são caros e não são específicos para uma determinada aplicação. Como alternativa, aplicativos de código aberto como ImageJ ([rsbweb.nih.gov/ij/](http://rsbweb.nih.gov/ij/)), Fiji ([pacific.mpi-cbg.de](http://pacific.mpi-cbg.de)) e OpenCV ([opencv.willowgarage.com](http://opencv.willowgarage.com)) podem ser utilizados, com a vantagem da opção de adaptações, por meio de plug-ins e algoritmos, permitindo ao usuário maior funcionalidade do aplicativo às suas necessidades (BARRY e WILLIAMS, 2011). Tais programas já contam atualmente com alguns pacotes que medem as principais características morfológicas dos microrganismos, como por exemplo, a esfericidade e a compacidade, além de claro, área e perímetro.

Uma das dificuldades encontradas nas análises de imagens é a presença de tanto fase microscópica quanto fase macroscópica, sendo necessário em alguns casos a utilização de mais de uma ferramenta de captura. Na análise de agregados macroscópicos, como pellets, é frequentemente necessário uma combinação entre a avaliação microscópica das hifas na periferia do pellet, por meio de microscópio, e o exame macroscópico da ultra-estrutura do pellet, por meio de “macrovisor” acoplado a uma câmera (COX e THOMAS, 1992).

O procedimento de análise de imagem aplicado a fungos filamentosos pode ser dividido em três etapas: criação de uma imagem nítida em todos os pixels, detecção e segmentação de fungos e análise morfológica (HARDY et al., 2017).

Barry, Chan e Williams (2009) desenvolveram *plugins* totalmente automáticos e de domínio público para o *software* de processamento de imagem ImageJ baseado em Java e utilizando os três princípios citados anteriormente. O pré-processamento da imagem começa com a filtragem da imagem para compensar a iluminação irregular de baixa frequência, pois isso pode complicar o processo de segmentação. A imagem é dividida em três outras em escala de cinza de 8 bits, representando os três componentes de cores primárias (vermelho, verde e azul). O componente vermelho exibe o maior contraste para imagens de amostras tratadas com azul de algodão lacto-fenol e é retido para processamento de imagem; os componentes verde e azul são descartados. Um limite de nível de cinza, calculado pelo ImageJ usando o algoritmo iso-data é aplicado, resultando em uma imagem binária. Com a imagem binarizada, pode-se utilizar a ferramenta "Analisador de Partículas" do ImageJ, onde todos os objetos são identificados, com a área projetada e a circularidade das medidas segundo valores de limite estimados pelo usuário, o que auxilia com que os objetos que não atendem a esses critérios

sejam excluídos da análise.

Em trabalho recentemente publicado por Hardy et al., (2017), um método avançado de análise de imagem automatizada foi utilizado para verificar a relação entre a mudança na reologia e a morfologia do fungo (*T. reesei*). Além disso, a morfologia foi analisada em duas diferentes condições de cisalhamento. O método utiliza um novo algoritmo chamado FACE, que permite imagens nítidas em várias posições, criando posteriormente uma imagem 3D dos objetos através da união de várias imagens 2D. Foram utilizados nove critérios de análise morfológica, que puderam ser relacionados com cisalhamento e a viscosidade do meio. O artigo destaca que duas grandes barreiras da análise de imagem são obter uma aquisição da micro morfologia e da macro morfologia conjuntamente e caracterizar objetos de 3D em 2D.

Mais recentemente, Cairns et al. (2019) desenvolveram um *plugin* em Java para o *software* livre ImageJ. O programa de análise de imagem desenvolvido possui a função de quantificar tanto a morfologia pelletizada, como a morfologia dispersa bem como as duas em conjunto, para qualquer cultura de fungos submersa baseada na escala inserida no programa. As principais vantagens destacadas pelos autores da ferramenta desenvolvida é que ela permite a captura e análise de várias centenas de imagens por usuário/dia, permite avaliar quantitativamente culturas heterogêneas que consistem em formas dispersas e pellets e gera automaticamente os principais parâmetros morfológicos, incluindo diâmetro das partículas, proporção de fases, área e solidez. Além disso, apesar da ferramenta ter sido desenvolvida utilizando dados morfológicos do fungo *A. niger*, ela é facilmente adaptável às ampliações e definições especificadas pelo usuário para outros microrganismos.

Como pode ser percebido, as técnicas de análise de imagens têm evoluído, mas ainda são dependentes de uma boa qualidade da imagem obtida. Existem diversos outros equipamentos que podem realizar medidas específicas, como por exemplo microscópios confocais, que fornecem uma caracterização superior da superfície e, portanto, uma análise de imagem mais completa. Com tais microscópios é possível também fazer uma varredura completa da lâmina automaticamente (BARRY e WILLIAMS, 2011). Já microscópios de fluorescência permitem a medida de hifas ativas e não ativas do microrganismo através do uso de um marcador, normalmente coloração branca de clorofluor (AMANULLAH et al., 2002). Outras técnicas de medidas específicas de morfologia fúngica podem ser encontradas em KRULL et al. (2013).

## **2.4. Biorreatores: definição, principais modelos e parâmetros de desempenho**

Os reatores são equipamentos responsáveis pelas transformações químicas nos processos químicos. Em bioprocessos, os reatores são denominados de biorreatores ou fermentadores e neles ocorrem reações bioquímicas catalisadas por enzimas, microrganismos, células animais ou vegetais. Devido ao fato de serem aplicados em bioprocessos, os biorreatores devem possuir um adequado monitoramento e controle de temperatura, pH, concentração de nutrientes e de oxigênio, no caso de cultivo envolvendo microrganismos aeróbios. Além disso, a maioria dos cultivos devem ser realizados em ambiente esterilizado, evitando contaminações e produção de produtos indesejáveis. Outros parâmetros que devem ser levados em conta na escolha ou no projeto do biorreator são o consumo de energia, que está relacionado com capacidade do equipamento em promover uma boa mistura, a transferência de oxigênio da fase gasosa ao meio líquido e o cisalhamento, que pode causar danos às células ou enzimas presentes.

Cada vez mais modelos de biorreatores vêm sendo desenvolvidos de forma específica aos mais diferentes tipos de bioprocessos. Apesar da diversidade de modelos, os principais exemplos de biorreatores são o convencional tipo tanque agitado mecanicamente e aerado e os biorreatores pneumáticos, sendo os convencionais mais amplamente empregados em todas as escalas de produção.

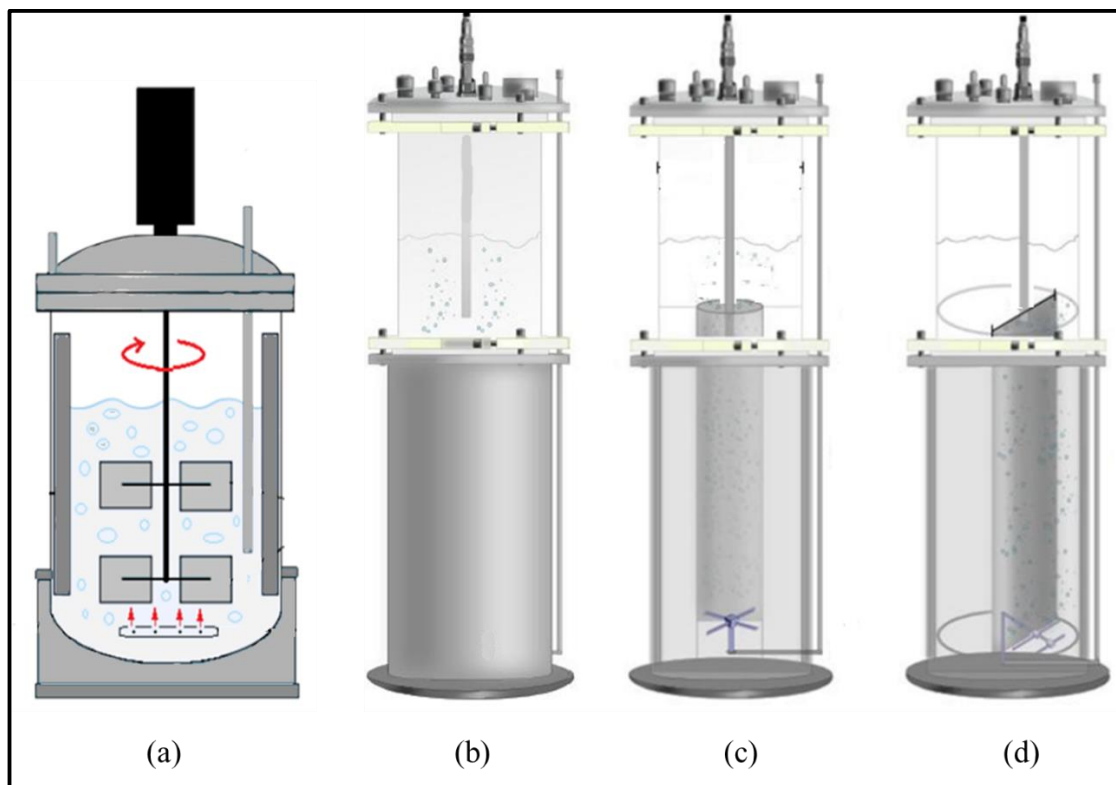
O biorreator convencional consiste de um tanque cilíndrico com relações geométricas (altura/diâmetro, diâmetro impelidor/diâmetro reator) definidas e sistema que promove a agitação e mistura por meio de um motor ligado a um eixo central provido de impelidores. A aeração, quando necessária, é realizada por um aspersor localizado na base do equipamento. Os principais parâmetros que podem ser alterados nesses biorreatores, de acordo com cada bioprocessos específico, são a velocidade de agitação, a vazão de alimentação de gás injetada, a geometria, posição e tipo dos impelidores, bem como a configuração interna do biorreator, como por exemplo o uso de chicanas (SCHMIDELL et al., 2001).

Por outro lado, os biorreatores pneumáticos têm mostrado um grande potencial e têm sido cada vez mais aplicados em processos biotecnológicos. Suas principais vantagens são o fato de não utilizarem partes móveis em sua construção, o que acaba por simplificar a construção. Nesses biorreatores a circulação de líquido, mistura do meio reacional e transferência de oxigênio são realizados exclusivamente pela injeção de ar, aliada às

geometrias próprias desses equipamentos (CHISTI, 1989; CERRI, 2009). Estes biorreatores são divididos em duas classes principais, a primeira composta pelo modelo coluna de bolhas e a segunda pelos diferentes modelos de biorreator de circulação (*airlifts*). A principal diferença entre esses modelos refere-se ao padrão de escoamento do meio reacional no interior do reator. O modelo coluna de bolhas exhibe escoamento aleatório da fase líquida devido ao escoamento ascendente de gás sem a presença de nenhum artefato. Já em biorreatores *airlift* tem-se um escoamento cíclico resultado de sua conformação geométrica, definida por canais na região interna do biorreator. Devido ao tipo de escoamento, os biorreatores *airlifts* dividem-se em quatro diferentes regiões internas: região de subida (*riser*), descida (*downcomer*), base (*bottom*) e região de mistura (*top*) (ESPERANÇA, 2018). Os principais parâmetros que podem ser alterados nesses biorreatores para otimizar o bioprocessos são a vazão de gás, a geometria interna do biorreator e a geometria e tamanho dos orifícios do aspersor (ESPERANÇA, 2018).

A Figura 2.6 ilustra os tipos mais comuns de biorreatores utilizados em cultivos submersos.

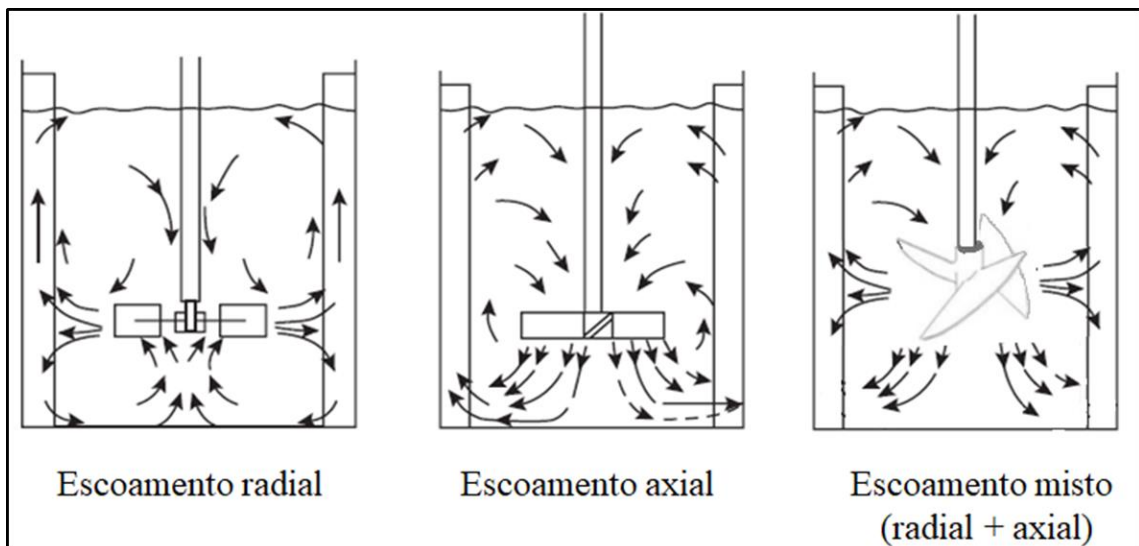
Figura 2.6. Modelos de biorreatores utilizados em cultivos submersos: (a) convencional tipo tanque agitado e aerado, (b) coluna de bolhas, (c) *airlift* de cilindros concêntricos e (d) *airlift* tipo *split*.



Fonte: Adaptado (BUSTAMANTE, 2013) e (MENDES, 2016)

Com relação aos biorreatores convencionais, sua geometria já foi vastamente estudada, tendo atualmente um maior número de pesquisas centrado nos impelidores na tentativa de melhorar o desempenho desses biorreatores (BUFFO et al., 2016; CORREA; BADINO e CRUZ, 2016). Os impelidores podem impor um escoamento predominantemente radial, como por exemplo a tradicional turbina de Rushton, um escoamento axial ou um escoamento misto (radial+axial) como são os impelidores tipo orelha de elefante. Figura 2.7 ilustra os diferentes padrões de escoamento de cada tipo de impelidor.

Figura 2.7. Principais tipos de escoamento em biorreatores convencionais: radial, axial e misto.



Fonte: Acervo próprio

O impelidor tipo turbina de Rushton (RT) é o mais tradicionalmente utilizado em biorreatores convencionais. São do tipo turbina de 6 pás planas e assim denominado em homenagem a seu inventor, J. H. Rushton (RUSHTON, 1950). Tais impelidores determinam uma adequada transferência de oxigênio ao processo, porém apresentam algumas desvantagens como alto consumo de potência e alto cisalhamento em regiões próximas às pás do impelidor (BADINO; FACCIOTTI e SCHMIDELL, 2001).

Por outro lado, impelidores de escoamento axial ou misto (axial+radial) vêm sendo estudados, pois definem um escoamento eficaz no interior do reator e geram valores de taxa de cisalhamento menores em relação aos impelidores de escoamento radial (COLLIGNON et al., 2010). Mais recentemente, um tipo de impelidor conhecido como "orelha de elefante"

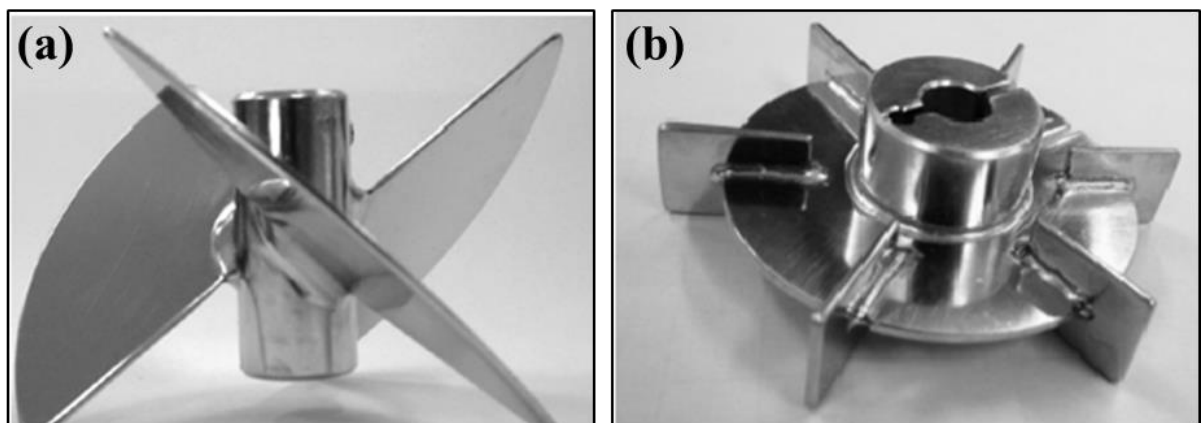


(*Elephant ear*, EE), devido ao formato e posicionamento de suas lâminas, vem sendo estudado e utilizado em bioprocessos. A grande vantagem apresentada pelos fabricantes é a vantajosa relação de baixo cisalhamento e adequada transferência de oxigênio proporcionada pelo impelidor (MIRRO e VOLL, 2009).

Os impelidores tipo EE apresentam 3 pás planas inclinadas em 45° e, devido ao escoamento misto (axial e radial), podem proporcionar um escoamento ascendente (EEUP: *up-pumping*) ou descendente (EEDP: *down-pumping*), dependendo da orientação do impelidor e do sentido de rotação do eixo, horário ou anti-horário. Bustamante, Cerri e Badino (2013) compararam os impelidores EEDP, EEUP separadamente com dois impelidores Rushton e encontraram resultados satisfatórios em termos de transferência de massa e menor cisalhamento nos impelidores EEUP. BUFFO et al. (2016) e (CORREA; BADINO e CRUZ (2016) trabalharam com associações dos impelidores, incluindo os dois impelidores orelha de elefante e o impelidor Rushton e constataram que a associação EEDP-EEUP apresentou bons resultados em termos de menor cisalhamento e tempo de mistura na hidrólise do bagaço de cana, respectivamente.

A Figura 2.8 ilustra os impelidores Rushton (a) e os impelidores orelha de elefante de fluxo ascendente ou descendente (b).

Figura 2.8. Impelidores Rushton e “Orelha de Elefante”



Fonte: Adaptado (BUSTAMANTE, 2013).

Alguns dos parâmetros que podem ser avaliados como de desempenho de biorreatores são o tempo de circulação, tempo de mistura, retenção gasosa, consumo de potência, coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) e taxa de cisalhamento.

Dentre esses, um dos parâmetros mais importantes em cultivos aeróbios é o  $k_{La}$ , que

fornece uma dimensão da capacidade do biorreator em transferir oxigênio, além de ser um importante parâmetro de aumento de escala. O oxigênio possui baixa solubilidade no meio líquido, o que faz com que sua transferência seja um fator crítico em bioprocessos. A transferência de oxigênio envolve etapas de transferência da fase gasosa para a fase líquida, difusão pelo líquido até a célula e consumo de oxigênio no interior da célula (SCHMIDELL, 2001).

O  $k_L a$  é definido como o produto de dois termos: o coeficiente convectivo de transferência de massa do filme líquido ( $k_L$ ) e a área interfacial de troca de massa ( $a$ ). O  $k_L$  é o coeficiente convectivo de transferência de massa da película líquida em torno da bolha, sendo que a transferência de oxigênio é melhorada quando essa película estagnada é diminuída. Tal película depende principalmente das condições operacionais do biorreator. Dessa maneira, quanto maior a vazão de ar ou a velocidade de agitação, maior será a velocidade do líquido no biorreator e menor a espessura desta película. Consequentemente, maior o valor de  $k_L$  e melhor a transferência de massa. Já a área interfacial ( $a$ ) depende da dimensão da bolha e do tempo em que ela fica em contato com o líquido, e está relacionada com a retenção gasosa. Sendo assim, fatores tais como diminuição do diâmetro da bolha e aumento da retenção gasosa acarretam um maior valor da área interfacial ( $a$ ) e, conseqüentemente, uma maior transferência de oxigênio.

Muitas vezes os fenômenos ocorrem conjuntamente no interior do biorreator, sendo difícil quantificar separadamente as contribuições de individuais. Sendo assim, o  $k_L a$  pode ser medido de forma conjunta através do balanço de massa de oxigênio, dado pela Equação 2.1.

$$N_{O_2} = k_L a (C^* - C) \quad (2.1)$$

onde  $N_{O_2}$  é a velocidade de transferência de oxigênio,  $k_L a$  é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $s^{-1}$ );  $C^*$  é a concentração de saturação (ou solubilidade) de oxigênio no líquido ( $kg.m^{-3}$ ) e  $C$  é a concentração de oxigênio no seio do líquido ( $kg.m^{-3}$ ) (SCHMIDELL, 2001).

Com base na Equação 2.1, o  $k_L a$  pode ser determinado por métodos experimentais que tem como princípio variar a concentração de oxigênio dissolvido ( $C$ ) no meio em função do tempo. Tais métodos são denominados métodos dinâmicos, onde a variação da concentração de oxigênio ( $C$ ) é realizada por meio de um ensaio degrau (método dinâmico) utilizando o sistema  $N_2/O_2$  ou uma mudança na pressão do biorreator (GARCIA-OCHOA e GOMEZ,

2009).

Com base nas medidas de  $k_{LA}$ , vários trabalhos na literatura propuseram correlações para estimá-lo em diferentes geometrias de biorreatores tanque agitado ou *airlift*. Tais correlações permitem uma previsão mais rápida e escolha de condições adequadas para o bioprocessamento. Correlações para tanque agitado com diferentes impelidores ou associações de impelidores podem ser encontradas na literatura em Campesi et al. (2009), Bustamante, Cerri e Badino (2013) e Buffo et al. (2016). Para biorreatores tipo *airlift*, correlações podem ser encontradas em Cerri et al. (2008), Thomasi, Cerri e Badino (2010) e Mendes e Badino (2015).

Para se obter alta transferência de oxigênio muitas vezes é necessário operar os biorreatores em condições extremas, tais como altas agitação e/ou aeração. Porém, tais condições, se por um lado geram adequada transferência de oxigênio, podem dispendir alto consumo de potência ou mesmo trazer alto grau de cisalhamento ao microrganismo, prejudicando a produção e aumentando o custo do produto desejado. Sendo assim, algumas vezes é necessário um equilíbrio desses três parâmetros para definir as condições mais adequadas de operação do biorreator.

Portanto, o cisalhamento é outro parâmetro importante na avaliação de biorreatores e, talvez o mais difícil de ser determinado, sendo o mesmo fortemente influenciado pela hidrodinâmica do biorreator. Além disso, é necessário um conhecimento de como esse cisalhamento de fato interfere e afeta o crescimento e a morfologia celular e a síntese de produtos de interesse. Um alto grau de cisalhamento pode ser bastante danoso, provocando a ruptura e a morte celular. Por outro lado, como já discutido, um certo grau de cisalhamento pode ser desejado para provocar uma mudança morfológica e favorecer certa produção.

De forma simples, o efeito do cisalhamento é definido pela exposição das células a um gradiente de velocidade ou taxa de cisalhamento determinado pelo escoamento dentro do biorreator (ESPERANÇA, 2018). Porém, o escoamento em biorreatores é bastante complexo e muitas vezes os mesmos são operados em regime turbulento o que torna o escoamento ainda mais caótico. Sendo assim, não é simples definir um cisalhamento no biorreator, pois deve-se considerar os três componentes do vetor velocidade de líquido, nas três coordenadas espaciais existentes no sistema cartesiano, bem como as interações gás-líquido, interações entre a fase líquida e partes sólidas, como a parede do biorreator e os impelidores, no caso do biorreator tipo tanque agitado.

Na prática, o cisalhamento vem sendo estudado como um parâmetro médio dentro do biorreator ou um parâmetro máximo, que é definido nas regiões mais críticas do biorreator,

como próximo aos impelidores no tanque agitado e próximo ao aspersor em biorreatores pneumáticos. Sendo assim, diversas correlações na literatura correlacionam o cisalhamento com parâmetros de operação dos biorreatores, tais como velocidade de agitação, vazão de alimentação de gás e reologia do caldo de cultivo (METZNER e OTTO, 1957; CAMPESI et al., 2009; BUSTAMANTE; CERRI e BADINO, 2013; CERRI et al., 2008). O cisalhamento também pode ser estimado através de fluidodinâmica computacional (CFD) (ESPERANÇA et al., 2019; KELLY e GIGAS, 2003).

Outra forma de se avaliar o cisalhamento é através da escala de Kolmogorov (KOLMOGOROV, 1991), que leva em consideração além da velocidade do líquido no biorreator, o valor da taxa de dissipação de energia no mesmo. A escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) é definida como sendo o tamanho do menor micro-turbilhão no interior do biorreator e a fragmentação ou cisalhamento ocorre quando o tamanho desse micro turbilhão é menor que a dimensão característica do microrganismo (BUFFO et al., 2016). Em condições mais severas de agitação, normalmente, o tamanho dos micro turbilhões estão abaixo de 100  $\mu\text{m}$ , enquanto muitos microrganismos filamentosos possuem estruturas maiores (BUFFO et al., 2016).

O cisalhamento pode também ser observado ou quantificado através do efeito que esse gera na morfologia do microrganismo (JUSTEN et al., 1996). De forma geral, os parâmetros de desempenho do biorreator são importantes de serem estimados para se ter um melhor controle do processo e a definição das condições de operação, sendo que essas podem estar vinculadas à melhor produção de um metabólito de interesse. A seguir, apresentamos em detalhes alguns trabalhos na literatura que abordam cisalhamento em biorreatores, principalmente os que relacionam tal variável aos danos causados ao microrganismo.

DE Jesus, Neto e Maciel (2017) compararam os desempenhos, em termos de hidrodinâmica, transferência de massa e cisalhamento, de quatro diferentes modelos de biorreatores: coluna de bolhas, *airlift* convencional, *airlift* agitado e tanque agitado. Os resultados mostraram que a retenção gasosa (*hold-up*) e a transferência de massa (em termos de  $k_{LA}$ ) foram maiores no *airlift* agitado e no tanque agitado, porém esses reatores apresentaram as maiores taxas de cisalhamento, avaliada através de correlações da literatura. Com relação ao consumo de potência, avaliado experimentalmente para tanque agitado e calculado/estimado para os biorreatores *airlift*, os menores valores foram obtidos em coluna de bolhas e *airlift*. Os autores ainda recomendam o uso de biorreatores *airlift* para cultivos de microrganismos sensíveis ao cisalhamento e que exijam boa transferência de massa. Porém, no trabalho não foi realizado nenhum cultivo com microrganismos para verificar as hipóteses

levantadas.

Braga et al. (2015) investigaram o uso de biorreatores *airlift* ou tanque agitado na produção do aromatizante  $\gamma$ -decalactone por *Yarrowia lipolytica* W29, uma levedura que pode crescer em duas diferentes morfologias. Usualmente, o crescimento ocorre na forma oval, porém ela pode se desenvolver também em forma de hifa filamentosa. Foi observado que a morfologia dependeu fortemente das condições de cultivo (aeração, fontes de carbono e nitrogênio, pH, oxigênio dissolvido). A maior produtividade foi obtida em maiores taxas de transferência de oxigênio nos dois biorreatores, sendo a maior produtividade em tanque agitado. Porém, a concentração de  $\gamma$ -decalactone obtida em *airlift* foi duas vezes maior em comparação com a obtida em tanque agitado na menor condição de aeração estudada. Os autores observaram por meio de análise de imagens, avaliando robustez, compacidade e excentricidade, que em tanque agitado as células se mostraram mais irregulares e largas, atribuindo tal fato ao maior cisalhamento devido a agitação mecânica desse biorreator.

Cerri e Badino (2012) investigaram a produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*, uma bactéria filamentosa, em biorreatores tipo tanque agitado e *airlift* de cilindros concêntricos. Na mesma condição inicial de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ), os autores verificaram maior produção de ácido clavulânico no biorreator *airlift*, atribuindo esse resultado a uma maior taxa de cisalhamento gerada nesse equipamento, cujo valor foi obtido através de correlações da literatura. Além disso, os cultivos em biorreator *airlift* apresentaram menores valores índice de consistência (K), parâmetro relacionado com a viscosidade aparente do caldo, que também é um indício de maior fragmentação sofrida pelas células da bactéria.

Michelin et al. (2013) avaliaram a produção de xilanase por *A. niger* em biorreatores tipo tanque agitado e *airlift* de cilindros concêntricos em diferentes condições de transferência de oxigênio, quantificada através de medidas de  $k_{LA}$  em meio livre de células. Os maiores valores de atividade de xilanase (9000 U.L<sup>-1</sup>) foram obtidos em cultivo em tanque agitado que apresentou maiores valores de  $k_{LA}$  (30 h<sup>-1</sup>). Quando comparados na mesma condição de transferência de oxigênio (mesmo  $k_{LA}$  de 12 h<sup>-1</sup>), a produção de xilanase foi maior em biorreator *airlift* (7000 U.L<sup>-1</sup>) em comparação ao tanque agitado (4500 U.L<sup>-1</sup>). A explicação atribuída pelos autores foram as diferentes condições de cisalhamento impostas ao microrganismo. No entanto, nenhuma medida da condição de cisalhamento ou de fragmentação das células fúngicas foram realizadas neste estudo.

Oliver-Salvador et al. (2013) estudaram a produção de proteases por *Jacaratia mexicana*, uma planta endêmica mexicana. Os estudos foram realizados comparando três

diferentes biorreatores: coluna de bolhas, *airlift* e tanque agitado. Os autores também analisaram os reatores em relação ao cisalhamento e à micro escala de Kolmogorov, utilizando correlações da literatura para estimar esses parâmetros. Uma maior taxa de cisalhamento e mais intensiva micro-turbulência ocorreu em tanque agitado, produzindo maior acúmulo de proteínas e maior atividade proteolítica em comparação com os outros dois sistemas de biorreatores. Além disso, análises de imagens constataram que células menores e mais finas foram observadas em tanque agitado.

Tang et al. (2015) compararam os efeitos de três impelidores turbina de Rushton e 3 impelidores axiais em cultivos de *A. niger* para produção de amiloglucosidase. Os autores verificaram que o sistema com impelidores axiais gerou 40% mais pellets e uma quantidade maior de pellets ativos, que se mostravam mais soltos. Ao contrário, no sistema com os impelidores turbina de Rushton a estrutura dos pellets se mostrou mais compacta. Tal diferença na morfologia dos pellets e viabilidade dos mesmos fez com que os autores atribuíssem tal fato ao cisalhamento impostos pelos impelidores. Ao final constatou-se uma atividade enzimática 25% mais elevada no sistema com impelidores axiais, além de eficiência de transferência de massa 60% superior.

Como pode ser notado na revisão bibliográfica realizada, existem poucos estudos que abordam de maneira direta a influência do cisalhamento e da morfologia na produção de enzimas celulolíticas, principalmente analisando a produção das enzimas individualmente. Tentando sanar tal lacuna e contribuir para uma melhora da produção de tais enzimas um estudo mais detalhado do cisalhamento microrganismos é que os estudos da presente tese estão inseridos.

## CAPÍTULO 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Fluidos e meio de cultivo

Para simular o comportamento reológico de um caldo de cultivo, solução de goma xantana 1,5% m.v<sup>-1</sup> (XGS) foi usada como fluido nos experimentos de fragmentação. Tal fluido representa um meio inerte, com comportamento reológico não newtoniano caracterizado pela equação da lei da potência. Os parâmetros do índice de consistência ( $K=0,370 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ ) e do índice de comportamento de escoamento ( $n=0,34$ ) foram determinados a 32 ° C a partir de reogramas gerados usando um reômetro digital de cilindros concêntricos (LV-DVIII+, Brookfield Engineering Laboratories Inc.). Esses valores foram semelhantes aos observados em caldos de cultivo de microrganismos filamentosos. Para caldos de cultivo de *Aspergillus awamori*, Badino, Facciotti e Schmidell (1999) relataram valores de K variando de 0,001 a 2,5 Pa.s<sup>n</sup> e valores de n entre 0,3 e 0,5. Segundo os autores, um valor de  $K=0,37 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$  foi equivalente a uma concentração celular de cerca de 5 g.L<sup>-1</sup>. Allen e Robinson (1990) também observaram comportamento reológico não-newtoniano pseudoplástico de caldo de cultivo de *A. niger*, em que uma concentração celular de cerca de 8 g.L<sup>-1</sup> resultou em  $K=0,41 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$  e  $n=0,40$ .

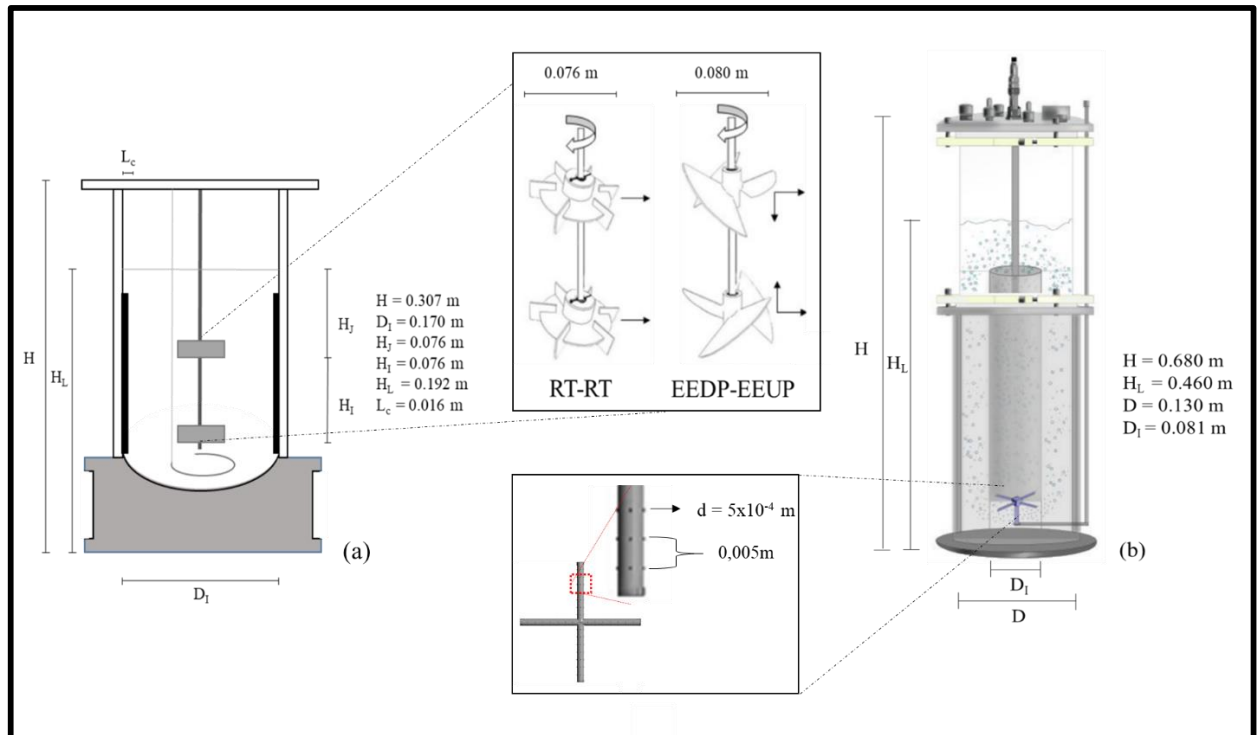
Nas etapas de crescimento do inóculo e de produção de enzimas, utilizou-se meio de cultura de MANDELS e STERNBERG (1976) com modificações de CUNHA et al. (2015), contendo os seguintes nutrientes (em g.L<sup>-1</sup>): glicose (10,0), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,4), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,0), CaCl<sub>2</sub> (0,3), MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O (0,2), Tween 80 (1,0) e solução salina (5 mg.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 1,6 mg.L<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O, 1,4 mg.L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> CoCl<sub>2</sub>) (1,0 mL.L<sup>-1</sup>). O meio foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos. Na etapa de produção da enzima foi utilizado o mesmo meio nutricional descrito anteriormente, com adição de lactose (14 g.L<sup>-1</sup>) como indutor e sem adição de Tween 80. A lactose é um indutor eficaz e industrialmente utilizado na produção de enzimas celulolíticas (NOVY et al., 2016; LI et al., 2017).

### 3.1.2. Biorreatores

Os estudos com biorreatores realizados na presente tese foram realizados utilizando biorreator tanque agitado e aerado (TAA) (New Brunswick Scientific, EUA), com um volume de trabalho de 4 L e um biorreator *airlift* de cilindros concêntricos (ACC) com 5 L de volume de trabalho. Nos ensaios em tanque agitado, duas associações de impelidores foram utilizadas, a primeira com dois impelidores orelha de elefante e a segunda com dois impelidores turbina Rushton. A Figura 3.1 mostra as dimensões dos biorreatores e as direções de escoamento impostas pelas configurações de impelidores. A Figura 3.2 ilustra os impelidores e as dimensões dos mesmos.

