

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

NILTON SILVA COSTA MAFRA

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Myceliophthora thermophila* I-1D3b EM  
RESPOSTA A DIFERENTES FONTES DE CARBONO E TAXAS DE AERAÇÃO EM  
CULTIVOS SÓLIDO E SUBMERSO**



São Carlos – SP

2023

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

NILTON SILVA COSTA MAFRA

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Myceliophthora thermophila* I-1D3b EM  
RESPOSTA A DIFERENTES FONTES DE CARBONO E TAXAS DE AERAÇÃO EM  
CULTIVOS SÓLIDO E SUBMERSO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Perpétua Casciotori.



São Carlos – SP

2023



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Nilton Silva Costa Mafra, realizada em 24/02/2023.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori (UFSCar)

Profa. Dra. Lina Maria Grajales Agudelo (UFT)

Profa. Dra. Clarissa Hamaio Okino Delgado (Ikove Agro)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família e  
aos meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a força, o discernimento e a sabedoria necessária para conclusão dessa etapa importante da minha vida.

A toda a minha família por compartilharem comigo os momentos decisivos durante esta trajetória. Em especial, agradeço à minha mãe Maria Nágia e ao meu irmão Nailton que sempre estiveram disponíveis para ajudar de todas as formas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Perpétua Casciotori, orientadora dessa dissertação, por todo o apoio, incentivo, atenção, ensinamentos, conselhos, preocupação e compreensão. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Aparecida Casciotori Frassatto e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarissa Hamaio Okino Delgado pelas sugestões que contribuíram de forma significativa para a finalização do presente trabalho.

Ao meu orientador da graduação, Prof. Dr. Harvey Alexander Villa Vélez, por todo auxílio, orientação, atenção e apoio. Por ter sido durante a minha graduação um grande professor, amigo, conselheiro e até por vezes um pai.

À Natália pela ajuda e parceria durante o desenvolvimento da Dissertação.

Aos amigos da Bioquímica e Pós-Graduação José Davi, Camila V., Ivan, Isabela, Letícia, Marília, Marina e Rauber, pela parceria.

Aos meus amigos que estão comigo desde o início, Éverton Holanda, Aline Medeiro, Paulo Sérgio, Kelle Jéssica, Fernanda Hellen, Nielson Brito e Felipe Muniz. O companheirismo de vocês me fortaleceu nessa caminhada, em especial Paulo, Éverton e Aline, com os quais criei laço mais forte através da experiência de morar junto, construindo uma segunda família.

A todas as pessoas que me ajudaram durante esse processo, com um conselho, ensinamentos ou por uma ajuda no trabalho, muitas vezes exaustivo, no laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos e a todo pessoal envolvido, pela infraestrutura e apoio institucional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001), à Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP – e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – por meio do Programa de Formação de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo, Gás e Biocombustíveis – PRH-ANP/MCTI, em particular ao PRH 39, do qual fui bolsista, bem como à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2018/00996-2 e 2016/10636-8), pelo apoio na forma de Auxílio à Pesquisa.

*“Os que confiam no Senhor são como  
o monte de Sião, que não se abala,  
firme para sempre.”*

(Salmo 125:01)

## RESUMO

Nas últimas décadas, o interesse nos sistemas celulolíticos de fungos termofílicos motivou o desenvolvimento de pesquisas visando o uso de suas enzimas em vários setores industriais, como na produção de biocombustíveis, particularmente do bioetanol de segunda geração (BE2G). O fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b demonstra ser um excelente produtor de celulases; no entanto, há pouco conhecimento sobre o seu metabolismo. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar experimentalmente o efeito de diferentes fontes de carbono e taxas de aeração sobre a capacidade de ativar ou inibir a produção de celulases pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em cultivos em estado sólido (CES) e submerso (CSm). Como fontes de carbono, foram avaliadas glicose, sacarose, frutose e lactose nas concentrações de 5, 10 e 15 g.L<sup>-1</sup>. Quanto às taxas de aeração, foram testadas 0,5 e 1 vvm. Os ensaios para os cultivos em meio sólido e submerso foram conduzidos a 45°C por 96 h. Inicialmente, em escala de frascos, foi avaliada a influência das fontes de carbono sobre a indução da produção enzimática e a adição de lactose e outros compostos possivelmente indutores ao meio de preparo do inóculo, assim como o efeito da proporção de bagaço de cana e farelo de trigo na composição do substrato. Foram avaliadas ainda a substituição do meio sintético de lactose por soro de leite *in natura*. Nos ensaios em biorreatores de leito empacotado (BLE) para CES e tanque agitado aerado (TAA) para CSm, foram estudados os efeitos da variação da taxa de aeração sobre o crescimento e a produção de enzimas. Os cultivos em escala de frascos mostraram que a lactose foi considerada um indutor promissor para a síntese de endoglucanase na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>, sendo alcançadas atividades de 210 e 120 U.gss<sup>-1</sup> nos cultivos sólido e submerso, respectivamente, empregando 7:3 m/m de bagaço de cana e farelo de trigo. A adição de lactose ao meio de preparo do inóculo não se mostrou interessante, não elevando de forma significativa a atividade de endoglucanase obtida. Os ensaios com soro de leite *in natura* apresentaram resultados próximos ao do controle realizado com uso de lactose sintética, o que mostra a sua perspectiva de aproveitamento. As análises em biorreatores mostraram que os perfis temporais de temperatura e de concentração de CO<sub>2</sub> não apresentaram variação significativa (95% de confiança) com o aumento da vazão de aeração. Apesar disso, na operação com 1 vvm, foi observado maior volume de CO<sub>2</sub> desprendido, o que se refletiu paralelamente em maior produção enzimática. Assim, a operação a 1 vvm mostrou-se aplicável e mais vantajosa para a produção de celulase.

**Palavras-chave:** Biorrefinaria; Fungo termofílico; Indução enzimática; Celulase; Bioetanol.

## ABSTRACT

The interest in cellulolytic systems of thermophilic fungi motivated the development of research aimed at the use of their enzymes in various industrial sectors, such as in the production of biofuels, particularly second-generation bioethanol (BE2G). The fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b has proved to be an excellent producer of cellulases; however, there is little knowledge about its metabolism. Thus, the objective of this work was to experimentally analyze the effect of different carbon sources and aeration rates on the ability to activate or inhibit cellulase production by the fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b in solid state (CES) and submerged (CSm) cultivations. Glucose, sucrose, fructose and lactose were evaluated as carbon sources at concentrations 5, 10 and 15 g.L<sup>-1</sup>, as for aeration rates 0.5 and 1 vvm were tested. The tests for the cultivations in solid and submerged medium were conducted at 45°C for 96 h. Initially, on flasks scale, it has been evaluated the influence of carbon sources on the induction of enzymatic production and the addition of lactose and other compounds likely inducers to the inoculum preparation medium, as well as the effect of the proportion sugarcane bagasse and wheat bran on substrate composition. The replacement of synthetic lactose medium by fresh whey was also evaluated. In the tests on packed bed bioreactor for CES and aerated stirred tank for CSm, the effects of variation in aeration rate on growth and secretion of enzymes were studied. Flasks-scale cultivations showed that lactose was considered a promising inducer for endoglucanase synthesis at the concentration of 15 g.L<sup>-1</sup>, achieving activities of 210 and 120 U.gss<sup>-1</sup> in solid and submerged cultivations, respectively, for mass proportion 7:3 of sugarcane bagasse and wheat bran. The addition of lactose to the inoculum preparation medium was not interesting, not increasing significantly endoglucanase activities. The assays with fresh whey showed results close to the control performed with the use of synthetic lactose, which shows their perspective of reuse. The analyses in bioreactors showed that time-profiles of temperature and CO<sub>2</sub> concentration did not present significant variation (95% confidence) with the increase of the aeration rate. Nevertheless, in the operation with 1 vvm, a higher volume of CO<sub>2</sub> released was observed, which reflected in higher enzymatic production. Thus, the operation with 1 vvm proved to be applicable and advantageous to produce cellulase.

**Keywords:** Biorefinery; Thermophilic fungus; Enzymatic induction; Cellulase; Bioethanol.



## LISTA DE SÍMBOLOS

$A_{\text{Enz}}$	Atividade enzimática (U/gss)
$A_{\text{Esp}}$	Atividade enzimática específica (U/mg)
ANOVA	Análise de variância
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
BC	Bagaço de cana-de-açúcar
BLE	Biorreator de leite empacotado
b.u	Base úmida (%)
BOD	Incubadora (demanda bioquímica de oxigênio)
C	Dióxido de carbono acumulado (mol)
CBH	Celobiohidrolases
CES	Cultivo em estado sólido
$C_{\text{Esporos}}$	Concentração de esporos desejada (esporos.g <sup>-1</sup> )
$C_{\text{Lac}}$	Concentração de lactose
CMC	Carboximetilcelulose
CMCase	Atividade de endoglucanase
CO <sub>2</sub>	Porcentagem volumétrica de dióxido de carbono (% $L_{\text{CO}_2} \cdot L_{\text{gás}}^{-1}$ )
CSm	Cultivo submerso
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
BE1G	Bioetanol de primeira geração
BE2G	Bioetanol de segunda geração
F	Vazão de ar (L/h)
FT	Farelo de trigo
FPase	Atividade sobre papel de filtro
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
Lac	Lactose
M	Média da contagem dos quadrantes ( $n_{\text{esporos}} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).
$m_s$	Massa de substrato (g)
$m_{\text{solução}}$	Massa de solução a ser adicionada (g)
P	Produção de proteínas solúveis (mg)
pH	Potencial hidrogeniônico

$R^2$	Coeficiente de determinação
$t$	Tempo (h)
TAA	Biorreator tanque agitado aerado
$V_{cam}$	Volume total da câmara (mL)
$V_{inóculo}$	Volume do inóculo a ser adicionado (mL)
$V_m$	Volume molar dos gases ideais (22,4 L/mol)
$vvm$	Volume de ar por volume de meio por minuto ( $L_{ar} \cdot L_{meio}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
$X_0$	Quantidade inicial de dióxido de carbono (mol)
$X_m$	Quantidade máxima de dióxido de carbono (mol)
$x_1$	Umidade inicial do substrato (g/g)
$x_2$	Umidade final do substrato (g/g)
$Y'_{P/S}$	Rendimento enzimático aparente ( $U/mg_{lactose}$ )
$\mu$	Constantes específicas ( $h^{-1}$ )
$\Delta t$	Diferença do tempo (h)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1:</b> Composição da biomassa vegetal.....	7
<b>Figura 3.2:</b> Produção implementada de etanol celulósico.....	8
<b>Figura 3.3:</b> Ação das celulasas no polímero de celulose.....	11
<b>Figura 3.4:</b> Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos .....	14
<b>Figura 3.5:</b> Aeração no cultivo em meio: a) Sólido; b) Submerso.....	23
<b>Figura 4.1:</b> Esquema de preparo do inóculo a partir dos criotubos.....	24
<b>Figura 4.2:</b> Embalagem de polipropileno com substrato seco.....	27
<b>Figura 4.3:</b> Extração de enzimas em cultivo sólido em embalagem de polipropileno.....	28
<b>Figura 4.4:</b> Esquema experimental dos cultivos submersos em escala de frascos.....	29
<b>Figura 4.5:</b> Esquema experimental dos cultivos sólidos e submersos com adição de soro de leite em escala de frascos.....	33
<b>Figura 4.6:</b> Aparato experimental empregado nos cultivos em estado sólido em BLE.....	34
<b>Figura 4.7:</b> Biorreator de leite empacotado modular .....	35
<b>Figura 4.8:</b> Posição do termopar para acompanhamento da temperatura .....	37
<b>Figura 4.9:</b> Sistema utilizado no cultivo submerso.....	38
<b>Figura 5.1:</b> Atividades endoglucanase (CMCase) obtidas ao final dos cultivos sólidos.....	44
<b>Figura 5.2:</b> Cultivo submerso de <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b em Erlenmeyer.....	45
<b>Figura 5.3:</b> Valores de atividade de endoglucanase obtidos ao final dos cultivos submersos de <i>M. thermophila</i> .....	46
<b>Figura 5.4:</b> Diagrama de Pareto para a atividade de endoglucanase (CMCase) nos cultivos sólido (a) e submerso (b).....	50
<b>Figura 5.5:</b> Ajuste da equação da logística aos pontos experimentais do cultivo em estado sólido de <i>M. thermophila</i> para atividade de endoglucanase .....	52
<b>Figura 5.6:</b> Aparência dos cultivos sólido e submerso de <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b após as 96 horas de cultivo .....	54
<b>Figura 5.7:</b> Perfis de temperatura do cultivo em estado sólido em BC:FT 7:3 de <i>M. thermophila</i> em BLE.....	57
<b>Figura 5.8:</b> Perfis de concentração de CO <sub>2</sub> em função do tempo de cultivo em duplicata em BLE.....	59
<b>Figura 5.9:</b> Ajuste do modelo de regressão logística aos dados de CO <sub>2</sub> acumulado em duplicata.....	60
<b>Figura 5.10:</b> Sistema utilizado no cultivo submerso, imagem real ao final do tempo de 96 h ...	65

<b>Figura 5.11:</b> Produção de endoglucanase (a) e proteínas solúveis (b) ao longo do cultivo submerso de <i>M. thermophila</i> com lactose (15g.L <sup>-1</sup> ) em TAA com taxa de aeração de 1,0 e 0,5 vvm.....	66
<b>Figura 5.12:</b> Perfis de concentração de CO <sub>2</sub> em função do tempo de cultivo em duplicata.....	68
<b>Figura 5.13:</b> Ajuste do modelo de regressão logística aos dados de CO <sub>2</sub> acumulado em duplicata do biorreator TAA para as duas taxas de aerações.....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1:</b> Estudos com microrganismos produtores de celulase.....	17
<b>Tabela 3.2:</b> Produção de enzimas por linhagens do fungo <i>Myceliophthora thermophila</i> .....	19
<b>Tabela 4.1:</b> Composição da solução nutriente.....	25
<b>Tabela 4.2:</b> Planejamento experimental de testes de preparo de inóculo de <i>M. thermophila</i> .....	29
<b>Tabela 4.3:</b> Variáveis independentes e níveis do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> .....	30
<b>Tabela 4.4:</b> Planejamento da cinética de cultivo sólido de <i>M. thermophila</i> em meio com lactose.....	31
<b>Tabela 5.1:</b> Atividade de endoglucanase (CMCase) na presença de diferentes fontes de carbono e respectivas concentrações em cultivo sólido em embalagens de polipropileno .....	42
<b>Tabela 5.2:</b> Atividade de endoglucanase (CMCase) na presença de diferentes fontes de carbono e respectivas concentrações em cultivo submerso.....	45
<b>Tabela 5.3:</b> Atividade de endoglucanase (CMCase) ao final dos cultivos de <i>M. thermophila</i> a partir de inóculos crescidos em diferentes composições de meio.....	48
<b>Tabela 5.4:</b> Resultados do planejamento fatorial dos cultivos em estado sólido e submerso de <i>M. thermophila</i> para atividade de endoglucanase.....	49
<b>Tabela 5.5:</b> Resultados da análise química do soro de leite <i>in natura</i> e concentrado.....	53
<b>Tabela 5.6:</b> Atividade de endoglucanase (CMCase) ao final dos cultivos de <i>M. thermophila</i> a partir de inóculos crescidos no meio formado por soro de leite.....	55
<b>Tabela 5.7:</b> Análise térmica ao longo do processo fermentativo BLE.....	58
<b>Tabela 5.8:</b> Constantes específicas de produção de CO <sub>2</sub> de acordo com as taxas de aeração em BLE.....	61
<b>Tabela 5.9:</b> Atividade de endoglucanase e Pfase, em U/gss, em relação às taxas de aeração.....	61
<b>Tabela 5.10:</b> Umidade final do meio utilizado nos módulos acessórios de entrada, fermentativo e saída do BLE após os cultivos de <i>M. thermophila</i> em estado sólido em BC:FT 7:3 m/m.....	63
<b>Tabela 5.11:</b> Produção de proteínas solúveis e atividade específica de acordo com as taxas de aeração em BLE.....	64
<b>Tabela 5.12:</b> Constantes específicas de produção de CO <sub>2</sub> de acordo com as taxas de aeração.....	70
<b>Tabela 5.13:</b> Resultados de rendimentos aparentes em cultivos sólido e submerso de <i>M. thermophila</i> em meio com lactose com taxas de aeração de 1,0 e 0,5 vvm em biorreatores.....	71

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	OBJETIVOS .....	4
2.1.	Objetivos específicos .....	4
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1.	Energia renovável e a importância do biocombustível.....	5
3.1.1.	Biomassa lignocelulósica.....	6
3.1.2.	Produção atual .....	8
3.2.	Etanol celulósico.....	9
3.3.	Enzimas celulolíticas .....	10
3.4.	Cultivo em estado sólido (CES) e submerso (CSm) na produção de enzimas .....	12
3.4.1.	Cultivo em estado sólido (CES) .....	12
3.4.1.1.	Crescimento de fungos filamentosos em CES .....	14
3.4.2.	Cultivo submerso (CSm) .....	16
3.5.	Microrganismos utilizados nos processos fermentativos .....	17
3.5.1.	Potencial de <i>Myceliophthora thermophila</i> para produção de celulase .....	18
3.6.	Influência de fontes de carbono e aeração na produção de celulases .....	19
3.6.1.	Aeração .....	22
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
4.1.	Microrganismo.....	24
4.2.	Solução nutriente e caldo de cultivo.....	25
4.3.	Substratos.....	26
4.4.	Avaliação do efeito das fontes de carbono .....	26
4.4.1.	Cultivos em estado sólido em embalagens plásticas .....	27
4.4.2.	Cultivos submersos em frascos de Erlenmeyer .....	28
4.5.	Análise do efeito de adição de compostos ao meio de preparo do inóculo .....	29

4.6. Planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> .....	30
4.7. Cinética enzimática de <i>M. thermophila</i> em CES em embalagens plásticas.....	31
4.8. Testes com soro de leite em cultivos sólido e submerso.....	31
4.8.1. Caracterização do soro de leite .....	32
4.8.2. Efeito da adição de soro de leite sobre o crescimento do microrganismo e a atividade de endoglucanase (CMCase).....	33
4.9. Efeito da aeração em biorreatores.....	34
4.9.1. Cultivos em estado sólido em biorreator de leite empacotado (BLE).....	34
4.9.2. Monitoramento da temperatura.....	36
4.9.3. Umidade.....	37
4.10. Cultivos submersos em biorreator de tanque agitado aerado (TAA) .....	37
4.11. Determinações analíticas .....	38
4.11.1. Concentração de proteínas solúveis .....	38
4.11.2. Atividade de endoglucanase e papel de filtro.....	39
4.11.3. Atividade específica .....	39
4.11.4. Cálculo de parâmetros de cultivo .....	40
4.11.5. Análise respirométrica.....	40
4.12. Análises estatísticas .....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Avaliação do efeito indutor de diferentes fontes de carbono .....	42
5.1.1. Efeito indutor no cultivo em estado sólido .....	42
5.1.2. Efeito indutor no cultivo submerso.....	44
5.2. Avaliação da suplementação de meios de preparo de inóculo.....	47
5.3. Planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> .....	49
5.4. Cinética de crescimento de <i>M. thermophila</i> em cultivo em estado sólido .....	51
5.5. Teste com soro de leite como fonte de lactose .....	53
5.5.1. Caracterização do soro de leite .....	53

5.5.2. Avaliação da adição de soro de leite sobre o crescimento do microrganismo e a atividade de endoglucanase (CMCase).....	54
5.6. Avaliação do efeito da taxa específica de aeração em biorreatores.....	56
5.6.1. Cultivos em estado sólido em biorreator de leite empacotado (BLE).....	57
5.6.1.1. Resultados térmicos dos cultivos .....	57
5.6.1.2. Análise respirométrica .....	58
5.6.1.4. Umidade .....	63
5.6.1.5. Proteínas solúveis.....	64
5.6.2. Cultivos submersos em biorreator tipo tanque agitado aerado (TAA) .....	65
5.6.2.1. Atividades enzimáticas e concentração de proteínas solúveis .....	66
5.6.2.2. Análise respirométrica .....	67
5.7. Comparação dos rendimentos aparentes dos cultivos em biorreatores .....	70
6. CONCLUSÕES .....	73
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76



## 1. INTRODUÇÃO

Diante do cenário global de alterações climáticas e da iminente perspectiva de esgotamento das jazidas de combustíveis fósseis, torna-se estratégico o desenvolvimento de matrizes energéticas renováveis. Neste contexto, os biocombustíveis surgem como uma alternativa promissora, estando cada vez mais presentes entre os combustíveis comercializados no Brasil (MORAIS et al., 2019).

Os biocombustíveis líquidos podem ser classificados em bioetanol de primeira geração (BE1G), que advém de carboidratos simples presentes em parte nobres de culturas como em grãos de milho e caldo de cana de açúcar utilizados como alimentos, e possui um processo de produção bem estabelecido. Porém, um dos entraves para o crescimento da produção de etanol 1G é a grande área plantada para estas monoculturas, áreas tais que poderiam servir para a produção de alimentos. Uma alternativa para solucionar tal questão é o bioetanol de segunda geração (BE2G), que utiliza subprodutos agroindustriais (biomassa lignocelulósica), inclusive os da rota de produção de BE1G, evitando a necessidade de aumento da área plantada (ZHAO e LIU, 2019). O aproveitamento dessa biomassa vegetal na sua totalidade é um fator importante para a sustentabilidade do processo de produção de biocombustíveis, em decorrência da redução das emissões de gases de efeito estufa (PINTO, 2021).

Neste cenário, o BE2G emerge como uma das principais alternativas para utilização da biomassa vegetal existente, que hoje tem grande parcela sendo utilizada para produção de energia pela geração de calor, mas uma grande parte permanece nas usinas causando problemas de armazenamentos, dessa forma o BE2G pode ser uma forma de aproveitamento dos subprodutos que são gerados pela rota de produção industrial, o que por sua vez não impede o uso posterior em caldeiras. Porém alguns percalços ainda precisam ser superados para que este biocombustível se torne competitivo. Dentre eles, destacam-se pré-tratamentos e hidrólises enzimáticas mais eficazes, assim como a obtenção de enzimas lignocelulolíticas a mais baixo custo. O processo de pré-tratamento é essencial para que ocorra a desestruturação da biomassa lignocelulósica, tornando as fibras de celulose e hemicelulose mais disponíveis para a hidrólise (CASCIATORI; CASCIATORI-FRASSATTO, 2018).