As duas turbinas Rushton (RT-RT) é a configuração convencional de impelidores, sendo amplamente utilizada, pois fornece transferência de oxigênio eficiente, embora o consumo de energia seja alto. A configuração com dois impelidores orelha de elefante (EEDP-EEUP), por outro lado, oferece um equilíbrio entre transferência de oxigênio e consumo de energia, além de uma menor taxa média de cisalhamento (BUFFO et al., 2016).

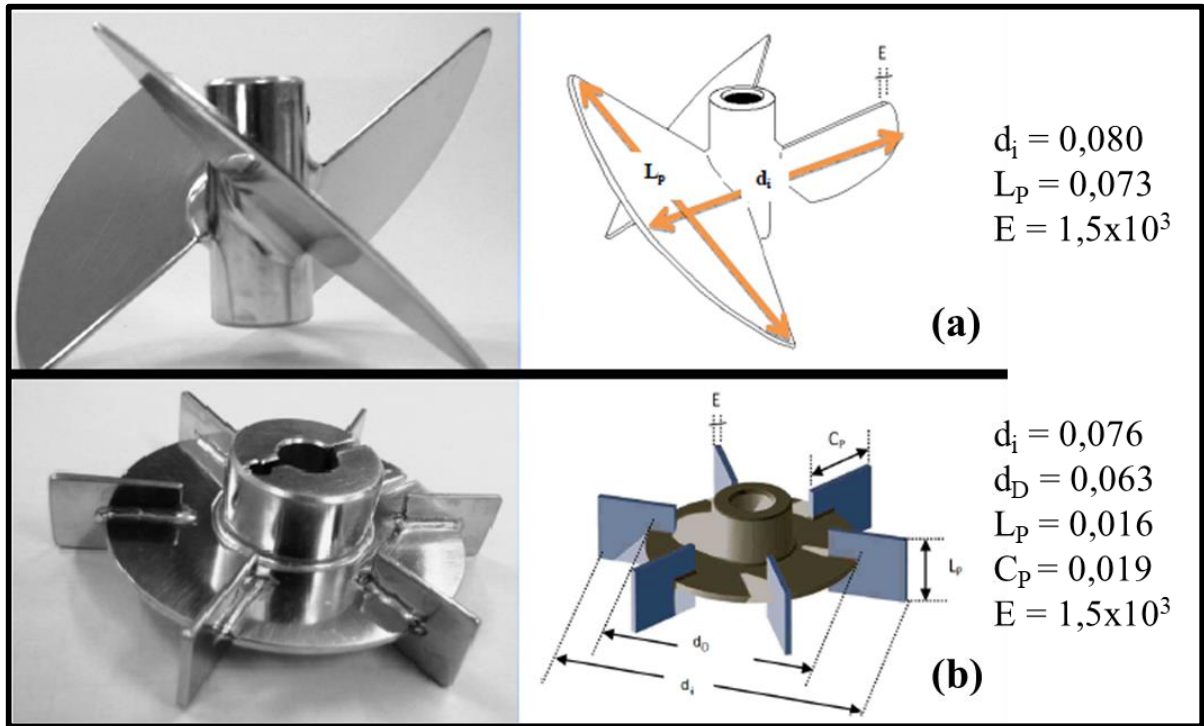
Figura 3.1. Geometria e dimensões dos biorreatores e impelidores utilizados. (a) biorreator tanque agitado e aerado de 4 L. (b) biorreator *airlift* de cilindros concêntricos de 5 L.



Fonte: Acervo próprio.



Figura 3.2. Esquema e dimensão dos impelidores. (a) Orelha de elefante (EE). (b) Turbina de Rushton (RT). Dimensões em metros (m).



Fonte: Adaptado (BUSTAMANTE, 2013) e (BUFFO, 2016).

### 3.1.3. Microrganismo

Foi utilizado o fungo filamentososo *Aspergillus niger* (*A. niger* 12) nos ensaios de fragmentação de pellets e de produção de enzimas. O fungo foi obtido da coleção de microrganismos da Embrapa Tecnologia de Alimentos (Rio de Janeiro, Brasil), possuindo Registro Nacional de Coleções Biológicas sob o número de BRM 028885.

### 3.1.4. Equipamentos para cultivo do microrganismo

Os principais equipamentos utilizados para manipular o microrganismo e realizar os ensaios propostos na tese são elencados como segue:

- Autoclave modelo 103 da FABBER-PRIMAR industrial operada a  $1,2 \text{ kgf/cm}^2$  e  $121^\circ\text{C}$  por 20 min para esterilizar vidrarias e o meio de cultivo.

- Mesa incubadora rotativa da marca Nova Ética com controle de temperatura e rotação para produção do inóculo.
- Câmara asséptica de fluxo laminar contendo lâmpada UV para a manipulação do microrganismo de forma asséptica.
- Ultrafreezer da marca FORMA SCIENTIFIC para o armazenamento e conservação do microrganismo.
- Equipamentos óticos para visualização e captura de imagens da morfologia do microrganismo: Microscópio ótico Olympus BX50 com câmera digital acoplada, estereoscópio (Biofocus XT-3H-BI) e Câmera Digital (Nikon D5200).

A Figura 3.3 ilustra os equipamentos óticos utilizados com suas faixas de área de observação.

Figura 3.3. Equipamentos utilizados para registrar a morfologia do fungo filamentososo *A. niger*, incluindo as faixas de área de observação.

$A > 1 \text{ mm}^2$	$0,05 \text{ mm}^2 < A < 8 \text{ mm}^2$	$A < 1 \text{ mm}^2$
		
Morfologias maiores: Câmera Fotográfica	Morfologias intermediárias: Estereoscópio (Lupa)	Morfologias menores: Microscópio

Fonte: Acervo Próprio.

## 3.2. Metodologia teórico-experimental

### 3.2.1. Etapas iniciais e resumo dos principais procedimentos do trabalho.

O estoque de trabalho utilizado no cultivo do inóculo foi na forma de criotubos. Na preparação dos criotubos, a linhagem estoque (armazenada a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) foi incubada em placas

de Petri com meio PDA (Potato Dextrose Ágar, 39 g.L<sup>-1</sup>) por 5 dias a 32 °C, por meio do qual foi possível o crescimento dos esporos. Esses foram então raspados com solução de glicerol 20% (v/v) e armazenados em criotubos de 5 mL, sendo esses mantidos a -18 °C. Considerou-se 90 dias como o tempo máximo para utilização dos criotubos, evitando assim desativação dos esporos. Testes verificando a eficácia do uso dos criotubos foram realizados e os resultados podem ser verificados no Anexo.

Os criotubos foram preparados e armazenados com concentração de esporos definida, sendo a concentração de esporos obtida por meio de câmara de Neubauer. A concentração de esporos (em esporos.mL<sup>-1</sup>) nos criotubos foi obtida através da Equação 3.1, onde  $N_e$  representa o número esporos, “d” é a diluição utilizada (v/v) e  $V_N$  o volume da câmara de Neubauer (mL).

$$C_{e_{Criotubos}} = \frac{N_e \cdot d}{V_N} \quad (3.1)$$

De posse da concentração de esporos nos criotubos é possível inocular um volume adequado de esporos ( $V_I$  em mL) para iniciar a fase de preparação do inóculo com a concentração de esporos desejada. Pela Equação 3.2 é possível calcular o volume da solução de esporos a ser inoculada no Erlenmeyer.

$$V_I = \frac{C_f \cdot V_f}{C_{e_{Criotubos}}} \quad (3.2)$$

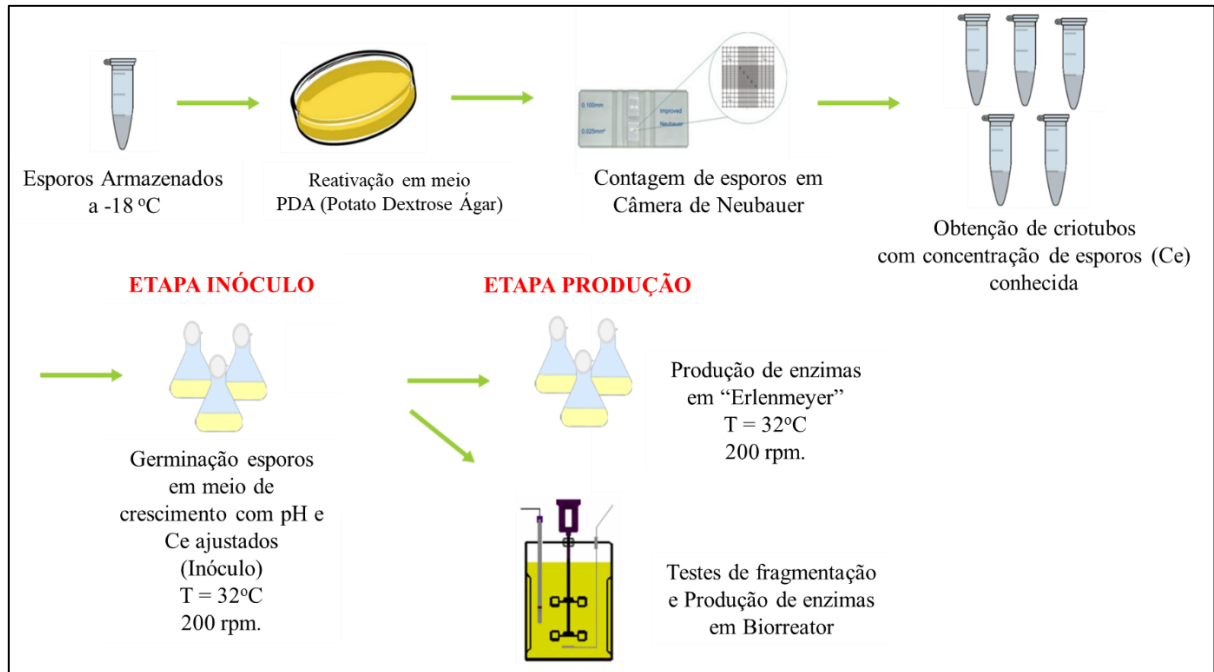
onde  $V_I$  é o volume de criotubo que deve ser inoculado (mL),  $C_f$  a concentração final de esporos desejada (esporos.mL<sup>-1</sup>) no Erlenmeyer e  $V_f$  o volume final de solução no Erlenmeyer (mL).

A etapa de inóculo foi realizada em Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL meio de cultivo. A incubação foi realizada em incubadora orbital agitada a 32 °C e 200 rpm (Cunha et al. 2015).

Nas etapas de fragmentação dos pellets e de produção de enzimas foram transferidos 10% (v/v) de inóculo para os respectivos recipientes (biorreatores ou frascos erlenmeyers). Na produção em frascos agitados foram utilizados Erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de volume útil, as características dos biorreatores foram apresentadas no item 3.1.2.

A Figura 3.4 ilustra o procedimento experimental adotado nos ensaios com o fungo *A. niger*.

Figura 3.4. Esquema das principais etapas realizadas nos ensaios com o fungo *A. niger*.



Fonte: Acervo Próprio.

### 3.2.2. Ensaios de fragmentação de pellets

A preparação do inóculo para os ensaios de fragmentação dos pellets foi realizada utilizando mesmo procedimento de Cunha et al. 2015, em incubadora orbital agitada a 32 °C e 200 rpm por 48 h. O pH foi ajustado em 4,5 e a concentração fixada em  $10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup> no Erlenmeyer. Tal condição resultou majoritariamente em pellets com diâmetros de aproximadamente 0,8 mm.

Os ensaios de fragmentação foram iniciados adicionando 10% (v/v) do inóculo de pellets de *A. niger* ao biorreator contendo 90% (v/v) de solução de goma xantana. Os ensaios foram realizados em diferentes velocidades de agitação (N) e vazões específicas de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ) por 4 h, evitando crescimento celular ou desintegração total das células. Amostras foram removidas periodicamente para análise. Os efeitos de N e  $\phi_{ar}$  na fragmentação dos pellets foram analisados para as duas associações de impelidores (RT-RT e EEDP-EEUP)

e para duas condições de aeração no biorreator *airlift*. As condições operacionais empregadas são resumidas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Condições de operação utilizadas nos ensaios para avaliação da fragmentação hidrodinâmica dos pellets

Ensaio	Biorreator	Associação de Impelidores	Agitação (N)	Aeração ( $\phi_{ar}$ )
			(rpm)	(vvm) <sup>a</sup>
A1	TAA <sub>1</sub>	RT-RT	400	0,40
A2	TAA <sub>2</sub>	RT-RT	600	0,40
A3	TAA <sub>3</sub>	RT-RT	600	1,20
A4	TAA <sub>4</sub>	RT-RT	800	0,40
A5	TAA <sub>5</sub>	RT-RT	1000	0,40
A6	TAA <sub>6</sub>	EEDP-EEUP	400	0,40
A7	TAA <sub>7</sub>	EEDP-EEUP	600	0,40
A8	TAA <sub>8</sub>	EEDP-EEUP	600	1,20
A9	TAA <sub>9</sub>	EEDP-EEUP	800	0,40
A10	TAA <sub>10</sub>	EEDP-EEUP	1000	0,40
A11	ACC <sub>1</sub>	-	-	2,0
A12	ACC <sub>2</sub>	-	-	5,0

<sup>a</sup>Volume de ar por volume de meio por minuto.

### 3.2.3. Cinética da fragmentação de pellets

O diâmetro equivalente ( $D_{eq}$ ) dos pellets ou diâmetro correspondente a de uma área circular foi calculado pela Equação 3.3 (PAPAGIANNI, 2014). Para cada ponto experimental, duas amostras foram analisadas, cada uma com mais de 100 objetos (pellets). O diâmetro equivalente ( $D_{eq}$ ) foi calculado para cada objeto e o valor médio de cada amostra foi usado como resposta. O parâmetro estatístico foi o desvio padrão das amostras.

$$D_{eq} = 2\sqrt{A_p/\pi} \quad (3.3)$$

onde A é a área projetada dos pellets, onde a obtenção da medida será detalhada no tópico seguinte.

Um perfil temporal do diâmetro equivalente do pellet ( $D_{eq}$ ) foi obtido para cada condição da Tabela 3.1. Um modelo cinético empírico (Equação 3.4) foi ajustado aos dados experimentais para facilitar a observação e comparação das características de fragmentação para cada condição.

$$\frac{D_{eq}}{D_{eq0}} = 1 - k_1 \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t}) \quad (3.4)$$

Onde  $D_{eq}$  é o diâmetro equivalente do pellet (mm),  $D_{eq0}$  é o diâmetro equivalente inicial do pellet (mm),  $k_1$  é um parâmetro empírico (-),  $k_2$  é um parâmetro empírico ( $s^{-1}$ ) e  $t$  é o tempo de ensaio (s). Embora a Equação 3.4 seja um modelo empírico, os parâmetros têm significados físicos, onde  $k_1$  representa a porcentagem que o diâmetro equivalente do pellet diminuiu em relação ao seu valor inicial, e  $k_2$  representa a taxa ou velocidade com a qual  $D_{eq}$  diminuiu. Portanto, quanto maiores os valores de  $k_1$  e  $k_2$ , maior e mais rápido o nível de dano observado aos pellets.

### 3.2.4. Análise quantitativa da morfologia fúngica

As imagens foram obtidas com os equipamentos apresentados na Figura 3.3, de acordo com o tamanho e fase de crescimento da morfologia obtida. A resolução das imagens e o aumento microscópico foram definidos de acordo com o tamanho morfológico, sendo usado normalmente aumento de 7,5x com o estereoscópio e aumento de 40x ou 100x em microscópio.

As imagens foram tratadas usando o *software* livre ImageJ ([rsbweb.nih.gov/ij](http://rsbweb.nih.gov/ij)), como ilustrado na Figura 3.5. Primeiramente a escala das imagens foi ajustada. Tendo-se uma dimensão conhecida da imagem, com o uso de réguas ou escalas microscópicas no mesmo aumento da imagem, é possível setar a escala traçando uma reta em tal dimensão conhecida e seguindo os seguintes passos dentro do programa:

Analyze → Set Scale → Inserir a distância conhecida em “known distance” → Inserir unidade em “Unit of length” → Clicar em “Global” se a distância conhecida foi retirada de outra imagem.

Após tal processo, as imagens foram binarizadas (Figura 3.5b). Em tal processo, a imagem é contrastada usando apenas duas cores, para tal é seguido os seguintes passos no programa:

Image → Type → 8-bit

Image → Adjust → Threshold

Assim foi possível separar os objetos que desejasse medir (Fig. 3.5b), sendo esses posteriormente selecionados e medidos individualmente ou uma outra alternativa é selecionar uma área e realizar a medida de todos os objetos presentes em tal seleção, por meio dos seguintes passos (Figura 3.5c):

Analyze → Analyze Particles

O diâmetro equivalente ( $D_{eq}$ ) foi então calculado pela Equação 3.3.

Da mesma forma que para os pellets, utilizando o mesmo procedimento de binarização, imagens com morfologias de *clumps* e de hifas ramificadas e isoladas também foram tratadas, obtendo-se assim parâmetros característicos das diferentes morfologias (pellets, *clumps* e hifas), tais como área projetada ( $A_p$  em  $mm^2$ ) e diâmetro médio das hifas ( $d_h$  em mm). Aproximadamente 10 imagens foram tratadas para quantificação dos parâmetros morfológicos de cada classe morfológica nos diferentes ensaios. Com os parâmetros característicos medidos ( $A_p$  e  $d_h$ ), foi possível calcular outros parâmetros morfológicos. Para tanto, considerou-se que os pellets e as hifas apresentaram geometrias de esfera e de cilindro, respectivamente, sendo assim possível estimar o comprimento das hifas ( $L$  em mm) e as áreas molhadas ( $A_m$  em  $mm^2$ ) de cada forma morfológica. As equações 3.5, 3.6 e 3.7 foram utilizadas para o cálculo dos valores de  $A_m$  dos pellets e hifas e do comprimento para as hifas ( $L$ ).

$$A_m = \pi \cdot D_{eq}^2 \quad (3.5)$$

onde  $D_{eq}$  é o diâmetro equivalente médio dos pellets, calculado pela equação 3.3.

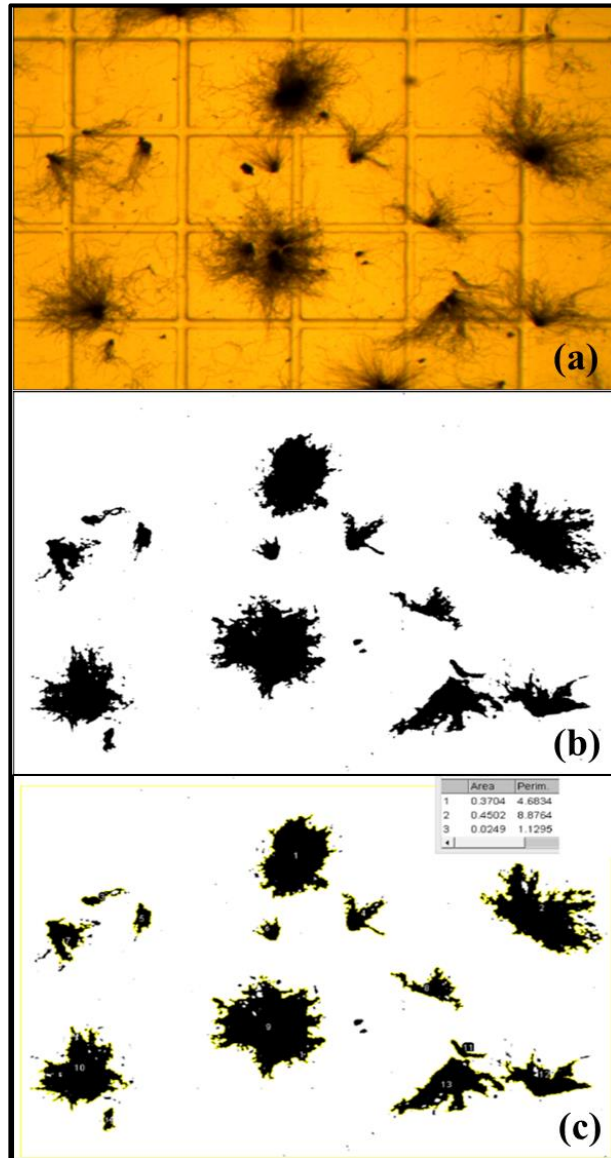
$$L = \frac{A_p}{d_h} \quad (3.6)$$

$$A_m = \pi \cdot d_h \cdot L \quad (3.7)$$

onde  $d_h$  é o diâmetro médio das hifas, sendo tal parâmetro medido nas imagens. No cálculo

de L considerou-se que a área projetada das hifas é igual à área de um retângulo.

Figura 3.5. Tratamento das imagens dos pellets usando o *software* livre ImageJ: (a) Imagem obtida em estereoscópio. (b) Imagem binarizada. (c) Medida da área dos objetos.



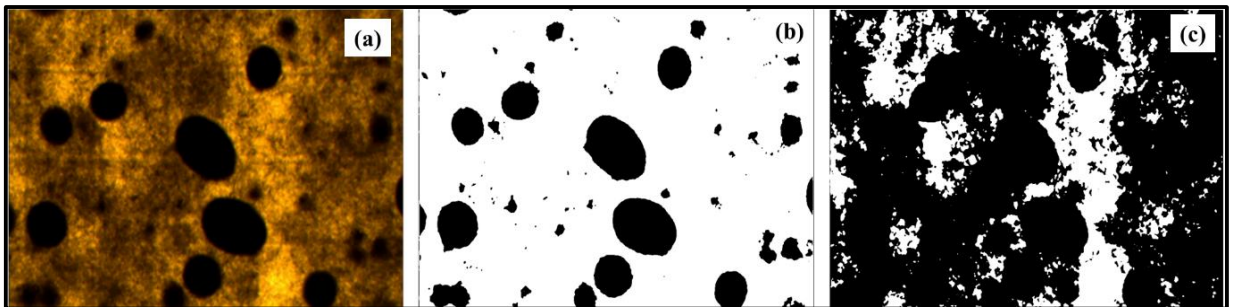
Fonte: Acervo Próprio.

Outro tratamento realizado foi a medida da fração ocupada por cada classe morfológica (pellets, *clumps* ou hifas dispersas), sendo essa definida pela área total projetada ocupada por uma determinada classe morfológica “i” ( $A_i$ ), dividida pela área total das classes morfológicas analisadas ( $A_T$ ). Tal procedimento foi utilizado principalmente na etapa em que diferentes metodologias para produção do inóculo foram testadas, gerando diferentes morfologias. A



Figura 3.6 ilustra como tal tratamento foi realizado, utilizando a mesma lógica de binarização descrita anteriormente.

Figura 3.6. Tratamento de imagem utilizando o programa ImageJ para determinar a fração ocupada por cada classe morfológica. (a) Imagem obtida em estereoscópio. (b) Imagem tratada para obtenção da área ocupada por pellets. (c) Imagem tratada para obtenção da área de pellets + fase dispersa.



Fonte: Acervo Próprio.

Na Figura 3.6 observa-se como foi realizado o tratamento das imagens para se obter a área projetada ocupada por pellets (Figura 3.6b) e a área projetada ocupada por pellets + fase dispersa (Figura 3.6c). Então, foi possível obter a área projetada ocupada pela fase dispersa, calculada como sendo a diferença entre essas. Tais medidas denotam a quantidade de cada classe morfológica obtida em um determinado ensaio. Assim, estimou-se o fator  $A_i/A_T$  que representa a razão de área projetada ocupada por uma determinada classe morfológica ( $A_i$  em  $\text{mm}^2$ ) dividida pela área total de todas as classes morfológicas analisada ( $A_T$  em  $\text{mm}^2$ ). Tal procedimento foi realizado em todas as condições de cultivo para obtenção de diferentes morfologias.

### 3.2.5. Planejamento de experimentos para obtenção diferentes morfologias de inóculo variando pH e concentração de esporos

Diferentes condições iniciais para produção de inóculo foram propostas para obtenção de diferentes morfologias. Os testes iniciais mais promissores foram obtidos quando alterada concomitantemente a concentração de esporos e o pH do inóculo. Sendo assim, as culturas foram iniciadas com esporos a partir de criotubos com concentração variando de  $5 \times 10^4$  a  $5 \times 10^8$  esporos. $\text{mL}^{-1}$ . Para obter diferentes morfologias do inóculo, foram utilizados diferentes

valores de concentração de esporos e pH do meio. As duas variáveis foram variadas de acordo com um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>. A Tabela 3.2 mostra um resumo das condições de pH e concentração de esporos utilizadas, incluindo uma condição padrão adicional, usada em estudo anterior de Cunha et al. (2015).

Tabela 3.2. Condições de concentração de esporos e pH para o crescimento do inóculo. Os valores 1 a 5 representam um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

<b>Código</b>	<b>Condições de cultivo (variáveis codificadas)</b>	<b>Ce* (esporos.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>pH inicial (-)</b>
0	Controle (CUNHA <i>et al.</i> , 2015)	1×10 <sup>7</sup>	4,5
1	Ce (-) and pH (-)	5×10 <sup>3</sup>	2,0
2	Ce (+) and pH (-)	5×10 <sup>7</sup>	2,0
3	Ce (-) and pH (+)	5×10 <sup>3</sup>	6,0
4	Ce (+) and pH (+)	5×10 <sup>7</sup>	6,0
5	Ce (0) and pH (0)	5×10 <sup>5</sup>	4,0

\*C<sub>e</sub>: concentração de esporos em 100 ml de meio.

Na análise dos efeitos das variáveis pH e concentração de esporos na morfologia do fungo, propôs-se uma resposta quantitativa (Y), dada pela Equação 3.8, relacionada com a frequência de cada classe morfológica representada pela razão entre a área da classe morfológica e a área total da imagem ( $A_i/A_T$ ) e com os fatores de forma destas, baseados em um tamanho característico de cada forma morfológica ( $f_i$ ) (Equação 3.8). Tal resposta (Y) permitiu que as variáveis fossem analisadas com base no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> e que efeitos fossem atribuídos a cada variável independente (pH e Ce), bem como à ação conjunta de ambas. O fator de forma ( $f_i$ ) é uma medida característica presente nos ensaios (pellets, *clumps* e hifas), sendo adotada a área molhada ( $A_m$ ) de cada classe morfológica, por meio da qual foi possível obter uma “escala” da variável resposta Y (Figura 3.7). As hifas isoladas foram os elementos de menor grandeza, seguidas pelos *clumps*. Os pellets foram os elementos de maior grandeza. Sendo assim, valores menores de Y indicam uma maior tendência à obtenção de

fase dispersa e maiores valores de Y indicam uma maior tendência à formação de pellets, sendo que, quanto maior o valor de Y, maior o tamanho dos pellets obtidos.

$$Y = f_D \cdot \frac{A_D}{A_T} + f_C \cdot \frac{A_C}{A_T} + f_P \cdot \frac{A_P}{A_T} \quad (3.8)$$

onde:

$f_D$ : fator de forma de hifas isoladas e ramificadas ( $\text{mm}^2$  para  $A_m$  utilizada como fator de forma)

$f_C$ : fator de forma dos *clumps* ( $\text{mm}^2$  para  $A_m$ ).

$f_P$ : fator de forma dos pellets ( $\text{mm}^2$  para  $A_m$ ).

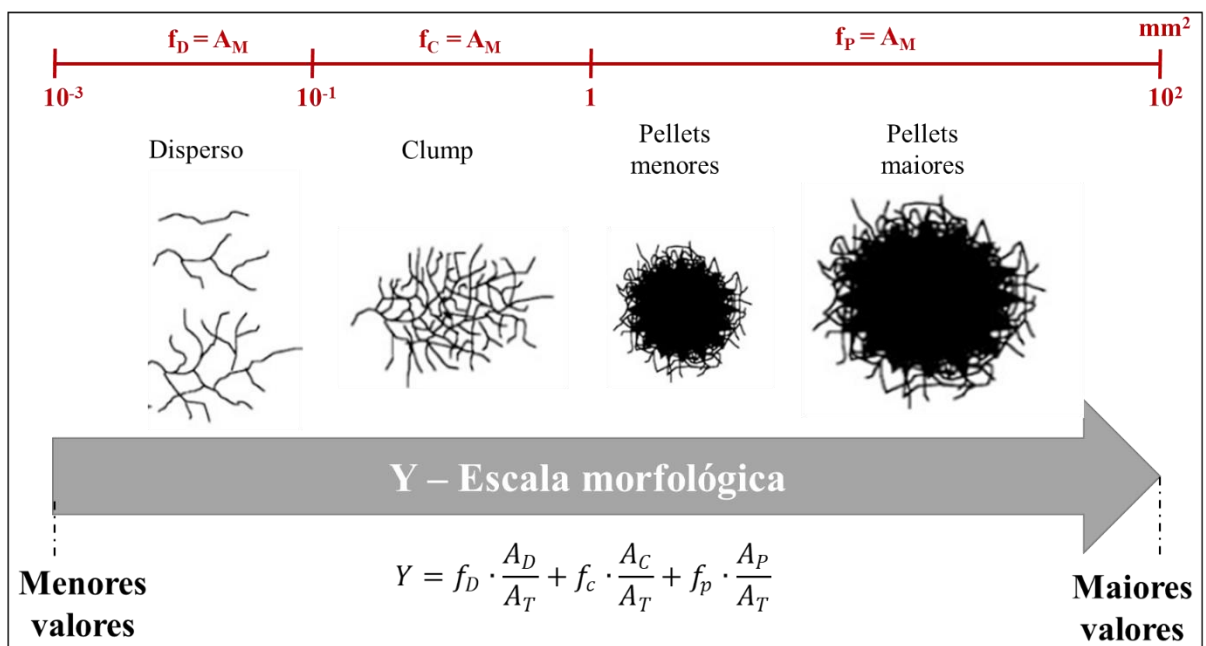
$\frac{A_D}{A_T}$ : fração ocupada pela fase dispersa (-)

$\frac{A_C}{A_T}$ : fração ocupada por *clumps* (-).

$\frac{A_P}{A_T}$ : fração ocupada por pellets (-).

Dessa forma é possível obter uma resposta quantitativa, Y em  $\text{mm}^2$ , que representa a ocorrência da morfologia predominante observada. A Figura 3.7 ilustra a escala morfológica proposta, mostrando como a resposta (Y) representa a principal morfologia do cultivo.

Figura 3.7. Escala de morfologia proposta para quantificar as influências do pH e da concentração de esporos na morfologia do inóculo.



Fonte: Acervo Próprio.

O *software* estatístico Statsoft (v. 7.0) foi utilizado para analisar o planejamento experimental estatístico, sendo esse realizado por meio de triplicata no ponto central. Como duas variáveis foram analisadas concomitantemente, o presente trabalho tratou-se de um delineamento fatorial 2<sup>2</sup>. A resposta (Y) foi utilizada como dado de entrada no programa. A análise de variância (ANOVA, nível de confiança de 95%) e a construção do gráfico de Pareto foram as ferramentas estatísticas utilizadas para identificar quais variáveis independentes (pH e concentração de esporos), e/ou associações de ambas, afetaram a morfologia.

### 3.2.6. Produção de enzimas

O inóculo para o uso nos cultivos de produção foi preparado segundo metodologia descrita na seção 3.2.1 e o tempo de inóculo dependeu da concentração de esporos e do pH inicial, ou seja, da morfologia obtida. O tempo de inóculo foi determinado para cada morfologia (Tabela 3.2: códigos 0, 1 e 2), com base no fato de que o inóculo ainda deveria estar em fase de crescimento exponencial e que os inóculos possuíssem concentrações celulares (g.L<sup>-1</sup>) semelhantes.

Os cultivos para produção de enzimas foram realizados em incubadora orbital agitada a 32 °C e 200 rpm por 96 h e em biorreator tipo tanque agitado e aerado por 48 h. Os ensaios em frascos agitados foram realizados em Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 mL de meio e 10 mL de inóculo (10% v.v<sup>-1</sup>), sem controle de pH. As amostras foram retiradas a cada 24 h, filtradas e o sobrenadante foi congelado a - 4 °C para determinação posterior das atividades enzimáticas de amilase, β-glicosidase, endoglucanase (CMCase) e xilanase. Os ensaios de produção foram realizados em triplicata com três tipos diferentes de inóculo (Tabela 3.2: códigos 0, 1 e 2). Os resultados experimentais foram expressos como o valor médio ± desvio padrão, com base em três cultivos realizados.

Para aumento de escala, confirmar os resultados e também avaliar a influência da configuração do impelidor na morfologia do fungo e na produção de enzimas, os cultivos com os diferentes inóculos foram reproduzidos em biorreator tipo tanque agitado e aerado (TAA) de 4 L (Bioflo IIC, New Brunswick Scientific, EUA), equipado com duas turbinas Rushton (RT-RT) ou com dois impelidores orelhas de elefante (EEDP-EEUP). Mais uma vez, os códigos de inóculo 0, 1 e 2 (Tabela 3.2) foram testados. O pH dos cultivos foi controlado em 5,0 pela adição de soluções de NaOH 2M ou HCl 2M. A temperatura foi mantida a 32 °C e a

concentração de oxigênio dissolvido foi monitorada por eletrodo/analizador de oxigênio. A Tabela 3.3 apresenta as condições experimentais dos cultivos.

Tabela 3.3. Condições de cultivos realizados em biorreator tipo tanque agitado e aerado (TAA).

<b>Cultivo</b>	<b>Tipo de inóculo</b>	<b>Configuração de impelidores</b>	<b>N (rpm)</b>	<b><math>\phi_{ar}</math> (vvm)</b>
1	Disperso (2)	RT-RT	800	0,40
2	Disperso (2)	EEDP-EEUP	800	0,40
3	Clumps (1)	RT-RT	800	0,40
4	Clumps (1)	EEDP-EEUP	800	0,40
5	Pellets (0)	RT-RT	800	0,40
6	Pellets (0)	EEDP-EEUP	800	0,40
7	Pellets (0)	RT-RT	600	0,40
8	Pellets (0)	EEDP-EEUP	600	0,40
9	Pellets (0)	RT-RT	400	0,40
10	Pellets (0)	EEDP-EEUP	400	0,40

Os cultivos em biorreator foram realizados em duplicada por 48 h e as amostras foram coletadas em intervalos de  $\pm 6$  h. As amostras foram filtradas, lavadas em membranas de acetato de celulose (0,2  $\mu\text{m}$ ) e o sedimento foi lavado e seco a 80 °C por 48 h para determinação da concentração celular. O sobrenadante foi congelado a -4 °C para determinação das atividades enzimáticas de  $\beta$ -glicosidase e endoglucanase (CMCase), atividades essas que apresentaram os resultados mais interessantes em Erlenmeyer.

### 3.2.7. Metodologia analítica das atividades enzimáticas

Ensaio de atividade enzimática de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase foram realizados usando o protocolo de Ghose (1987) utilizando como substratos carboximetilcelulose (CMC) 1,0% m.v<sup>-1</sup> (Sigma, EUA) e  $\beta$ -nitrofenil 2mM (Sigma, EUA), respectivamente. Xilanase foi quantificada usando o método de Bailey e Poutanen (1989), utilizando 2,0% m.v<sup>-1</sup> de xilana de espelta de aveia como substrato. A amilase foi quantificada pelo método de Campos e Felix (1995) usando amido a 1,0% m.v<sup>-1</sup> como substrato. As atividades enzimáticas foram determinadas a 50 °C e pH 4,8. Os tempos dos ensaios variaram de 15 a 30 minutos, de acordo com os protocolos mencionados acima. Uma unidade de atividade enzimática refere-se à quantidade de enzima necessária para produzir um  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições especificadas. Os açúcares redutores nos ensaios de endoglucanase, xilanase e amilase foram quantificados usando o método DNS (MILLER, 1959).

### 3.2.8. Consumo de Potência (P)

No biorreator tipo tanque agitado e aerado (TAA), o consumo de energia foi determinado usando a metodologia descrita por Badino, Barboza e Hokka (1994), em que P foi calculado como o produto do torque (T) necessário para a agitação do fluido e a velocidade angular ( $\omega=2\pi.N$ ) do eixo do agitador. A velocidade de agitação (N) foi controlada por inversor de frequência (Micro-master MM420, Siemens, precisão de 0,1% da escala completa) e a vazão do gás foi medida com um controlador de vazão mássica de gás (ModelGFC37, Aalborg). O torque necessário foi calculado como o produto da força (F), medida em triplicata com um dinamômetro digital (FG 6005SD, Lutron, precisão de 0,4% da escala completa) e o comprimento do braço (b=0,175 m) acoplado ao eixo do agitador ( $T=F.b$ ). A potência consumida na agitação foi, então, calculada usando a Equação 3.9.

$$P = T \cdot \omega = 1.10 \cdot F \cdot N \quad (3.9)$$

No biorreator *airlift* de cilindros concêntricos (ACC), o consumo de potência foi calculado assumindo a expansão isotérmica das bolhas de gás desde os orifícios do aspersor até a superfície do fluido (CHISTI, 1989), usando a Equação 3.10.

$$P = Q_g \cdot P_a \cdot \ln\left(1 + \frac{\rho_d \cdot g \cdot h_d}{P_a}\right) \quad (3.10)$$

onde  $Q_g$  é a vazão volumétrica do gás ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ );  $P_a$  é a pressão atmosférica (Pa);  $\rho_d$  é a densidade da mistura gás-líquido ( $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ );  $g$  é a aceleração gravitacional ( $\text{m} \cdot \text{s}^{-2}$ ) e  $h_d$  é a altura de dispersão gás-líquido (m). Sendo  $\rho_d = 865,5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ , média ponderada da densidade do gás e do líquido baseada na retenção gasosa.