A hidrólise, etapa chave na cadeia de obtenção do BE2G, pode ser conduzida por via química ou enzimática. A rota enzimática é a mais ambientalmente amigável, dada a especificidade enzima-substrato, o que torna o processo mais efetivo e promissor, evitando a produção de compostos indesejáveis (DENTI, 2021). Assim, focando na síntese bioquímica de BE2G, a produção de enzimas úteis a essa cadeia na própria biorrefinaria (*in house*) pode

praticamente garantir a autossuficiência da unidade, contribuindo para a viabilidade econômica do processo (FARINAS, 2015).

Neste contexto, a fermentação mostra-se como alternativa biotecnológica de obtenção de tais enzimas, conhecidas como celulases. Entre os sistemas empregados para a produção de enzimas, o cultivo em estado sólido (CES) apresenta diversas vantagens sobre o cultivo submerso (CSm), especialmente para o meio fúngico (THOMAS et al. 2013).

Os microrganismos que mais se adaptam a esse cultivo são os fungos filamentosos. Dentre estes, os termofílicos se destacam por produzirem enzimas termoestáveis e atuantes em pHs ácidos, tornando-as interessantes do ponto de vista industrial da produção de biocombustíveis (ALAZI et al. 2018). *Myceliophthora thermophila* é um fungo termofílico que produz uma variedade de enzimas termoestáveis em CES, bem como em CSm, como enzimas lignocelulolíticas, com destaque à alta atividade de endoglucanase (SINGH, 2016).

Na natureza, os fungos termofílicos ajustam seu metabolismo aos nutrientes disponíveis no meio para melhor crescimento (GOMES et al., 2020). Assim, para degradar a biomassa celulósica os fungos precisam ajustar seu metabolismo para degradar as enzimas específicas. O que ocorre pelo reconhecimento de substâncias que estimulam sua produção chamadas de indutores (DENTI, 2021). Dentre os nutrientes essenciais para o desenvolvimento desse fungo, estão carbono e nitrogênio, sendo o carbono o principal constituinte do material celular. Desta forma, a busca da combinação ideal de fontes simples e complexas de carbono visa potencializar a síntese das enzimas de interesse (GOMES et al., 2020).

Os principais compostos empregados como fonte de carbono são os monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) e os dissacarídeos (maltose e sacarose) (SANTOS et al., 2013). Altas concentrações de monossacarídeos facilmente assimiláveis no meio podem ser eficientes na produção de células, porém podem causar repressão catabólica por carbono (RODRIGUES, 2021). A celulose é um polissacarídeo grande, que, portanto, não entra na célula, de modo que não atua diretamente como indutor. A hipótese principal é que os fungos reconhecem a presença de polímeros complexos por meio de compostos de baixo peso molecular, como mono ou dissacarídeos (GOMES, 2020). A resposta da concentração de células e a síntese enzimática estão estreitamente relacionadas com o tipo de fonte de carbono utilizada, assim como sua concentração no meio (FAHEINA JUNIOR, 2017).

Além dos fatores associados aos nutrientes com efeito indutor, tem-se a aeração, que está diretamente relacionada à disponibilidade e à transferência de oxigênio ao meio de cultivo (AMBROZIM, 2019). A definição das melhores condições do processo de cultivo é muito importante e, em particular, a compreensão do efeito da aeração nas produções microbianas.

Devido a isso, o uso da aeração forçada em CES e CSm melhora a respiração microbiana e promove maior crescimento celular. No caso do CES, também ajuda a remover dióxido de carbono e controlar a temperatura, podendo assim proporcionar maior rendimento enzimático (FARINAS et al. 2018; PIROTA et al. 2016), sendo outro fator a se avaliar criteriosamente.

Embora à literatura apresente trabalhos que avaliem o efeito indutor de fontes de carbono, ela é escassa no que se refere a uma análise completa dos tipos de cultivos sólido e submerso sobre o efeito na produção de celulases, bem como não há relatos de estudos que proponham o efeito da transferência de oxigênio em biorreatores, de forma a prever a cinética nas condições impostas, tal como a relação entre parâmetros cinéticos na produção de enzimas celulolíticas. Portanto, há uma lacuna na literatura no que diz respeito a uma abordagem mais sistemática de engenharia de bioprocessos relacionada com o tema. Devido a isso o presente trabalho procura mostrar o efeito de fontes de carbono e taxas de aeração na produção de celulases pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em cultivo sólido e submerso em escala de frascos e biorreatores.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi analisar experimentalmente o efeito de diferentes fontes de carbono e taxas de aeração quanto à capacidade de ativar ou inibir a produção de celulases pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em cultivos sólido e submerso.

### 2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Avaliar a produção de endoglucanase no cultivo do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em escala de frascos em meio sólido e submerso, empregando bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT) como substratos, acrescidos de diferentes fontes de carbono monossacarídeos (frutose e glicose) e dissacarídeos (lactose e sacarose), nas concentrações de 5,0, 10,0 e 15,0 g.L<sup>-1</sup>;
- Avaliar o efeito da adição de compostos ao meio de preparo do inóculo e à solução nutriente sobre a produção de endoglucanase pelo microrganismo;
- Analisar o efeito da adição de soro de leite como fonte de lactose sobre o crescimento do microrganismo e a atividade de endoglucanase (CMCase);
- Verificar a influência das taxas de aeração de 0,5 e 1 vvm na produção enzimática empregando BC e FT como substratos em biorreatores de leito empacotado (BLE) para CES e tanque agitado aerado (TAA) para CSm;
- Avaliar o desempenho dos biorreatores através dos perfis temporais de temperatura e de produção de CO<sub>2</sub>.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Energia renovável e a importância do biocombustível

O desenvolvimento de biocombustíveis líquidos, como o bioetanol de primeira geração (BE1G), como alternativa aos combustíveis fósseis visa reduzir a dependência das importações de petróleo e carvão. Essa dependência coloca muitos países em posição de vulnerabilidade estratégica, pois esses recursos podem se esgotar por serem fontes de energia não renováveis, além de estarem sujeitos à volatilidade de preços nos mercados internacionais e a muitos problemas ambientais (CHANDEL et al., 2019).

Em 2020, com a grande crise causada pela pandemia da Covid-19 e os conflitos entre nações, o preço da gasolina foi nesse momento afetado pela queda na oferta do petróleo. Isso provocou o forte impacto dessa queda no preço internacional do petróleo, além de que o real se desvalorizou durante a crise (CARVAJAL et al. 2020). A escalada do preço aumentou no ano de 2022 conforme surgiram as preocupações de sanções, tendo a Rússia como alvo devido à guerra com a Ucrânia, o que prejudicou o fornecimento de energia para o restante do mundo. No contexto atual, mesmo antes da invasão da Ucrânia, a oferta mundial de petróleo já não conseguia acompanhar a demanda na retomada da atividade econômica, à medida que as medidas restritivas contra a Covid-19 eram flexibilizadas. A preocupação com os preços da *commodity* se intensificou dada a importância da produção russa (SILVEIRA, 2022).

Apesar de a demanda de energia ter sido afetada pela pandemia, muitas usinas sucroalcooleiras continuaram produzindo bioenergia (BLOOMBERG, 2020). Segundo o 1º Levantamento da Safra 2020/2021, estima-se que houve uma redução de 2% no primeiro ano da pandemia, quando comparado ao período anterior (CONAB, 2020). O setor encontrou dificuldades decorrentes das medidas de distanciamento social, como a redução e realocação de pessoal, onde foi necessária a adoção de novas práticas para minimizar os impactos da crise sanitária. As metas de descarbonização pelos biocombustíveis foram publicadas pela Resolução CNPE nº 15/2019, que define as metas compulsórias para o Programa RenovaBio, que por sua vez tem um importante papel para a descarbonização no setor de transporte, além de aumentar a segurança de abastecimento de biocombustíveis.

Os biocombustíveis desempenham um papel importante na matriz energética devido à possibilidade da redução de gases do efeito estufa. Estima-se que a substituição de combustíveis fósseis pelos biocombustíveis possa ajudar a reduzir em cerca de 43% desses gases. Dessa forma, pode contribuir para atingir a meta estabelecida na reunião da COP21 na França em 2015 de redução de 2°C na temperatura do planeta (SANTOS et al., 2022).

Portanto, para atender à crescente demanda nacional e internacional por energia limpa e renovável, medidas devem ser tomadas como forma de controlar conflitos de natureza econômica, como a concorrência direta com matérias-primas e a expansão desmedida das áreas de plantio de monoculturas para tal finalidade. Por essa razão, a ciência e a tecnologia têm buscado novas metodologias de produzir biocombustíveis que minimizem os impactos causados no ambiente (ZHAO; LIU, 2019). Neste cenário, destaca-se o bioetanol de segunda geração (BE2G), ou seja, um biocombustível derivado de biomassa renovável lignocelulósica, constituída de um complexo de vários polissacarídeos e oriunda dos subprodutos que são gerados no processo de produção do bioetanol de primeira geração (BE1G) (ROBAK; BALCEREK, 2018).

O aproveitamento da biomassa lignocelulósica pode, assim, aumentar de maneira significativa o rendimento global de bioetanol por unidade de terra plantada em biorrefinarias integradas de produção de etanol e açúcar, sem necessidade de expandir a área total de cultivo. Além de possibilitar, teoricamente, o uso de qualquer biomassa lignocelulósica como matéria prima para produção de BE2G, incluindo resíduos agrícolas, recursos florestais e resíduos municipais (SALOMÃO et al., 2018).

### **3.1.1. Biomassa lignocelulósica**

A biomassa lignocelulósica é uma fonte farta e concentrada de carbono que está disponível na Terra. A conversão da biomassa em especialidades químicas e biocombustíveis tem sido o foco da indústria e de pesquisas nos últimos anos para que assim se possa minimizar a geração de resíduos agroindustriais e desenvolver tecnologias ambientalmente eficazes (YAN et al., 2015). A composição exata varia de espécie para espécie com relação aos constituintes e suas proporções (FARIA et al., 2016).

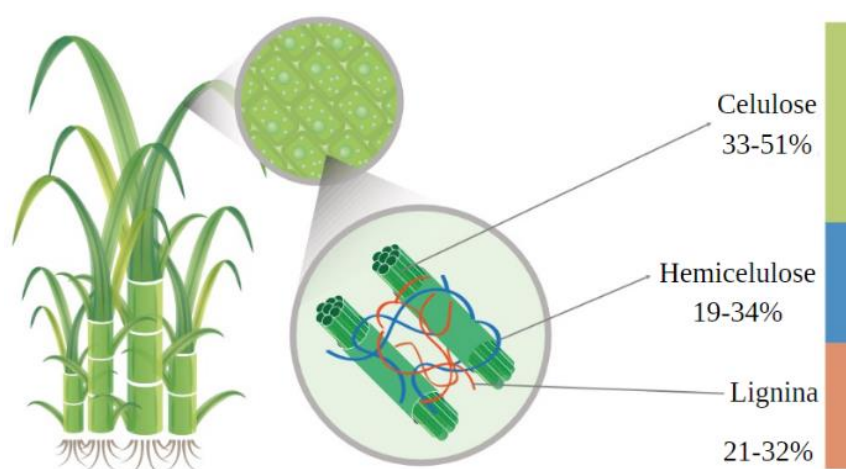
No Brasil, uma matéria-prima abundante para conversão a BE2G é o bagaço de cana-de-açúcar, que hoje tem parte destinada à cogeração de energia elétrica, mas ainda uma grande parcela permanece na usina, causando problema de armazenamento pela ampla área ocupada (CASCIATORI et al., 2015). A produção brasileira de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 585 milhões de toneladas na safra 2021/2022 (CONAB, 2022), o que gerou cerca de 158 milhões de toneladas de bagaço, com 50% de umidade (MINISTERIO DE MINAS E ENERGIA, 2021), o que demonstra o potencial dessa biomassa conversível a BE2G no país. Outro tipo de biomassa lignocelulósica é o farelo de trigo, gerado a partir do processo de moagem de trigo, que representa uma matéria-prima promissora de baixo custo para a produção de bioetanol (CRIPWELL et al., 2015). Estima-se que 1,9 milhões de toneladas de farelo de

trigo são produzidos por ano no Brasil. O farelo de trigo corresponde a 20% do grão e consiste, principalmente, de amido, hemicelulose, celulose residual, proteína e lignina (NAIR et al., 2015).