### 3.2.9. Coeficiente volumétrico de transferência de massa ( $k_{La}$ )

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) foi determinado pelo método da pressão (LINEK et al., 1993), que consistiu em alterar abruptamente a pressão dentro do biorreator em rampas de  $\pm 15$  kPa, obstruindo em parte a saída de gás do biorreator, o que promoveu uma variação da concentração de oxigênio dissolvido ( $C$ ). A Equação 3.11 foi ajustada aos dados de concentração de oxigênio dissolvido ( $C$ ) em função do tempo ( $t$ ) e o  $k_{La}$  foi estimado pelo método de mínimos quadrados não linear pelo algoritmo de Marquadt. Os valores de  $k_{La}$  foram obtidos em triplicata usando uma constante de atraso da sonda de  $k_e = 0,158 \text{ s}^{-1}$  (BUFFO et al., 2016).

$$C = C_0 e^{-k_e(t-t_0)} + C_S \left(1 - e^{-k_e(t-t_0)}\right) + \frac{k_e(C_S - C_0)}{k_e - k_{La}} \left(e^{-k_e(t-t_0)} - e^{-k_{La}(t-t_0)}\right) \quad (3.11)$$

Onde  $C_0$  é a concentração de oxigênio dissolvido no tempo inicial ( $t_0$ ) e  $C_S$  é a concentração de saturação de oxigênio no meio líquido.

### 3.2.10. Eficiência de transferência de massa ( $E_{MT}$ )

A eficiência de transferência de massa ( $E_{MT}$ ), no caso de oxigênio, foi calculada de acordo com a proposta de BUFFO et al. (2016) (Equação 3.12) e representa a transferência de oxigênio por unidade consumida de energia, dada em  $J^{-1} = 1/J$  (joule).

$$E_{MT} = \frac{k_L a}{P_g} \quad (3.12)$$

### 3.2.11. Taxa de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ )

Os valores de taxa de cisalhamento média nos biorreatores ACC e TAA, operados sob diferentes condições, foram obtidos a partir das metodologias propostas por Esperança et al. (2019) e Valverde, Bettega e Badino (2016), respectivamente. Valverde, Bettega e Badino (2016) simularam o comportamento de um biorreator tipo tanque agitado de 4 L com soluções de goma xantana em várias condições operacionais ( $N$  e  $\phi_{ar}$ ) usando a abordagem Euler-Euler. Os autores utilizaram em suas simulações parâmetros de transferência de massa, retenção gasosa média e número de potência. Os resultados mostraram valores próximos simulados e experimentais do coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ). Esperança et al. (2019) estimaram  $\dot{\gamma}_m$  em biorreator *airlift* de tubo concêntrico de 5 L por fluidodinâmica computacional (CFD). Com base nos resultados simulados e no perfil teórico da velocidade do líquido, os autores mostraram que a simulação de CFD pode ser aplicada com sucesso para a previsão do  $\dot{\gamma}_m$ .

Os valores de  $\dot{\gamma}_m$  obtidos nos estudos anteriores foram calculados adotando-se um procedimento de média de volume para a distribuição espacial da taxa de cisalhamento ao longo do volume do biorreator.

### 3.2.12. Taxa de dissipação de energia

A caracterização da hidrodinâmica do biorreator foi realizada utilizando a função de dissipação/circulação de energia (FDCE), que relaciona a taxa de dissipação de energia



específica local ( $\varepsilon$ ), próxima aos impelidores, e o tempo de circulação ( $t_c$ ). O FDCE foi calculado pela Equação 3.13, proposta por SMITH; LILLY e FOX (1990).

$$\text{FDCE} = \frac{\varepsilon}{t_c} \quad (3.13)$$

A taxa de dissipação de energia específica local ( $\varepsilon$ ) é dada pela Equação 3.14 e o consumo de potência pode ser obtido experimentalmente como descrito na seção 3.2.8.

$$\varepsilon = \frac{P}{D_i^3} \quad (3.14)$$

O tempo de circulação ( $t_c$ ) foi calculado como sendo um quarto do tempo de mistura ( $t_m$ ) (RILEY et al., 2000), o  $t_m$  foi determinado pelo método de pulso de temperatura (TAN; EBERHARD e BUCHS, 2011; CORREA; BADINO e CRUZ, 2016). Esse método consiste em induzir um aumento da temperatura do fluido no interior do biorreator (solução de goma xantana a 1,5% m.v<sup>-1</sup>), através da adição de uma quantidade de fluido aquecido, correspondente a 10% do volume do biorreator (V). A temperatura do fluido foi então monitorada usando quatro termopares conectados a cada um das chicanas (hastes defletoras) do biorreator. O tempo de mistura ( $t_m$ ) foi estimado como o tempo necessário para a temperatura no último termopar atingir um valor correspondente a 95% da temperatura final.

## **CAPÍTULO 4. Transferência de oxigênio e fragmentação de pellets de *Aspergillus niger* em biorreatores tanque agitado e *airlift* de cilindros concêntricos**

**Resumo:** O ambiente hidrodinâmico dos biorreatores é importante e precisa ser investigado, pois, condições de cultivo que proporcionam taxas de transferência de oxigênio satisfatórias tendem a ser prejudiciais aos microorganismos, devido ao efeito do cisalhamento na estrutura celular. Sendo assim, é um desafio encontrar um conjunto ideal de condições operacionais do biorreator que favoreçam a produção dos metabólitos de interesse. O presente trabalho avaliou a fragmentação de pellets de *Aspergillus niger* em dois tipos diferentes de biorreator, a saber, um biorreator convencional de tanque agitado (TAA) e um biorreator *airlift* de cilindros concêntricos (ACC), operando sob condições semelhantes de transferência de oxigênio ou cisalhamento. A transferência de oxigênio foi quantificada por meio do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ). A condição de cisalhamento foi determinada utilizando a taxa média de cisalhamento ( $\dot{\gamma}_m$ ), obtida por meio de fluidodinâmica computacional (CFD), juntamente com um estudo da fragmentação dos pellets. Os resultados mostraram que o biorreator ACC causou menor fragmentação dos pellets, em comparação com o TAA, quando ambos os sistemas foram operados com os mesmos valores de  $k_{La}$ . Para níveis de fragmentação semelhantes, o valor de  $k_{La}$  para o biorreator ACC foi 38% maior que o observado para o TAA. Considerando os resultados para os dois modelos de biorreatores, a fragmentação dos pellets de *A. niger*, representada pela variação do diâmetro médio normalizado do pellet de *A. niger* ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) após ensaios de fragmentação de 4 h de duração ( $\Delta_{frag}$ ), exibiu uma relação linear com  $\dot{\gamma}_m$  ( $R^2 = 0,97$ ). O biorreator ACC também apresentou vantagens em termos de consumo de potência e eficiência de transferência de massa. Esses resultados devem auxiliar na seleção de modelos de biorreatores e condições operacionais adequadas, a fim de melhorar a eficiência da produção industrial de produtos de base biológica.

## 4.1. Introdução

Os biorreatores são sistemas utilizados industrialmente para converter matérias-primas em uma ampla gama de produtos de base biológica, como ácidos orgânicos, enzimas, antibióticos e biocombustíveis. As reações que ocorrem nesses dispositivos podem ser catalisadas por enzimas, microrganismos, células animais ou células vegetais. Para se obter altas conversão e/ou produtividade no processo, o biorreator deve fornecer condições adequadas de pH, temperatura, nutrientes, incluindo oxigênio (em culturas aeróbicas) e cisalhamento. Vários tipos de biorreatores têm sido empregados em culturas submersas (PATEL et al., 2009), sendo os biorreatores tipo tanque agitado e aerado (TAA) e os biorreatores pneumáticos os dispositivos mais utilizados em escalas de bancada, piloto e industrial. Os biorreatores TAA usam um sistema de agitação mecânica para promover a mistura e a transferência de oxigênio da fase gasosa para a líquida, empregando diferentes impelidores para esse fim. Geralmente exibem boa transferência de oxigênio, mas alto consumo de energia (BUFFO et al., 2016). Os biorreatores pneumáticos, como os tipos coluna de bolhas (CB) e *airlift* de cilindros concêntricos (ACC) apresentam construção e operação simples, boa transferência de oxigênio e um menor consumo de energia em comparação aos biorreatores TAA (MENDES e BADINO, 2015; CAMPANI et al., 2015).

As condições de transferência de oxigênio e cisalhamento são fatores importantes a serem considerados na avaliação de desempenho de biorreatores. É necessário que se tenha uma alta capacidade de transferência de oxigênio para garantir o crescimento microbiano e a formação dos bioprodutos de maneira satisfatória. Além disso, condições de cisalhamento adequadas são necessárias para que haja uma transferência eficiente de calor e massa, mas sem causar danos físicos excessivos às células. A transferência de oxigênio em biorreatores geralmente é caracterizada pelo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ). As condições de cisalhamento podem ser avaliadas estimando-se a taxa média de cisalhamento ( $\dot{\gamma}_m$ ) usando correlações (CERRI et al., 2008), observação direta das alterações na morfologia dos microrganismos (CHOY; PATEL e THIBAUT, 2011; JUSTEN et al., 1996) ou da reologia do caldo de cultivo (CERRI e BADINO, 2012). As condições de  $k_{LA}$  e de cisalhamento dependem do modelo do biorreator, do tipo de impelidor (no caso dos TAA), das condições operacionais e das propriedades físicas do caldo (BUFFO et al., 2016; BUSTAMANTE; CERRI e BADINO, 2013; CERRI e BADINO, 2012; DE JESUS; NETO e MACIEL, 2017; THOMASI; CERRI e BADINO, 2010). Apesar do impacto desses

parâmetros ( $k_{LA}$  e condições de cisalhamento) em culturas microbianas, poucos estudos têm focado na análise simultânea desses dois fatores e na comparação dos valores médios estimados da taxa de cisalhamento e os efeitos reais na morfologia dos microrganismos em diferentes modelos de biorreatores.

Cerri et al. (2008), Thomasi, Cerri e Badino (2010) e Mendes e Badino (2016) compararam a hidrodinâmica e taxas médias de cisalhamento ( $\dot{\gamma}_m$ ) em diferentes biorreatores pneumáticos (CB e *airlift*). Bustamante, Cerri e Badino (2013), Campesi et al. (2009) e Buffo et al. (2016) avaliaram o  $k_{LA}$ , o consumo de energia e aplicaram uma metodologia de análise analógica (CERRI et al., 2008) para estimar  $\dot{\gamma}_m$  em biorreatores TAA operados com diferentes tipos e combinações de impelidores. De Jesus, Neto e Maciel (2017) compararam biorreatores TAA e *airlift* considerando a transferência de oxigênio e a taxa média de cisalhamento. Com base na literatura sobre o assunto, uma análise sistemática das condições de transferência de oxigênio e de cisalhamento em diferentes biorreatores considerando as condições operacionais e o tipo de microrganismo é de importância crucial para o desenvolvimento de bioprocessos industriais.

Isso posto, o objetivo desta etapa do trabalho foi avaliar as condições de transferência de oxigênio, consumo de energia e de cisalhamento em biorreatores TAA e ACC sob diferentes condições operacionais. Buscou-se correlacionar as condições de cisalhamento com a fragmentação de pellets de *A. niger*. Tal método de avaliação da condição de cisalhamento (fragmentação dos pellets) foi então comparado com as taxas de cisalhamento estimadas usando fluidodinâmica computacional (CFD). *A. niger* é um importante produtor de enzimas (CUNHA et al., 2015; DRIOUCH; SOMMER e WITTMANN, 2010) e ácidos orgânicos (KLAIC et al., 2018; PAPAGIANNI, 2004; PAPAGIANNI e MATTEY, 2006), portanto, é altamente desejável entender como as condições de cisalhamento em diferentes biorreatores afetam a estrutura desse microrganismo.

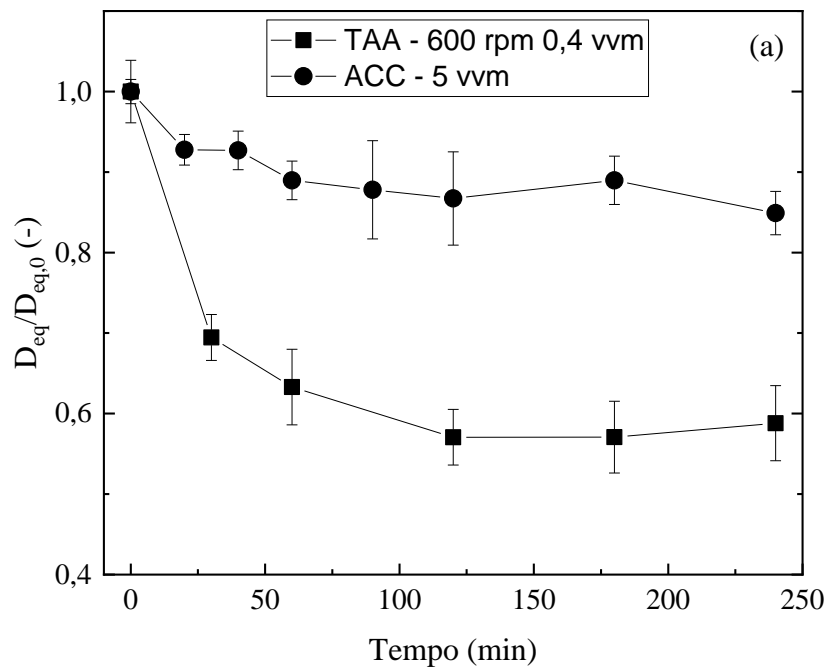
## 4.2. Resultados e Discussão

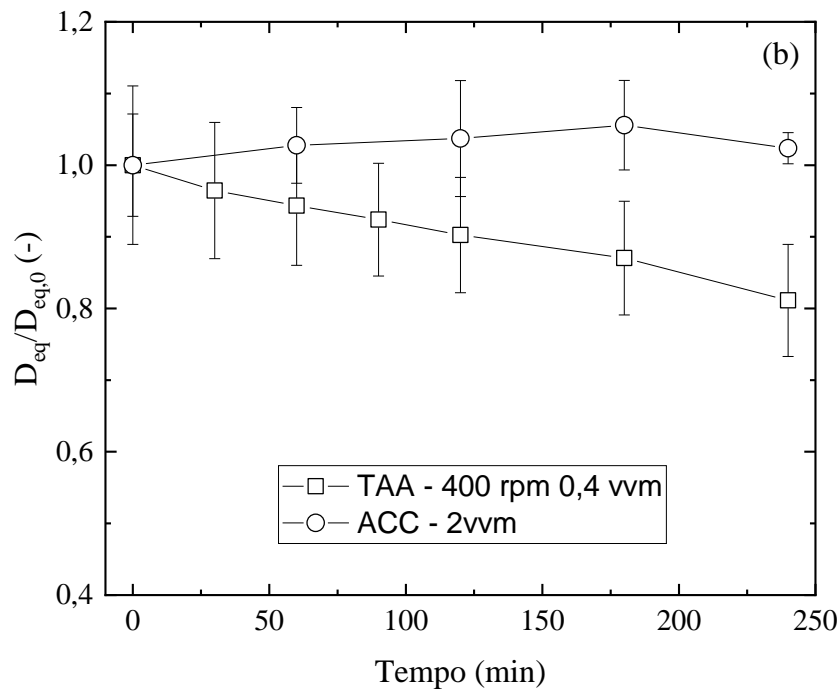
As condições de cisalhamento nos dois diferentes modelos de biorreatores (TAA e ACC) foram analisadas considerando a fragmentação dos pellets com base na determinação do diâmetro equivalente normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ). Nesta abordagem, uma diminuição maior e mais rápida de  $D_{eq}/D_{eq,0}$  ao longo do tempo indicou uma condição de cisalhamento maior imposta ao microrganismo pela operação do biorreator. A comparação dos sistemas TAA e

ACC foi realizada considerando duas situações. Primeiramente, foi avaliado o efeito da condição de cisalhamento ( $\dot{\gamma}_m$ ) nos dois biorreatores operados com coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio semelhantes ( $k_{LA}$ ). Posteriormente, os dispositivos foram operados em condições de cisalhamento semelhantes, permitindo a análise do efeito do  $k_{LA}$ .

A Figura 4.1 mostra os perfis temporais dos diâmetros equivalentes de pellets normalizados ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) nos sistemas TAA e ACC operados sob as mesmas condições de transferência de oxigênio.

Figura 4.1. Comparação da dinâmica de fragmentação de pellets de *A. niger* em biorreatores TAA e ACC operados sob condições similares de transferência de oxigênio. (a)  $k_{LA} \cong 112 \text{ h}^{-1}$  e (b)  $k_{LA} \cong 77 \text{ h}^{-1}$ .





A Figura 4.1a mostra a dinâmica da fragmentação dos pellets de *A. niger* nos valores mais altos de  $k_{LA}$ , onde o biorreator TAA foi operado a 600 rpm e 0,4 vvm (ensaio TAA<sub>2</sub>), enquanto o biorreator ACC foi operado a 5 vvm (ensaio ACC<sub>2</sub>), resultando em valores de  $k_{LA}$  próximos a 112 h<sup>-1</sup>. Sob essas condições de  $k_{LA}$ , uma condição de cisalhamento mais alta foi imposta aos pellets no TAA, em comparação ao biorreator ACC, uma vez que  $D_{eq}/D_{eq,0}$  foi menor que 0,6 no TAA após 4 h de ensaio, enquanto um valor final de  $D_{eq}/D_{eq,0}$  próximo a 0,85 foi obtido no biorreator ACC. Comportamento semelhante foi observado quando os sistemas TAA e ACC foram operados com valores de  $k_{LA}$  mais baixos, em torno de 77 h<sup>-1</sup> (Figura 4.1b). O biorreator TAA operado a 400 rpm e 0,4 vvm (ensaio TAA<sub>1</sub>) impôs uma condição de cisalhamento mais alta aos pellets, em comparação com o biorreator ACC a 2 vvm (ensaio ACC<sub>1</sub>), levando a um valor final de  $D_{eq}/D_{eq,0}$  de cerca de 0,8, enquanto que no ensaio ACC<sub>1</sub> o cisalhamento imposto não afetou o diâmetro dos pellets. Esses resultados indicam que nos sistemas operados em condições semelhantes de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ), o biorreator ACC impôs um ambiente hidrodinâmico menos prejudicial aos pellets de *A. niger*.

Como já exposto, Braga et al. (2015) também observaram que biorreatores *airlift* foram menos danosos às células *Yarrowia lipolytica* W29, em comparação com os biorreatores tipo tanque agitado e aerado. Tais conclusões foram obtidas através de análise de

imagens das células da levedura estudada. A produção máxima de  $\gamma$ -decalactona foi obtida usando biorreator *airlift* na menor vazão de ar estudada ( $6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) e  $k_{La}$  de  $16 \text{ h}^{-1}$ . Tal resultado foi atribuído ao menor dano celular. Sob valores semelhantes de  $k_{La}$  ( $\cong 37 \text{ h}^{-1}$ ), o biorreator ACC operado a  $9 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  também apresentou melhores resultados que o biorreator TAA operado a  $400 \text{ rpm}$  e  $1,7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , com produção de  $2,3$  e  $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e produtividade de  $65$  e  $16 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , para os sistemas ACC e TAA, respectivamente.

Oliver-Salvador et al. (2013) cultivaram células de *Jacaratia mexicana*, em biorreatores tipo tanque agitado e aerado (TAA), *airlift* de cilindros concêntricos (ACC) e coluna de bolhas (CB) visando a produção de protease. Os autores, também por análise de imagens, evidenciaram menores danos às células em biorreatores CB e ACC. Tais resultados concordaram com valores de taxa de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) e microescala de turbulência de Kolmogorov ( $\lambda$ ). O maior valor de  $\dot{\gamma}_m$  observado em biorreator TAA levou ao maior acúmulo de proteínas e maior atividade proteolítica, em comparação com os outros dois modelos de biorreatores.

Os trabalhos de Braga et al. (2015) e Oliver-salvador et al. (2013) mostraram resultados de acordo com o relatado na literatura, com biorreatores *airlift* exibindo taxas de cisalhamento mais baixas em comparação com biorreatores tipo tanque agitado e aerado. Entretanto, comportamento oposto foi observado por Cerri e Badino (2012) que cultivaram a bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus* para a produção de ácido clavulânico. Operando um biorreator TAA de  $4 \text{ L}$  a  $400$  ou  $600 \text{ rpm}$  e vazão de ar de  $0,5 \text{ vvm}$  e um biorreator ACC de  $5 \text{ L}$  a  $3,0$  ou  $4,0 \text{ vvm}$ , foram observadas condições de cisalhamento mais altas no biorreator ACC. Esta conclusão foi baseada no comportamento do índice de consistência do caldo (K) durante os cultivos. Tal parâmetro indica indiretamente o grau de fragmentação das células bacterianas frente às condições hidrodinâmicas. O índice de consistência (K) reflete a saúde estrutural dos micélios e está relacionado à viscosidade aparente do meio, uma vez que os caldos de cultivo apresentam o comportamento reológico de um fluido pseudoplástico não newtoniano. Cerri e Badino (2012) constataram que para a mesma condição inicial de transferência de oxigênio, o biorreator ACC operando com altas vazões específicas de alimentação de ar ( $3,0$  e  $4,0 \text{ vvm}$ ) exibiu caldo de cultivo com menor índice de consistência ao longo do cultivo, o que é um indicativo de maior fragmentação micelial e, conseqüentemente, maiores taxas de cisalhamento. Esses resultados foram correlacionados com uma maior produção de ácido clavulânico no biorreator *airlift*.

Siedenberg et al. (1997) também observaram uma maior taxa de cisalhamento em biorreator *airlift* em comparação com biorreator TAA, durante cultivos de *Aspergillus awamori* com farelo de trigo como fonte de carbono e indutor de xilanase. O biorreator TAA de 30 L foi operado usando velocidades de agitação de 200, 400 e 600 rpm, com uma vazão específica de alimentação de ar de 1 vvm, enquanto o biorreator ACC de 100 L foi operado a 0,2 vvm. A análise da morfologia do fungo mostrou um crescimento em forma de pellets em TAA, enquanto houve formação de micélio filamentososo em biorreator *airlift*. Tal comportamento morfológico foi atribuído a um ambiente de cisalhamento mais alto no último dispositivo.

Os resultados descritos com relação aos efeitos das condições de cisalhamento em biorreatores convencional e pneumático sugerem que a fragmentação sofrida pelas células depende não apenas da taxa de cisalhamento, mas também da fisiologia, morfologia e espécie do microrganismo empregado. No geral, o biorreator *airlift* apresentou valores mais altos de  $k_{LA}$  para a mesma fragmentação de pellets, o que pode ser um resultado favorável para esse tipo de biorreator, assumindo que uma alta taxa de cisalhamento seja prejudicial ao cultivo. Entretanto, condições de cisalhamento mais altas podem favorecer a produção de alguns bioprodutos, conforme relatado por Cerri e Badino (2012) na produção de ácido clavulânico e por Oliver-Salvador et al. (2013) na produção de protease. Portanto, a escolha do biorreator e as condições operacionais dependerão das necessidades específicas do cultivo, considerando a transferência de oxigênio e o ambiente de cisalhamento.

A Figura 4.2 mostra os perfis temporais do diâmetro equivalente normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) na mesma condição de cisalhamento, com o biorreator TAA operado a 400 rpm e 0,4 vvm (TAA<sub>1</sub>), enquanto a vazão no biorreator ACC foi operado a 5 vvm (ACC<sub>2</sub>). A comparação entre os resultados de  $D_{eq}/D_{eq,0}$  nos dois biorreatores mostrou que a fragmentação de pellets foi semelhante, com um valor  $D_{eq}/D_{eq,0}$  de aproximadamente 0,8 em ambos os biorreatores após 240 min, sendo o valor de  $k_{LA}$  mais alto em biorreator ACC ( $108 \text{ h}^{-1}$ ) em comparação ao valor obtido em TAA ( $78 \text{ h}^{-1}$ ). Essa diferença representou uma transferência de oxigênio 38% maior no biorreator ACC, refletindo numa maior eficiência na transferência de oxigênio desse dispositivo em comparação com o TAA, quando os dois biorreatores expuseram as células fúngicas ao mesmo nível de fragmentação.

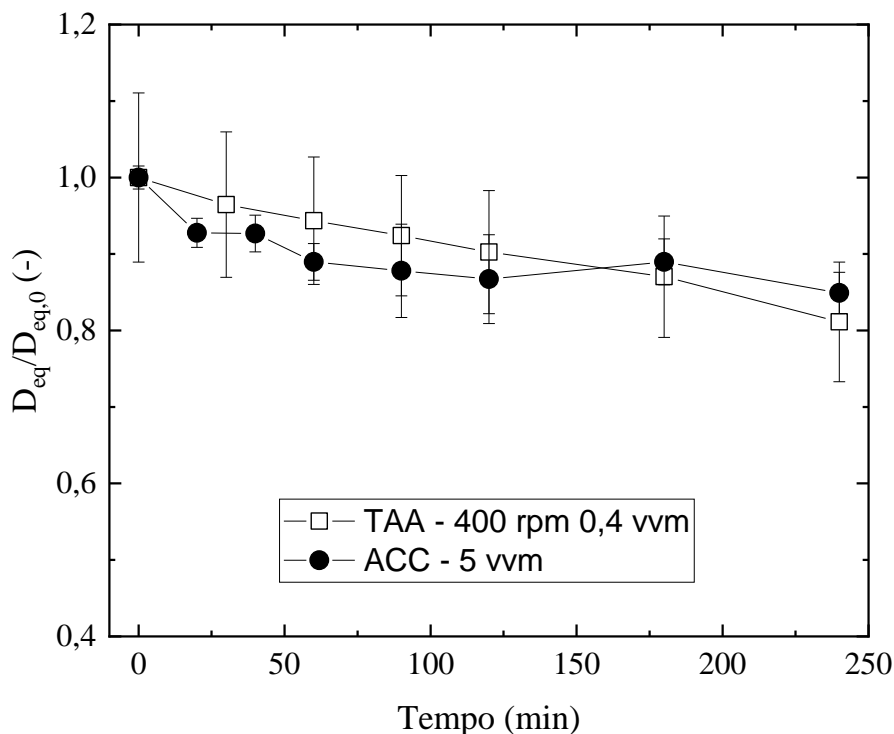
Em estudo de Michelin et al. (2013), também maiores taxa de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ) foram obtidas em biorreator TAA ( $30 \text{ h}^{-1}$ ), o que culminou em uma maior produção de xilanase por *A. niger* ( $9000 \text{ U.L}^{-1}$ ). Quando operados sob condições similares de transferência



de oxigênio ( $k_{La} \cong 12 \text{ h}^{-1}$ ), a produção de xilanase foi maior no biorreator ACC ( $7000 \text{ U.L}^{-1}$ ) em comparação a obtida no biorreator TAA ( $4500 \text{ U.L}^{-1}$ ), sendo tal fato atribuído às diferentes condições de cisalhamento impostas ao microrganismo..

De Jesus, Neto e Maciel (2017) avaliaram os coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) e as taxas de cisalhamento médias ( $\dot{\gamma}_m$ ) em biorreator ACC de 4 L e TAA de 4 L. Observou-se que para valores semelhantes de  $k_{La}$ , o biorreator ACC exibiu  $\dot{\gamma}_m$  menor em comparação ao TAA. No intervalo de condições operacionais empregado por De Jesus; Neto e Maciel (2017), não houve um conjunto de condições operacionais em que as taxas de cisalhamento médias fossem semelhantes para os sistemas TAA e ACC. No entanto, a faixa de variação de  $\phi_{ar}$  utilizada foi estreita no biorreator *airlift*. Pode-se esperar que caso o valor de  $\phi_{ar}$  fosse aumentado, os valores de  $k_{La}$  e  $\dot{\gamma}_m$  também aumentariam, atingindo uma condição em que a taxa de cisalhamento média no biorreator ACC seria semelhante ou até superior à observada no biorreator TAA a 400 rpm.

Figura 4.2. Comparação da dinâmica de fragmentação de pellets de *A. niger* nos sistemas ACC e TAA operados sob condições de cisalhamento semelhantes.



Para avaliar e comparar os resultados da fragmentação de pellets nos diferentes biorreatores sob diferentes condições operacionais foi definido um valor de redução do

tamanho dos pellets após 240 min de fragmentação ( $\Delta_{frag}$ , em %), dado pela Equação 4.1. Tal parâmetro indica a diminuição do diâmetro equivalente normalizado do pellet, ou seja, um valor mais alto de  $\Delta_{frag}$  está associado a uma condição de cisalhamento mais intensa.

$$\Delta_{frag} = \left(1 - \frac{D_{eq}}{D_{eq,0}}\right) \cdot 100 \quad (4.1)$$

onde  $D_{eq}/D_{eq,0}$  é o diâmetro equivalente do pellet normalizado ao final do ensaio (após 240 min).

A Tabela 4.1 apresenta os resultados de consumo de potência (P), fragmentação de pellets ( $\Delta_{frag}$ ), eficiência de transferência de massa ( $E_{MT}$ ),  $k_{La}$  e taxa média de cisalhamento ( $\dot{\gamma}_{av}$ ) sob diferentes condições de operação dos biorreatores TAA e ACC.

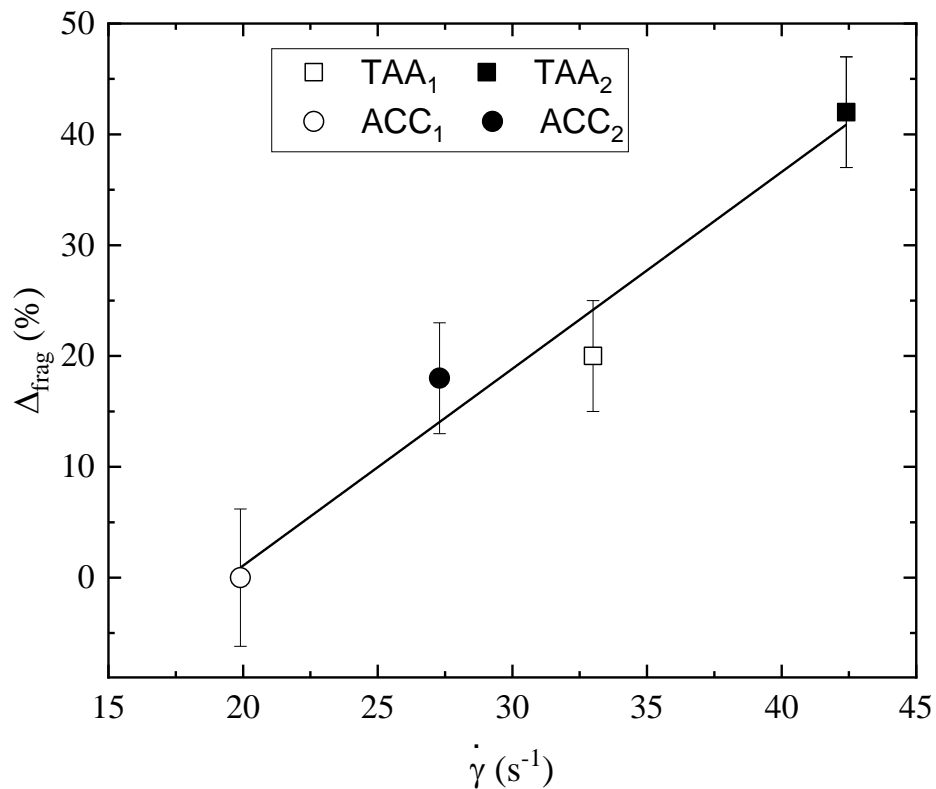
Tabela 4.1. Comparação entre as principais variáveis de desempenho dos sistemas TAA e ACC sob diferentes condições operacionais.

<b>Ensaio</b>	<b>Condições de Operação</b>	<b>P (W)</b>	<b><math>k_{La}</math> (<math>h^{-1}</math>)</b>	<b><math>\dot{\gamma}_m</math> (CFD) (<math>s^{-1}</math>)</b>	<b><math>\Delta_{frag}</math> (%)</b>	<b><math>E_{MT} \times 10^3</math> (1/J)</b>
TAA <sub>1</sub>	400 rpm e 0,4 vvm	5,2	78	33,0	20	4,2
TAA <sub>2</sub>	600 rpm e 0,4 vvm	12,4	115	42,4	42	2,6
ACC <sub>1</sub>	2 vvm	0,7	76	19,9	0	31,8
ACC <sub>2</sub>	5 vvm	1,6	108	27,3	18	18,4

Os resultados (Tabela 4.1) mostram que os valores de  $\dot{\gamma}_m$  apresentaram correlação com a fragmentação experimental dos pellets. Nos ensaios realizados em condições semelhantes de cisalhamento nos dois biorreatores (ensaios TAA<sub>1</sub> e ACC<sub>2</sub>), as taxas de cisalhamento médias foram de 33,0 e 27,3  $s^{-1}$ , enquanto os valores de  $\Delta_{frag}$  foram de 20 e 18%, respectivamente. O ensaio com maior fragmentação de pellets (TAA<sub>2</sub>) apresentou os maiores valores de  $\dot{\gamma}_m$  e  $\Delta_{frag}$ , 42,4  $s^{-1}$  e 42%, respectivamente. Foi observada uma relação linear entre a fragmentação dos pellets e a condição de cisalhamento, com boa correlação entre as variáveis ( $R^2=0,97$ ). É importante ressaltar que esse resultado foi obtido com diferentes tipos de biorreatores e condições operacionais, o que mostrou que a relação entre a taxa de

cisalhamento e a fragmentação dos pellets foi forte e não dependeu do dispositivo utilizado (Figura 4.3).

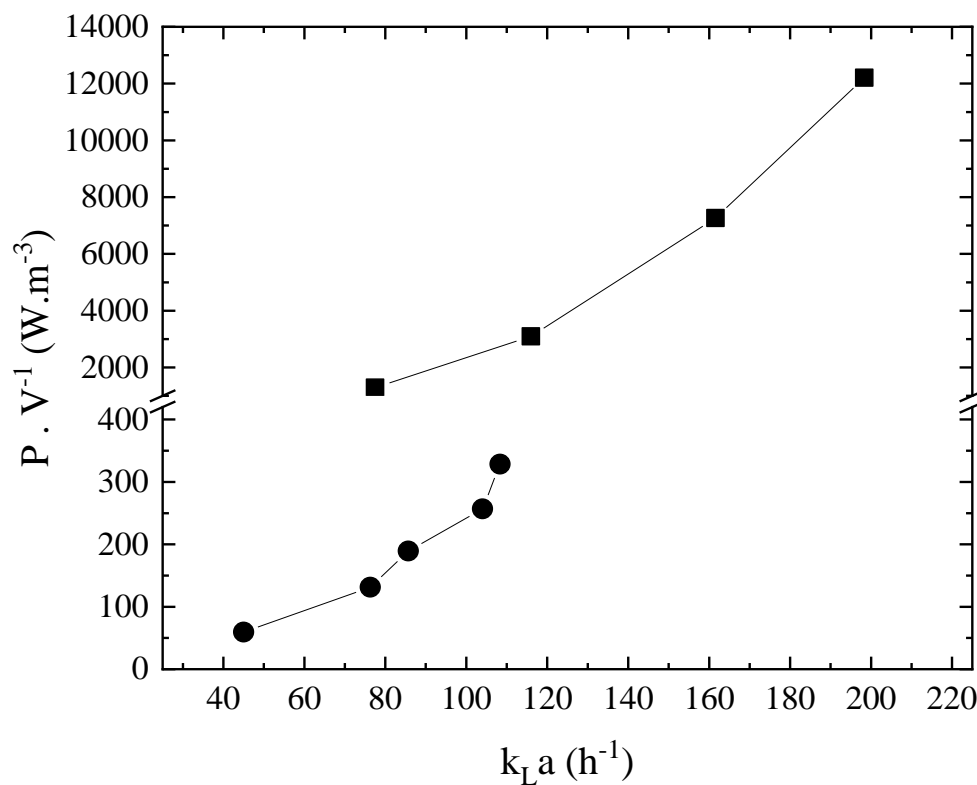
Figura 4.3. Fragmentação dos pellets ( $\Delta_{frag}$ ) em função da taxa de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) (regressão linear com  $R^2 = 0,97$ ).