Esses materiais (que representam cerca de 160 milhões de toneladas por ano) são tradicionalmente queimados ou descartados devido ao seu restrito reaproveitamento produtivo e, também, ao baixo custo de mercado (MELENDEZ et al., 2022; JIN et al., 2020; SHANMUGAM et al., 2018). Neste contexto, a utilização desses resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma alternativa racional, devido ao seu rico conteúdo orgânico, alto teor de açúcares fermentescíveis, baixo custo e alta disponibilidade para produção de substratos no cultivo microbiano (FALKOSKI et al., 2013; EL-BAKRY et al., 2015; YUAN et al., 2021; GANDAM et al., 2022).

A Figura 3.1 mostra a estrutura geral de biomassas lignocelulósicas, que são compostas basicamente por 33–51% de celulose, 19–34% de hemicelulose e 21–32% de lignina (LEE, 1997; AGHAEI et al., 2022).

**Figura 3.1.** Composição da biomassa vegetal.



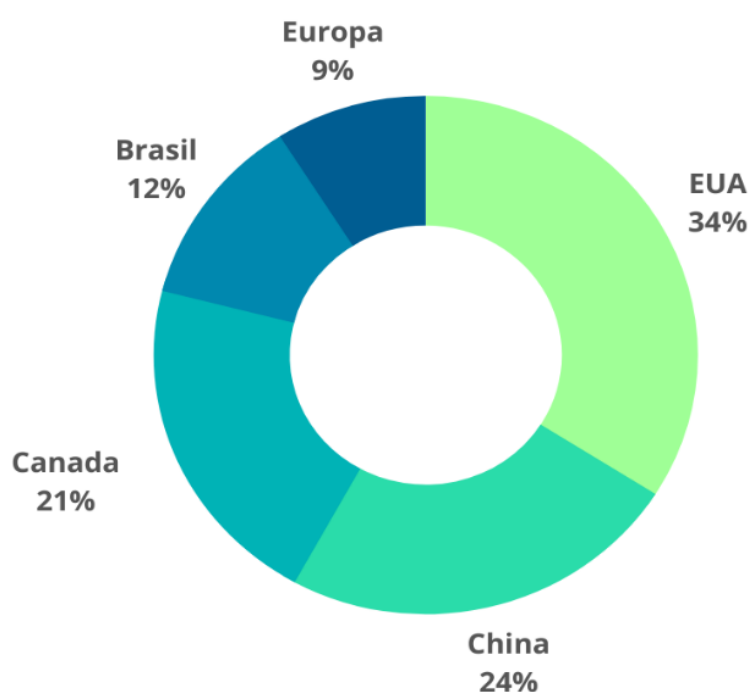
Fonte: Extraído e adaptado de LGE UNICAMP (2022).

Os dois primeiros são polissacarídeos e o último uma macromolécula formada por álcoois aromáticos, os quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio, sendo responsável por prover sustentação aos vegetais (GUO; CHANG e LEE, 2018). Diversos estudos tentam avaliar a produção anual desse material sem que haja real consenso sobre o valor, porém todos afirmam que se trata do recurso orgânico mais abundante na superfície terrestre (SOARES, 2019). Portanto, diferentemente do BE1G, o uso da tecnologia de segunda geração permite o uso de biomassa que não é utilizada como alimento.

### 3.1.2. Produção atual

No cenário atual, os Estados Unidos da América (EUA) é o maior detentor da capacidade de produção de BE2G com instalações bem solidificadas, tendo uma produção estimada de 490 milhões de litros, seguido por China, Canadá, União Europeia (UE) e Brasil, respectivamente, conforme mostra a Figura 3.2. A produção de cada país varia conforme as rotas tecnológicas e o tipo de matéria-prima usada para a produção, incluindo o uso de palha de milho, bagaço de cana, palha de arroz, palha de trigo, resíduos sólidos urbanos e resíduos florestais, entre outros (MORALES et al., 2015).

**Figura 3.2.** Produção implementada de etanol celulósico (BE2G).



Fonte: Extraído e adaptado de UNCTAD (2016).

Apesar do papel de destaque no mercado global de etanol celulósico, o mercado brasileiro está ainda em expansão, com aumento na capacidade de produção de unidades já existentes (MUSSATTO et al., 2010). A indústria de biocombustíveis de segunda geração no Brasil segue uma tendência de se desenvolver com base em infraestrutura e matéria-prima de logísticas existentes, que estão em vigor para a sua indústria estabelecida de primeira geração (MONTES, 2017).



Contudo, as unidades comerciais ainda enfrentam desafios, e permanecem funcionando abaixo da capacidade nominal, tendo como principal dificuldade superar o nível de impurezas minerais trazidas do campo junto com o bagaço e a palha (DANTAS, 2016). Dessa forma, existem poucas plantas de biocombustível de 2G por rotas enzimáticas produzindo em escala comercial no mundo, duas das quais estão no Brasil, GranBio e Raízen, sendo que ambas utilizam bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima (VIDAL et al., 2019).

A usina Bioflex-I da Granbio, no Município de São Miguel dos Campos, em Alagoas, possui capacidade de produção de 60 milhões de litros/ano, a partir do processamento de bagaço e palha (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2020). A Raízen, com planta em Piracicaba, São Paulo, possui capacidade de 41 milhões de litros/ano, a partir do processamento de bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto, uma nova unidade produtora de etanol celulósico será integrada ao parque de bioenergia Bonfim localizado em Guariba, São Paulo, e terá capacidade de produção de 82 milhões de litros/ano a partir de 2023 (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2021).

Com o início da operação da planta de BE2G em Bonfim, a capacidade de produção da Raízen será de aproximadamente 120 milhões de litros de BE2G por ano. De acordo ainda com a companhia, a meta é ter 20 plantas até 2030, aumentando em mais de 50% a capacidade de produção do combustível celulósico até 2030/2031, totalizando mais de 1,6 bilhão de litros anualmente em seus parques de biocombustível produzido a partir da biomassa não aproveitada no processo do etanol de primeira geração, o BE1G (KUTIANSKI et al., 2021)

### **3.2. Etanol celulósico**

As tecnologias para a obtenção de bioetanol de segunda geração (BE2G), produzido a partir de materiais lignocelulósicos nas biorrefinarias, consiste na integração de pelo menos três etapas principais de processamento da biomassa: pré-tratamento, hidrólise e fermentação (GIRIO et al., 2010).

O pré-tratamento tem a função de degradar parcialmente estruturas de lignina e hemicelulose, para separar os três biopolímeros (lignina, celulose e hemicelulose), melhorando a digestibilidade do material pelas enzimas a serem empregadas na etapa seguinte. A hidrólise é uma etapa importante do processo, envolvendo a conversão dos polissacarídeos da biomassa em açúcares fermentáveis para posterior fermentação (DIAZ; BLANDINO; CARO, 2018). Para executar essa tarefa, o processo de hidrólise utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas ácidas ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção das fibras (GIRIO et al., 2010).

Entre as tecnologias disponíveis de hidrólise de materiais lignocelulósicos, a conversão enzimática é promissora, pois representa uma abordagem de gerenciamento de biomassa ambientalmente amigável, sobretudo por não produzir resíduos químicos ao final do processo (HU; MOK e SADDLER, 2018).

A etapa da hidrólise tem atraído a atenção das empresas de biotecnologia e dos governos, principalmente devido à alta eficiência da produção de BE2G por essa via. Um dos grandes obstáculos que ainda precisa ser superado para tornar viável essa rota de produção nas biorrefinarias é justamente o alto custo dessas enzimas e o monopólio de algumas empresas em relação à comercialização das mesmas (NOVY et al., 2016). Nos EUA, por exemplo, desde 2004, o NREL (National Renewable Energy Laboratory), juntamente com a Dupont e a Novozymes, vem desenvolvendo enzimas mais eficientes. Em quatro anos, essa parceria conseguiu reduzir os custos de produção de enzimas em 20 vezes (CHOUDHARI; ODANETH e LALI, 2019).

Assim, se faz necessário continuar avançando sobre a tecnologia atual e alcançar novos ganhos com as tecnologias em desenvolvimento, principalmente as rotas enzimáticas de pré-tratamento e hidrólise (VIDAL, 2019; YUAN et al., 2021)

### **3.3. Enzimas celulolíticas**

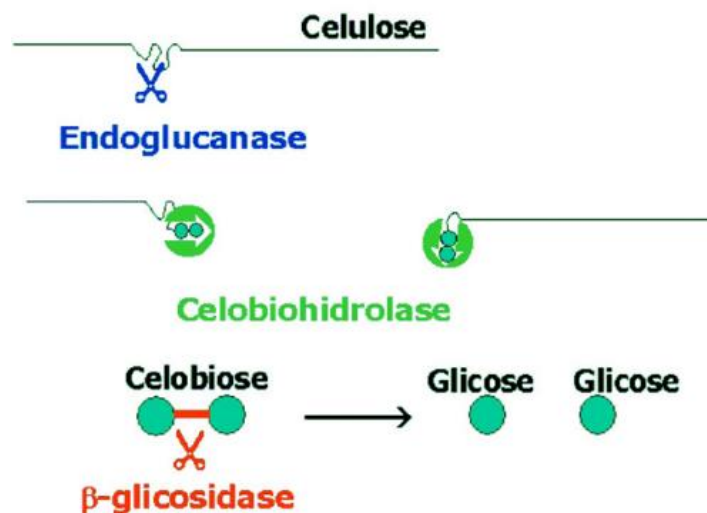
Enzimas são catalisadores biológicos muito potentes e eficazes. Uma das características notáveis das enzimas quando comparadas com catalisadores químicos é a especificidade pelo substrato e a especificidade em promover somente uma reação bioquímica com seu substrato. Além disso, pode-se operar em faixas de temperaturas e pH mais baixos, evitando problemas de corrosão (KUMAR; SINGH; KORSTAD, 2017, SANTOS, 2007). Segundo dados da Comissão Internacional de Enzimas (E.C.), o número de enzimas empregadas e identificadas é de 3000; entretanto, apenas cerca de 3% possuem uso comercial atualmente (COELHO et al., 2008).

Dentre as enzimas utilizadas no processo de hidrólise enzimática da celulose, destacam-se as celulases, pertencentes à classe de hidrolases. São enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais a glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão na produção de BE2G (CASCIATORI et al., 2015, CAMARGO et al., 2016).

Para a hidrólise eficiente da celulose, são necessários basicamente três tipos de enzimas que atuam em sinergia: endoglucanase (CMCase) (EC 3.2.1.4), responsável por clivar as

ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 internamente das áreas amorfas da celulose e gerar novos terminais redutores e não redutores. Estas enzimas são classificadas em várias famílias CAZy (carbohydrate-active enzymes), e compartilham uma estrutura comum que inclui uma grande fenda contendo aminoácidos catalíticos (GUPTA et al., 2016). As celobiohidrolases (CBH) (EC 3.2.1.91), igualmente nomeadas como exoglucanases, possuem a capacidade de atacar as extremidades cristalinas de celulose (redutoras e não redutoras), resultando em celobiose (dímeros de glicose). Por fim, a  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21) hidrolisa a celobiose, resultando em monômeros de glicose. Estas enzimas são caracterizadas por permitirem a detecção dos terminais não-redutores, como pode ser visto na Figura 3.3 (LIU et al., 2016).

**Figura 3.3.** Ação das celulasas no polímero de celulose.



Fonte: Extraído de Tébéka et al. (2009).

O grande gargalo para uma aplicação mais ampla de celulasas na produção de BE2G é o seu custo, especialmente porque grandes quantidades de enzimas são necessárias (DELABONA et al., 2012). Nesse sentido, investimentos em pesquisas têm sido realizados avaliando a biomassa lignocelulósica, a cepa microbiana utilizada e as condições de cultivo para a bioprospecção de enzimas (REINEHR et al., 2014).

Esses estudos buscam aumentar a produção das celulasas através da seleção da fonte de carbono, da seleção de microrganismos capazes de secretar uma alta quantidade de enzimas e de um coquetel enzimático eficiente (GOMEZ-MENDOZA et al., 2014; BORIN et al., 2015, GOMES et al. 2020). O custo das enzimas nesse processo é contabilizado em dólares/galão de etanol celulósico (KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012).

Com base no preço real de compra das celulasas no mercado industrial de enzimas e na

produção de etanol convencional, segundo estudo realizado em 2016, o custo da enzima é de até \$2.71/gal etanol, sendo responsável por 48% do preço mínimo de venda do etanol celulósico (LIU et al., 2016). Hong et al. (2013) mostraram que as enzimas produzidas na própria rota de produção reduziram em até 30% o custo comparado com as enzimas comerciais. Segundo Takimura et al. (2013), a redução foi de até 70% no custo das celulasas quando obtidas nesse formato.

Tendo em vista esses valores do custo no processo de produção de bioetanol 2G, a produção de enzimas na própria rota de produção do etanol 1G pode reduzir significativamente o custo da enzima, proporcionando uma alternativa promissora para a produção de etanol celulósico em larga escala (FLORENCIO et al. 2016). Para solucionar este problema, algumas estratégias podem ser usadas, como o uso de microrganismos com altas taxas de produção das enzimas e a utilização de processos fermentativos diversificados (GOMES et al., 2020).

### **3.4. Cultivo em estado sólido (CES) e submerso (CSm) na produção de enzimas**

O desenvolvimento dos processos biotecnológicos tem sido foco de grande parte dos esforços para a redução nos custos das enzimas. Esses processos podem ser conduzidos em meio sólido, chamado de cultivo em estado sólido (CES), ou em meio líquido, cultivo submerso (CSm). Grande parte dos avanços na produção de celulasas microbianas foi feita para CSm. No entanto, o crescimento de fungos filamentosos produtores de enzimas celulolíticas ocorre naturalmente em condições similares ao CES (ZANELATO et al., 2012; CASCIATORI et al., 2016; FRASSATO et al. 2020). Ambos os processos apresentam características positivas e negativas, as quais devem ser consideradas de acordo com o produto desejado e o microrganismo a ser utilizado.

#### **3.4.1. Cultivo em estado sólido (CES)**

No CES, o crescimento do microrganismo ocorre sobre uma matriz sólida porosa umidificada, de forma que a quantidade de água forme apenas uma fina camada suficiente para garantir a manutenção do metabolismo e desenvolvimento microbiano (ZANELATO et al. 2012; PEREZ et al. 2019). A matriz sólida normalmente é composta por polímeros inertes ou degradáveis. Na primeira hipótese, a matriz sólida serve somente como um suporte estrutural para crescimento dos microrganismos. Na segunda hipótese, além de atuar como suporte, a matriz exerce a função do próprio substrato, agindo como meio de nutriente a ser degradado pelo microrganismo (BEHERA; RAY, 2016).

A utilização de resíduos agroindustriais como suportes pode promover uma redução de

25 até 50% nos custos do bioprocesso (SATHYA et al., 2009). Além disso, são materiais de alta disponibilidade, estando presentes em várias rotas de produções como subprodutos. Devido a isso, a maioria dos trabalhos de CES emprega resíduos agroindustriais como suportes e/ou substratos (VANDENBERGHE et al., 2020).

Substratos celulósicos como bagaço de cana-de-açúcar (BC), farelo de trigo (FT), farelo de soja e casca de arroz são alguns dos resíduos agroindustriais comumente empregados como suportes e substratos nos processos de CES. Dentre as características que os tornam interessantes, destacam-se o baixo custo e a composição rica em celulose, sendo, portanto, fontes de açúcares fermentescíveis. De um modo geral, substratos celulósicos permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados, de 60 a 80% em base úmida, sem a presença de água líquida (SOCCOL, 1992).

Também é comum a umidificação desses biomateriais com solução nutriente de pH corrigido para regular o teor de umidade inicial e suprir a falta de algum componente necessário para crescimento microbiano (ZANELATO et al. 2012; PEREZ et al. 2019). O teor ideal de umidade depende das características do substrato e do microrganismo utilizado, sendo crucial que o valor ótimo dessa variável seja identificado individualmente em cada combinação. Valores de umidade demasiadamente altos podem dificultar a difusão gasosa e a transferência de calor no meio (RAGHAVARAO et al., 2003). Por outro lado, a baixa disponibilidade de água pode dificultar o transporte e a absorção de nutrientes, assim como a estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas e carboidratos (DE OLIVEIRA et al., 2020). Ambos os extremos devem ser evitados, pois prejudicam o crescimento e a produção de metabólitos pelos microrganismos.

Além da suplementação da matriz sólida com soluções líquidas, também pode ser realizada a adequação do tamanho das partículas, através de operações como moagem e peneiramento, com intuito de facilitar a atuação dos microrganismos. A umidade da matriz sólida também pode estar relacionada com a porosidade do leito. De acordo com Casciatori et al. (2014), a porosidade diminui com o aumento do teor de umidade. Quanto menor o tamanho das partículas, maior a área superficial e, conseqüentemente, maior o grau de transformação de substratos em bioprodutos através do processo fermentativo (PANDEY, 2003). Entretanto, é importante que a porosidade do meio seja levada em consideração, para permitir a aeração necessária, uma vez que quanto menor a porosidade, maior o risco de ocorrer canalização de ar e mais difíceis são as transferências de calor (PEREZ et al., 2020).

Cabe mencionar que se considera que o CES pode ser conduzido em modo aeróbio ou anaeróbio, através do que o termo fermentação pode ser entendido como a quebra de compostos

orgânicos por microrganismos na presença ou ausência de oxigênio (BEHERA; RAY, 2016).

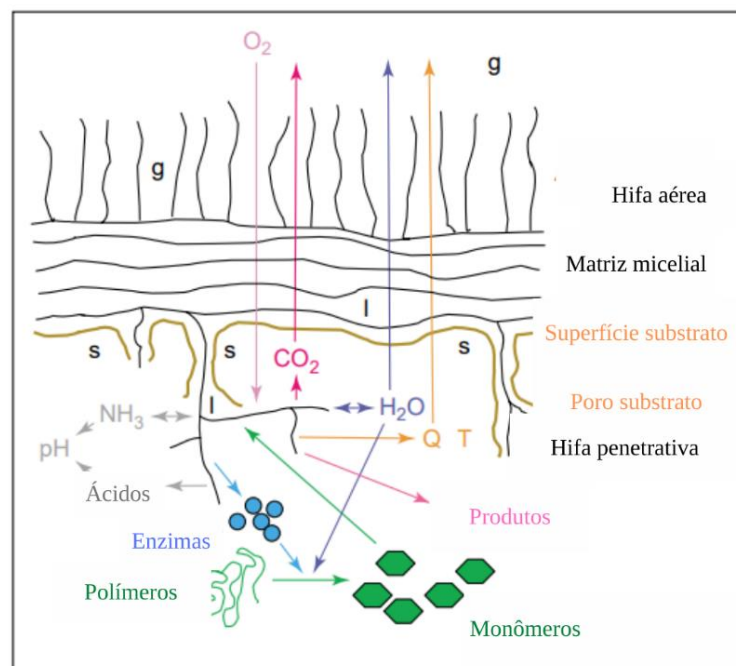
As principais etapas dos processos de operação do CES, como seleção e preparação do substrato e do microrganismo, preparação do biorreator, inoculação e tratamento de efluentes, são equivalentes a outros tipos de cultivos (MITCHELL et al., 2006). Para fungos filamentosos, o CES é considerado interessante, pois suas características assemelham-se às condições sob as quais a maioria das espécies fúngicas cresce na natureza (FLORENCIO et al., 2017). Outra vantagem do CES é que pode ser realizado por um processo estático, não acarretando custos energéticos adicionais (THOMAS et al., 2013).

Existem outras vantagens inerentes ao CES como maior produtividade dos coquetéis enzimáticos, menor susceptibilidade a inibição pelo produto e substrato e maior estabilidade em termos de efeito de pH e temperatura (BARRIOS-GONZÁLEZ, 2012).

#### 3.4.1.1. Crescimento de fungos filamentosos em CES

Para entender o crescimento de microrganismos e a formação de produto microbiano é essencial, portanto, entender a relação entre a regulação do metabolismo microbiano e o ambiente a que a célula fica exposta. O microrganismo se adapta ao ambiente respondendo com mecanismos tanto de natureza física como química (QUEIROZ; SOUSA, 2020). A Figura 3.4 apresenta os processos de transferência que ocorrem durante o CES e os elementos envolvidos.

**Figura 3.4.** Representação do crescimento de fungos em substratos sólidos.



Fonte: Adaptado Hölker e Lenz (2005).

O crescimento dos fungos filamentosos no CES ocorre após a germinação dos esporos. As hifas são desenvolvidas em uma matriz micelial que se espalha pela superfície das partículas que compõem o substrato sólido. Existem dois tipos de hifas, que são denominadas como aéreas e penetrativas. As hifas aéreas adentram no espaço gasoso, sobre a interface ar-líquido, enquanto as hifas penetrativas se desenvolvem nos poros do substrato preenchidos por líquido (HÖLKER e LANZ, 2005).

As hifas penetrativas desempenham um importante papel na disponibilidade do substrato, pois, na maioria dos casos, estes são formados por polímeros insolúveis em água, que precisam ser degradados em unidades menores (monômeros) solúveis em água, para serem então absorvidos pelos fungos como forma de nutrientes. Portanto, essa degradação enzimática do substrato pela fração penetrante das hifas é um fator determinante para o processo, pois a partir daí os fragmentos difundem-se até a superfície das partículas, sendo transformados pela ação de enzimas em compostos metabolizáveis no meio extracelular (ASSIS, 2015).