Outro parâmetro que pode ser analisado para comparar o desempenho de biorreatores em termos de fragmentação celular é o consumo de energia (potência consumida). Uma das principais vantagens que o biorreator *airlift* apresenta em relação ao tanque agitado e aerado é a maior relação taxa de transferência de oxigênio por consumo de energia. O valor da eficiência da transferência de massa ( $E_{MT}$ ) foi uma ordem de magnitude superior no biorreator ACC, em comparação com o TAA (Tabela 4.1), independentemente das condições de transferência de oxigênio e cisalhamento empregadas. Além disso, a relação entre consumo de energia e  $k_{LA}$  (Figura 4.4) mostrou que, comparando esses dois biorreatores, operados com solução de goma xantana, o biorreator ACC exigiu um menor consumo de energia para atingir o mesmo  $k_{LA}$ , quando comparado ao biorreator TAA. De Jesus, Neto e Maciel (2017) também relataram comportamento semelhante, quando compararam o consumo de energia em função da vazão específica de alimentação de ar para quatro diferentes biorreatores operados com solução de goma xantana. Foram obtidas as seguintes faixas de  $P \cdot V^{-1}$  (do maior para o menor):

250-3300  $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$  (TAA), 50-800  $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$  (ACC agitado), 1-80  $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$  (CB) e 1-50  $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$  (ACC). Como encontrado no presente trabalho, a  $P\cdot V^{-1}$  foi uma ordem de magnitude maior no biorreator TAA, em comparação ao biorreator ACC. YAHIRO et al. (1997) avaliaram o consumo de energia nos dispositivos TAA e ACC em cultivos de *Aspergillus terreus* para produção de ácido itacônico. A máxima produtividade em ácido itacônico foi de  $0,48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  em TAA operado a 400 rpm e 0,5 vvm ( $P\cdot V^{-1}=1180 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ ), enquanto que em biorreator ACC operado a 3 vvm ( $P\cdot V^{-1}=542 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ ) alcançou-se uma produtividade máxima em ácido itacônico de  $0,64 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

Figura 4.4. Consumo específico de energia ( $P\cdot V^{-1}$ ) em função de  $k_L a$  para os sistemas TAA e ACC operados com solução de goma xantana. (■) TAA: 400 a 1000 rpm e 0,4 vvm; (●) ACC: 1 a 5 vvm.



É importante enfatizar que os resultados de fragmentação obtidos neste trabalho são válidos apenas para pellets de *A. niger* e não devem ser generalizados para outros microrganismos ou formas morfológicas. Os resultados indicaram que o efeito da condição de cisalhamento nas células depende não apenas do tipo de biorreator, mas também das condições operacionais e da espécie e da morfologia do microrganismo. Portanto, as

condições operacionais devem ser avaliadas para cada bioprocessamento específico, a fim de selecionar o conjunto mais adequado biorreator/condições do cultivo.

### 4.3. Conclusões

Em geral, o biorreator *airlift* de cilindros concêntricos (ACC) apresentou menor cisalhamento em comparação ao biorreator tipo tanque agitado e aerado (TAA). Para um mesmo valor de  $k_{LA}$ , o biorreator TAA causou uma fragmentação aos pellets 50% superior, enquanto que para condições semelhantes de fragmentação, o valor de  $k_{LA}$  foi 38% maior no biorreator ACC. Além disso, o biorreator ACC mostrou vantagens em termos de consumo de energia e eficiência de transferência de massa. Os valores de fragmentação dos pellets ( $\Delta_{frag}$ ) obtidos no presente trabalho tiveram forte dependência com a taxa de cisalhamento média estimada por CFD, apresentando os dois parâmetros uma boa correlação linear ( $R^2=0,97$ ). O fato do biorreator ACC não ser agitado mecanicamente pode ser o motivo para as condições de cisalhamento menos intensas impostas ao microrganismo. Os resultados fornecem informações importantes relacionadas com a fragmentação microbiana em diferentes modelos de biorreatores e devem auxiliar na seleção do biorreator e nas condições de operação ideais para o cultivo de *A. niger*, um importante microrganismo produtor de enzimas e ácidos orgânicos.

## **CAPÍTULO 5. Relação entre a cinética de fragmentação de pellets e a produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger* em biorreator convencional com diferentes impelidores**

**Resumo:** O ambiente hidrodinâmico nos biorreatores afeta a transferência de oxigênio e as condições de cisalhamento durante os cultivos microbianos. Portanto, a avaliação do efeito do ambiente hidrodinâmico na morfologia celular pode contribuir para favorecer a produção de metabólitos de interesse. Nessa etapa do trabalho utilizou-se a análise de imagens para quantificar a fragmentação de pellets de *A. niger* em biorreator convencional operado sob diferentes condições de agitação e aeração e configurações de impelidores, incluindo turbinas de Rushton e orelhas de elefante, bem como foi avaliada a influência do ambiente hidrodinâmico na produção de enzimas celulolíticas. Um modelo cinético empírico foi utilizado para descrever a dinâmica da fragmentação dos pellets e quantificar as condições de cisalhamento. Os resultados mostraram que a velocidade de agitação afetou a dinâmica da fragmentação de pellets tanto acelerando quanto aumentando a magnitude da fragmentação celular. As produções de endoglucanase e de  $\beta$ -glicosidase exibiram uma relação linear com o parâmetro cinético  $k_1$ , relacionado com a magnitude de fragmentação dos pellets e, portanto, com as condições de cisalhamento impostas às células. A produção de  $\beta$ -glicosidase foi favorecida sob condições de alto cisalhamento, enquanto uma maior produção de endoglucanase foi observada em condições de baixa fragmentação. Tais resultados podem ser úteis para definir sistemas e condições operacionais adequados para a produção de metabólitos em biorreator convencional, incluindo enzimas, bem como definir condições que favoreçam a obtenção de um coquetel enzimático específico.

## 5.1. Introdução

Os fungos filamentosos são utilizados em processos biotecnológicos há décadas para produzir compostos de interesse industrial como antibióticos, ácidos orgânicos e enzimas. Em cultivos submersos, esses microrganismos geralmente exibem uma morfologia complexa e que varia durante o ciclo de vida, sendo frequentemente associada à produção de metabólitos (QUINTANILLA et al., 2015; VEITER; RAJAMANICKAM e HERWIG, 2018). As formas morfológicas mais comuns de microrganismos filamentosos são pellets, aglomerados (*clumps*), hifas ramificadas e hifas isoladas (GRIMM et al., 2005; QUINTANILLA et al., 2015). A morfologia dos fungos filamentosos tem um grande impacto na produtividade dos bioprocessos, porém a relação entre morfologia e produção depende do microrganismo e do produto de interesse, podendo variar até para a mesma espécie (VEITER; RAJAMANICKAM e HERWIG, 2018).

A morfologia fúngica é influenciada pela composição do meio de cultura (AHAMED e VERMETTE, 2009), concentração de esporos (PAPAGIANNI e MATTEY, 2006), pH (COLIN; BAIGORII e PERA, 2013) e condições de operação do biorreator (agitação e/ou aeração) (LIN; SCHOLZ e KRULL, 2010; YU et al., 2012). As condições de agitação e aeração nos biorreatores podem ter efeitos diferentes na morfologia dos fungos durante o cultivo, dependendo se o microrganismo é inoculado como esporos ou células germinadas (micélio). Lin, Scholz e Krull (2010) observaram que uma condição de alta agitação levou à formação de pellets durante o cultivo de *A. niger* inoculado como esporos. O mesmo efeito foi relatado por Yu et al. (2012) durante cultivo de *T. reesei*, onde o aumento da velocidade de agitação de 100 para 400 rpm levou a formação de pellets maiores. Tal comportamento pode ser explicado pelo efeito da agitação na agregação de esporos. Por outro lado, quando a morfologia já está formada, a agitação impõe um ambiente de cisalhamento ao microrganismo. Justen et al. (1996) inocularam biorreator com micélio e verificaram que a área dos *clumps* foi menor em maiores velocidades de agitação. Em outro trabalho, Amanullah et al. (2002) investigaram a influência da intensidade de agitação na morfologia do fungo filamentosos *Aspergillus oryzae* e analisaram como a morfologia afetou a produção das enzimas amilase e amiloglicosidase. Foi verificado que a quantidade de hifas ativas era maior em velocidade de agitação menor (525 rpm) enquanto a alta agitação levou a diminuição de tamanho devido a ruptura das estruturas. Portanto, a condição de agitação pode ter um efeito substancial na morfologia, influenciando tanto a aglomeração celular quanto a estrutura celular já estabelecida, onde uma forte agitação pode levar a efeitos adversos, como ruptura

da estrutura (VEITER; RAJAMANICKAM e HERWIG, 2018).

O fungo filamentoso *A. niger* é conhecido principalmente por sua produção de ácidos orgânicos (KLAIC et al., 2018) e enzimas como celulases (CUNHA et al., 2015; VASCONCELLOS et al., 2016). Um coquetel celulolítico eficiente e de baixo custo ainda é um desafio na indústria de etanol de segunda geração e derivados, mostrando a importância desse campo de pesquisa (ADSUL et al., 2020). A morfologia predominante no *A. niger* são os pellets, pois seus esporos tendem a aglomerar-se na fase de germinação, resultando na formação de pellets (NIELSEN, 1996). Os pellets consistem em aglomerados esféricos estáveis compostos por uma rede ramificada de hifas, com formas que podem variar de suaves e esféricas a alongados e "peludos". Cultivos realizados utilizando microrganismos com morfologia peletizada têm a vantagem de gerar caldos com menor viscosidade, melhorando a mistura e a transferência de oxigênio. Além disso, pellets facilitam a separação do microrganismo nas etapas a jusante do processo. A principal desvantagem dessa morfologia é a difusão limitada de nutrientes, incluindo oxigênio, do caldo de cultura para o centro do pellet (EL-ENSHASY, 2007; SERRANO-CARREON et al., 2015). Portanto, o controle do tamanho do pellet pode ser uma estratégia útil para melhorar a produção de produtos de interesse como as enzimas.

As condições hidrodinâmicas nos biorreatores influenciam a morfologia e a saúde estrutural dos microrganismos. Portanto, é importante entender seus efeitos, a fim de estabelecer condições de processo que favoreçam a produção de compostos de interesse industrial. O objetivo desta etapa do trabalho foi investigar a influência das condições operacionais (agitação e aeração) e da associação dos impelidores (duas turbinas de Rushton ou dois impelidores tipo orelha de elefante) nas condições de cisalhamento do biorreator, por meio da análise da fragmentação dos pellets de *A. niger*, obtidos por meio da condição padrão (código 0 da Tabela 3.2). Um modelo cinético empírico foi ajustado aos valores experimentais de diâmetro equivalente de pellets normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) obtendo-se parâmetros cinéticos relacionados com as condições de cisalhamento, representando uma nova abordagem para análise de cisalhamento em biorreatores. Os parâmetros cinéticos da fragmentação de pellets foram correlacionados com a função de dissipação/circulação de energia (FDCE), um importante parâmetro de desempenho do biorreator, e com a produção de duas enzimas celulolíticas, endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase. Desta forma, as condições hidrodinâmicas em biorreatores e a produção de enzimas celulolíticas, na maioria das vezes estudadas separadamente, foram avaliadas em conjunto em função das condições de operação e do tipo



de impelidor em biorreator convencional.

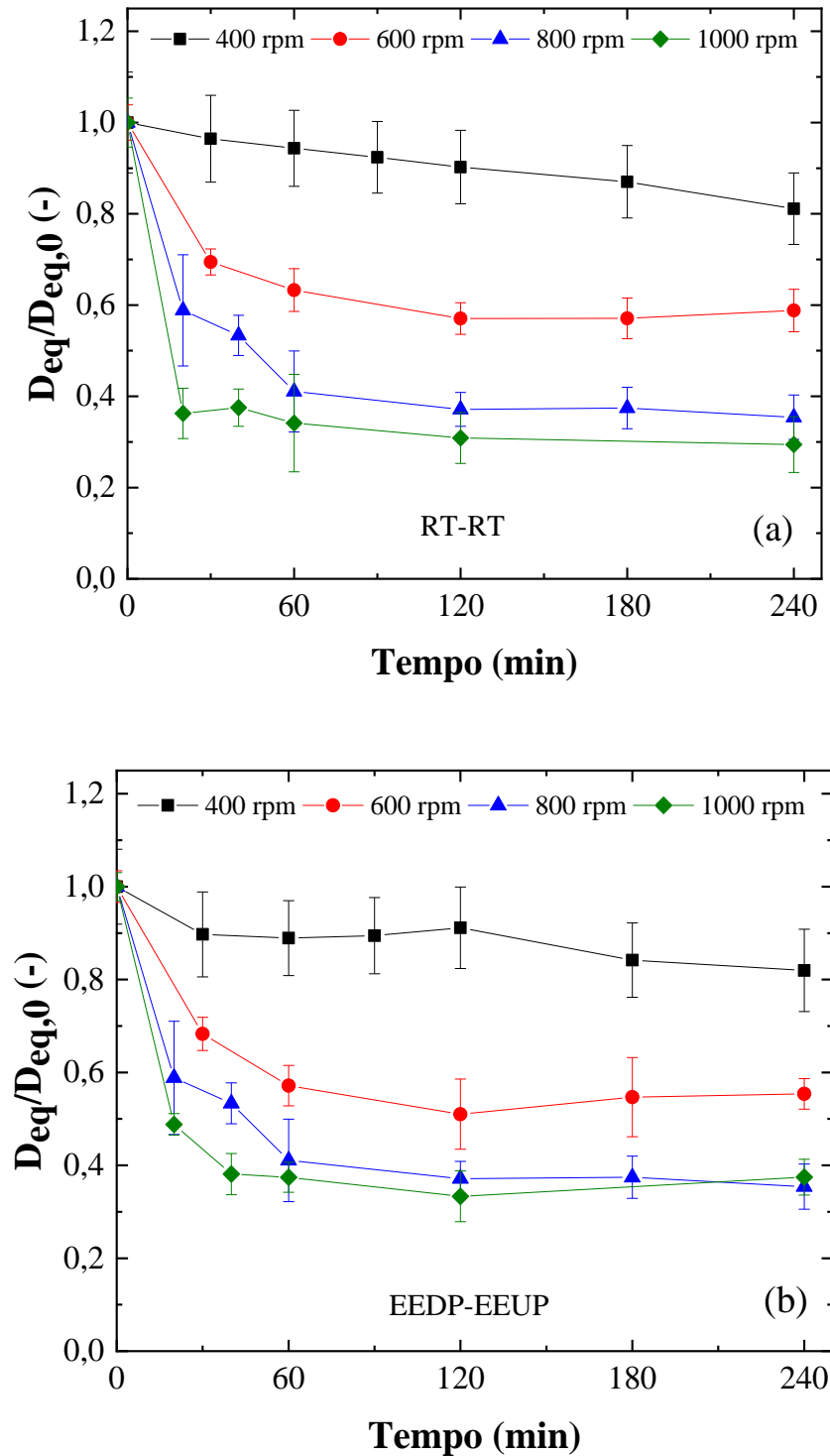
## 5.2. Resultados e Discussões

### 5.2.1. Efeito das condições de agitação na fragmentação de pellets

Foram realizados ensaios para avaliar os efeitos das condições hidrodinâmicas na fragmentação de pellets em biorreator tanque agitado e aerado com duas diferentes configurações de impelidores, operando em diferentes condições de agitação. O efeito da velocidade de agitação ( $N$ ) na fragmentação dos pellets foi avaliado sob vazão de alimentação de ar de 0,4 vvm, variando os valores de  $N$  de 400 a 1000 rpm (Tabela 3.1 – ensaios A1 ao A10). A fragmentação dos pellets foi avaliada monitorando-se o diâmetro equivalente médio ( $D_{eq}$ ) dos mesmos ao longo do tempo, causada pelos efeitos hidrodinâmicos sofridos pelos pellets. A Figura 5.1 mostra os perfis temporais do diâmetro equivalente normalizado dos pellets ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) no biorreator TAA equipado com as configurações de impelidores RT-RT e EEDP-EEUP (Figura 5.1). A análise estatística foi realizada calculando-se o desvio padrão de duas amostras diferentes. Para cada amostra mais de 100 objetos (pellets) foram avaliados.

Para as duas configurações de impelidores testadas foram observadas reduções de  $D_{eq}/D_{eq,0}$  ao longo do tempo até que os valores se tornassem constantes após aproximadamente 2 h. Esse efeito foi observado em todas as frequências de rotação e configurações dos impelidores, exceto nos ensaios realizados a 400 rpm nas configurações RT-RT e EEDP-EEUP (ensaios A1 e A6). Tal comportamento indica que a estrutura do pellet apresentou um nível de resistência ao campo hidrodinâmico imposto. Os resultados também mostraram que, para ambas as configurações de impelidores, quanto maior a velocidade de agitação ( $N$ ), menor o valor final do diâmetro normalizado dos pellets ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ). Por exemplo, para a configuração RT-RT a 400 rpm, após 4 h o valor final de  $D_{eq}/D_{eq,0}$  foi cerca de 0,80, enquanto que a 1000 rpm o valor  $D_{eq}/D_{eq,0}$  foi de 0,30, o que significa que  $D_{eq}$  correspondeu a 80 e 30% do valor inicial ( $D_{eq,0}$ ), respectivamente.

Figura 5.1. Efeito da velocidade de rotação (N) no diâmetro equivalente normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) de pellets de *A. niger* em biorreatores TAA equipados com diferentes configurações do impelidores e operados a uma vazão específica de alimentação de ar de 0,4 vvm: (a) RT-RT; (b) EEDP-EEUP. As barras de erro representam o erro padrão de duas amostras diferentes.



Outra característica a ser destacada foi que com o aumento de N decresceu a diferença entre os perfis de diâmetro dos pellets. Por exemplo, para a associação RT-RT, as faixas de tamanho de pellets a 800 e 1000 rpm foram muito mais próximas umas das outras do que a 600 e 800 rpm (Figura 5.1a). O mesmo comportamento foi observado para a associação EEDP-EEUP (Figura 5.1b). Além do efeito das condições de agitação no tamanho final do pellet, o aumento de N fez com que a redução do tamanho do pellet se acelerasse. No ensaios com a configuração RT-RT a 600 rpm, o diâmetro normalizado equivalente ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) diminuiu até 120 min, permanecendo constante a partir desse tempo, enquanto que nos ensaios com a configuração RT-RT a 1000 rpm, o valor final de ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) foi atingido em apenas 20 min.

A fragmentação de microrganismos filamentosos em biorreatores tem sido amplamente relatada na literatura. Os resultados mostram que a fragmentação depende do tipo de microrganismo e das condições operacionais utilizadas. Justen et al. (1996) avaliaram a influência das condições de agitação produzidas com diferentes impelidores na morfologia de *Penicillium chrysogenum* (livremente dispersa e *clumps*). Em ensaios de curta duração (30 minutos) verificou-se que o comprimento total das hifas e a área média projetada (A) diminuíram com o tempo e com o fornecimento de energia ou potência transferida ao caldo (P). Choy, Patel e Thibault (2011) cultivaram *Trichoderma reesei* RUT-C30 em sua forma filamentosa (*clumps* e hifas) para produção de proteínas e avaliaram a variação da morfologia durante o cultivo. Os autores verificaram que nem o tipo de dispositivo de mistura (impelidores) nem a velocidade de agitação (200 a 500 rpm) afetaram área e no perímetro de cada tipo morfológico. A influência da agitação na morfologia foi observada apenas para a unidade de crescimento hifal (HGU), que é definida como o comprimento total do microrganismo individual dividido pelo número de pontas de hifa, fornecendo uma medida indireta da ramificação da hifa. Paul, Kent e Thomas (1994) avaliaram a fragmentação de hifas na morfologia dispersa do fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum* em um biorreator convencional (TAA) e sugeriram que a fragmentação foi afetada tanto pelas condições de cisalhamento no biorreator, quanto pelo estado fisiológico das células e crescimento celular.

No presente trabalho, o fato dos ensaios terem sido realizados durante um curto período de tempo (4 h) permitiu às células manter um alto nível de saúde fisiológica, além de evitar a interferência de um possível crescimento celular, como possivelmente ocorrido em trabalho de Choy, Patel e Thibault (2011). Dessa forma, foi observado apenas o efeito hidrodinâmico na estrutura celular, permitindo que os ensaios fossem utilizados para a

previsão do comportamento de fragmentação durante cultivos prolongados.

O efeito da velocidade de agitação (N) na fragmentação celular está associado à taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ). Vários estudos relatam a relação de proporcionalidade entre  $\dot{\gamma}$  e N em tanques agitados (aerados ou não) equipados com diferentes impelidores (BUFFO et al., 2016; BUSTAMANTE; CERRI e BADINO, 2013; CAMPESI et al., 2009; KELLY e GIGAS, 2003; METZ; DEBRUIJN e VANSUIJDAM, 1981):

$$\dot{\gamma} \propto N^\alpha \quad (5.1)$$

onde, de acordo com a literatura, o expoente  $\alpha$  apresenta valores variando de 0,232 a 2,954.

Resumidamente, os resultados obtidos aqui mostraram que N afetou a dinâmica da fragmentação de pellets de duas maneiras: aumentando a magnitude da fragmentação ( $k_1$ ) e acelerando o processo de dano à estrutura dos pellets ( $k_2$ ). O aumento da fragmentação deveu-se provavelmente ao aumento da taxa de cisalhamento média ( $\dot{\gamma}_m$ ) e da frequência com que os pellets se aproximaram da zona de cisalhamento mais intensa, próxima aos impelidores. No entanto, é importante enfatizar que a fragmentação também depende da fisiologia e do tamanho do microrganismo.

### 5.2.2. Efeito das condições de aeração na fragmentação de pellets

Com relação ao efeito da aeração, as células podem ser danificadas por dois mecanismos (CHISTI, 1989; OH e NIENOW, 2000; ALRUBEAI e EMERY, 1992). O primeiro é o dano hidrodinâmico causado pelos perfis de velocidade do líquido dentro do biorreator (taxa de cisalhamento), com as estruturas morfológicas do microrganismo (como hifas e pellets) expostas a diferentes velocidades locais do líquido, de acordo com seu tamanho característico. O segundo mecanismo é o dano associado às bolhas de ar, que envolve interações bolha-líquido-célula e estão associadas a algumas características, como a formação de bolhas de ar nos orifícios dos aspersores, o aumento das bolhas ao longo do fluido e a dinâmica de quebra, coalescência e ruptura de bolhas na superfície do líquido. O dano causado pelas bolhas de ar representa um problema mais complexo no cultivo de células de tecido, devido à ausência de parede celular nessa estrutura celular. Em cultivos de microrganismos como fungos, a principal fonte de dano é geralmente o efeito hidrodinâmico no biorreator (CHISTI, 1989; OH e NIENOW, 2000; ALRUBEAI e EMERY, 1992).

Para avaliar o efeito das condições de aeração na fragmentação dos pellets foram realizados ensaios variando a vazão específica de alimentação de ar (0,40 e 1,20 vvm) utilizando as duas configurações de impelidores (RT-RT e EEDP-EEUP). Nos ensaios foi mantida a velocidade de rotação em 600 rpm, representando uma condição de agitação moderada. A Figura 5.2 ilustra os perfis temporais do diâmetro equivalente normalizado dos pellets ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) nos ensaios com biorreatores equipados com RT-RT (ensaios A2 e A3) e EEDP-EEUP (ensaios A7 e A8), operando com os diferentes valores de  $\phi_{ar}$ .

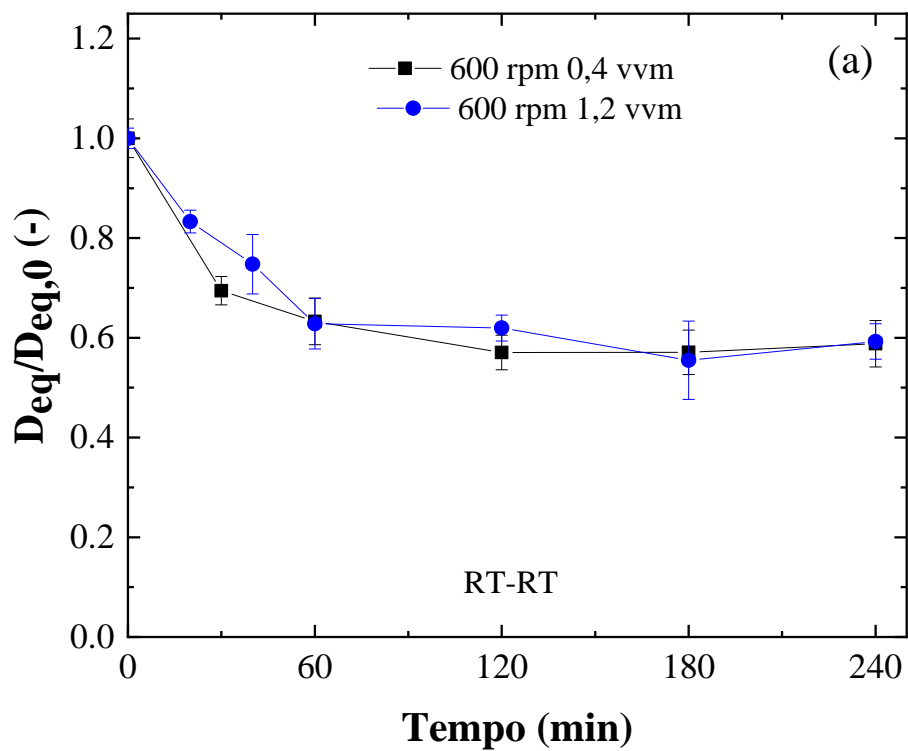
Nos ensaios com impelidores RT-RT não houve mudança significativa na dinâmica de fragmentação dos pellets com a alteração da vazão de alimentação de ar (Figura 5.2a). Nas duas condições de aeração (0,40 e 1,20 vvm), o tamanho final dos pellets correspondeu a aproximadamente 60% do valor inicial e, após cerca de 120 min, não foram mais observadas alterações no diâmetro do pellet. Por outro lado, quando utilizada a configuração do impelidor EEDP-EEUP, o aumento de  $\phi_{ar}$  promoveu uma diminuição na condição de cisalhamento, uma vez que os valores finais do diâmetro normalizado equivalente dos pellets ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) foram iguais a  $0,66\pm 0,03$  e  $0,55\pm 0,03$  (Figura 5.2b) nos ensaios a 1,20 vvm (A8) e 0,40 vvm (A7), respectivamente. Isso mostra que a fragmentação dos pellets foi menor quando empregada a maior vazão específica de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ). A diferença no efeito da aeração no cisalhamento em função da configuração de impelidores (RT-RT e EEDP-EEUP) está provavelmente relacionada ao tipo de padrão de escoamento imposto ao fluido por tais sistemas ao microrganismo. Os impelidores RT-RT apresentam um padrão de escoamento radial, enquanto os impelidores EEDP-EEUP impõem um escoamento misto (axial e radial) ao fluido (BUFFO et al., 2016).

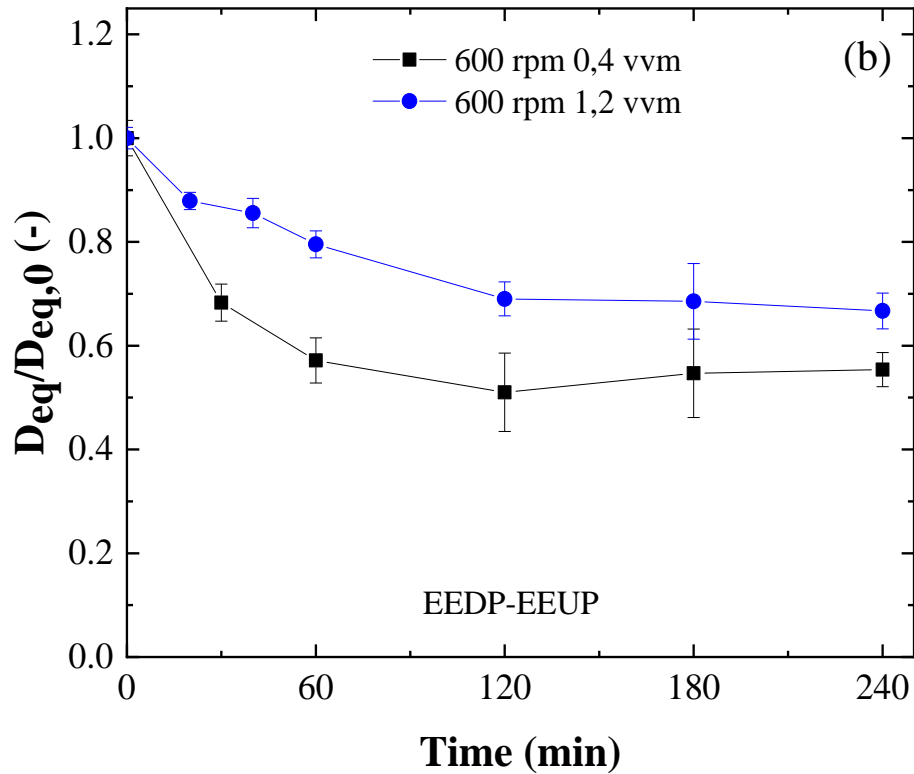
Tal fato pode influenciar principalmente no escoamento dos pellets dentro do biorreator e com isso gerar as diferenças de cisalhamento. Sabe-se que as maiores taxas de cisalhamento são observadas próximas aos impelidores (LU et al., 2015; SHAMLOU et al., 1994), assim, uma condição hidrodinâmica que dispersa os pellets dessa região pode ser vantajosa para evitar sua fragmentação. Dessa maneira, uma condição de aeração mais intensa pode ter levado a um efeito de inundação próximo aos impelidores (BUSTAMANTE; CERRI e BADINO, 2013), impedindo a aproximação dos pellets. Uma quantidade maior quantidade de ar fluindo pela região próxima aos impelidores pode ter formado uma camada protetora em torno deles.

Nas duas configurações de impelidores, a diminuição do consumo de energia causada pelo aumento da aeração também pode ter levado a uma menor fragmentação. No entanto,

como o efeito da aeração na redução da fragmentação foi observado apenas nos impelidores EEDP-EEUP, provavelmente a mesma está mais relacionada às características específicas desses impelidores, como discutido anteriormente.

Figura 5.2. Efeito da vazão específica de alimentação de ar ( $\phi_{ar}$ ) no diâmetro equivalente normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) de pellets de *A. niger* em biorreator TAA equipado com diferentes configurações de impelidores: (a) RT-RT; (b) EEDP-EEUP.





### 5.2.3 Efeito da configuração de impelidores na fragmentação dos pellets

O efeito da configuração do impelidor na fragmentação dos pellets foi avaliado usando ensaios conduzidos a 0,40 vvm, variando-se a frequência de rotação do eixo do agitador de 400 a 1000 rpm. Como mostrado na Figura 5.3 não houve diferença significativa na variação do diâmetro equivalente dos pellets nas diferentes configurações de impelidores. Por exemplo, após 4 h dos ensaios realizados a 600 rpm, os valores de  $D_{eq}/D_{eq,0}$  foram  $0,59 \pm 0,05$  e  $0,55 \pm 0,03$  quando utilizada a configuração RT-RT (ensaio A2) e EEDP-EEUP (ensaio A7), respectivamente. Portanto, foi constatado que a 0,40 vvm as condições de cisalhamento impostas aos pellets foram semelhantes nos sistemas com as duas configurações de impelidores.

Considerando o dano dos pellets a 0,40 vvm como único critério para selecionar a configuração de impelidores, não houve diferença entre as duas configurações avaliadas. No entanto, tal resultado não pode ser generalizado para outras estruturas morfológicas, uma vez

que trabalhos anteriores observaram diferenças entre impelidores, considerando os danos causados a aglomerados celulares (*clumps*) (JUSTEN et al. 1996). Além disso, a configuração EEDP-EEUP apresentou vantagem em termos das condições de cisalhamento com valores mais elevados de vazão de alimentação de ar (ensaios A3 e A8, Figura 5.3e). Relacionando tal condição de operação (600 rpm e 1,20 vvm) a outros parâmetros importantes de avaliação do biorreator, como o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ) e a eficiência da transferência de massa ( $E_{MT}$ ), razão entre  $k_{LA}$  e o consumo de energia, conforme descrito por BUFFO et al. (2016), verificou-se que o sistema com impelidores EEDP-EEUP apresentou um valor de  $k_{LA}$  122% maior e uma eficiência de transferência de massa 72% maior, em comparação ao sistema com impelidores turbina de Rushton.

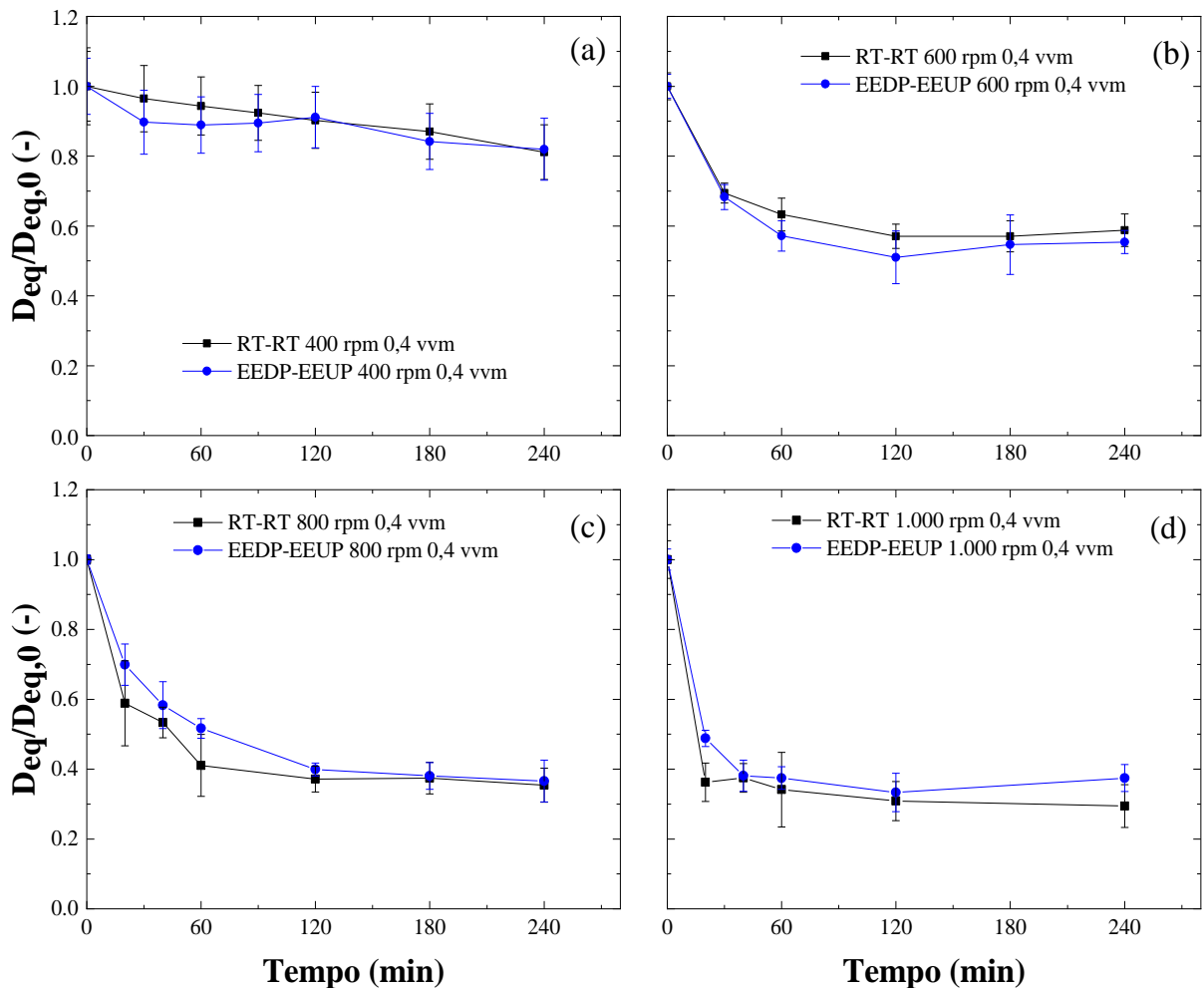
De maneira geral as configurações de impelidores apresentaram pouca diferença na fragmentação de pellets, quando operadas nas mesmas condições de agitação ou no mesmo FDCE. O comportamento observado no presente trabalho difere daquele observado nos estudos de Justen et al. (1996), onde a fragmentação dos microrganismos foi afetada pelo tipo de impelidor. Justen et al. (1996) avaliaram a fragmentação de *clumps* e hifas de *P. chrysogenum* em um tanque agitado equipado com diferentes impelidores (turbina de Rushton, Prochem Maxflow T, hélice marinha, Intermig e turbina de pás - *Paddles*). Os autores verificaram que para uma dada condição de potência transferida por volume de líquido ( $P.V^{-1}$ ), a fragmentação das hifas e *clumps* foi afetada pelo tipo de impelidor, com os impelidores tipo turbina de Rushton e turbina de pás não causando fragmentação significativa ao microrganismo, enquanto a turbina de lâminas inclinadas causou o maior dano às estruturas morfológicas. Uma possível explicação para a diferença entre esses resultados pode ser os diferentes tamanhos e morfologias dos microrganismos estudados. No presente trabalho, foram utilizados pellets macroscópicos com diâmetro inicial de aproximadamente 800  $\mu\text{m}$ , enquanto Justen et al. (1996) analisaram a fragmentação usando *clumps* de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , um tamanho característico quatro vezes menor. Além disso, houve diferenças nas estruturas morfológicas dos pellets e *clumps*, bem como nas fisiologias dos fungos filamentosos.