Ao longo do processo, o oxigênio é consumido e são produzidos gás carbônico, água, energia e produtos bioquímicos (HÖLKER e LANZ, 2005). À medida em que os fungos crescem dentro da matriz, desenvolvem-se gradientes de difusão, que por exemplo forçam o oxigênio a se difundir da fase gasosa para a região mais profunda da matriz porosa e o CO<sub>2</sub> dessa região para a fase gasosa, de forma que a concentração de nutrientes pode ser muito baixa no local onde a biomassa está crescendo e os consumindo, o que pode limitar o crescimento. Os fungos precisam de oxigênio molecular para gerar a energia necessária ao crescimento. Este oxigênio necessário para a respiração da biomassa deve ser capaz de difundir não somente da fase gasosa para as hifas aéreas, mas também para dentro da fase líquida do meio de crescimento até os locais onde ele é consumido pelas hifas que não se encontram em contato direto com o ar (GOMES et al., 2020).

O aquecimento gerado leva a um aumento de temperatura, o que é um sério problema durante o CES. O calor é então removido do substrato não somente pela via de condução, mas também por meio da evaporação, que é parte do equilíbrio complexo de água no sistema (HÖLKER e LANZ, 2005). Outro fator importante é o pH, que pode ser modificado devido à liberação de ácidos de carbono e a troca de amônia (HÖLKER e LANZ, 2005). Os produtos bioquímicos são liberados na matriz sólida e no interior dos poros, sendo por isso necessário, na maioria dos casos, realizar uma extração ao final do processo (HÖLKER e LANZ, 2005). A principal vantagem da extração no CES é o seu custo, que é relativamente mais baixo em relação ao CSm, devido à possibilidade de se conseguirem maiores concentrações de produtos e ao menor volume de efluentes gerados (THAKUR; KARANTH; NAND, 1993).

Generalizar vantagens entre os processos submersos ou em estado sólido é algo singular, pois se sabe que os microrganismos podem se adaptar a ambos os processos, assim como resultar em complexos enzimáticos distintos. Para Pandey, Soccol e Leon (2001), a tecnologia do cultivo em estado sólido não deveria ser vista como uma técnica que substitua o cultivo submerso, pois cada uma delas possui suas potencialidades e singularidades.

### **3.4.2. Cultivo submerso (CSm)**

O cultivo submerso é definido como um processo fermentativo de mistura perfeita (homogêneo) no qual, em teoria, cada parte do meio contém, ao mesmo tempo, a mesma quantidade de microrganismos, nutrientes e metabólitos (SINGHANIA et al., 2010). No cultivo submerso, o meio essencial consiste em água contendo nutrientes dissolvidos, sendo que a água pode representar cerca de 90 a 99% da massa total do material. Ainda que o CSm utilize resíduos agrícolas sólidos na sua composição do meio para a disponibilidade de celulose, sua proporção será sempre reduzida, levando em consideração que o sólido terá que ser combinado com um outro meio líquido (IRAM; CEKMECELIOGLU; DEMIRCI, 2020).

É de interesse industrial que os nutrientes relacionados ao meio de crescimento dos microrganismos contidos no CSm sejam de substratos alternativos com menores custos, pois 40% do custo total na produção de enzimas microbianas estão relacionados ao meio de cultivo (OLIVEIRA et al., 2012). Os nutrientes neste tipo de bioprocessos como peptonas, açúcares e substâncias complexas (vitaminas e íons) são dissolvidos no meio líquido ou mesmo em soluções tampões. A fim de reduzir este alto custo com meio de produção, estudos foram realizados para obtenção de meio produtivo para cultivo submerso com farinha de soja (PORTO et al., 1996), visando tornar o processo de produção enzimática menos oneroso.

Essas fermentações devem ser mantidas sob agitação constante para ideal aeração e disponibilidade de nutrientes. Os processos industriais de CSm para produção de enzimas são desenvolvidos em biorreatores agitados mecanicamente, os quais permitem um maior controle dos parâmetros operacionais, tais como aeração, pH, temperatura, umidade, além de permitir maior eficiência de absorção de nutrientes e excreção de metabólitos pela célula (PITOL et al., 2016; FINKLER et al., 2017; POLETTO et al., 2017).

Dentre outras vantagens do cultivo submerso frente ao sólido, podem-se citar: facilidade de controle dos parâmetros físico-químicos, como controle de temperatura, devido à homogeneidade do sistema; melhor absorção de nutrientes e recuperação de metabólitos e ainda redução da possibilidade de degradação do produto, principalmente enzimas com baixa termoestabilidade (CASTRO; PEREIRA JR., 2010).



Pode-se destacar também que amostras de CSm são utilizadas para determinação das células viáveis e totais, e o sobrenadante é utilizado para a identificação da atividade enzimática. A determinação de biomassa e cinética de crescimento do microrganismo também é facilitada. Entretanto, há uma maior facilidade de contaminação devido à alta atividade de água e consequente possibilidade de desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, como bactérias e leveduras (GARG et al., 2016; SINGH et al., 2016).

### 3.5. Microrganismos utilizados nos processos fermentativos

Na natureza, existe uma gama de microrganismos conhecidos por serem produtores de celulases, mas nem todos são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, aqueles capazes de degradar a celulose natural. De fato, as celulases para hidrólise dos materiais lignocelulósicos podem ser produzidas por uma grande variedade de microrganismos, que podem ser aeróbicos ou anaeróbicos, mesofílicos ou termofílicos, incluindo bactérias, actinomicetos e fungos filamentosos (TEIXEIRA et al., 2016; TEIXEIRA, 2018). A Tabela 3.1 apresenta alguns estudos com microrganismos produtores de celulase em diversos substratos.

**Tabela 3.1.** Estudos com microrganismos produtores de celulase.

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Referências</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana	Florencio et al. (2016)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Palha de trigo	Masui et al. (2012)
<i>Trichoderma reesei</i>	Bagaço de cana	Idris et al. (2017)
<i>Myceliophthora sp</i> M.7.7	Bagaço de cana e farelo de trigo	Moretti (2010)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b		Zanelato et al. (2012)
<i>Trichoderma harzianum</i> PBLA	Serragem de pinheiro	Lopez- Ramirez et al. (2018)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	Bagaço de cana e farelo de trigo	Frassatto et al. (2020)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI756		
<i>Penicillium echnulatum</i> S1M29	Capim elefante	Scholl et al. (2015)
<i>Trichoderma reesei</i> LCB 48	Resíduo de acerola	Mélo (2016)
<i>Acremonium cellulolyticus</i> CF2612	Palha de arroz	Hideno et al. (2011)
<i>Clostridium thermocellum</i>	Bagaço de cana	Johnson et al. (1982)
<i>Bacteroides cellulosolvens</i>	Bagaço de cana	Ghazanfar et al. (2021)

Embora muitas bactérias celulolíticas produzam grandes quantidades de enzimas altamente específicas, como é o caso do *Clostridium thermocellum* e *Bacteroides cellulosolvens*, elas não são usadas em pesquisas para produção comercial de celulases, pois requerem condições de anaerobiose para o seu desenvolvimento e ainda apresentam uma baixa taxa de crescimento (CASCIATORI et al., 2015). Dentre os microrganismos produtores de celulases, os fungos são os principais degradadores de biomassa vegetal e, como tal, têm função importante no ciclo do carbono.

Os fungos termofílicos, atualmente, têm recebido considerável atenção devido ao seu potencial de aplicação industrial. Estes microrganismos apresentam uma série de vantagens quando comparados com microrganismos mesofílicos, pois apresentam rápido crescimento, alta estabilidade das enzimas e ausência de patogenicidade. Além disso, são cultivados em altas temperaturas, o que proporciona uma maior solubilidade no meio reacional, melhorando a acessibilidade da enzima ao substrato (DA SILVA, 2015). Foi mostrado que reações em altas temperaturas também podem melhorar a degradação de polissacarídeos vegetais (KOLBUSZ et al., 2014).

Segundo Gomes et al. (2020), o interesse no estudo de fungos termofílicos baseia-se no fato de que estes apresentam uma elevada velocidade de crescimento e produção de celulases, alcançando níveis superiores aos microrganismos mesofílicos.

### **3.5.1. Potencial de *Myceliophthora thermophila* para produção de celulase**

*Myceliophthora* é um gênero composto por fungos mesofílicos e termofílicos, incluindo 10 espécies. Dentre as espécies, *Myceliophthora thermophila* vem se destacando por ser descrito como termofílico, com base no seu crescimento ótimo a 45°C, assim como por resistir a valores extremos de pH (JUTURU e WU, 2014). *Myceliophthora thermophila* é um Ascomiceto da classe dos *Sordariomycetes*, ordem *Sordariales* e família *Chaetomiaceae* (INDEX FUNGORUM, 2022).

Diversos estudos descreveram a atividade ótima das enzimas lignocelulolíticas produzidas por *M. thermophila* na faixa de 45 a 70°C (KARNAOURI; TOPAKAS; CHRISTAKOPOULOS, 2014). A Tabela 3.2 apresenta alguns valores de atividades enzimáticas relatados pela literatura obtidas em processos de fermentação com *M. thermophila*.

**Tabela 3.2.** Produção de enzimas por linhagens do fungo *Myceliophthora thermophila*.

<b>Microrganismo</b>	<b>CMCase (U/gss)*</b>	<b>Referência</b>
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	800	Zanelato (2011)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	292	Rodrigues et al. (2022)
<i>Myceliophthora thermophila</i> (IMI 89099)	27	Badhan et al. 2007
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	80	Perez et al. (2019)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	79	Perez et al. (2020)
<i>Myceliophthora thermophila</i> (MYC)	37	Soni et al. (2008)

\*U/gss: unidade de atividade enzimática por grama de substrato sólido seco inicial.

Em particular, a atividade celulolítica de *M. thermophila* mostrou ser maior que a da maioria dos fungos mesófilos (KOLBUSZ et al., 2014). Essa diversidade de substâncias termofílicas secretadas justifica a atenção dedicada a esse microrganismo, cujas enzimas têm potencial de aplicações em diversas áreas como alimentícia, têxtil, detergentes, couro e principalmente para produção de bioetanol a partir da desconstrução das paredes celulares das plantas.

O fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* é frequentemente isolado do solo ou de massas de matéria vegetal decomposta (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1982), em que contribui para a decomposição de polissacarídeos presentes nas estruturas das plantas. Os resultados de atividades celulolíticas obtidos por Zanelato (2011) são muito promissores quando comparados aos de outros trabalhos da literatura que empregaram fungos do mesmo gênero.

O fungo termófilo *Myceliophthora thermophila* tem mostrado habilidade na degradação da biomassa vegetal quando cultivado em materiais lignocelulósicos, sendo relatada principalmente a produção de xilanases (DOS SANTOS et al., 2016). Apesar disto, ainda faltam estudos mais evidentes das condições que maximizem a produção de cada uma das enzimas e da potencialidade destas na hidrólise de polissacarídeos, tanto na forma bruta como purificada. Dependendo do tipo de estudo que se pretende realizar e do produto final que se deseja obter, o uso do extrato bruto obtido do cultivo de fungos pode influenciar negativamente nos resultados.