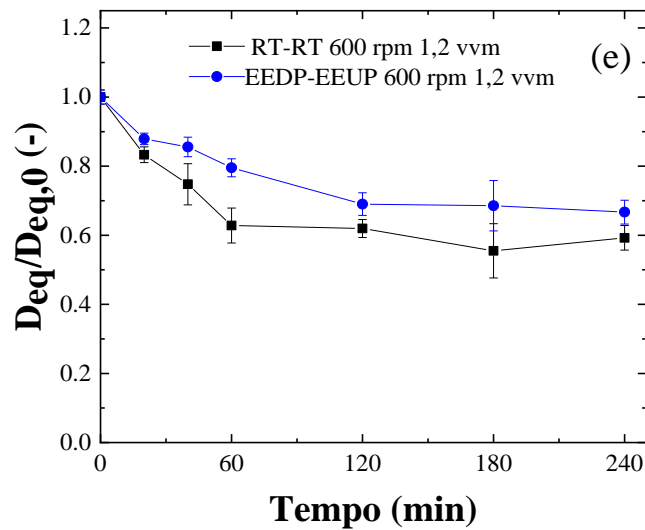
Sabe-se que o tamanho das estruturas celulares é influenciado pelos efeitos de cisalhamento de acordo com a escala de Kolmogorov ( $\lambda$ ). A teoria de Kolmogorov (1991) estabelece que estruturas morfológicas (ou células) maiores que a microescala de turbulência são danificadas pela micro turbulência, com a probabilidade de os danos serem maiores conforme o tamanho da estrutura morfológica aumenta. BUFFO et al. (2016) estimaram a



microescala de turbulência em um biorreator convencional equivalente ao utilizado no presente estudo, obtendo valores variando de 20 a 60  $\mu\text{m}$  na mesma faixa de condições operacionais. Como o tamanho do pellet (800  $\mu\text{m}$ ) corresponde a estruturas maiores que a microescala de turbulência ( $\lambda$ ), os pellets foram afetados pelas condições de cisalhamento, com a magnitude do dano dependente da estrutura fisiológica dos pellets.

Figura 5.3. Efeito da configuração de impelidores no diâmetro equivalente normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) de pellets de *A. niger* em biorreator tanque agitado e aerado operado sob diferentes condições de agitação e aeração.





#### 5.2.4. Mecanismo de fragmentação dos pellets

Shamlou et al. (1994) propuseram dois tipos principais de tensão que atuam em microrganismos filamentosos em biorreatores, a saber, a tensão devido a forças paralelas à superfície da partícula (tensão de cisalhamento,  $\tau$ ) e a tensão devido a forças normais à superfície da partícula (tensão normal). Segundo os autores, a predominância de um tipo particular de tensão depende do tamanho característico das partículas ( $L$ ) e do tamanho da microescala de Kolmogorov ( $\lambda$ ). Portanto, para  $L \ll \lambda$ , a desintegração das células fúngicas ocorre predominantemente pela ação do estresse de cisalhamento ( $\tau$ ), enquanto que para  $L \gg \lambda$ , a desintegração celular ocorre principalmente devido a forças normais. Para  $L \approx \lambda$  a desintegração ocorre devido a forças normais e de cisalhamento em conjunto.

A Figura 5.4 mostra como a fragmentação dos pellets ocorreu sob as diferentes condições de agitação ( $N$ ). Pode ser visto que houve a ocorrência de ambas as tensões, normais e de cisalhamento. Nas menores velocidades de agitação (400 rpm), o diâmetro do pellet diminuiu de maneira mais uniforme e suave, com predominância de forças de cisalhamento. Em velocidades mais altas (800 e 1000 rpm), houve uma diminuição abrupta do diâmetro equivalente dos pellets ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ), resultante da quebra em fragmentos menores, provavelmente devido à ação de tensões normais. Essa hipótese foi reforçada pela relação entre o tamanho característico dos pellets ( $L$ ) e o valor da microescala de Kolmogorov ( $\lambda$ ) para cada condição de agitação. A microescala de turbulência ( $\lambda$ ) tende a diminuir quando a velocidade de agitação aumenta (BUFFO *et al.*, 2016). Portanto, o valor da microescala de Kolmogorov foi maior a 400 rpm, com  $\lambda > 60 \mu\text{m}$  *et al.*, 2016), valor mais próximo de  $L$  que,

de acordo com a teoria, deve estar associado à ação das forças normal e de cisalhamento. Por outro lado, a 1000 rpm o valor da microescala de turbulência é menor, com  $\lambda$  podendo chegar a 20  $\mu\text{m}$  (BUFFO *et al.*, 2016), o que fez com que a diferença entre os valores de  $\lambda$  e  $L$  fosse maior ( $L \gg \lambda$ ) e, conseqüentemente, a microescala de turbulência atuasse na direção das partículas, perfurando-as e assim causando a fragmentação.

Para analisar a fragmentação dos pellets, a morfologia foi classificada de acordo com o diâmetro equivalente das mesmas. As seguintes classes foram estabelecidas:

- Class I  $\rightarrow$  pellets maiores:  $D_{eq} > 1,0 \text{ mm}$
- Class II  $\rightarrow$  pellets menores:  $0,5 < D_{eq} < 1,0 \text{ mm}$
- Class III  $\rightarrow$  fragmentos maiores de pellets:  $0,2 < D_{eq} < 0,5 \text{ mm}$
- Class IV  $\rightarrow$  fragmentos menores de pellets:  $D_{eq} < 0,2 \text{ mm}$

Com base nessa classificação, quantificou-se a porcentagem de pellets que sofreram fragmentação ou a porcentagem de pellets que permaneceram praticamente intactos, para cada condição operacional e sistema de impelidores. A Figura 5.5 mostra os perfis de distribuição percentual das classes, para cada configuração de impelidor e condição de agitação e aeração.

Figura 5.4. Perfil da fragmentação dos pellets ao longo do tempo para o ensaio com configuração de impelidores RT-RT operada a 0,4 vvm e em diferentes condições de agitação (N).

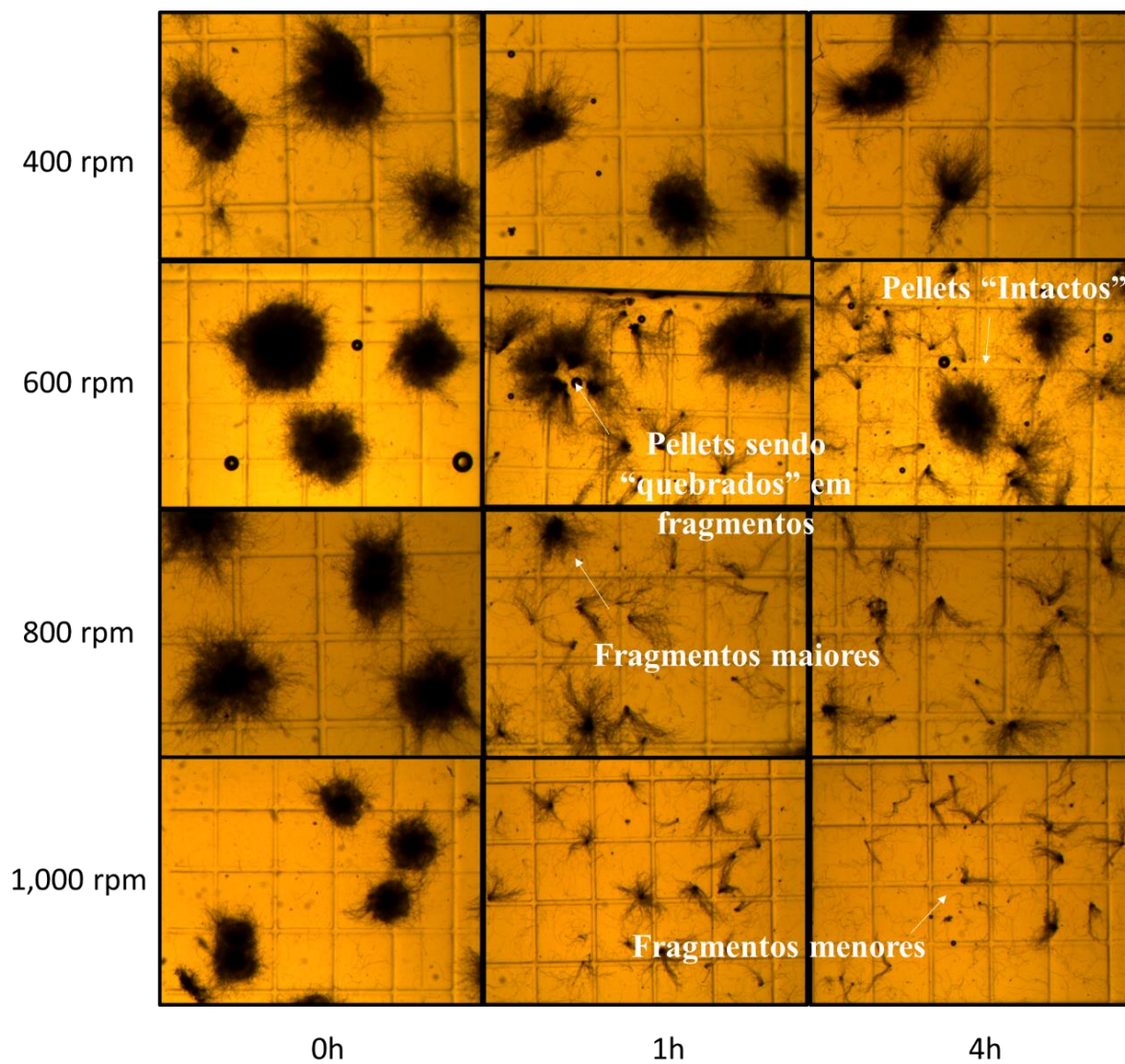
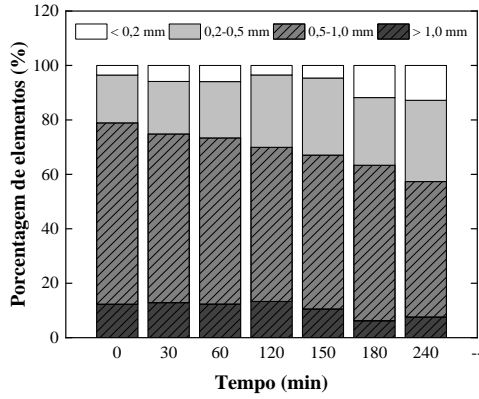
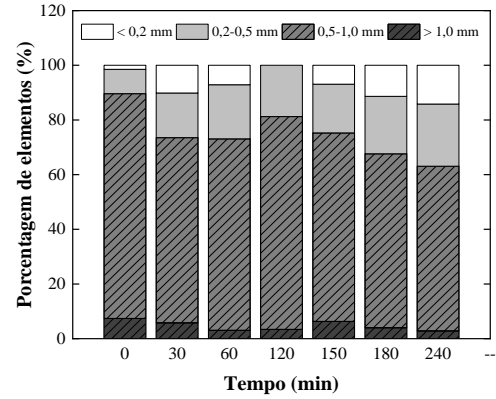


Figura 5.5. Perfis temporais das distribuições percentuais de cada classe de pellets durante os ensaios de fragmentação em biorreator tipo tanque agitado e aerado (TAA).

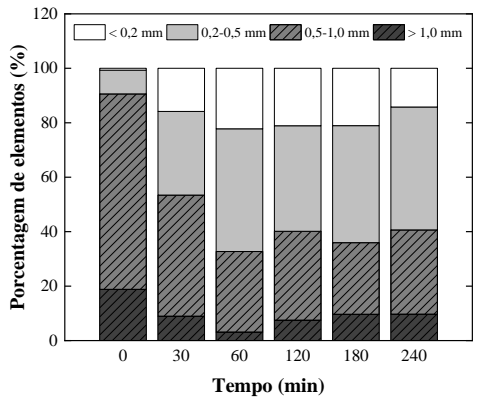
(a) RT-RT: 400 rpm e 0,40 vvm



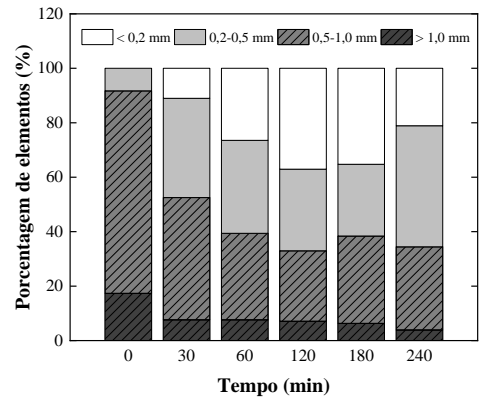
(f) EEDP-EEUP: 400 rpm e 0,40 vvm



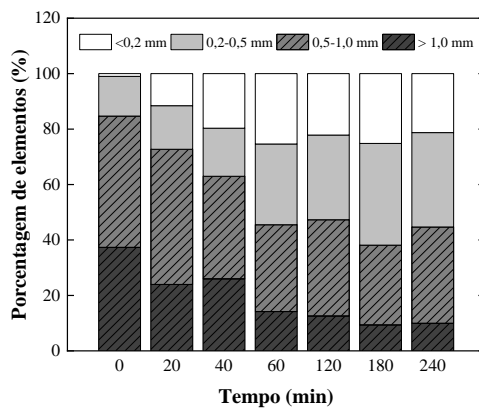
(b) RT-RT: 600 rpm e 0,40 vvm



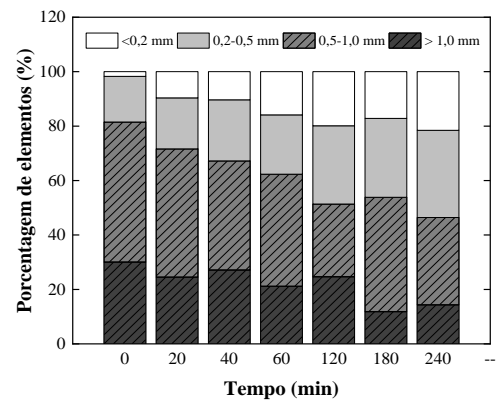
(g) EEDP-EEUP: 600 rpm e 0,40 vvm



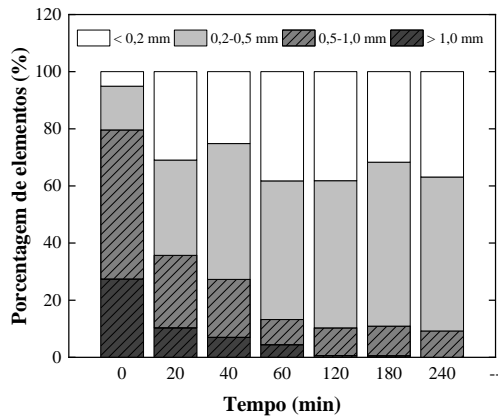
(c) RT-RT: 600 rpm e 1,20 vvm



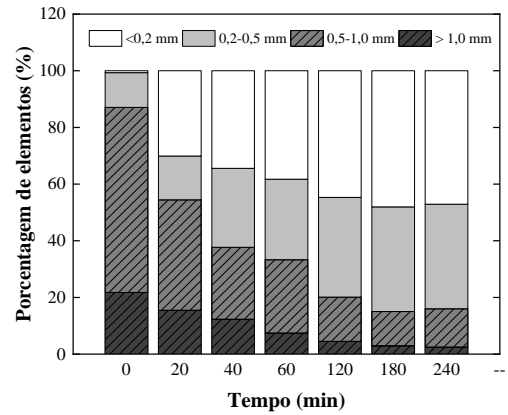
(h) EEDP-EEUP: 600 rpm e 1,20 vvm



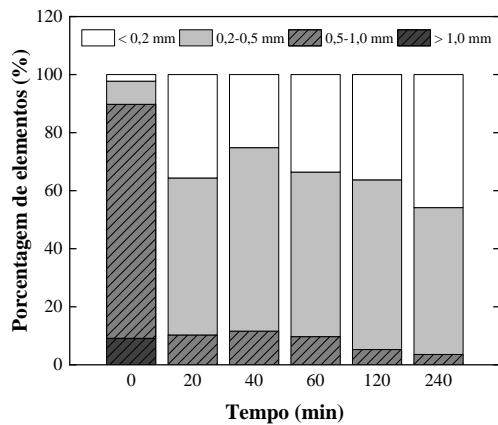
(d) RT-RT: 800 rpm e 0,40 vvm



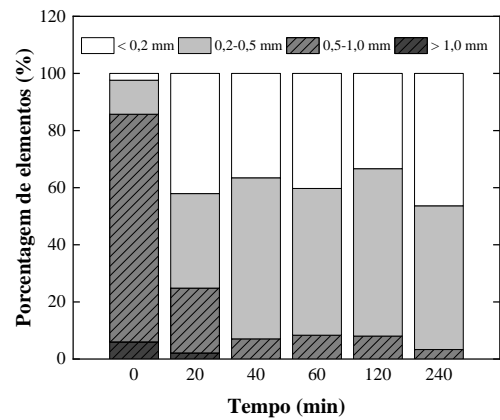
(i) EEDP-EEUP: 800 rpm e 0,40 vvm



(e) RT-RT: 1000 rpm e 0,40 vvm



(j) EEDP-EEUP: 1000 rpm e 0,40 vvm



A análise dos perfis de distribuição das classes de pellets (Figura 5.5) mostrou que a velocidade de agitação ( $N$ ) foi a variável com maior influência na fragmentação dos pellets. A 400 rpm (Figuras 5.5a e 5.5f), os ensaios começaram com 80% dos pellets exibindo tamanhos maiores que 0,5 mm (correspondendo às classes I e II). Após 4 h (240 min) de experimento, a proporção de pellets nessa faixa de tamanho diminuiu para aproximadamente 60%. Por outro lado, nos ensaios realizados a 1000 rpm (Figuras 5.5e e 5.5j), a população inicial apresentava cerca de 90% dos pellets com diâmetros equivalentes correspondentes às classes I e II (tamanhos maiores que 0,5 mm), enquanto que no final dos experimentos houve uma diminuição de  $D_{eq}$  abaixo de 10% do valor inicial.

Frequências de rotação de 400 e 1000 rpm definem condições com baixo e alto níveis de fragmentação, respectivamente. A 400 rpm, a resistência do pellet pareceu ser suficiente para evitar a fragmentação, resultado que fez com que a maioria dos pellets permanecesse

intactos, independentemente da configuração de impelidor empregada. A 1000 rpm, a condição de cisalhamento no biorreator foi muito mais intensa, resultando em uma redução substancial da população de pellets já nos primeiros 20 minutos do ensaio nas duas configurações de impelidores utilizadas. Como essas condições operacionais representaram os extremos em termos de fragmentação dos pellets (pouca e alta fragmentação), não foram observadas diferenças entre as configurações de impelidores, confirmando os resultados anteriores.

No ensaio a 800 rpm (Figuras 5.5d e 5.5i), a configuração EEDP-EEUP causou menos fragmentação do que a configuração RT-RT. Após 20 min, a proporção de pellets correspondentes às classes I e II foi de quase 60% com a configuração EEDP-EEUP, enquanto um valor de 40% foi obtido com a configuração RT-RT. No final do ensaio (4 h), as porcentagens de pellets foram semelhantes para as duas configurações de impelidores. Quando a configuração EEDP-EEUP foi empregada, ainda foi possível observar pellets da classe I, enquanto nenhum pellet desta classe foi observado quando empregada a configuração RT-RT. Portanto, a taxa com a qual a fragmentação ocorreu foi mais lenta com a configuração EEDP-EEUP do que com a RT-RT, embora a magnitude final do cisalhamento tenha sido parecida. Outro ponto a ser observado é que a 400 rpm (Figuras 5.5a e 5.5f), os pellets permaneceram praticamente na mesma faixa de tamanho (classes I e II), mostrando que os mesmos foram menos afetados pelo estresse normal, que provoca a ruptura abrupta dos pellets.

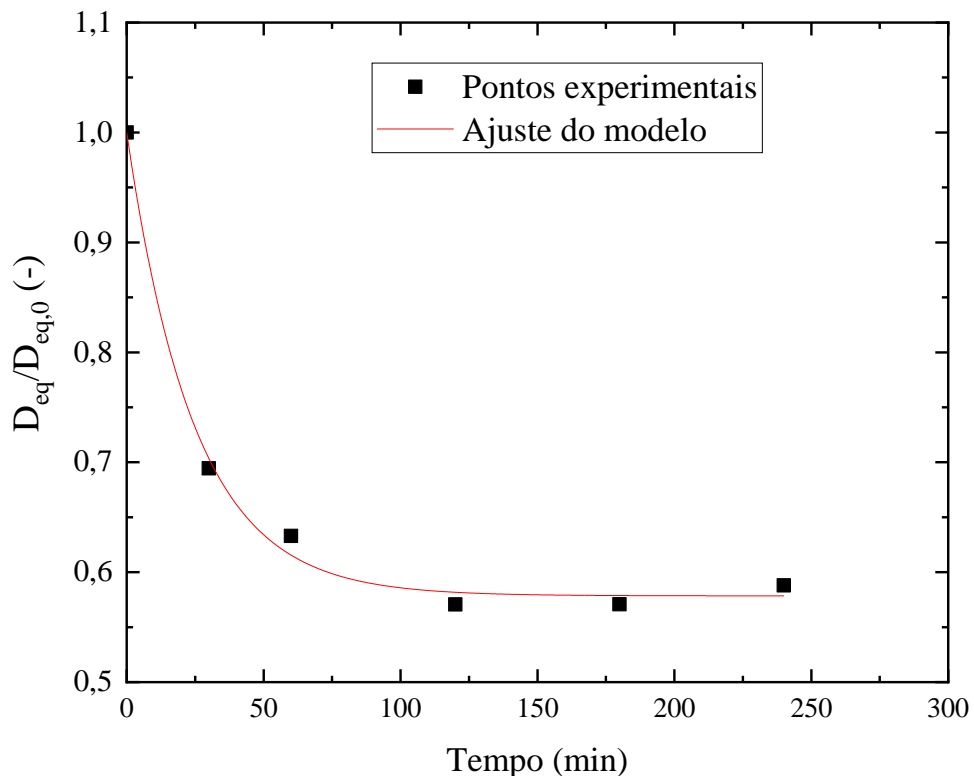
### **5.2.5. Cinética da fragmentação hidrodinâmica de pellets e relação com a produção de enzimas celulolíticas**

Após investigação da dinâmica de fragmentação de pellets para cada configuração de impelidores e condições de operação, o modelo descrito pela Equação 3.4 foi ajustado aos dados experimentais do diâmetro equivalente normalizado ( $D_{eq}/D_{eq,0}$ ) em função do tempo de ensaio, para a estimativa dos parâmetros cinéticos  $k_1$  (porcentagem de redução do diâmetro equivalente  $D_{eq}$  em relação ao valor inicial,  $D_{eq,0}$ ) e  $k_2$  (constante de velocidade de redução de  $D_{eq}$ ). Portanto, valores mais altos de  $k_1$  e  $k_2$  indicam, respectivamente, danos maiores e mais rápidos aos pellets.

$$\frac{D_{eq}}{D_{eq0}} = 1 - k_1 \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t}) \quad (3.4)$$

O modelo se ajustou adequadamente para todas as condições experimentais testadas, com valores de  $R^2$  superiores a 0,98 para todas as condições experimentais (Tabela 5.1). Um exemplo do ajuste do modelo aos pontos experimentais pode ser visualizado na Figura 5.6, para a condição de 600 rpm e 0,4 vvm.

Figura 5.6. Ajuste do modelo proposto aos pontos experimentais.



A Tabela 5.1 também apresenta os resultados do consumo específico de energia ( $P.V^{-1}$ ), função de dissipação/circulação de energia (FDCE), parâmetros de cisalhamento ( $k_1$  e  $k_2$ ) e os valores normalizados de produção de enzimas para as condições experimentais estudadas. Os valores de produção da enzima foram normalizados em relação ao valor mais alto de produção (variando de 0 a 100%).

Justen et al. (1996) também propuseram o uso da função de dissipação-circulação de energia (FDCE) para relacionar com a fragmentação de hifas e aglomerados em diferentes escalas de biorreatores equipados com diferentes impelidores, obtendo-se uma excelente correlação entre esses parâmetros. É importante determinar e analisar vários parâmetros de desempenho do biorreator, pois eles podem fornecer informações sobre a dinâmica dos fluidos



e as condições de cisalhamento, além de servirem como critério de aumento de escala (HARDY et al., 2017). Variáveis como a velocidade da ponta do impelidor, potência específica transferida ao líquido ( $P.V^{-1}$ ) e o FDCE podem ser usadas para serem relacionadas com grandezas como a velocidade específica de crescimento celular, viscosidade aparente do caldo e morfologia do fungo. Dentre todos os parâmetros de desempenho do biorreator, Hardy et al. (2017) observaram que o FDCE apresentou as melhores relações com a velocidade específica de crescimento celular, viscosidade aparente e morfologia do fungo *T. reesei*, sendo esse parâmetro utilizado com sucesso para aumento de escala de biorreatores. Os valores de FDCE relatados por Hardy et al. (2017) foram maiores (entre 100 e 1000  $\text{kW.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$ ) do que os observados no presente estudo, o que pode ser explicado pelas maiores condições de agitação utilizadas nos experimentos (800-1600 rpm).

Tabela 5.1. Parâmetros cinéticos de cisalhamento ( $k_1$  e  $k_2$ ), hidrodinâmicos ( $P.V^{-1}$ ,  $t_c$  e FDCE) e produção normalizada de enzimas (endoglucanase, EG, e  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -G) em função da configuração de impelidores e das condições de operação (N e  $\phi_{ar}$ ).

<b>Configuração de Impelidores</b>	<b><math>P.V^{-1}</math></b>	<b><math>t_c</math></b>	<b>FDCE</b>	<b><math>k_1</math></b>	<b><math>k_2</math></b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>EG<sup>a</sup></b>	<b>B-G<sup>b</sup></b>
<b>N (rpm) - <math>\phi_{ar}</math> (vvm)</b>	<b>(<math>\text{kW.m}^{-3}</math>)</b>	<b>(s)</b>	<b>(<math>\text{kW.m}^{-3}.\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b>(-)</b>	<b>(<math>\text{s}^{-1}</math>)</b>	<b>(-)</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
RT-RT: 400 – 0,40	1,1	1,81	5,3	0,20	0,33	0,99	71	60
RT-RT: 600 – 1,20	2,7	1,43	17,1	0,42	4,33	0,98		
RT-RT: 600 – 0,40	3,1	1,34	21,1	0,42	6,83	0,99	35	53
RT-RT: 800 – 0,40	7,3	1,29	51,2	0,63	7,33	0,98	0	100
RT-RT: 1000 – 0,40	12,2	1,26	88,2	0,68	20,50	0,99		
EEDP-UP: 400 – 0,40	0,9	1,37	5,0	0,17	3,17	0,98	100	56
EEDP-UP: 600 – 1,20	2,4	1,25	15,1	0,34	2,67	0,99		
EEDP-UP: 600 – 0,40	2,7	1,29	16,4	0,47	6,67	0,99	33	77
EEDP-UP: 800 – 0,40	5,8	1,17	38,9	0,62	4,67	0,99	0	84
EEDP-UP: 1000 – 0,40	10,3	1,14	71,0	0,64	13,17	0,99		

EG<sup>a</sup>: Atividade de endoglucanase em valores relativos ao maior valor.

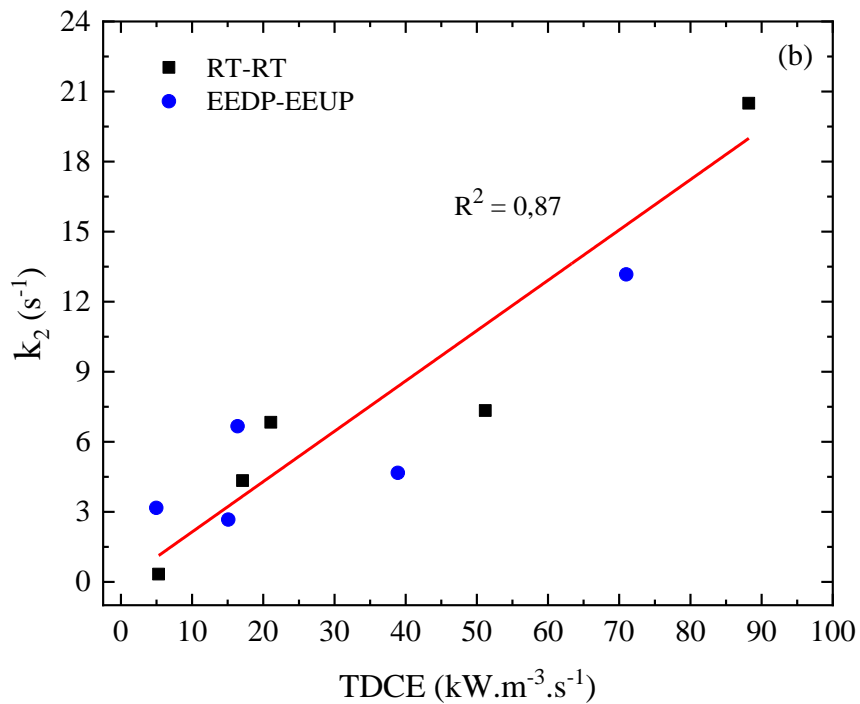
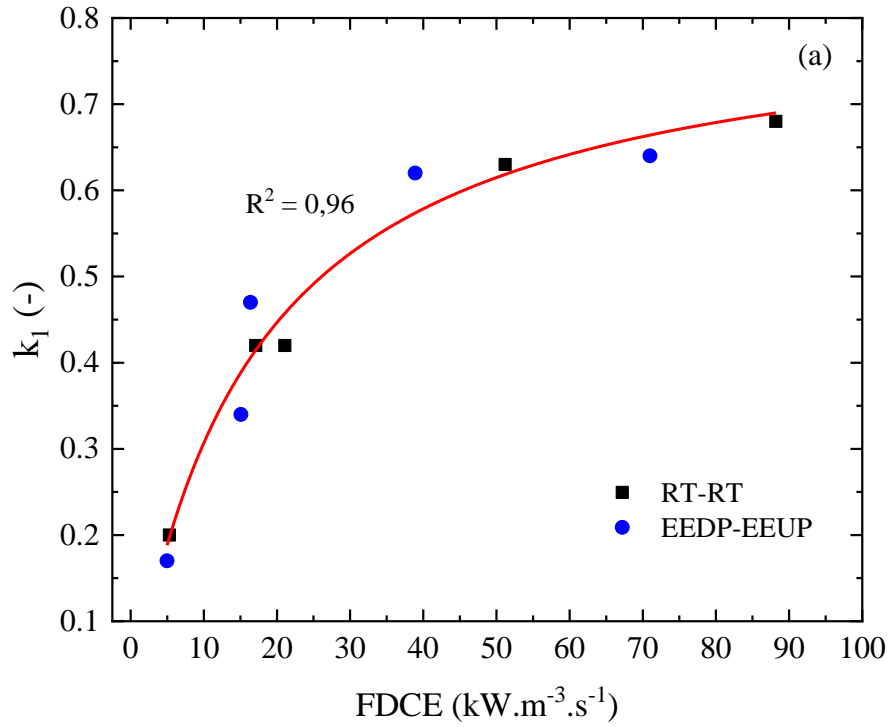
$\beta$ -G<sup>b</sup>: Atividade de  $\beta$ -glicosidase em valores relativos ao maior valor.

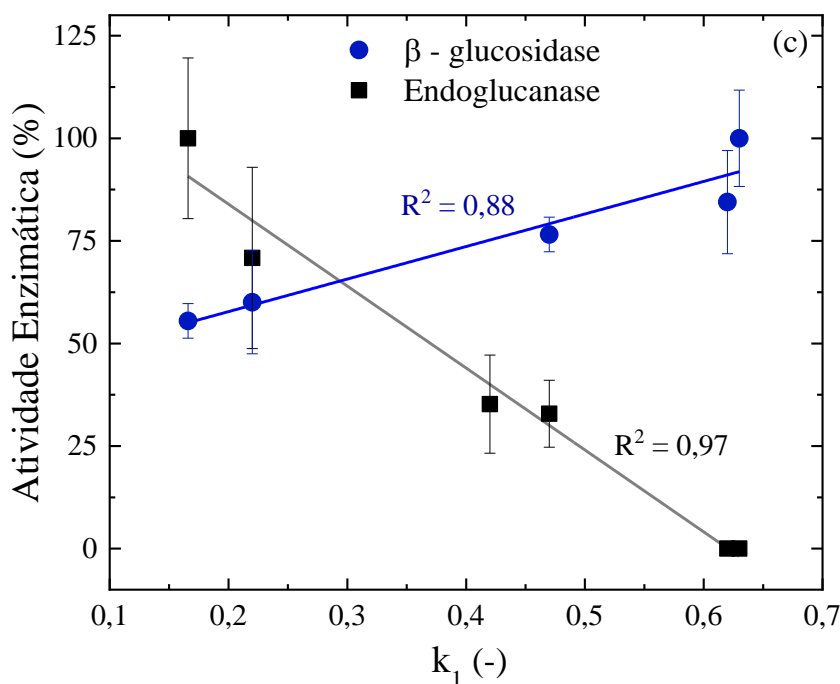
Os valores de  $k_1$  e  $k_2$  mostraram uma tendência de aumentar com o aumento da frequência de rotação (N) e da função de dissipação/circulação de energia (FDCE). Tanto N

quanto FDCE estão relacionados com a fragmentação dos pellets, tendo efeitos positivos. O valor de  $k_1$  foi semelhante nas duas configurações de impelidores, exceto nos ensaios realizados a 1,20 vvm, onde os impelidores EEDP-EEUP apresentaram menor cisalhamento, com um valor de  $k_1$  aproximadamente 20% menor. Os resultados também mostraram que o efeito de agitação foi ligeiramente menor para os impelidores orelha de elefante, principalmente nas frequências de rotação mais altas. Esse comportamento foi refletido na constante  $k_2$ , cujo valor a 800 rpm foi aproximadamente 36% maior para a configuração RT-RT. Tal comportamento está relacionado com o observado para os valores do FDCE, onde foi observada maior diferença entre as duas configurações de impelidores nas condições de agitação mais intensas (maiores N), confirmando que há uma forte relação entre o FDCE e a fragmentação dos pellets. As regressões realizadas entre os parâmetros de fragmentação de pellets ( $k_1$  e  $k_2$ ) e o parâmetro de desempenho do biorreator (FDCE) mostraram relações claras (Figura 5.7a e 5.7b). Além disso, os erros médios dos parâmetros foram inferiores a 3 e 13% para  $k_1$  e  $k_2$ , respectivamente e todos ajustes apresentaram um  $R^2$  bastante satisfatório.

As boas correlações entre os parâmetros cinéticos de cisalhamento ( $k_1$  e  $k_2$ ) e FDCE mostram que este pode ser um parâmetro satisfatório de desempenho para prever a fragmentação de pellets de *A. niger*. Observa-se uma relação hiperbólica entre  $k_1$  e FDCE ( $R^2=0,96$ , Figura 5.7a), enquanto uma dependência linear foi observada entre  $k_2$  e FDCE ( $R^2=0,87$ , Figura 5.7b). A correlação hiperbólica de  $k_1$  indica a ocorrência de uma "saturação" da fragmentação de pellets, considerando o tamanho final do pellet relacionado com o parâmetro  $k_1$ ). Isso significa que para valores de FDCE superiores a  $40 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ , praticamente nenhuma variação na fragmentação de pellets é observada, uma vez que houve apenas um ligeiro aumento de  $k_1$ . Por exemplo, para se atingir 90% do valor máximo de  $k_1$ , seria necessário um FDCE de  $135 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ , um valor 70% superior ao valor mais alto de FDCE encontrado experimentalmente. Portanto, mesmo para cultivos onde as condições de cisalhamento são favoráveis, não seria interessante aumentar tanto o fornecimento de energia. Também, é importante observar que as correlações foram estabelecidas com base nos resultados obtidos para as duas configurações de impelidores, mostrando que o FDCE pode ser usado como um parâmetro de desempenho representativo no biorreator.

Figura 5.7. Relações entre os parâmetros de cisalhamento ( $k_1$  e  $k_2$ ) e função de dissipação/circulação de energia (FDCE): (a)  $k_1$  em função de FDCE; (b)  $k_2$  em função de FDCE. (c) Atividade enzimática normalizada de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase em função do parâmetro de cisalhamento  $k_1$ .





A fim de avaliar o efeito da fragmentação dos pellets na produção de enzimas celulolíticas, foram realizados cultivos utilizando as duas configurações de impelidores sob condições operacionais específicas. Os resultados máximos de produção de enzimas foram normalizados em relação aos valores máximos obtidos em determinada condição e para cada enzima (Tabela 5.1), uma vez que o principal objetivo do trabalho foi analisar os impactos da morfologia gerado pelo ambiente hidrodinâmico do biorreator (condições de cisalhamento) na produção das enzimas. No caso da endoglucanase, não foi observada produção a 800 rpm nas duas configurações de impelidores estudadas, indicando que as condições de cisalhamento fragmentaram fortemente os pellets, impedindo a produção de tal enzima (Tabela 5.1). Os maiores valores de produção de endoglucanase foram obtidos na menor condição de agitação (400 rpm) com a configuração EEDP-EEUP fornecendo o valor mais alto, usado como referência (Tabela 5.1). Quando a configuração EEDP-EEUP foi operada a 400 rpm, foi necessário um aumento nas condições de aeração para evitar uma baixa concentração de oxigênio dissolvido. Curiosamente, comportamento oposto foi observado na produção de  $\beta$ -glucosidase, com maiores valores de produção alcançados em condições de agitação mais altas. A maior produção de  $\beta$ -glucosidase foi observada na configuração RT-RT a 800 rpm, que exibiu fragmentação dos pellets um pouco maior do que a observada com os impelidores EEDP-EEUP a 800 rpm (Figuras 5.5e e 5.5f).

Foi possível observar uma relação linear entre o parâmetro cinético  $k_1$  e a produção de enzimas endoglucanase e  $\beta$ -glucosidase (Figura 5.7c). Valores mais altos de  $k_1$ , associados a

condições de cisalhamento mais altas e morfologia mais fragmentada (Figura 5), levaram a uma menor produção de endoglucanase. Por outro lado, para a produção de  $\beta$ -glicosidase, um valor mais alto de  $k_1$  foi associado à maior produção dessa enzima (Figura 5.7c).

Em resumo a fragmentação dos pellets na produção de enzimas celulolíticas revelou comportamentos opostos para as duas enzimas, em função do parâmetro cinético  $k_1$  (Figura 5.7c). A produção de endoglucanase foi favorecida em condições mais suaves de cisalhamento (valores mais baixos de  $k_1$ ), enquanto a produção de  $\beta$ -glicosidase aumentou em condições mais intensas de cisalhamento (valores mais altos de  $k_1$ ). Um maior cisalhamento levou a um aumento da fragmentação do pellet, com a morfologia do *A. niger* mudando de pellets para hifas dispersas, possivelmente contribuindo para a maior produção de  $\beta$ -glicosidase. Para ambas as enzimas (endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase), a produção exibiu uma boa relação linear com  $k_1$ . Por outro lado, não foi observada correlação clara entre a produção das enzimas e o parâmetro cinético  $k_2$ , o que mostra que a produção foi afetada principalmente pela magnitude do cisalhamento, representada por  $k_1$ , e não pela velocidade da fragmentação, representada por  $k_2$ . Tal comportamento sugere que as possíveis razões para a relação entre produção e cisalhamento são a inativação dos pellets ou a alteração morfológica. É importante destacar que a morfologia também foi monitorada durante os cultivos de produção de enzimas. A partir dos resultados foi possível observar que a maior mudança morfológica ocorre, de fato, no início do cultivo, devido à ação das condições operacionais do biorreator.

A associação direta entre um parâmetro morfológico ou de cisalhamento e a produção de um produto de interesse não é fácil de ser estabelecida, existindo poucas informações na literatura. Diferentes condições de cisalhamento, principalmente relacionadas a alterações na taxa de dissipação/circulação de energia (FDCE), podem afetar a produção de enzimas celulolíticas de diferentes maneiras. Até onde se sabe, esse comportamento não foi relatado anteriormente. Estudos anteriores geralmente mostram que condições menos intensas de cisalhamento levam a uma produção enzimática superior. Em cultivos de *A. niger*, CUNHA et al. (2015) observaram que a menor velocidade de agitação testada (400 rpm) proporcionou maior produção de endoglucanase em cultivo em biorreator convencional com agitação realizada por duas turbinas de Rushton. Lan et al. (2013) observaram maior produção de endoglucanase (EG II) e celobio-hidrolase (CBH II) em reator de leito fibroso, fato que foi atribuído à condição de menor cisalhamento obtido nesse sistema. Patel et al. (2009) também encontraram atividades mais altas de FPase sob condições mais brandas de agitação (menor tensão de cisalhamento,  $\tau$ ), em cultivos realizados em dois tipos de biorreatores (convencional

e de placa). Com relação à produção de endoglucanase, pode-se notar que os resultados relatados na literatura estão de acordo com os observados no presente trabalho. No entanto, até o momento nenhum trabalho de literatura relacionou a produção de  $\beta$ -glicosidase às condições de cisalhamento.

### 5.3. Conclusões

A velocidade do impelidor (N) e a taxa de dissipação/circulação de energia (FDCE) tiveram uma forte influência na fragmentação dos pellets de *A. niger* em biorreator tanque agitado. Sob condições de agitação mais intensa, a configuração de impelidor EEDP-EEUP pareceu ser ligeiramente menos cisalhante do que a configuração RT-RT. Um modelo cinético empírico foi proposto para descrever o efeito das condições de cisalhamento na fragmentação de pellets, fornecendo valores de parâmetros que foram correlacionados com sucesso à produção de enzimas celulolíticas. Para ambas as associações de impelidores, uma velocidade de agitação mais alta (800 rpm) causou maior fragmentação dos pellets, aumentando a produção de  $\beta$ -glicosidase. No entanto, a produção de endoglucanase foi favorecida em cultivo empregando uma velocidade de agitação mais baixa (400 rpm), o que levou a uma menor fragmentação dos pellets. Os resultados do presente trabalho fornecem um guia para avaliação dos efeitos da morfologia e do cisalhamento de microrganismos na produção de outros produtos microbianos, auxiliando na seleção da configuração de impelidores e das condições operacionais em biorreatores convencionais, com base na condição de cisalhamento ou morfologia desejadas.

## **CAPÍTULO 6. Engenharia morfológica para expressão dirigida de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger***

**Resumo:** Nessa etapa do trabalho o foco é a morfologia microbiana, sendo essa uma ferramenta que pode ser usada para direcionar a expressão e secreção de proteínas em fungos filamentosos, como por exemplo *Aspergillus niger*. Tal fato tem um significado particular prático na produção de endoglucanases e  $\beta$ -glicosidases, nas quais a secreção de endoglucanase foi favorável em condições de menor agitação e morfologia pelletizada e a secreção de  $\beta$ -glicosidase favorável em morfologia dispersa. Em condições mais comuns de cultivo, o fungo filamentoso *A. niger* cresce de forma predominantemente pelletizada. A mudança morfológica de tal fungo, de pelletizada para dispersa, obtida pela ação do cisalhamento ou pela ação conjunta de uma diminuição no pH e aumento na concentração de esporos, dirigiu a expressão de proteínas de favorável à endoglucanase para favorável a  $\beta$ -glicosidase. Além disso, foi possível quantificar a mudança morfológica provocada por diferentes condições de pH e concentração de esporos através da proposição de um modelo que aponta para condições que resultam em determinada morfologia e, conseqüentemente, em alta seletividade para produção de endoglucanase ou  $\beta$ -glicosidase pelo microrganismo. Tal característica pode ser valiosa na obtenção de proporções desejadas dessas enzimas, em formulações controladas de caldos de fermentação ricos em endoglucanase ou  $\beta$ -glicosidase, gerados em biorreatores separados e, em seguida, combinados nas proporções desejadas, maximizando assim a produção enzimática *in house*, com a vantagem da utilização de apenas um microrganismo, o *A. niger*. Portanto, o presente trabalho identifica condições que direcionam a expressão de enzimas por *A. niger* para produção de endoglucanase ou  $\beta$ -glicosidase e propõe um modelo que relaciona o rendimento de tais enzimas em função da morfologia do fungo, fornecendo uma ferramenta de engenharia bastante útil para produção das mesmas.

Palavras-chave: Engenharia morfológica, enzimas, (hemi) celulases, fungos filamentosos, *A. niger*.

## 6.1. Introdução

Uma economia mundial de base biológica está emergindo em resposta aos desafios globais e ambientais. Associado a isso, tem-se a necessidade de reduzir a dependência em relação a produtos baseados em fontes fósseis. A União Europeia, por exemplo, tem o objetivo ambicioso de produzir 30% de todos os produtos químicos e materiais industriais baseados em materiais renováveis e/ou bioprocessos até o ano 2030 (ZENG, 2019). Uma grande variedade de produtos de base biológica é geralmente produzida industrialmente em biorreatores por culturas submersas de microrganismos filamentosos. Esses exibem um comportamento morfológico complexo, com formas morfológicas classificadas em pellets, *clumps* e micélio disperso, que inclui hifas ramificadas e isoladas (QUINTANILLA et al., 2015).

Do ponto de vista da engenharia de bioprocessos, a morfologia microbiana e as formas de crescimento tem um impacto importante nas condições internas do biorreator, como reologia do caldo, transferência de oxigênio e condições de cisalhamento, que por sua vez estão intimamente ligadas à eficiência de produção no biorreator (EL-ENSHASY, 2007; KRULL et al., 2013; SERRANO-CARREON et al., 2015). O contrário também ocorre, ou seja, o biorreator e os impelidores podem influenciar a morfologia e o crescimento dos fungos, principalmente devido às condições de cisalhamento e transferência de oxigênio (BUFFO et al., 2016; JUSTEN et al., 1996). Portanto, manipular a morfologia do microrganismo continua tendo considerável interesse no aumento da produção de importantes produtos de base biológica (MCINTYRE, 2001; VEITER; RAJAMANICKAM e HERWIG, 2018).

Relatos da literatura demonstram diferentes métodos para modificar a morfologia de fungos filamentosos, a fim de melhorar a produção de um produto específico desejado. Essas diferentes ferramentas chamadas de engenharia morfológica incluem alterar a concentração de esporos (PAPAGIANNI e MATTEY, 2006) ou o pH do inóculo (COLIN, BAIGORII e PERA, 2013); alterar a osmolaridade do meio de cultivo (WUCHERPFENNIG, HESTLER e KRULL, 2011) e utilizar micropartículas (DRIOUCH et al., 2012; DRIOUCH, SOMMER e WITTMANN, 2010). Técnicas para modificar a morfologia microbiana geralmente dependem do tipo de microrganismo e/ou cepa, o que traz desafios em relação a definição de protocolos para a seleção de condições apropriadas de bioprocessos ou condições específicas para produtos de base biológica.

As enzimas representam um produto de base biológica que tem um papel importante nas indústrias de alimentos, ração animal, papel e celulose e na produção de bioetanol. Em



relação à produção de enzimas celulolíticas, a literatura não possui consenso sobre qual a morfologia mais vantajosa. Por exemplo, Ahamed e Vermette (2009) compararam diferentes meios de cultura para a produção de celulases por *T. reesei*, onde cada meio gerou diferentes macromorfologias dispersas. Os autores concluíram que a morfologia com o maior número de pontas de hifas apresentou os melhores resultados em termos de produção de celulases. Entretanto, o maior rendimento em celulases não pode ser atribuído apenas à morfologia, uma vez que os meios de cultura foram diferentes. Por outro lado, Callow e Ju (2012) cultivaram *T. reesei* em forma de pellets pela adição de surfactantes ("rhamnolipid" e Triton X-100), resultando em um aumento da produção de celulases em 73%, em comparação ao cultivo na ausência de surfactantes e morfologia predominantemente dispersa. Mais recentemente, Dong et al. (2018) usaram micropartículas de óxido de alumínio para alterar a morfologia do fungo *T. viride*, reduzindo o diâmetro do tamanho de pellets em três vezes, resultando em um aumento de 17% na produção de celulase.

*A. niger* é outro importante fungo filamentosos utilizado na produção de celulases. Além do status “geralmente reconhecido como seguro” (*GRAS*) pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA), tal fungo é um bom produtor de endoglucanase, xilanase (CUNHA et al., 2015) e  $\beta$ -glicosidase (VASCONCELLOS et al., 2016), com o potencial de que uma alteração na morfologia possa melhorar a produção dessas enzimas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar como uma mudança na morfologia de *A. niger* influenciaria a produção de enzimas celulolíticas. O inóculo foi preparado em diferentes condições de cultivo, utilizando-se de diferentes concentrações de esporos ( $C_E$ ) e pH, por meio de planejamento experimental fatorial, ferramenta utilizada para orientar a seleção de diferentes condições. Usando diferentes morfologias de inóculo (pellets, *clumps* e hifas ramificadas/isoladas) e tipos de impelidores, o microrganismo pode ser direcionado para produzir seletivamente um tipo de enzima sobre o outro. As formas dispersas de *A. niger* podem ser obtidas aumentando, por exemplo, a concentração de esporos do inóculo ou aumentando a agitação (cisalhamento). No presente trabalho, a obtenção de uma morfologia dispersa favoreceu a expressão  $\beta$ -glicosidase em relação a enzima endoglucanase, cuja melhor produção foi resultante de formas pelletizadas desse fungo. A engenharia morfológica pode ser uma maneira eficaz de melhoria da produção de enzimas celulolíticas e, conseqüentemente, melhorar eficiência da hidrólise de materiais celulósicos (SRIVASTAVA et al., 2019).

## 6.2. Resultados e Discussão

### 6.2.1. Modificação do inóculo para obter diferentes morfologias

Um procedimento simples e econômico para alterar a morfologia dos fungos filamentosos é alterar o pH ou a concentração de esporos. O delineamento fatorial  $2^2$  foi utilizado como ferramenta estatística para avaliar a variação concomitante do pH e da concentração de esporos do inóculo para obter diferentes formas morfológicas. Anteriormente à análise estatística, cada classe morfológica obtida nos ensaios foi analisada em termos dos principais parâmetros morfológicos, tais como área projetada e diâmetro de hifas ou pellets. A Tabela 6.1 mostra as grandezas características medidas ou calculadas para os elementos (hifas, *clumps* e pellets) nas diferentes condições de pH e  $C_E$  testadas.

Tabela 6.1. Medidas características das principais classes morfológicas (pellets, clumps e

Ensaio	$C_E$ (esp.mL <sup>-1</sup> )	pH (-)	$A_P$ (mm <sup>2</sup> )	$A_{mi}$ (=f <sub>i</sub> ) (mm <sup>2</sup> )	$D_i$ (mm <sup>2</sup> )	L (mm)	Porcentagem Morfologia ( $0 \leq A_i/A_T \leq 1$ )	Y (mm <sup>2</sup> )
0	$1 \times 10^7$	4,5	0,57	2,27	0,849		100% Pellets	2,27
1	$5 \times 10^3$	2,0	0,11	0,34	0,003	39,4	100% Clumps	0,34
2	$5 \times 10^7$	2,0	$5 \times 10^{-4}$ 0,41	$1,56 \times 10^{-3}$ 1,24	0,003 0,629	0,2	92% Disperso 8% Pellets	$9,92 \times 10^{-2}$
3	$5 \times 10^3$	6,0	25,4	96,97	5,556		100% Pellets	96,97
4	$5 \times 10^7$	6,0	$1 \times 10^{-3}$ 0,26	$3,99 \times 10^{-3}$ 1,00	0,564 0,003	0,5	82% Disperso 18% Pellets	0,18
5	$5 \times 10^5$	4,0	11,8	46,37	3,842		100% Pellets	46,37

dispersa) e resposta quantitativa para morfologia (Y).

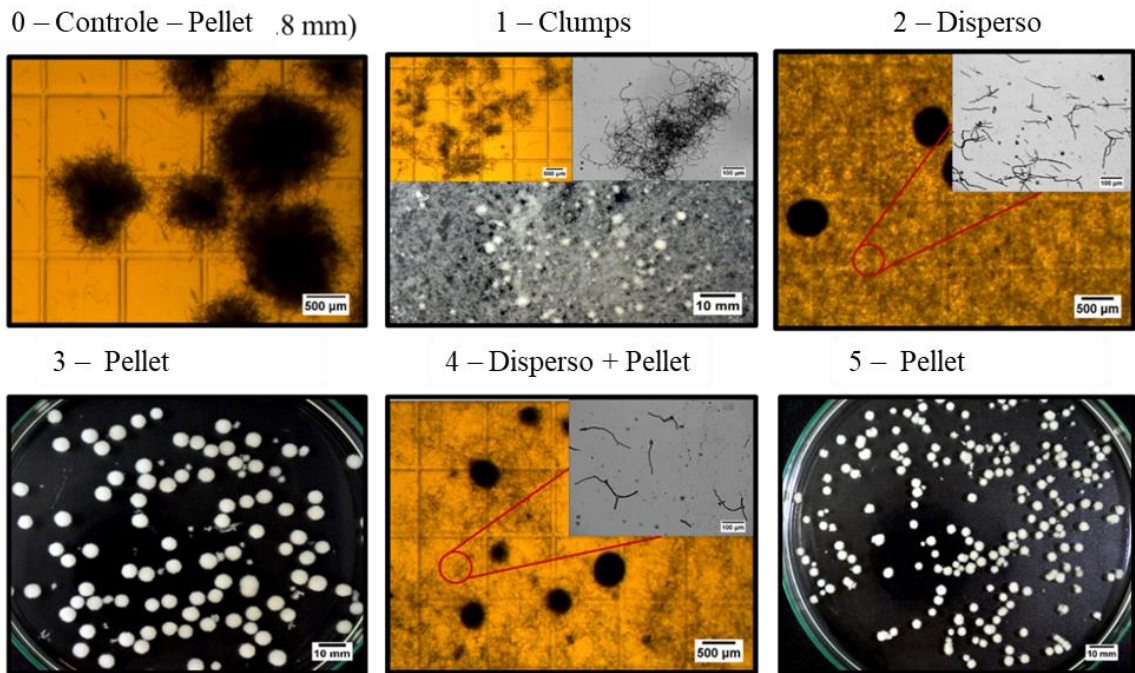
As medidas da Tabela 6.1 são características médias, obtidas para os elementos morfológicos (pellets, *clumps* e micélio disperso), sendo  $A_P$  a área projetada,  $D_i$  o diâmetro das hifas ou dos pellets, ambos obtidos pelo *software* ImageJ, L o comprimento total de hifas ou *clumps*, estimado pela área projetada ( $A_P$ ),  $A_M$  é a área molhada ou a área lateral de um cilindro ou esfera, baseado no volume de uma esfera ou um cilindro.

Com as medidas características obtidas e a estimativa da quantidade de cada classe

morfológica presente ( $A_i/A_T$ ), foi possível estimar valores de  $Y$  para cada condição de cultivo pela Equação 3.5. A Tabela 6.1 também apresenta as morfologias finais obtidas e os valores do fator  $Y$  calculado (Equação 3.5) para as diferentes condições de pH e concentração de esporos ( $C_E$ ), sendo que  $Y$  indica uma resposta quantitativa para a morfologia. Para o cálculo do valor de  $Y$  foi utilizada a área molhada ( $A_M$ ) como parâmetro característico e a frequência de casa classe morfológica nos ensaios, representada pela razão entre a área total de um elemento e a área de todos os elementos ( $A_i/A_T$ ). Dessa forma, valores maiores de  $Y$  levam a uma morfologia pelletizada e valores menores à morfologia mais dispersa, isso por que o tamanho característico de cada elemento morfológico possui grandezas diferentes. Além disso, a Tabela 6.1 traz também os dados obtidos usando uma condição padrão (Cunha et al., 2015). Os resultados mostram que uma variedade de diferentes morfologias foi obtida, desde pellets (ensaios 3 a 5) a *clumps* (ensaio 1), até morfologia predominante dispersa (ensaio 2). Uma ilustração das diferentes morfologias obtidas em cada condição de cultivo pode ser visualizada na Figura 6.1.

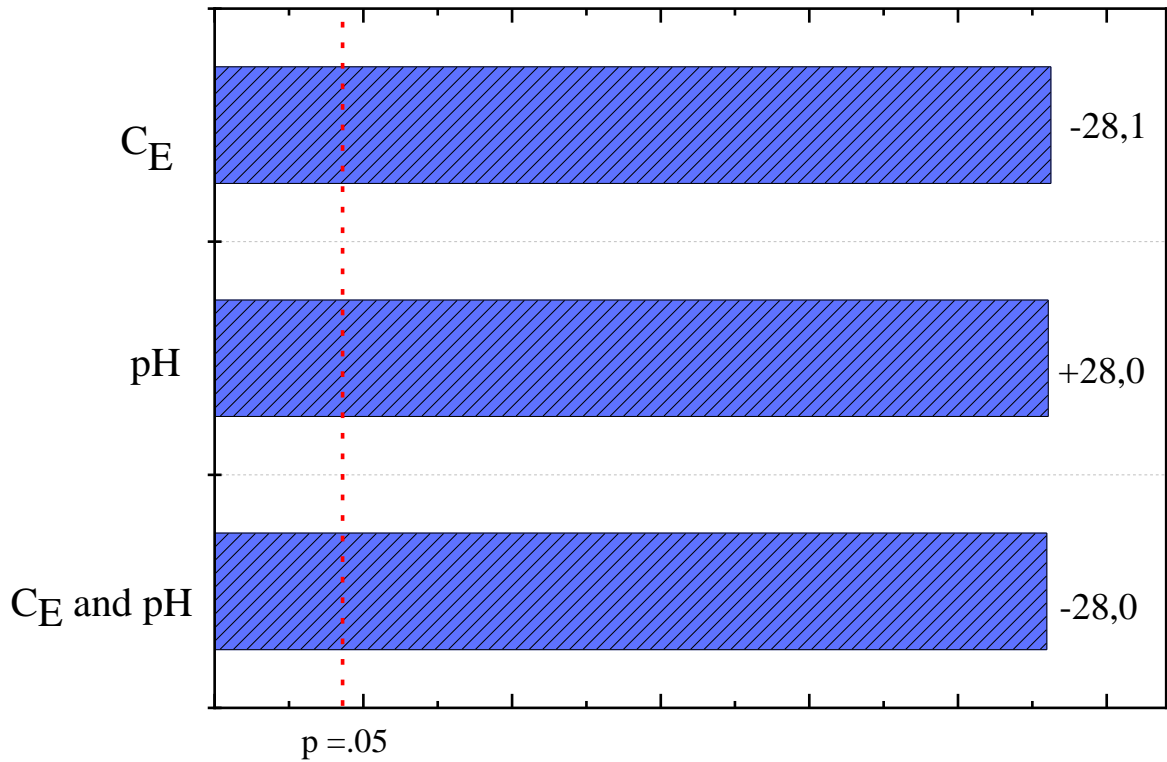
Como previsto, valores mais altos de  $Y$  são obtidos em ensaios que apresentam morfologia predominantemente de pellets e valores menores de  $Y$  em ensaios com morfologia predominantemente dispersa (Figura 3.7). Através do procedimento adotado de estabelecer uma quantificação das morfologias foi possível gerar dados para análise estatística e consequentemente obter o gráfico de Pareto (Figura 6.2), onde são apresentados os efeitos das variáveis pH e concentração de esporos ( $C_E$ ) na morfologia final obtida. Na Figura 6.2, efeitos significativos são verificados através da linha vermelha tracejada, obtida em um nível de confiança de 5%, sendo que valores de efeito absoluto maiores que os demarcados pela linha vermelha têm significância estatística. Analisando o gráfico, observa-se que todos os efeitos são estatisticamente significativos na morfologia, sendo semelhantes em valores absolutos.

Figura 6.1. Morfologias dos inóculos obtidos nas condições detalhadas na Tabela 6.1.



Legenda: Barra de escala das imagens obtidas em câmera é de 10 mm, barra de escala das imagens de estereoscópio é de 500 μm e barra de escala das imagens microscópicas é de 100 μm.

Figura 6.2. Análise dos efeitos das variáveis concentração de esporos ( $C_E$ ) e pH na morfologia fúngica (Y).



A concentração de esporos tem um efeito ligeiramente maior e negativo. O efeito negativo indica que um aumento dessa variável leva a diminuição do valor de Y, ou seja, diminuição na escala morfológica, com o fungo tendendo a crescer mais disperso (Figura 3.7). Por outro lado, o efeito do pH foi positivo, o que significa que o aumento do pH favorece o aumento do valor de Y, ou seja, é favorável a formação de pellets (Figura 3.7). O efeito de interação das duas variáveis também foi significativo e na mesma magnitude daqueles das variáveis separadamente, mostrando que a estratégia utilizada de alterar o pH e a concentração de esporos conjuntamente foi adequada para se obter uma maior variedade de diferentes morfologias. A mudança concomitante de pH e concentração de esporos para modificar a morfologia fúngica de *A. niger* não havia sido investigada anteriormente. Papagianni e Mattey (2006) alteraram apenas a concentração de esporos, enquanto Colin, Baigorii e Pera (2013) alteraram apenas o pH em estudos para produção de ácido cítrico e enzima, respectivamente.

O mecanismo de formação de pellets em várias espécies de *Aspergillus*, incluindo *A. niger*, ocorre através da coagulação de esporos, que aglutinam e germinam em pellets (NIELSEN, 1996). Assim, a morfologia de *A. niger* é geralmente definida no início do processo de cultivo e depende da agregação ou não dos esporos. Os principais fatores que influenciam a agregação de esporos são as forças que atuam sobre eles, classificadas em interações inespecíficas (interações eletrostáticas, forças de van der Waals, repulsão eletrostática e hidrofobicidade) e interações específicas (componentes da parede de esporos) (ZHANG e ZHANG, 2016). Ambas as variáveis, pH e concentração de esporos, podem alterar essas forças. O pH pode alterar o ponto isoelétrico da solução e, conseqüentemente, alterar a carga superficial dos esporos, o que interfere em sua atração-repulsão. O pH também interfere na hidrofobicidade dos esporos. A concentração de esporos altera o número de elementos em solução, afetando a interação esporo-esporo e aumentando ou diminuindo sua atração-repulsão (ZHANG E ZHANG, 2016).

Com relação à influência da concentração de esporos, os resultados estão de acordo com os observados por Papagianni e Mattey (2006), onde os autores cultivaram *A. niger* em biorreator tanque agitado e aerado para a produção de ácido cítrico e avaliaram o efeito da concentração inicial de esporos do inóculo na morfologia do fungo. Os autores descobriram que na presença de valores mais altos de concentração inicial de esporos, houve predominância da morfologia dispersa, sendo a faixa de concentração de esporos usada no trabalho de  $10^4$  a  $10^9$  esporos.mL<sup>-1</sup>.

Com relação ao pH, os resultados encontrados para o fungo *A. niger* também

concordam com os relatos da literatura. Grimm et al. (2005) estudaram a influência das condições operacionais (agitação e aeração) e do pH na agregação de esporos de *A. niger* durante as primeiras 15 h de cultivo. Observou-se que o diâmetro do pellet diminuiu com a redução do pH, ou seja, a agregação de esporos foi menor em valores mais baixos de pH, sendo a faixa de pH estudada de 2 a 8. Tais efeitos observados estão relacionados à influência do pH no potencial elétrico das superfícies dos esporos. Os potenciais zeta medidos foram negativos para todos os valores de pH, tornando-se ainda mais negativos à medida que o pH diminuiu, o que, por sua vez, aumentou a repulsão.

Colin, Baigorii e Pera (2013) avaliaram quantitativamente a morfologia das hifas e a adesão de esporos de *A. niger* sob diferentes condições de cultivo, além disso, verificaram como tais parâmetros afetaram a macro morfologia dos fungos. Os autores notaram que o pH inicial alterou fortemente a adesão dos esporos. Em pH 2 foi observada menor adesão dos esporos no início e durante o cultivo, o que resultou em uma morfologia dispersa. Por outro lado, com o aumento do pH inicial, a adesão dos esporos aumentou com o tempo, resultando em morfologia pelletizada. Nesse caso, o tamanho e a concentração dos pellets variaram de pequenos e em grandes números em pH 3, a grandes e em pequenos números em pH 8.

No presente trabalho, a agregação de esporos no início do cultivo também foi determinante para a morfologia. Os cultivos que culminaram em pellets apresentaram um maior número de esporos agregados, enquanto as culturas dispersas exibiram maior dispersão dos esporos. No entanto, em alguns casos, a mudança na morfologia ocorreu durante o crescimento. Vale a pena mencionar novamente que a combinação entre pH e concentração de esporos, versus estudá-los separadamente, gerou uma gama mais ampla de morfologias. No presente estudo, assim como no estudo de Colin, Baigorii e Pera (2013), não foi observada morfologia dispersa alterando-se apenas o pH.

Para a sequência do presente estudo, três diferentes morfologias (pellets/controle: código 0, *clumps*: código 1 e disperso: código 2) foram escolhidas para serem empregadas em ensaios de produção de enzimas. O crescimento do inóculo foi verificado previamente, uma vez que cada condição apresentava pH e concentração de esporos diferentes. Sendo importante que os três inóculos estivessem em fase de crescimento exponencial e com concentração fúngica semelhante, quando utilizados para iniciar a fase de produção, assim os resultados obtidos teriam uma maior consistência. A Figura 6.3 e a Tabela 6.2 mostram os resultados das concentrações celular e de glicose ao longo do crescimento do inóculo.

Para as morfologias de pellets e dispersa, o tempo de 24 h mostrou-se mais adequado,

pois nesse tempo o inóculo apresentava-se no final da fase exponencial de crescimento e com aproximadamente  $7 \text{ g.L}^{-1}$  de massa seca. Para a morfologia de *clumps*, o final da fase exponencial, que também resultou em uma concentração em massa seca de aproximadamente  $7 \text{ g.L}^{-1}$ , foi obtida no tempo de 40 h (Figura 6.3).

Figura 6.3. Concentrações de glicose (linha sólida e símbolo completo) e de células (linha tracejada e símbolo vazio) ao longo do tempo de crescimento do inóculo nas diferentes morfologias dos fungos.

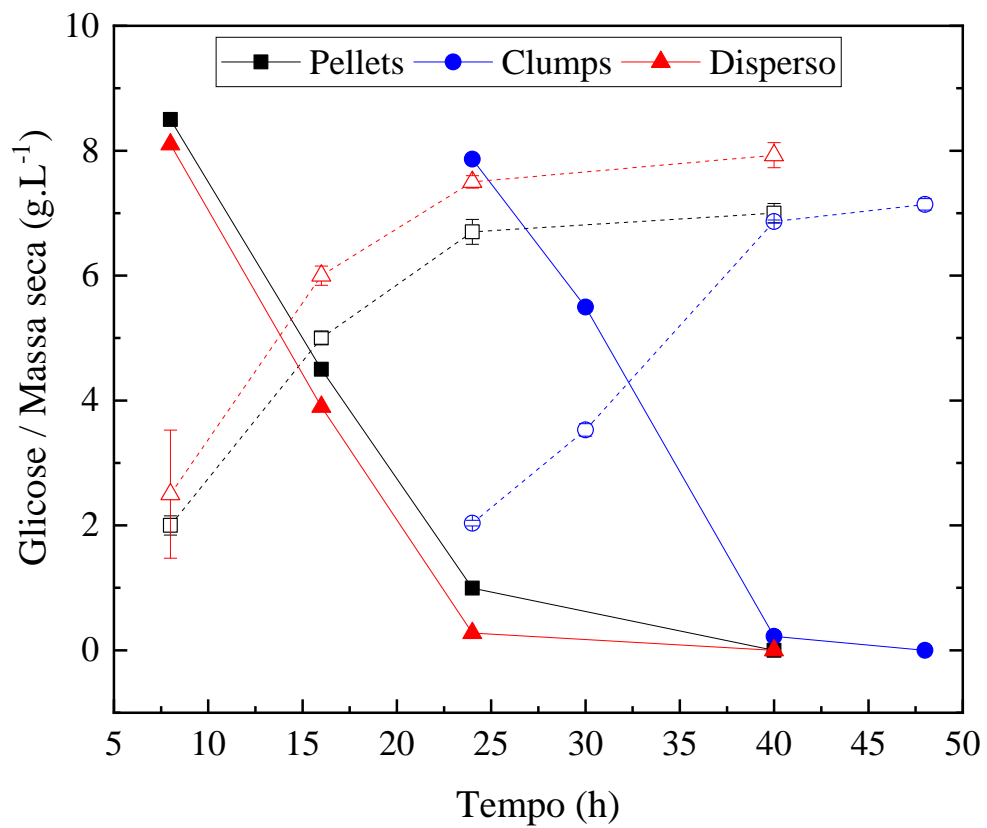


Tabela 6.2. Crescimento celular do inóculo com diferentes morfologias.

Código	Morfologia	C <sub>E</sub> (esporos.mL <sup>-1</sup> )	pH (-)	Massa seca (g.L <sup>-1</sup> )		Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	
				24 h	40 h	24 h	40 h
0	Pellet	10 <sup>7</sup>	4,5	6,7	7,0	1,0	0,0
1	<i>Clumps</i>	5×10 <sup>3</sup>	2,0	2,0	7,1	7,9	0,2
2	Dispersa	5×10 <sup>7</sup>	2,0	7,5	7,9	0,3	0,0

### 6.2.2. Produção de enzimas celulolíticas em frascos agitados

As três diferentes morfologias dos inóculos, pellets/controle (código 0), *clumps* (código 1) e dispersa (código 2) (Tabela 3.2), foram empregadas em cultivos em frascos agitados a fim de investigar a influência da morfologia do inóculo na produção de quatro enzimas diferentes (endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase, amilase e xilanase). Essas enzimas foram escolhidas com base em suas importantes aplicações em diferentes tipos de indústrias, como alimentos, ração, têxtil, celulose, papel e, mais recentemente, na indústria de etanol de segunda geração (BISCHOF; RAMONI e SEIBOTH, 2016; SRIVASTAVA et al., 2019).

A Figura 6.4 mostra os resultados das atividades enzimáticas após 24, 48, 72 e 96 h de cultivo utilizando as diferentes morfologias de inóculo. A maior atividade de endoglucanase ( $\sim 900 \text{ UI.L}^{-1}$ ) foi observada com a morfologia pelletizada (Figura 6.4A) quando comparada às formas dispersas, sendo esse valor cerca de três vezes maior. Por outro lado, a maior produção de  $\beta$ -glicosidase foi observada no cultivo com morfologia dispersa (Figura 6.4B), com atividade de  $\beta$ -glicosidase de  $2.300 \pm 120 \text{ UI.L}^{-1}$ , correspondendo a um valor aproximadamente quatro vezes maior que a forma pelletizada. As outras duas enzimas, amilase (Figura 6.4C) e xilanase (Figura 6.4D), apresentaram valores de atividade semelhantes nas diferentes morfologias de inóculo testadas, aproximadamente  $500 \text{ UI.L}^{-1}$  de amilase e  $300 \text{ UI.L}^{-1}$  de xilanase.