### **3.6. Influência de fontes de carbono e aeração na produção de celulases**

Vários fungos produzem celulases apenas em meios contendo a molécula alvo da

hidrólise, como a celulose. No entanto, a celulose, sendo um polímero de alto peso molecular, não pode por si só induzir o processo de produção de enzimas celulolíticas. Portanto, muitos estudos têm se concentrado em hidrolisados de celulose para investigar as moléculas reais envolvidas no processo de indução (KLOCK et al., 2005; SUTO et al., 2001).

Gombert et al. (1999) observaram que pequenas variações nos níveis de nutrientes (fontes de carbono e nitrogênio) exercem grande influência na quantidade de enzima obtida e que o meio basal, ao ser enriquecido diferentemente, pode proporcionar uma maior produção de enzimas. A escolha do substrato indutor é um dos principais fatores que influenciam a produção dessas enzimas (SUKUMARAN et al., 2005; SINGHANIA et al., 2010).

A influência das fontes de carbono e nitrogênio sobre a síntese de celulasas é um importante fator a ser analisado, uma vez que essas enzimas são induzíveis e que na maioria dos casos a produção enzimática está atrelada ao crescimento microbiano (HO; KU, 2017). Substratos como glicose, sacarose, frutose, lactose e resíduos agrícolas (bagaço de cana de açúcar, casca de batata, farelo de trigo) são utilizados como fonte de carbono na síntese de celulasas (PADILHA et al., 2015; LUGANI et al., 2015; IRFAN et al., 2017).

As fontes de carbono com melhores resultados sobre a síntese de enzimas do complexo celulolítico são CMC, frutose e lactose (SREEJA et al., 2013; DIAS et al., 2014; MARRA et al., 2015; MARCO et al., 2017; THOMAS et al., 2018). Em relação às fontes de nitrogênio, extrato de levedura e peptona são as que têm demonstrado maior influência (KUMAR et al., 2012; SINGH, 2014; LUGANI et al., 2015; ABU-GARBIA et al., 2018).

A celulose comercial amorfa (CMC) é considerada o melhor indutor para a produção de celulasas, mas é um composto caro e que pode causar problemas operacionais e reológicos devido à sua alta viscosidade. A utilização de uma fonte de carbono solúvel, tal como monossacarídeos e dissacarídeos, permite menor custo de produção, maior controle do cultivo e simplifica a operação do processo (JANAS et al., 2002).

Mandels et al. (1960) realizaram uma triagem de possíveis moléculas que seriam capazes de induzir a produção de celulasas por *Trichoderma viride*, tendo cultivado o fungo em meios contendo monossacarídeos e dissacarídeos, a fim de identificar os reais indutores da produção. Após crescimento dos fungos, foi constatado que lactose, salicilina e glicose foram as fontes de carbono capazes de induzir a maior produção de celulasas por *Trichoderma viride*.

A lactose pode ser considerada como uma fonte de carbono renovável e, portanto, biotecnologicamente um importante substrato que é, principalmente, um subproduto da fabricação de queijo ou do processamento de soro de leite. Cerca de 300.000 toneladas de lactose são produzidas por ano em todo o mundo, mas sua aplicação ainda é limitada em

produtos alimentares (ROELFSEMA et al., 2010), e grande parte do soro contendo lactose é descartada como resíduo, gerando graves problemas ambientais (SISO, 1996). A lactose, um dissacarídeo de glicoses ligadas por ligação  $\beta$ -1,4, tem sido observada como um importante indutor de celulases.

Atualmente, a lactose é uma importante fonte de carbono para produção de enzimas celulolíticas pelo fungo *Trichoderma reesei*, em processos em que se produz celulases, na concentração de até 100 g.L<sup>-1</sup>. O forte efeito promotor das celulases de *T. reesei*, induzido na presença de lactose, também tem sido usado para a produção de proteínas recombinantes (KUBICEK e HARMAN, 1998; PENTTILÄ et al., 2004).

Resultados similares foram encontrados por Sen et al. (1983) para *Myceliophthora thermophila*, que observaram que a lactose foi capaz de induzir uma maior produção de celulase. Muitos dissacarídeos têm sido reportados na literatura como potenciais indutores de enzimas celulolíticas.

A glicose é a fonte de carbono geralmente utilizada em cultivos submersos para crescimento de fungos filamentosos para a produção de celulases. Sua adição nos meios de cultivos em concentrações adequadas pode favorecer a produção enzimática. No entanto, quando adicionada em excesso, pode causar repressão catabólica (BOTELLA et al., 2007; SALES et al., 2011). A presença de glicose inibe diretamente a  $\beta$ -glicosidase, o que pode gerar acúmulo de celobiose. Tanto a glicose quanto a celobiose, além de serem substratos, são também reconhecidas por serem possíveis inibidoras das endoglucanases e celobiohidrolases e também da  $\beta$ -glicosidade (ANDRIĆ et al., 2010).

A sacarose é o dissacarídeo mais amplamente encontrado na natureza e a principal forma na qual os carboidratos são transportados na maioria das espécies de plantas e, assim, se assume que este é o melhor carboidrato para a suplementação dos meios de cultura (Strickland et al., 1987). É composta por uma molécula de glicose e uma de frutose unidas por ligação glicosídica  $\alpha$ -1,2. Diferente da glicose e da frutose, a sacarose é um açúcar não redutor, pelo fato de a ligação glicosídica ocorrer entre o carbono 1 da aldose (glicose) e o carbono 2 da cetose (frutose).

Mallagutti (2015) observou que a adição de sacarose ao meio resultou em um aumento na produção de celulases pelos fungos filamentosos L1 e E5B derivados da Antártica. Este aumento pode ter ocorrido devido à maior disponibilidade de fonte de carbono e maior crescimento dos isolados, aumentando a excreção de celulase no meio. Resultados semelhantes também foram observados para a frutose, utilizado a mesma linhagem dos microrganismos (CUNHA et al., 2012).

A celulose de materiais lignocelulósicos atua como fonte de carbono e um dos principais indutores para a produção de celulase por fungos filamentosos (LEITE et al., 2021). Ao realizar a hidrólise enzimática da biomassa com diferentes coquetéis enzimáticos produzidos via bioprocesso, foi possível observar que as amostras que utilizaram substratos lignocelulósicos, no lugar de indutores comerciais como carboximetilcelulose (CMC), apresentavam uma especificidade das celulasas maior e melhoraram o rendimento da hidrólise (BEZERRA et al., 2021; CUNHA et al., 2012; SILVA, 2017).

A utilização do bagaço de cana como indutor foi comparada frente aos indutores CMC e papel de filtro, sendo que a produção de celulasas por linhagens fúngicas como *Aspergillus niger* obtida na presença do bagaço de cana foi superior às obtidas na presença dos demais indutores (MENEZES et al., 1976; AGUIAR; MENEZES, 2000).

### **3.6.1. Aeração**

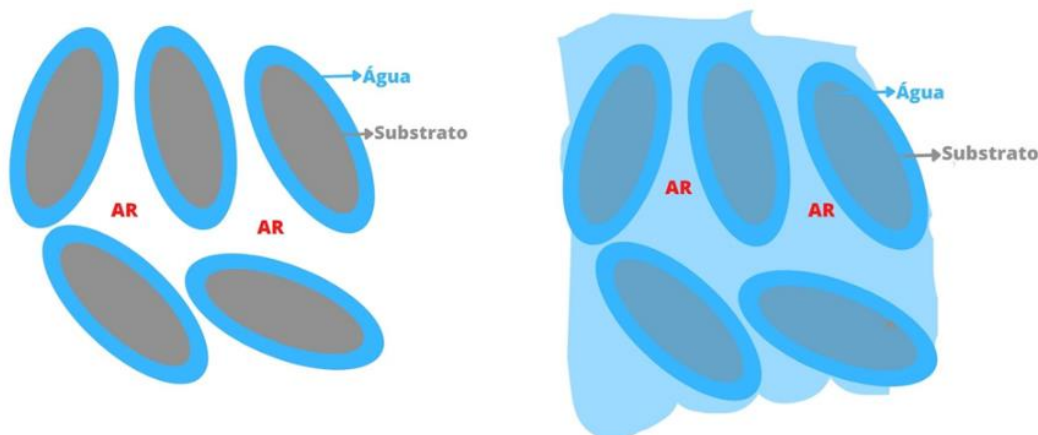
Segundo Ambrozim et al. (2019), a aeração no processo fermentativo está diretamente relacionada à disponibilidade e à transferência de oxigênio no meio de cultivo, de forma que influencia diretamente na manutenção de condições aeróbicas, assim como na regulação da temperatura do substrato, ajuste do nível de umidade e na remoção do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) gerado, no caso do CES. Devido a isso, o uso de aeração forçada em processos fermentativos em estado sólido aumenta o crescimento celular e, conseqüentemente, proporciona um maior rendimento enzimático (FARINAS, 2015; MÉLO, 2016).

Os níveis de oxigênio precisam ser mantidos de maneira suficiente para evitar a redução da respiração normal dos microrganismos. Em contraste, a demanda de oxigênio varia com a espécie utilizada, assim como as condições utilizadas no processo. Algumas variáveis como agitação e transferência de oxigênio são características específicas do fungo a ser utilizado (taxa de crescimento, morfologia). Portanto, estudos respirométricos são importantes para determinar a relação entre a quantidade de oxigênio necessária durante o crescimento de um determinado fungo e a produção de enzimas (RODRIGUES et al., 2012).

O ambiente gasoso que se forma em um cultivo em meio sólido têm caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por um filme líquido na superfície do substrato. Como não existe água livre no meio, a área interfacial e a pressão parcial de oxigênio tornam-se fatores cruciais, o que permite ao microrganismo o acesso livre ao oxigênio. Nos cultivos aeróbios em meio líquido, o fornecimento de oxigênio é muitas vezes o fator limitante de crescimento devido à baixa solubilidade do oxigênio na água (ALBANO, 2012). Assim, a aeração em CES pode ser mais fácil do que em CSm, devido à rápida taxa de difusão de oxigênio na película de água

em torno das partículas de substrato, como pode ser visto na Figura 3.5.

**Figura 3.5.** Aeração no cultivo em meio: a) Sólido; b) Submerso.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

De acordo com Mitchell (2006), as medidas do consumo de  $O_2$  ou da produção de  $CO_2$  são mais eficazes quando acopladas a um modelo matemático que relacione a quantidade de biomassa a um parâmetro mensurável. A medida do desprendimento do  $CO_2$  pode ser correlacionada ao desenvolvimento da biomassa, como mostrado por Carrizales, Rodriguez e Sardina (1981), Smits et al. (1996) e Ikasari (1997). Embora se saiba que o consumo de  $O_2$  nem sempre é diretamente relacionado ao crescimento celular, uma vez que o consumo está ligado tanto ao crescimento como à manutenção celular, o monitoramento dessas medidas é interessante para o controle do bioprocessamento.