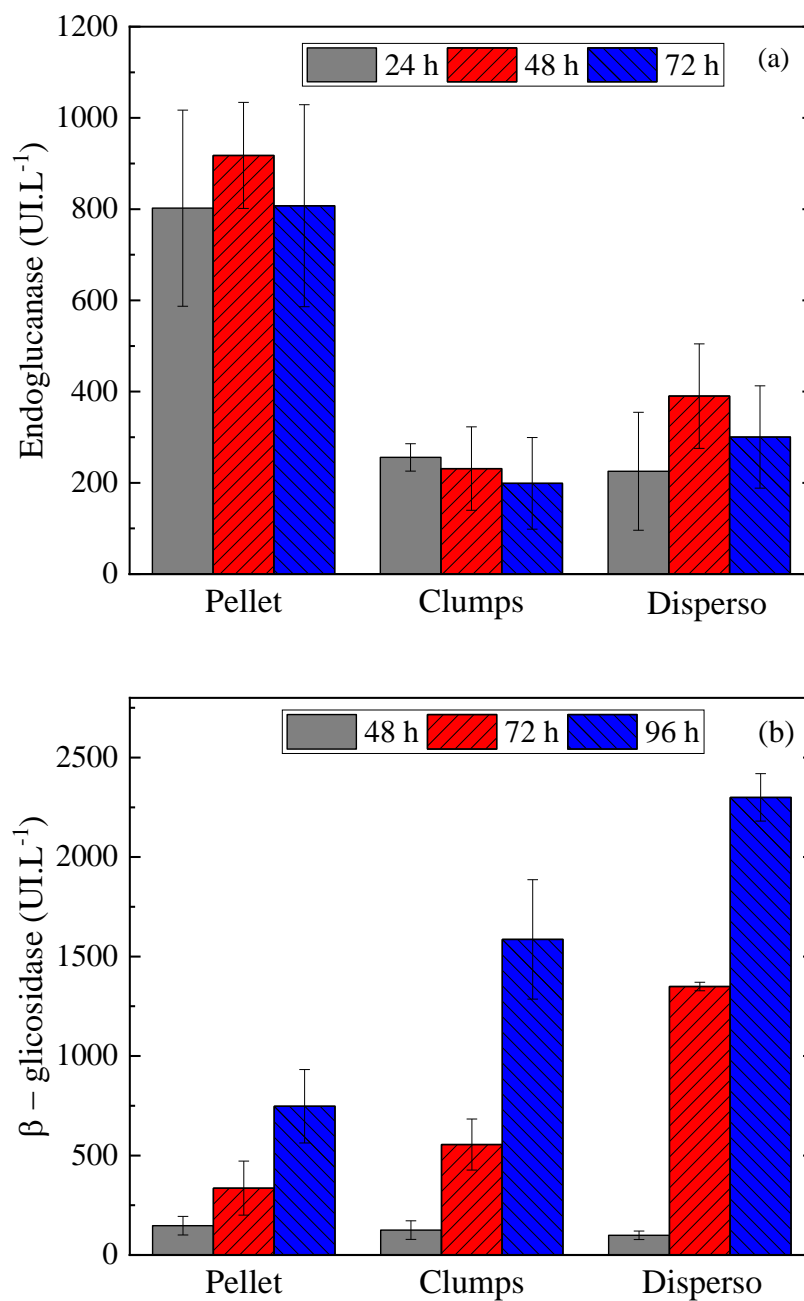
De acordo com a literatura, a morfologia dispersa normalmente favorece a produção de enzimas, devido à secreção de enzimas ocorrer nas pontas das hifas (EL-ENSHASY, 2007; ROBSON et al., 2008). Tal fato pode ter contribuído para a maior produção de  $\beta$ -glicosidase.

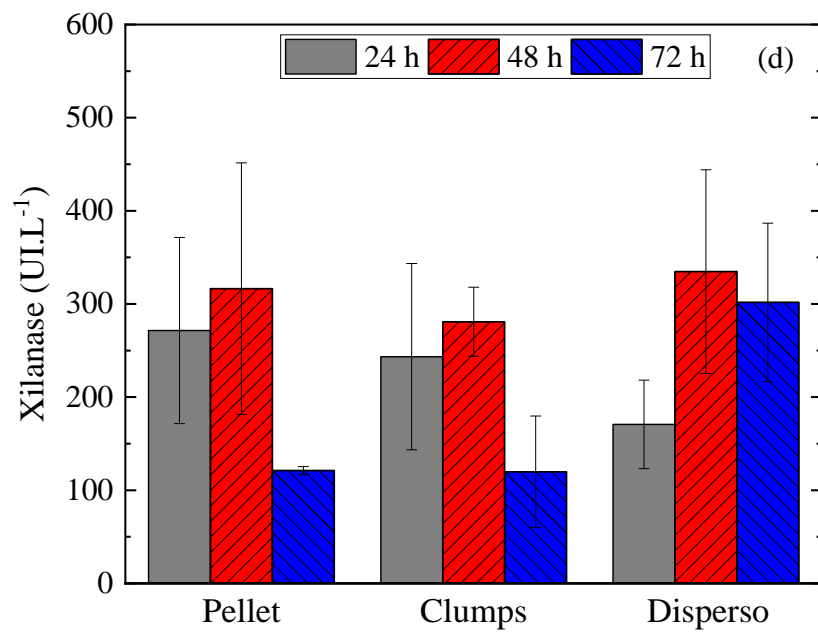
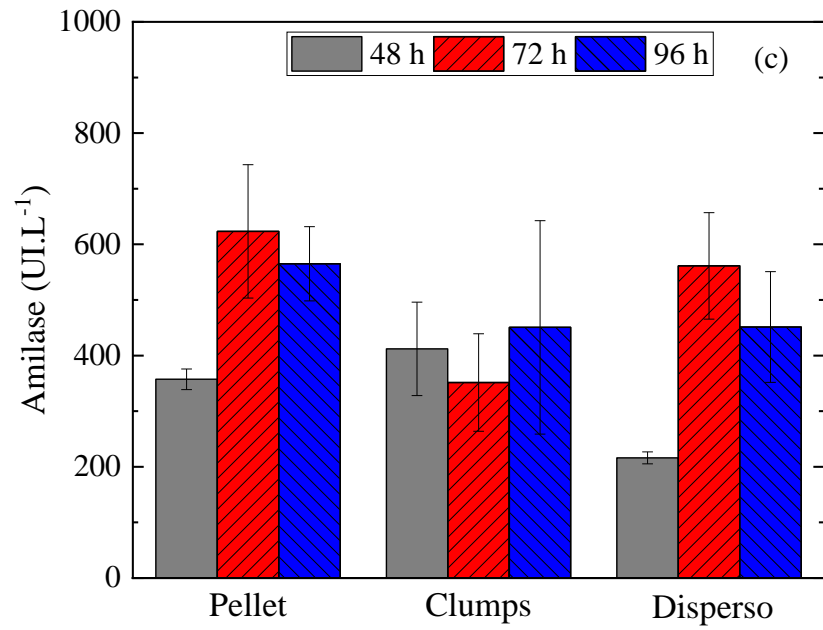


No entanto, observou-se maior produção de endoglucanase quando empregado inóculo com morfologia de pellets. Uma possível explicação para a menor produção de endoglucanase na morfologia dispersa é o fato dessa morfologia gerar caldo com maior viscosidade aparente, o que prejudica a transferência de oxigênio para a fase líquida (CERRI e BADINO, 2012). Como em frascos agitados a transferência de oxigênio é limitada, isso pode ter contribuído para diminuir a produção dessa enzima. O fato da quantidade de oxigênio dissolvido possivelmente afetar apenas a produção de endoglucanase indica que essa enzima é mais dependente desse nutriente para sua produção.

A concentração de  $\beta$ -glicosidase foi semelhante a valores considerados altos encontrados na literatura. Por exemplo, Zhao, Deng e Fang (2018) obtiveram produção de  $\beta$ -glicosidase de  $1.930 \pm 280$  UI.mL<sup>-1</sup> em cultura mista de *T. reesei* e *A. niger* geneticamente modificados. Outra observação interessante é que as enzimas estudadas tiveram tempos de secreção diferentes ao longo do cultivo. Por exemplo, a endoglucanase (Figura 6.4A) teve seu pico de produção nas primeiras 24 h de cultivo, enquanto a  $\beta$ -glicosidase teve o pico de produção no final do cultivo (96 h) (Figura 6.4B). Tal resultado não foi surpreendente, levando em consideração que a endoglucanase atua sinergicamente primeiro que a  $\beta$ -glicosidase na hidrólise de materiais lignocelulósicos (JUTURU e WU, 2014). O mesmo comportamento foi também observado em outros estudos. Li et al. (2017) observaram um pico de produção de endoglucanase por *T. reesei* em 120 h de cultivo, enquanto o pico de produção de  $\beta$ -glicosidase ocorreu em 168 h de cultivo, quando se utilizou também lactose como indutor. Anteriormente, Gaikwad e Maheshwari (1994) observaram que a endoglucanase era secretada primeiro que a  $\beta$ -glicosidase no cultivo de *Sporotrichum thermophile*. Endoglucanase foi secretada na fase de crescimento celular e com a utilização de celulose, enquanto a produção de  $\beta$ -glicosidase mostrou um comportamento distinto, qual seja, a expressão ocorreu após a utilização da celulose e aumentou progressivamente com o início da autólise da hifa. O mesmo comportamento foi observado em cultivos com lactose, os quais indicaram uma relação causal entre a autólise dos micélios e a liberação da  $\beta$ -glicosidase.

Figura 6.4. Atividades enzimáticas ao longo de cultivos de *A. niger* em frascos agitados a 32 °C e 200 rpm com diferentes morfologias de inóculo (pellets, clumps e dispersa): (a) endoglucanase, (b)  $\beta$ -glicosidase, (c) amilase e (d) xilanase.





### 6.2.3. Produção de enzimas celulolíticas em biorreator com diferentes associações de impelidores

Para confirmar os resultados obtidos em frascos agitados e como forma de aumentar a produção de enzimas com as três diferentes morfologias (pellets, *clumps* e dispersa), foram realizados cultivos em batelada em biorreator convencional com diferentes associações de impelidores. Apenas as produções de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase foram analisadas, uma vez que essas enzimas apresentaram resultados mais expressivos em frascos agitados, com comportamentos opostos em relação à morfologia do inóculo. A Tabela 3.3 mostra as condições experimentais empregadas nos cultivos. As Figuras 6.5A e 6.5B mostram as atividades de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase máximas obtidas, respectivamente, sob diferentes condições de cultivo.

Com relação à endoglucanase (Figura 6.5A), pode-se observar produções semelhantes, em torno de  $500 \text{ UI.L}^{-1}$ , para todas as condições avaliadas de inóculo. Apesar de se observar uma certa tendência dos cultivos com impelidores orelha de elefante apresentarem maior produção de endoglucanase, os resultados ainda estão dentro do erro experimental. A produção de endoglucanase foi menor que a obtida com pellets ( $\sim 900 \text{ UI.L}^{-1}$ ) e maior que a obtida com morfologias de *clumps* ou dispersa ( $\sim 300 \text{ UI.L}^{-1}$ ) em frascos agitados. Tal resultado confirma a hipótese anterior de que uma maior viscosidade aparente do inóculo disperso possa ter limitado a transferência de oxigênio em frascos agitados. Em biorreator, a transferência de massa é facilitada devido à agitação e aeração serem mais eficientes, em todos os cultivos realizados em biorreator não houve limitação de transferência de oxigênio, sendo que o valor mínimo medido foi arredor de 10%. O fato da maior produção de endoglucanase ter ocorrido em frascos de agitação, com pellets, mostra que essa morfologia é possivelmente a melhor para obter tal enzima.

Outra variável que apresenta comportamento bastante diferente quando comparada em frascos de agitação e em biorreator é a condição de cisalhamento. Peter, Suzuki e Buchs (2006) analisaram a taxa máxima de dissipação de energia local em frascos de agitação e em biorreator tipo tanque agitado e verificaram que a taxa máxima de dissipação de energia e, conseqüentemente, a condição de cisalhamento foram cerca de 10 vezes menores nos frascos agitados. Tal observação também é pertinente para o presente trabalho, onde em frascos agitados os pellets permaneceram intactos em maior número. A endoglucanase parece ser uma enzima mais sensível às condições de cisalhamento, uma vez que a 800 rpm (maior condição

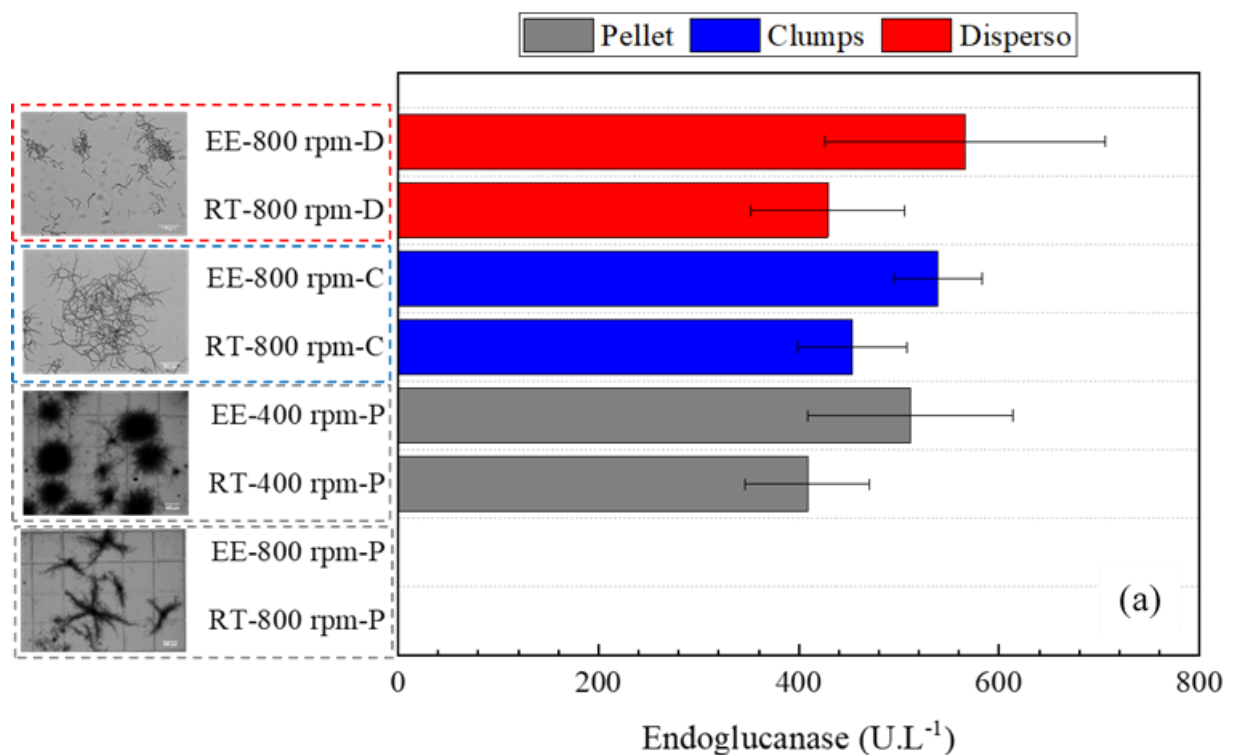
de cisalhamento) e inóculo com pellets, a produção de tal enzima foi insignificante. Outros trabalhos de literatura também indicam que o cisalhamento é prejudicial à produção de endoglucanase (PATEL et al., 2009; LAN et al., 2013). Além disso, as diferentes morfologias são afetadas de maneira diferente em relação ao ambiente de cisalhamento e modelo de biorreator. Os pellets parecem ser mais suscetíveis ao cisalhamento do que a morfologia dispersa, uma vez que a produção com pellets diminuiu no biorreator. Tal fato pode ser explicado pela diferença de tamanho das formas morfológicas, sendo as estruturas maiores mais suscetíveis ao cisalhamento, de acordo com a teoria de Kolmogorov (KOLMOGOROV, 1991). Nesse sentido, dispositivos que tragam uma boa transferência de oxigênio combinada com um baixo cisalhamento seriam os mais recomendados para a produção de endoglucanase. Um exemplo desses dispositivos são os biorreatores *airlifts*, que foram estudados no Capítulo 4 da presente tese e mostraram tais características.

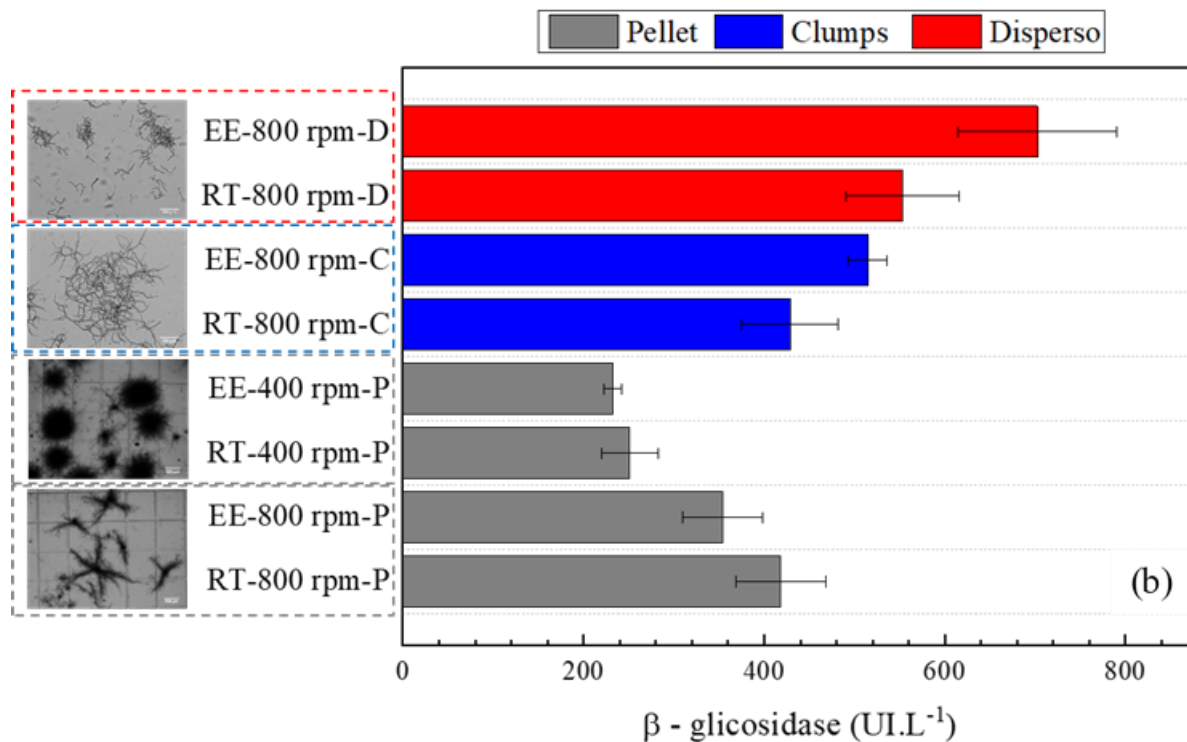
Com relação à produção de  $\beta$ -glicosidase, foi possível observar diferenças entre as atividades nos ensaios do biorreator. Da mesma forma que nos ensaios em frascos agitados, os inóculos dispersos proporcionaram maior produção de  $\beta$ -glicosidase. Comparando os resultados de atividade dos inóculos com morfologias dispersa e com pellets a 800 rpm (Figura 6.5B), o inóculo disperso proporcionou produção de  $\beta$ -glicosidase 63% superior do que o inóculo com pellets. No entanto, a 800 rpm, os pellets sofreram uma maior fragmentação (ver figura na Figura 6.5B), levando ao surgimento de morfologia dispersa. Comparando a morfologia dispersa com a de pellets a 400 rpm, que praticamente mantiveram sua estrutura, a morfologia dispersa teve uma produção de  $\beta$ -glicosidase significativamente maior, cerca 160%.

Uma possível explicação para a melhoria da produção de  $\beta$ -glicosidase em morfologia dispersa, sem alteração da produção de endoglucanase, é que essas enzimas são produzidas em locais diferentes e secretadas de maneira diferente por fungos filamentosos. Staykova et al. (1985) estudaram as localizações de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase em *Aspergillus terreus*. A endoglucanase foi observada predominantemente no meio de cultivo, sendo transportada do periplasma para o caldo de cultivo por meio de vesículas, sendo então excretada. Por outro lado, verificou-se que a  $\beta$ -glicosidase está localizada principalmente no interior das células e na superfície celular e sua liberação celular para o caldo de cultivo está localizada no glicocálice. Resultados de estudo ultraestrutural também indicaram que as endoglucanases e as  $\beta$ -glicosidases são transportadas através da parede celular para o caldo de cultivo de diferentes maneiras. Jackson e Talburt (1988) descobriram que a  $\beta$ -glicosidase de *T. reesei*

estava associada ao complexo parede celular/membrana celular. Além disso, os autores observaram que níveis mais elevados de  $\beta$ -glicosidase estavam associados a conídios germinativos. A presença desta enzima no sobrenadante resultou de sua liberação por enzimas esquizolíticas durante a fase de autólise, sendo que a principal função das  $\beta$ -glicosidases no crescimento de *T. reesei* estava relacionada ao amolecimento da parede celular. Tais informações nos auxiliam a explicar a maior secreção de  $\beta$ -glicosidase no final do cultivo, onde o substrato é mais escasso e o fungo apresentava alguma esporulação. Ou seja, as células já estavam em fase de autólise, o que também colaborou na secreção. No geral, a  $\beta$ -glicosidase parece ter um mecanismo secretório menos conhecido e, possivelmente, menos eficiente que o da endoglucanase.

Figura 6.5. Atividades enzimáticas em cultivos de *A. niger* com diferentes morfologias de inóculo (pellets: P, *clumps*: C e dispersa: D) em biorreator convencional com diferentes associações de impelidores (RT-RT: impelidores turbinas de Rushton e EEDP-EEUP: impelidores orelha de elefante) em diferentes condições de agitação (N em rpm): (a) endoglucanase e (b)  $\beta$ -glicosidase. As figuras à esquerda representam as morfologias em 12 h de cultivo.



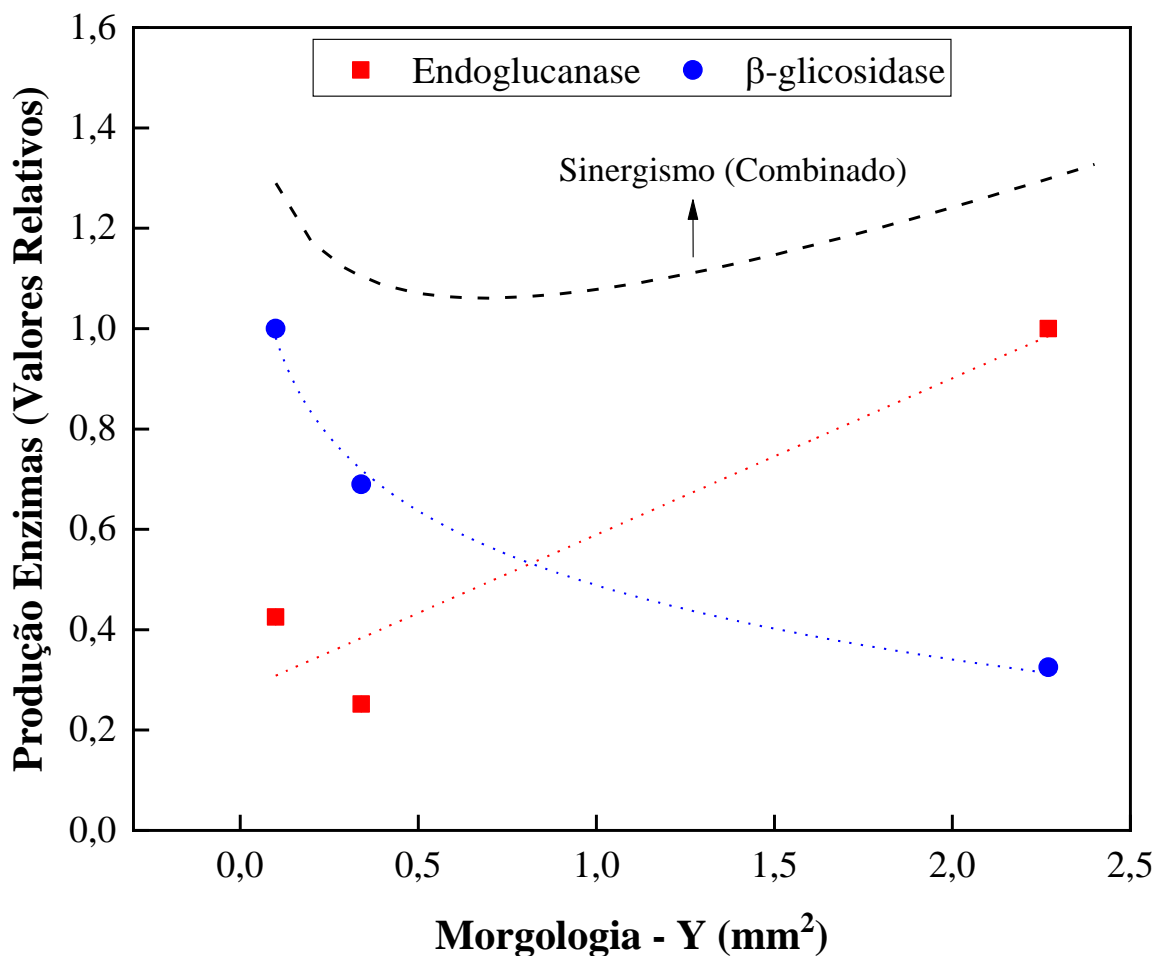


Em geral, os impelidores tiveram menor influência na produção das enzimas do que a morfologia. A associação orelha de elefante (EEDP-EEUP) apresentou uma leve tendência a melhores resultados para a produção de enzimas, principalmente com relação à endoglucanase, enzima cuja expressão mostrou ser mais sensível ao cisalhamento. Essa associação de impelidores apresenta uma taxa de cisalhamento média menor que a associação de turbinas de Rushton (RT-RT) (BUFFO et al., 2016), o que pode ter levado a tais resultados. No capítulo 5 também foi verificado que a associação de impelidores EEDP-EEUP foi um pouco menos prejudicial que a RT-RT para pellets de *A. niger* em algumas condições de agitação, enquanto que em outras condições a fragmentação dos pellets foi bastante semelhante. Tal resultado está de acordo com a semelhança encontrada para a produção de enzimas nos dois sistemas de impelidores testados.

Na tentativa de isolar o efeito morfológico e analisar como ele influencia a produção das enzimas, foram utilizados os resultados obtidos em frascos agitados. A Figura 6.6 ilustra a produção normalizada (com base no valor mais alto) em função do parâmetro morfológico proposto (Y). Pode-se observar que a  $\beta$ -glicosidase apresentou maior produção em valores menores de Y, onde a morfologia apresenta tamanho menor ou forma dispersa. Por outro lado,

a maior produção de endoglucanase foi obtida em maiores valores de  $Y$ , ou seja, em morfologia de pellets. A tendência de produção de  $\beta$ -glicosidase foi aproximada por uma curva logarítmica, com alto coeficiente de determinação ( $R^2=0,99$ ) e a produção de endoglucanase aproximada por tendência linear ( $R^2=0,90$ ). Dessa forma, foi proposto uma produção combinada de ambas as enzimas, sendo dada pela soma da produção individual normalizada de cada enzima, para uma determinada morfologia ( $Y$ ). Analisando os resultados obtidos (curva de sinergismo combinado), verifica-se que a maior produção total de enzimas ocorre em condições extremas, valores mais baixos ou mais altos de  $Y$ . Além disso, um melhor equilíbrio entre as duas enzimas pode ser obtido nos valores intermediários de  $Y$ . No entanto, tal condição não é a de maior produção total de enzimas (endoglucanase +  $\beta$ -glicosidase).

Figura 6.6. Produção de enzima como função da morfologia e previsão da produção combinada em cada condição (soma produção enzimática individual).



Dessa forma, uma produção em biorreatores individuais e nas condições ideais para cada enzima, principalmente em termos de morfologia e condições de cisalhamento, seria



mais vantajoso para uma produção global máxima de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase. Os resultados também apresentam potencial para gerar coquetéis enzimáticos específicos para usos específicos. Por exemplo, ao visar apenas a liquefação de substratos lignocelulósicos com alto teor de sólidos, conforme descrito no trabalho de Cunha et al. (2014), é requerido um coquetel rico em endoglucanase e pobre em  $\beta$ -glicosidase. Para tanto, considerando os resultados do presente trabalho, os cultivos devem ser realizados com morfologia de pellets e em condições de cisalhamento mais amenas. Para aplicações visando um coquetel enzimático rico em  $\beta$ -glicosidase, uma morfologia dispersa seria requerida.

A morfologia padrão da linhagem de *A. niger* utilizada no presente trabalho é a pelletizada. Portanto, alterar a morfologia para dispersa provou ser uma boa estratégia para a produção de enzimas celulolíticas. A morfologia dispersa favorece a produção de  $\beta$ -glicosidase, uma enzima importante na tecnologia de produção de biocombustíveis e que muitas vezes apresenta produção insuficiente por *T. reesei*, um dos maiores produtores industriais de celulasas (SRIVASTAVA et al., 2019). Sendo assim, o controle morfológico se mostra uma estratégia interessante para a obtenção de coquetéis enzimáticos mais específicos.

### 6.3. Conclusões

Os resultados mostraram que a morfologia de *A. niger* pode ser modulada para favorecer a produção de enzimas celulolíticas específicas. Utilizando diferentes combinações de pH e concentração de esporos, foi possível obter inóculos com morfologias variadas, desde pellets de diferentes tamanhos até morfologia completamente dispersa. A produção de endoglucanase foi maior na morfologia pelletizada, enquanto que a produção de  $\beta$ -glicosidase foi favorecida quando a morfologia foi a dispersa, com predominância de hifas ramificadas e isoladas, sendo a produção cerca de 160% maior que com pellets em biorreator. Diferentes morfologias podem influenciar a forma de secreção enzimática, bem como a transferência de oxigênio e cisalhamento no biorreator. O presente trabalho mostra o potencial uso da engenharia morfológica para otimizar a produção de produtos de base biológica, no nosso caso mais especificamente a produção de enzimas celulolíticas.

## CAPÍTULO 7. Considerações finais e perspectivas futuras

Com relação à fragmentação de pellets de *A. niger*, o biorreator *airlift* de cilindros concêntricos (ACC) apresentou menor cisalhamento em comparação ao biorreator tipo tanque agitado e aerado (TAA). Considerando um mesmo valor de  $k_{La}$ , o biorreator TAA causou uma fragmentação aos pellets 50% superior ao biorreator ACC. O biorreator ACC mostrou também vantagens em termos de consumo de energia e eficiência de transferência de massa. Provavelmente o tipo de mistura e as regiões de cisalhamento máximo diferentes são os motivos para as condições de cisalhamento menos intensas impostas ao microrganismo pelo biorreator *airlift*. Além disso, tais conclusões são válidas para a morfologia pelletrizada apenas, possivelmente a fragmentação também depende da morfologia, microrganismo e dimensões de ambos.

Comparando apenas os biorreatores TAA, a frequência de rotação (N) e a taxa de dissipação/circulação de energia (FDCE) foram as variáveis que tiveram maior influência na fragmentação dos pellets de *A. niger*. Em termos de impelidores, as fragmentações foram semelhantes apenas sob condições de agitação mais intensas, a configuração de impelidor EEDP-EEUP mostrou-se levemente menos cisalhante do que a configuração RT-RT.

Um modelo cinético empírico foi proposto com sucesso para descrever o efeito das condições de cisalhamento na fragmentação de pellets, através qual foi possível obter parâmetros que podem ser utilizados como medida de cisalhamento em biorreatores. Tal modelo fornece informações importantes relacionadas com a fragmentação microbiana em diferentes modelos de biorreatores e podem auxiliar na seleção do biorreator e das condições de operação ideais para o cultivo de *A. niger*, um importante produtor microrganismo de enzimas e ácidos orgânicos.

Comparando o efeito do cisalhamento na produção de enzimas celulolíticas, em ambas as associações de impelidores, uma velocidade de agitação mais alta (800 rpm) causou maior fragmentação dos pellets, aumentando a produção de  $\beta$ -glicosidase. Quanto à produção de endoglucanase, esta foi favorecida em cultivo empregando uma velocidade de agitação mais baixa (400 rpm), o que levou a uma menor fragmentação dos pellets.

Outro importante resultado obtido foi a definição da morfologia de *A. niger* através de diferentes combinações de pH e concentração de esporos. Foi possível obter inóculos com morfologias variadas, desde pellets de diferentes tamanhos até morfologia completamente dispersa. Com tal manipulação foi possível favorecer a produção de enzimas celulolíticas

específicas. A produção de endoglucanase foi maior na morfologia pelletizada, enquanto que a produção de  $\beta$ -glicosidase foi favorecida quando a morfologia foi a dispersa. Tal resultado está de acordo com o obtido anteriormente, em que a produção de  $\beta$ -glicosidase havia sido favorecida em condições de maior cisalhamento e define uma morfologia mais dispersa e endoglucanase favorecida em condições de menor cisalhamento e que, portanto, manteve os pellets mais intactos.

De forma geral o trabalho mostrou que de fato, o cisalhamento e a morfologia influenciam a produção de enzimas celulolíticas, sendo que a influência foi diferente para cada enzima específica produzidas por *A. niger*.

Seguindo a linha da pesquisa, propõe-se os seguintes temas de trabalhos que seriam interessantes de serem realizados:

- Otimização da produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase para se obter um coquetel ideal e aplicação de tal coquetel na hidrólise de materiais lignocelulósicos. Por exemplo, por ser favorável em menor cisalhamento e em morfologia de pellets a endoglucanase poderia ser produzida em biorreatores *airlift* com *A. niger* em morfologia pelletizada. A  $\beta$ -glicosidase seria produzida em biorreator convencional com morfologia dispersa em com alto grau de cisalhamento. Maximizando a produção de cada enzima, essas seriam aplicadas conjuntamente na hidrólise do material lignocelulósico.

- Uso das diferentes morfologias de inóculo de *A. niger* na tentativa de melhorar outros produtos importantes metabolizados por tal fungo, como por exemplo, ácidos orgânicos.

- Teste da técnica conjunta de pH e concentração de esporos para modificar a morfologia de outros microrganismos filamentosos, verificando a influência da morfologia na produção de produtos de interesse.

## CAPÍTULO 8. Referências Bibliográficas

- ADSUL, M.; SANDHU, S.K.; SINGHANIA, R.R.; GUPTA, R. et al. Designing a cellulolytic enzyme cocktail for the efficient and economical conversion of lignocellulosic biomass to biofuels, **Enzyme and Microbiol Technology**, 133, 2020.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei's* morphology and cellulase production. **Bioresource Technology**, 100, n. 23, p. 5979-5987, Dec 2009. Article.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube *airlift* bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 49, n. 3, p. 379-387, May 2010. Article.
- ALI, N.; ZHANG, Q.; LIU, Z. Y.; LI, F. L. et al 2019. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 19. Review; Early Access.
- ALLEN, D. G.; ROBINSON, C. W. Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths. **Chemical Engineering Science**, 45, n. 1, p. 37-48, 1990. Article.
- AMANULLAH, A.; BLAIR, R.; NIENOW, A. W.; THOMAS, C. R. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and Bioengineering**, 62, n. 4, p. 434-446, Feb 1999. Article.
- AMANULLAH, A.; CHRISTENSEN, L. H.; HANSEN, K.; NIENOW, A. W. et al. Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus oryzae* and its implications for recombinant protein production. **Biotechnology and Bioengineering**, 77, n. 7, p. 815-826, Mar 2002. Article.
- ANDLAR, M.; REZIC, T.; MARDETKO, N.; KRACHER, D. et al. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. **Engineering in Life Sciences**, 18, n. 11, p. 768-778, Nov 2018. Review.
- BADINO, A. C.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O. Power input and oxygen transfer in fed-batch *penicillin* production process. **Advances in Bioprocess Engineering**, p. 157-162, 1994. Proceedings Paper.
- BADINO, A. C.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Estimation of the rheology of glucoamylase fermentation broth from the biomass concentration and shear conditions. **Biotechnology Techniques**, 13, n. 10, p. 723-726, Oct 1999. Article.

- BADINO, A. C.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Volumetric oxygen transfer coefficients ( $k_{La}$ ) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. **Biochemical Engineering Journal**, 8, n. 2, p. 111-119, Sep 2001. Article.
- BAILEY, M. J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 30, n. 1, p. 5-10, Jan 1989. Article.
- BARRY, D. J.; CHAN, C.; WILLIAMS, G. A. Morphological quantification of filamentous fungal development using membrane immobilization and automatic image analysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 36, n. 6, p. 787-800, Jun 2009.
- BARRY, D. J.; WILLIAMS, G. A. Microscopic characterisation of filamentous microbes: towards fully automated morphological quantification through image analysis. **Journal of Microscopy**, 244, n. 1, p. 1-20, Oct 2011. Review.
- BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources and Bioprocessing**, 6, n. 1, p. 36, Dec 2019. Review.
- BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial Cell Factories**, 15, p. 13, Jun 2016. Review.
- BRAGA, A.; MESQUITA, D. P.; AMARAL, A. L.; FERREIRA, E. C. et al. Aroma production by *Yarrowia lipolytica* in airlift and stirred tank bioreactors: Differences in yeast metabolism and morphology. **Biochemical Engineering Journal**, 93, p. 55-62, Jan 2015. Article.
- BUFFO, M. M. **Transferência de oxigênio e cisalhamento em biorreator convencional com diferentes combinações de impelidores**. 2016. 87 (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- BUFFO, M. M.; CORREA, L. J.; ESPERANÇA, M. N.; CRUZ, A. J. G. et al. Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 114, p. 133-142, Oct 2016. Article.
- BUSTAMANTE, M. C. C. **Transferência de oxigênio e Condições de Cisalhamento em Biorreator Convencional com Impelidores Orelha de Elefante**. 2013. 222f. Dissertação (Doutorado) – Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

- BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chemical Engineering Science**, 90, p. 92-100, Mar 2013. Article.
- CAIRNS, T. C.; ZHENG, X. M.; ZHENG, P.; SUN, J. B. et al. Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. **Biotechnology for Biofuels**, 12, Apr 2019.
- CALLOW, N. V.; JU, L. K. Promoting pellet growth of *Trichoderma reesei* Rut C30 by surfactants for easy separation and enhanced cellulase production. **Enzyme and Microbial Technology**, 50, n. 6-7, p. 311-317, May 2012. Article.
- CALLOW, N. V.; RAY, C. S.; KELBLY, M. A.; JU, L. K. Nutrient control for stationary phase cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, 82, p. 8-14, Jan 2016. Article.
- CAMPANI, G.; RIBEIRO, M. P. A.; HORTA, A. C. L.; GIORDANO, R. C. et al. Oxygen transfer in a pressurized *airlift* bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 38, n. 8, p. 1559-1567, Aug 2015. Article.
- CAMPESI, A.; CERRI, M. O.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Determination of the average shear rate in a stirred and aerated tank bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 32, n. 2, p. 241-248, Feb 2009. Article.
- CAMPOS, L.; FELIX, C. R. Purification and characterization of a glucoamylase from *humicola-grisea*. **Applied and Environmental Microbiology**, 61, n. 6, p. 2436-2438, Jun 1995. Note.
- CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e Transferência de Oxigênio em Três Biorreatores Airlift de Circulação Interna Geometricamente Semelhantes**. 2009. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2009.
- CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Shear conditions in clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in stirred tank and *airlift* bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 35, n. 6, p. 977-984, Aug 2012. Article.
- CERRI, M. O.; FUTIWAKI, L.; JESUS, C. D. F.; CRUZ, A. J. F. et al. Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube *airlift* bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 39, n. 1, p. 51-57, Apr 2008. Article.
- CHANDEL, A. K.; ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; CHUNDAWAT, S. P. S. et al. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian

- sugarcane bagasse at a commercial scale. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, 13, n. 4, p. 994-1014, Jul 2019. Article.
- CHISTI, Y. *Airlift* reactors - Design and diversity. **Chemical Engineer-London**, n. 457, p. 41-43, Feb 1989. Article.
- CHISTI, Y. Animal-cell damage in sparged bioreactors. **Trends in Biotechnology**, 18, n. 10, p. 420-432, Oct 2000. Review.
- CHOUDHARI, V. G.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M. Application of high-throughput screening for evaluating hydrolytic potential of cellulases. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 9, n. 4, p. 659-667, Dec 2019. Article.
- CHOY, V.; PATEL, N.; THIBAUT, J. Application of image analysis in the fungal fermentation of *Trichoderma reesei* RUT-C30. **Biotechnology Progress**, 27, n. 6, p. 1544-1553, Nov-Dec 2011. Article.
- COLIN, V. L.; BAIGORII, M. D.; PERA, L. M. Tailoring fungal morphology of *Aspergillus niger* MYA 135 by altering the hyphal morphology and the conidia adhesion capacity: biotechnological applications. **Amb Express**, 3, p. 13, 2013. Article.
- COLLIGNON, M. L.; DELAFOSSE, A.; CRINE, M.; TOYE, D. Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors: Methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation. **Chemical Engineering Science**, 65, n. 22, p. 5929-5941, Nov 2010. Article.
- CORREA, L. J.; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 39, n. 2, p. 285-294, Feb 2016. Article.
- COX, P. W.; THOMAS, C. R. Classification and measurement of fungal pellets by automated image-analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, 39, n. 9, p. 945-952, Apr 15 1992.
- CUI, Y. Q.; VAN DER LANS, R.; LUYBEN, K. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, 57, n. 4, p. 409-419, Feb 1998. Article.
- CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; FLORENCIO, C.; VASCONCELLOS, V. M. et al. Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method. **Biochemical Engineering Journal**, 97, p. 32-39, May 2015. Article.

- CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C. et al. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, 112, p. 270-274, May 2012. Article.
- CUNHA, F. M.; KREKE, T.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. et al. Liquefaction of sugarcane bagasse for enzyme production. **Bioresource Technology**, 172, p. 249-252, Nov 2014. Article.
- DE JESUS, S. S.; NETO, J. M.; MACIEL, R. Hydrodynamics and mass transfer in bubble column, conventional *airlift*, stirred *airlift* and stirred tank bioreactors, using viscous fluid: A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, 118, p. 70-81, Feb 2017. Article.
- DE PAULA, R. G.; ANTONIETO, A. C. C.; RIBEIRO, L. F. C.; SRIVASTAVA, N. et al. Engineered microbial host selection for value-added bioproducts from lignocellulose. **Biotechnology Advances**, 37, n. 6, p. 18, Nov 2019. Review.
- DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P. et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. **Bioresource Technology**, 103, n. 1, p. 152-161, Jan 2012. Article.
- DOMINGUES, F. C.; QUEIROZ, J. A.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, n. 5-6, p. 394-401, Mar 2000. Article.
- DONG, M. Y.; WANG, S. Y.; XU, F. Q.; LI, Q. Q. et al. Addition of aluminum oxide microparticles to *Trichoderma viride* My preculture enhances cellulase production and influences fungal morphology. **Engineering in Life Sciences**, 18, n. 6, p. 353-358, Jun 2018. Article.
- DRIOUCH, H.; HANSCH, R.; WUCHERPFENNIG, T.; KRULL, R. et al. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, 109, n. 2, p. 462-471, Feb 2012. Article.
- DRIOUCH, H.; SOMMER, B.; WITTMANN, C. Morphology Engineering of *Aspergillus niger* for Improved Enzyme Production. **Biotechnology and Bioengineering**, 105, n. 6, p. 1058-1068, Apr 15 2010.
- EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. **New Technologies and Applications** 2007.
- ESPERANÇA, M. N. **Contribuição ao estudo do desempenho de biorreatores *airlift* de circulação interna: análise das condições operacionais e da geometria do equipamento.**



2018. 221 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

ESPERANÇA, M. N.; MENDES, C. E.; RODRIGUEZ, G. Y.; CERRI, M. O. et al. Average shear rate in *airlift* bioreactors: searching for the true value. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 42, n. 6, p. 995-1008, Jun 2019. Article.

FANG, H.; ZHAO, R. Z.; LI, C. F.; ZHAO, C. Simultaneous enhancement of the beta-exo synergism and exo-exo synergism in *Trichoderma reesei* cellulase to increase the cellulose degrading capability. **Microbial Cell Factories**, 18, p. 14, Jan 2019. Article.

FERREIRA, S. M. P.; DUARTE, A. P.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut C-30 morphology and cellulase production. **Electronic Journal of Biotechnology**, 12, n. 3, p. 9, Jul 2009. Article.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Validation of a Novel Sequential Cultivation Method for the Production of Enzymatic Cocktails from *Trichoderma* Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 175, n. 3, p. 1389-1402, Feb 2015. Article.

FREITAS, A. C.; BALEEIRO, F. C. F.; FONSECA, R. F.; NETO, V. B. et al. Bioprocess development to add value to canola cake used as substrate for proteolytic enzyme production. **Food and Bioproducts Processing**, 95, p. 173-182, Jul 2015. Article.

GAIKWAD, J. S.; MAHESHWARI, R. Localization and release of beta-glucosidase in the thermophilic and cellulolytic fungus, *sporotrichum thermophile*. **Experimental Mycology**, 18, n. 4, p. 300-310, Dec 1994. Article.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, 27, n. 2, p. 153-176, Mar-Apr 2009. Review.

GEBEREKIDAN, M.; ZHANG, J.; LIU, Z. L.; BAO, J. Improved cellulosic ethanol production from corn stover with a low cellulase input using a beta-glucosidase-producing yeast following a dry biorefining process. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 42, n. 2, p. 297-304, Feb 2019. Article.

GHADGE, R. S.; PATWARDHAN, A. W.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. Effect of flow pattern on cellulase deactivation in stirred tank bioreactors. **Chemical Engineering Science**, 60, n. 4, p. 1067-1083, Feb 2005. Article.

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

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, 101, n. 13, p. 4775-4800, Jul 2010. Review.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 69, n. 4, p. 375-384, Dec 2005.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; VOLKERDING, II; KRULL, R. et al. Influence of mechanical stress and surface interaction on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. **Biotechnology and Bioengineering**, 92, n. 7, p. 879-888, Dec 2005. Article.

GUO, H. L.; CHANG, Y. J.; LEE, D. J. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biorefinery: Research focuses. **Bioresource Technology**, 252, p. 198-215, Mar 2018. Review.

HARDY, N.; AUGIER, F.; NIENOW, A. W.; BEAL, C. et al. Scale-up agitation criteria for *Trichoderma reesei* fermentation. **Chemical Engineering Science**, 172, p. 158-168, Nov 2017. Article.

HARDY, N.; MOREAUD, M.; GUILLAUME, D.; AUGIER, F. et al. Advanced digital image analysis method dedicated to the characterization of the morphology of filamentous fungus. **Journal of Microscopy**, 266, n. 2, p. 126-140, May 2017. Article.

HERRAN, N. S.; LOPEZ, J. L. C.; PEREZ, J. A. S.; CHISTI, Y. Effects of ultrasound on culture of *Aspergillus terreus*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 83, n. 5, p. 593-600, May 2008. Article.

HU, J. G.; MOK, Y. K.; SADDLER, J. N. Can We Reduce the Cellulase Enzyme Loading Required To Achieve Efficient Lignocellulose Deconstruction by Only Using the Initially Absorbed Enzymes? **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, 6, n. 5, p. 6233-6239, May 2018. Article.

JACKSON, M. A.; TALBURT, D. E. Mechanism for beta-glucosidase release into cellulose-grown *trichoderma-reesei* culture supernatants. **Experimental Mycology**, 12, n. 2, p. 203-216, Jun 1988. Article.

JUSTEN, P.; PAUL, G. C.; NIENOW, A. W.; THOMAS, C. R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, 52, n. 6, p. 672-684, Dec 1996. Article.

JUSTEN, P.; PAUL, G. C.; NIENOW, A. W.; THOMAS, C. R. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations

- on impeller type and agitation intensity. **Biotechnology and Bioengineering**, 59, n. 6, p. 762-775, Sep 1998. Article.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, 33, p. 188-203, May 2014. Review.
- KELLY, W.; GIGAS, B. Using CFD to predict the behavior of power law fluids near axial-flow impellers operating in the transitional flow regime. **Chemical Engineering Science**, 58, n. 10, p. 2141-2152, May 2003. Review.
- KIM, D.; ORREGO, D.; XIMENES, E. A.; LADISCH, M. R. Cellulose conversion of corn pericarp without pretreatment. **Bioresource Technology**, 245, p. 511-517, Dec 2017. Article.
- KLAIC, R.; PLOTTEGHER, F.; RIBEIRO, C.; ZANGIROLAMI, T. C. et al. A Fed-Batch Strategy Integrated with Mechanical Activation Improves the Solubilization of Phosphate Rock by *Aspergillus niger*. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, 6, n. 9, p. 11326-11334, Sep 2018. Article.
- KOLMOGOROV, A. N. Dissipation of energy in the locally isotropic turbulence. **Proceedings of the Royal Society-Mathematical and Physical Sciences**, 434, n. 1890, p. 15-17, Jul 1991. Article.
- KRULL, R.; WUCHERPFENNIG, T.; ESFANDABADI, M. E.; WALISKO, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, 163, n. 2, p. 112-123, Jan 2013. Article.
- KUMAR, P.; MAHARJAN, A.; JUN, H. B.; KIM, B. S. Bioconversion of lignin and its derivatives into polyhydroxyalkanoates: Challenges and opportunities. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 66, n. 2, p. 153-162, Mar-Apr 2019. Review.
- LAN, T. Q.; WEI, D.; YANG, S. T.; LIU, X. G. Enhanced cellulase production by *Trichoderma viride* in a rotating fibrous bed bioreactor. **Bioresource Technology**, 133, p. 175-182, Apr 2013. Article.
- LEITE, C. L.; ESPOSITO, E. Fungos: estrutura e ultraestruturas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, 2010. p.15-46.
- LI, C. C.; LIN, F. M.; ZHOU, L.; QIN, L. et al. Cellulase hyper-production by *Trichoderma reesei* mutant SEU-7 on lactose. **Biotechnology for Biofuels**, 10, p. 15, Oct 2017. Article.
- LI, C.; YANG, Z. H.; ZHANG, R.; ZHANG, D. Y. et al. Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, 168, n. 4, p. 470-477, Dec 2013. Article.

- LIN, P. J.; SCHOLZ, A.; KRULL, R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, 49, n. 2, p. 213-220, Apr 2010. Article.
- LINEK, V.; BENES, P.; SINKULE, J.; MOUCHA, T. Nonideal pressure step method for kla measurement. **Chemical Engineering Science**, 48, n. 9, p. 1593-1599, May 1993. Article.
- LIU, Y.; LIAO, W.; CHEN, S. L. Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. **Biotechnology and Bioengineering**, 99, n. 1, p. 117-128, Jan 2008. Article.
- LIU, Y.; WANG, Z. J.; XIA, J. Y.; HARINGA, C. et al. Application of Euler-Lagrange CFD for quantitative evaluating the effect of shear force on *Carthamus tinctorius* L. cell in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 114, p. 212-220, Oct 2016. Article.
- LU, H. Z.; LI, C.; TANG, W. J.; WANG, Z. J. et al. Dependence of fungal characteristics on seed morphology and shear stress in bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 38, n. 5, p. 917-928, May 2015. Article.
- MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, 54, n. 4, p. 267-286, 1976. Review.
- MANISHA; YADAV, S. K. Technological advances and applications of hydrolytic enzymes for valorization of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 245, p. 1727-1739, Dec 2017. Article.
- MCINTYRE, M. M., CHRISTIAN. DYNESEN, JENS. NIELSEN, JENS. Metabolic Engineering of the Morphology of *Aspergillus*. 2001. Disponível em: [http://download.bioon.com.cn/upload/month\\_0910/20091026\\_14e042cbe8682b6179ffX0gtnxmnMIHo.attach.pdf](http://download.bioon.com.cn/upload/month_0910/20091026_14e042cbe8682b6179ffX0gtnxmnMIHo.attach.pdf).
- MENDES, C. E. **Avaliação das condições hidrodinâmicas, de transferência de oxigênio e de cisalhamento em diferentes modelos e escalas de reatores pneumáticos**. 2016. 239 (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- MENDES, C. E.; BADINO, A. C. Hydrodynamics of Newtonian and non-Newtonian liquids in internal-loop *airlift* reactors. **Biochemical Engineering Journal**, 109, p. 137-152, May 2016. Article.
- MENDES, C. E.; BADINO, A. C. Oxygen transfer in different pneumatic bioreactors containing viscous Newtonian fluids. **Chemical Engineering Research & Design**, 94, p. 456-465, Feb 2015. Article.

- METZ, B.; DEBRUIJN, E. W.; VANSUIJDAM, J. C. Method for quantitative representation of the morphology of molds. **Biotechnology and Bioengineering**, 23, n. 1, p. 149-162, 1981. Article.
- METZNER, A. B.; OTTO, R. E. Agitation of non-newtonian fluids. **Aiche Journal**, 3, n. 1, p. 3-10, 1957. Article.
- MICHELIN, M.; MOTA, A. M. D.; POLIZELI, M.; DA SILVA, D. P. et al. Influence of volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_{La}$ ) on xylanases batch production by *Aspergillus niger van Tieghem* in stirred tank and internal-loop *airlift* bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, 80, p. 19-26, Nov 2013. Article.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31, n. 3, p. 426-428, 1959. Article.
- MIRRO, R.; VOLL, K. Which Impeller Is Right for Your Cell Line? A Guide to Impeller Selection for Stirred-Tank Bioreactors. **BioProcess International**, v.7, p.52-57, 2009.
- NIELSEN, J. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. **Trends in Biotechnology**, 14, n. 11, p. 438-443, Nov 1996. Article.
- NIELSEN, J.; JOHANSEN, C. L.; JACOBSEN, M.; KRABBEN, P. et al. pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *penicillium-chrysogenum* and its relation to penicillin production. **Biotechnology Progress**, 11, n. 1, p. 93-98, Jan-Feb 1995. Note.
- NOVY, V.; NIELSEN, F.; SEIBOTH, B.; NIDETZKY, B. The influence of feedstock characteristics on enzyme production in *Trichoderma reesei*: a review on productivity, gene regulation and secretion profiles. **Biotechnology for Biofuels**, 12, n. 1, p. 16, Oct 2019. Review.
- NOVY, V.; SCHMID, M.; EIBINGER, M.; PETRASEK, Z. et al. The micromorphology of *Trichoderma reesei* analyzed in cultivations on lactose and solid lignocellulosic substrate, and its relationship with cellulase production. **Biotechnol Biofuels**. 9: 169 p. 2016.
- OH, S. K. W.; NIENOW, A. W.; ALRUBEAI, M.; EMERY, A. N. Further-studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. **Journal of Biotechnology**, 22, n. 3, p. 245-270, Feb 1992. Article.
- OH, S. K. W.; NIENOW, A. W.; ALRUBEAI, M.; EMERY, A. N. Further-studies of the culture of mouse hybridomas in an agitated bioreactor with and without continuous sparging. **Journal of Biotechnology**, 22, n. 3, p. 245-270, Feb 1992. Article.
- OLIVER-SALVADOR, M. D.; MORALES-LOPEZ, E.; DURAN-PARAMO, E.; OROZCO-ALVAREZ, C. et al. Shear rate and microturbulence effects on the synthesis of proteases by

*Jacaratia mexicana* cells cultured in a bubble column, airlift, and stirred tank bioreactors.

**Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 18, n. 4, p. 808-818, Jul 2013. Article.

PAPAGIANNI, M. Characterization of Fungal Morphology using Digital Image Analysis **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, 2014. ISSN 1948-5948 JMBT, an open access journal. Disponível em: <http://www.omicsonline.org/open-access/characterization-of-fungal-morphology-using-digital-image-analysis-techniques-1948-5948.1000142.pdf>.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. 22, n. 3, p. 189–259, January 2004,

PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. **Microbial Cell Factories**, 5, Jan 25 2006.

PATEL, N.; CHOY, V.; MALOUF, P.; THIBAUT, J. Growth of *Trichoderma reesei* RUT C-30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. **Process Biochemistry**, 44, n. 10, p. 1164-1171, Oct 2009. Article.

PAUL, G. C.; KENT, C. A.; THOMAS, C. R. HYPHAL Vacuolation and fragmentation in penicillium-chrysogenum. **Biotechnology and Bioengineering**, 44, n. 5, p. 655-660, Aug 1994. Note.

PECIULYTE, A.; ANASONTZIS, G. E.; KARLSTROM, K.; LARSSON, P. T. et al. Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. **Fungal Genetics and Biology**, 72, p. 64-72, Nov 2014. Article.

PETER, C. P., SUZUKI, Y., & BUCHS, J. Hydromechanical Stress in Shake Flasks: Correlation for the Maximum Local Energy Dissipation Rate. **Biotechnology and Bioengineering**, 93, p. 1164-1176, 2006.

PIROTA, R.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; FONSECA, R. F. et al. Bioprocess developments for cellulase production by *aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 33, n. 1, p. 21-31, Jan-Mar 2016. Article.

QUINTANILLA, D.; HAGEMANN, T.; HANSEN, K.; GERNAEY, K. V. Fungal Morphology in Industrial Enzyme Production-Modelling and Monitoring. In: KRULL, R. e BLEY, T. (Ed.). **Filaments in Bioprocesses**. Berlin: Springer-Verlag Berlin. v. 149, p. 29-54, 2015.

- RAVEN, P. H; EVERT, R. F; CURTIS, H. **Biologia vegetal: A variação nas plantas: Fungos**. Traduzido por: VOEUX, P. L; RIZZINI, I; RIZZINI, C. T; SOUZA, V.L.B; RIZZINI, B. New York, 1976, 2ed, editora Guanabara, rio de janeiro, 1978.
- RILEY, G. L.; TUCKER, K. G.; PAUL, G. C.; THOMAS, C. R. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. **Biotechnology and Bioengineering**, 68, n. 2, p. 160-172, Apr 2000. Article.
- ROBSON, G. D.; PUCI, J.; THRONSET, W.; DUNN-COLEMAN, N. Oxidative stress, fragmentation and cell death during bioreactor growth of filamentous fungi. 27, p. 129–142, 2008.
- RUSHTON, J. H. Mixing. **Industrial and Engineering Chemistry**, 42, n. 1, p. 74-76, 1950. Article.
- SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.;LIMA, U. A., et al (Ed.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, v.2, 2001.
- SERRANO-CARREON, L.; GALINDO, E.; ROCHA-VALADEZ, J. A.; HOLGUIN-SALAS, A. et al. Hydrodynamics, Fungal Physiology, and Morphology. In: KRULL, R. e BLEY, T. (Ed.). **Filaments in Bioprocesses**. Berlin: Springer-Verlag Berlin. v. 149, p. 55-90, 2015.
- SHAMLOU, P. A.; MAKAGIANSAR, H. Y.; ISON, A. P.; LILLY, M. D. et al. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chemical Engineering Science*, 49, n. 16, p. 2621-2631, Aug 1994. Article.
- SHAMLOU, P. A.; MAKAGIANSAR, H. Y.; ISON, A. P.; LILLY, M. D. et al. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, 49, n. 16, p. 2621-2631, Aug 1994. Article.
- SIEDENBERG, D.; GERLACH, S. R.; WEIGEL, B.; SCHUGERL, K. et al. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in stirred tank and *airlift* tower loop reactors: the influence of stirrer speed and phosphate concentration. **Journal of Biotechnology**, 56, n. 2, p. 103-114, Aug 1997. Article.
- SILVA, C. O. G.; VAZ, R. P.; FILHO, E. X. F. Bringing plant cell wall-degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, 12, n. 2, p. 277-289, Mar-Apr 2018. Review.

- SINDHU, R.; BINOD, P.; MADHAVAN, A.; BEEVI, U. S. et al. Molecular improvements in microbial alpha-amylases for enhanced stability and catalytic efficiency. **Bioresource Technology**, 245, p. 1740-1748, Dec 2017. Review.
- SMITH, J. J.; LILLY, M. D.; FOX, R. I. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *penicillium-chrysogenum*. **Biotechnology and Bioengineering**, 35, n. 10, p. 1011-1023, Apr 1990. Article.
- SONG, J. M.; WEI, D. Z. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. **Biomass & Bioenergy**, 34, n. 12, p. 1930-1934, Dec 2010. Article.
- SRIVASTAVA, N.; RATHOUR, R.; JHA, S.; PANDEY, K. et al. Microbial beta glucosidase Enzymes: Recent Advances in Biomass Conversation for Biofuels Application. **Biomolecules**, 9, n. 6, p. 23, Jun 2019. Review.
- STAYKOVA, D.; PETRIKEVICH, S. B.; IVANOVA, G. S.; KULAEV, I. S. Localization of cellulases and beta-d-glucosidases in *Aspergillus terreus* upon substrate-induced biosynthesis. **Folia Microbiologica**, 30, n. 2, p. 126-&, 1985. Article.
- SUKHARNIKOV, L. O.; CANTWELL, B. J.; PODAR, M.; ZHULIN, I. B. Cellulases: ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. **Trends in Biotechnology**, 29, n. 10, p. 473-479, Oct 2011. Review.
- SUN, Y.; CHENG, J. Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, 83, n. 1, p. 1-11, May 2002. Review.
- TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, 101, n. 13, p. 4744-4753, Jul 2010. Article.
- TAN, R. K.; EBERHARD, W.; BUCHS, J. Measurement and characterization of mixing time in shake flasks. **Chemical Engineering Science**, 66, n. 3, p. 440-447, Feb 2011. Article.
- TANG, W. J.; PAN, A.; LU, H. Z.; XIA, J. Y. et al. Improvement of glucoamylase production using axial impellers with low power consumption and homogeneous mass transfer. **Biochemical Engineering Journal**, 99, p. 167-176, Jul 2015. Article.
- THOMAS, C. R. Image-analysis - putting filamentous microorganisms in the picture. **Trends in Biotechnology**, 10, n. 10, p. 343-348, Oct 1992. Article.
- THOMASI, S. S.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Average shear rate in three pneumatic bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 33, n. 8, p. 979-988, Oct 2010. Article.



- TUCKER, K. G.; THOMAS, C. R. Mycelial morphology - the effect of spore inoculum level. **Biotechnology Letters**, 14, n. 11, p. 1071-1074, Nov 1992. Article.
- VALVERDE, M. R.; BETTEGA, R.; BADINO, A. C. Numerical evaluation of mass transfer coefficient in stirred tank reactors with non-Newtonian fluid. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, 50, n. 6, p. 945-958, Nov 2016. Article.
- VASCONCELLOS, V. M.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C.; FARINAS, C. S. Addition of metal ions to a (hemi)cellulolytic enzymatic cocktail produced in-house improves its activity, thermostability, and efficiency in the saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **New Biotechnology**, 33, n. 3, p. 331-337, May 2016. Article.
- VEITER, L.; RAJAMANICKAM, V.; HERWIG, C. The filamentous fungal pellet-relationship between morphology and productivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102, n. 7, p. 2997-3006, Apr 2018. Review.
- WALISKO, R.; MOENCH-TEGEDER, J.; BLOTENBERG, J.; WUCHERPFENNIG, T. et al. The Taming of the Shrew - Controlling the Morphology of Filamentous Eukaryotic and Prokaryotic Microorganisms. In: KRULL, R. e BLEY, T. (Ed.). **Filaments in Bioprocesses**. Berlin: Springer-Verlag Berlin. v. 149, p. 1-27, 2015.
- WONGWICHARN, A.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. **Biotechnology and Bioengineering**, 65, n. 4, p. 416-424, Nov 1999. Article.
- WUCHERPFENNIG, T.; HESTLER, T.; KRULL, R. Morphology engineering - Osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. **Microbial Cell Factories**, 10, p. 15, Jul 2011. Article.
- XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B. et al. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, 48, n. 1, p. 54-60, Jan 2011. Article.
- YAHIRO, K.; TAKAHAMA, T.; JAI, S. R.; PARK, Y. S. et al. Comparison of air-lift and stirred tank reactors for itaconic acid production by *Aspergillus terreus*. **Biotechnology Letters**, 19, n. 7, p. 619-621, Jul 1997. Article.
- YU, L.; CHAO, Y. P.; WENSEL, P.; CHEN, S. L. Hydrodynamic and kinetic study of cellulase production by *Trichoderma reesei* with pellet morphology. **Biotechnology and Bioengineering**, 109, n. 7, p. 1755-1768, Jul 2012. Article.
- ZENG, A. P. New bioproduction systems for chemicals and fuels: Needs and new development. **Biotechnology Advances**, 37, n. 4, p. 508-518, Jul-Aug 2019. Review.

ZHANG, J. G.; ZHANG, J. N. The filamentous fungal pellet and forces driving its formation. **Critical Reviews in Biotechnology**, 36, n. 6, p. 1066-1077, Dec 2016. Review.

ZHAO, C.; DENG, L.; FANG, H. Mixed culture of recombinant *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* for cellulase production to increase the cellulose degrading capability. **Biomass & Bioenergy**, 112, p. 93-98, May 2018. Article.

ZHAO, X. B.; LIU, D. H. Multi-products co-production improves the economic feasibility of cellulosic ethanol: A case of Formiline pretreatment-based biorefining. **Applied Energy**, 250, p. 229-244, Sep 2019. Article.

## APÊNDICE A. Viabilidade do uso de esporos congelados (criotubos)

O uso de criotubos, como descrito em materiais e métodos, foi adotado depois de realizado alguns testes em relação a validade de tal procedimento. Tal validade foi verificada analisando-se a atividade enzimática e massa seca de inóculos crescidos através de esporos frescos (ressuspensos no mesmo dia) e esporos recém descongelados (providos de criotubos). Os resultados de massa seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ), atividade enzimática (endoglucanase –  $\text{U.L}^{-1}$ ) e atividade de endoglucanase específica (Atividade enzimática/concentração inóculo –  $\text{U.g}^{-1}$ ) para as duas condições são mostrados na Tabela A1. Pode-se observar que todos os resultados foram similares para os dois tipos de esporos utilizados. Os ensaios foram realizados em concentração de esporos de  $10^7$  e pH 4,5 (condição adotada como padrão na presente Tese) e em triplicata.

Tabela A1. Comparação massa seca e atividade enzimática esporos ressuspensos e esporos advindos de criotubos.

<b>Condição Esporos</b>	<b>Atividade endoglucanase (<math>\text{U.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Desvio Padrão (-)</b>	<b>Massa seca (<math>\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	<b>Desvio Padrão (-)</b>	<b>Atividade específica (<math>\text{U.g}^{-1}</math>)</b>	<b>Desvio Padrão (-)</b>
Ressuspendido	729	46	7.0	0.2	104	7
Criotubo	892	92	7.5	1.0	119	20

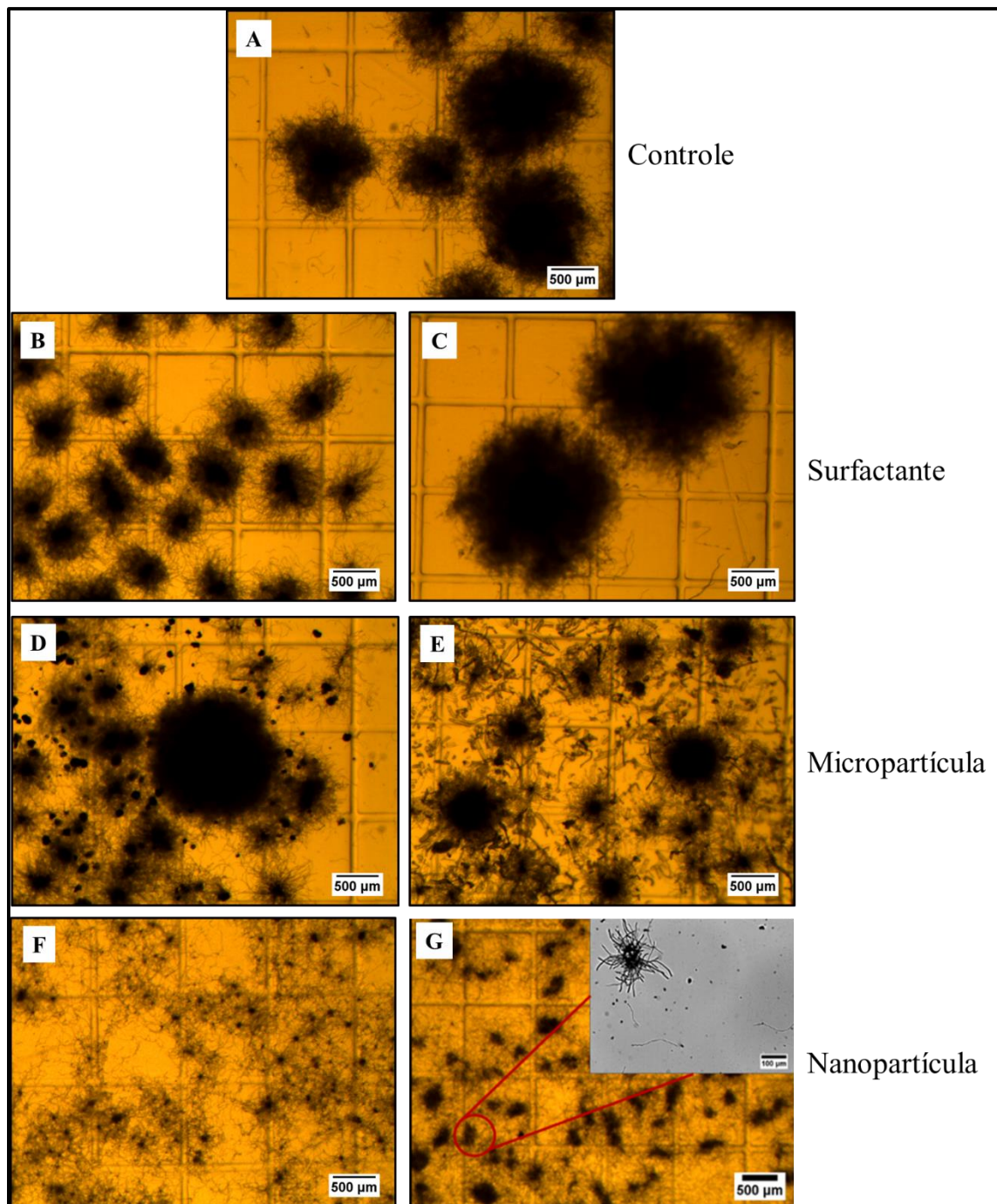
## APÊNDICE B. Outros métodos utilizados para alterar morfologia fúngica

Além do mostrado no capítulo 6, referente a mudança concomitante da concentração de esporos e pH, outras técnicas também foram testadas no intuito de alterar a morfologia fúngica. Sendo essas: alterar a quantidade de surfactante utilizada (tween 80) e o uso de micropartículas e nanopartículas. Tais ensaios são enumerados na Tabela B1 e as morfologias, em 48 horas de inóculo, mostradas na Figura B1.

Tabela B1. Condições extras avaliadas para mudança da morfologia do inóculo

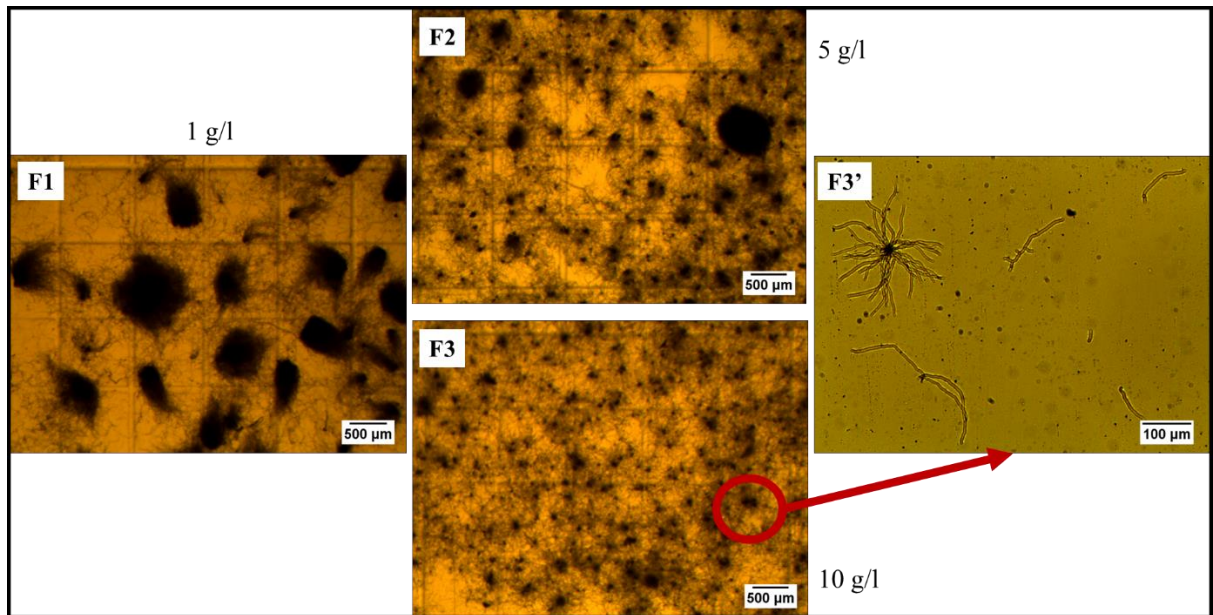
<b>Condição</b>	<b>Característica</b>
A (Controle)	0,1% m/v Tween 80 (Cunha et al. 2015)
B	0% Tween 80
C	1% Tween 80
D	Micropartículas Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (5 µm) 30 g/L
E	Micropartículas de Celulose 30 g/L
F	Nanopartículas Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (13nm) 30 g/L
G	Nanopartículas de Celulose 30 g/L

Figura B1. Morfologias obtidas com base nas alterações propostas na Tabela A1.



Com base nos resultados obtidos realizou-se estudo da quantidade de nanopartícula de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (condição F) a ser utilizada, os resultados são apresentados na Figura B2, onde observa-se que uma quantidade de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  já se mostra suficiente para diminuir bastante o tamanho da morfologia.

Figura B2. Morfologias obtidas alterando a concentração de nanopartículas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  utilizada (Condição F). F1: 1 g/l; F2: 5 g/l; F3: 10 g/l; F3': 10 g/l (diluído 1:50).



Foram realizados ensaios para produção de endoglucanase, comparando os inóculo da condição controle (pellets) com os inóculos com mais fase dispersa obtidos através do uso de nanopartículas. Tais resultados podem ser verificados na Figura B3. Os resultados estão de acordo com a comparação em shaker para produção de endoglucanase, em que a morfologia pelletizada apresentou melhores resultados. Não foram analisadas as produções de  $\beta$ -glicosidase ou outras enzimas. Os estudos com diferentes morfologias de inóculos foram realizados através da mudança concomitante do pH e da concentração de esporos, visto que se trata de uma técnica mais economicamente viável e que também apresentou bons resultados. Porém os resultados com nanopartículas também são promissores, principalmente considerando a evolução de estudos nesse tema e a obtenção de nanopartículas em um contexto de biorrefinarias.

Figura B3. Uso de nanopartículas para alterar a morfologia do inóculo e consequência na produção de endoglucanase.