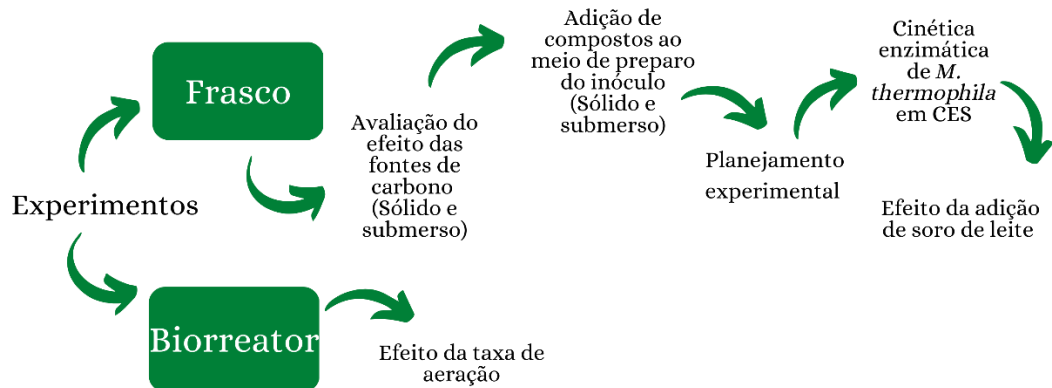
### 3.7 Considerações frente ao estado da arte

Como visto ao longo desta seção de Revisão Bibliográfica, muitas variáveis podem afetar a produção de celulases em cultivos sólido e submerso. Diante do exposto, este trabalho, tendo definido seu escopo de empregar o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b como agente fermentativo, concentrou-se em testar o efeito indutor de mono e dissacarídeos adicionados ao meio de cultivo ou ao meio de preparo de inóculo, visando encontrar a composição de substrato mais favorável à síntese de endoglucanase por esse fungo. Em seguida, prospectando aumento de escala em cultivos sólido e submerso, foi avaliado o efeito de duas taxas de aeração sobre a síntese da mesma enzima, empregando em cada forma de cultivo o tipo de biorreator mais comumente aplicado em cada caso. Espera-se, assim, avançar no conhecimento a respeito da produção de enzimas por esse microrganismo.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido em duas etapas: cultivos experimentais em escala de frascos e em biorreatores, como demonstrado no Fluxograma 1.

**Fluxograma 1.** Etapas do desenvolvimento do estudo.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

##### 4.1. Microrganismo

Para avaliação do potencial celulolítico, utilizou-se como microrganismo o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, isolado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Alonso Bocchini (IQ/UNESP) a partir de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar da Usina Guarani, de Olímpia-SP, recentemente empregado por Oliveira et al. (2020) e Rodrigues (2021), que reportaram resultados positivos de produção de celulasas em escalas de frascos e biorreatores de bancada.

A solução estoque do fungo foi mantida em tubos criogênicos com 20% de glicerol a -80 °C. Para a utilização dessa cepa, foram realizadas repicagens em frascos de Erlenmeyer inclinados contendo 50 mL do meio Agar-Sabouraud-Dextrose (ASD), como pode ser observado na Figura 4.1.

**Figura 4.1.** Esquema de preparo do inóculo a partir dos criotubos.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).



Esses frascos foram mantidos em câmara BOD (Mylabor, modelo 411.B), por 4 dias a 45°C, para crescimento do inóculo, após o que foram adicionados 100 mL de solução nutriente para remoção dos esporos crescidos na superfície, por meio de raspagem com auxílio de alça de platina e bastão de vidro. Posteriormente, foi realizada a padronização da suspensão de esporos para uma concentração de  $10^7$  esporos/g de sólido seco (gss) a partir da contagem de esporos em câmara de Neubauer, por meio da Equação 4.1.

$$V_{\text{Inóculo}} = m_s \times C_{\text{Esporos}} \times F \times V_{\text{cam}} \times M^{-1} \quad (4.1)$$

onde  $V_{\text{Inóculo}}$  representa o volume da suspensão de esporos do inóculo a ser adicionado (mL);  $m_s$  é a massa do substrato usado no cultivo (g);  $C_{\text{Esporos}}$  é a concentração de esporos desejada (esporos.g<sup>-1</sup>);  $F$  é o fator de diluição da suspensão para leitura na câmara de Neubauer;  $V_{\text{cam}}$  é o volume total da câmara (mL); e  $M$  é a média da contagem dos quadrantes da câmara (número de esporos).

#### 4.2. Solução nutriente e caldo de cultivo

A solução nutriente utilizada foi baseada em Zanelato et al. (2012), com adaptações. O pH do meio foi ajustado antes da esterilização para 5,0 com uso de solução de NaOH e HCl. As composições de sais da solução nutriente estão apresentadas na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1.** Composição da solução nutriente.

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>) (Zanelato et al., 2012)</b>
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	3,5
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	3,0
<b>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</b>	0,5
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,5
<b>Tween 20</b>	1,0

Em todos os ensaios de cultivo submerso, a composição do caldo de cultivo foi formada por uma mistura dos substratos triturados (m/m): bagaço de cana e farelo de trigo, na proporção de 10% (m/v), conforme estudos de Perez et al. (2020), com a solução nutriente de Zanelato et

al. (2012). A solução nutriente, assim como o caldo de cultivo, foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

### 4.3. Substratos

Como substratos particulados, foram utilizados o bagaço de cana de açúcar (BC) e o farelo de trigo (FT). O bagaço de cana foi doado pela Usina São Manoel, de São Manuel-SP, e foi lavado com água para remoção de sacarose residual. Após esta etapa, foi seco em estufa convectiva a 60°C até peso constante e peneirado para uniformização de tamanho das fibras, passando primeiramente por uma peneira com abertura de 5 x 5 mm, que reteve fibras mais grossas, as quais foram denominadas como bagaço grosso (BG) e, em seguida, por uma peneira com abertura de 4 x 2 mm, que reteve as fibras mais finas, denominadas como bagaço fermentativo (BF), separando-as do pó.

O farelo de trigo foi adquirido no comércio local de São Carlos-SP (Agropecuária Claro, São Carlos – SP). Ambos os materiais foram acondicionados em sacos de polipropileno de parede espessa e mantidos em câmara de refrigeração até sua utilização.

A umidificação dos substratos foi realizada pela adição da mesma solução nutriente empregada na raspagem dos esporos. A quantidade adicionada foi ajustada de acordo com a máxima absorção de líquido para cada composição de substratos. Os valores exatos da quantidade de água adicionada à matriz sólida foram obtidos por meio da Equação 4.2.

$$m_{\text{Solução}} = \frac{m_s(x_1 - x_2)}{(100 - x_2)} \quad (4.2)$$

onde  $m_{\text{Solução}}$  é a massa de solução a ser adicionada (g);  $m_s$  é a massa do substrato (g);  $x_1$  é a umidade inicial do substrato (% m/m); e  $x_2$  é a umidade final desejada do substrato (% m/m).

### 4.4. Avaliação do efeito das fontes de carbono

Considerando o efeito indutor de fontes de carbono, como já mencionado, o sistema de fermentações em escala de frascos foi utilizado experimentalmente para verificar a atividade enzimática obtida nos cultivos e, conseqüentemente, a produtividade e o rendimento do bioprocessos. Dessa forma, tanto para CES quanto para CSm, foi avaliado o efeito da suplementação da solução nutriente com diferentes fontes de carbono facilmente metabolizáveis, a saber glicose, sacarose, frutose e lactose, nas concentrações de 5,0, 10,0 e 15,0 g.L<sup>-1</sup>, com base no estudo de Gomes et al. (2020). Como controle, também foram

realizados cultivos sem a adição de açúcares. O valor escolhido de tempo e temperatura foram determinados com base na literatura, que reporta que a temperatura ideal de produção de celulases pelo fungo *M. thermophila* é 45°C, com tempo de cultivo de 96 h (ZANELATO et al., 2012).

#### 4.4.1. Cultivos em estado sólido em embalagens plásticas

Os ensaios fermentativos em estado sólido foram realizados em triplicata em embalagens de polipropileno de 12 x 20 cm acoplados a um bocal de PVC de 3,6 cm de diâmetro através de fita adesiva, os quais foram tampados com rodilhão de algodão, a fim de garantir a troca gasosa e evitar contaminação por outros microrganismos, como apresentado na Figura 4.2. Dentro de cada embalagem plástica, foram adicionados 5 g de substrato seco inicial (gss) na proporção de BC:FT 7:3 (m/m). O sistema completo foi levado para autoclave a 120°C por 20 minutos para sua esterilização.

**Figura 4.2.** Embalagem de polipropileno com substrato seco.



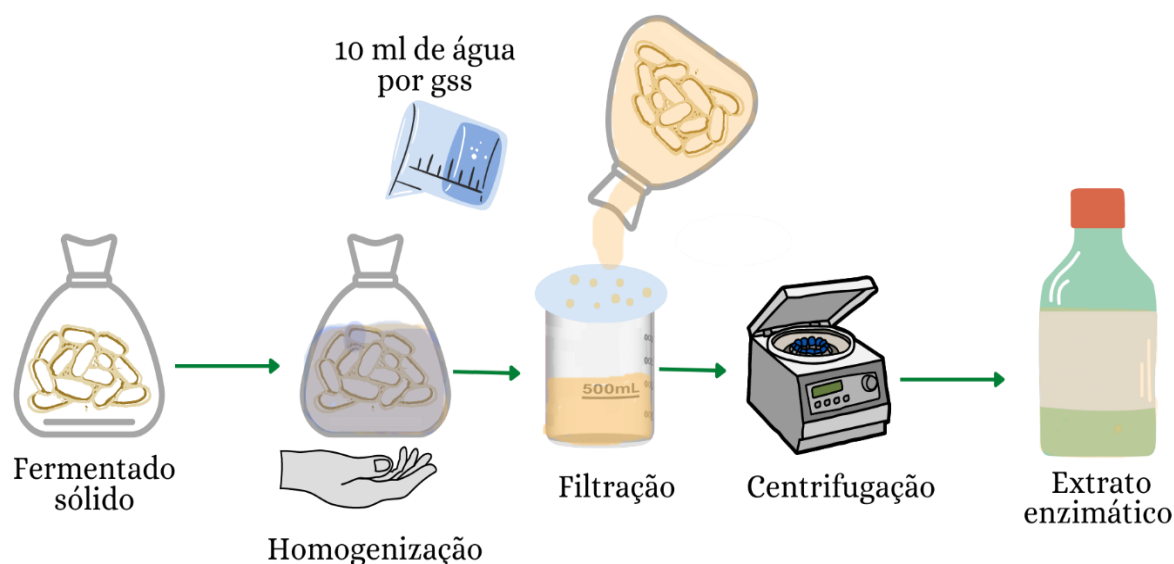
Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Após a autoclavagem, o frasco plástico estéril foi deixado à temperatura ambiente até resfriamento em câmara de fluxo laminar. A umidificação foi realizada com a solução nutriente incorporada das fontes de carbono facilmente metabolizáveis (mono e dissacarídeos). A suspensão de esporos foi adicionada na concentração de  $10^7$  esporos/gss ao meio sólido e

complementada com solução nutriente em quantidade suficiente para o substrato atingir umidade final de 75% em base úmida (b.u.) (ZANELATO et al., 2012). Em seguida, realizou-se a homogeneização manual do material nas embalagens e essas foram levadas para uma câmara BOD, onde foram incubadas nas condições ideais de produção de celulases.

Uma vez concluído o processo fermentativo, a extração das enzimas foi feita pela adição de água destilada (10 mL de água por grama de substrato sólido seco inicial), permanecendo em câmara de agitação orbital por 30 min a 100 rpm. O extrato foi filtrado e centrifugado (10000 rpm, 15 min, 5°C), como ilustra a Figura 4.3, após o que o sobrenadante foi empregado como solução enzimática bruta para as análises de atividade de endoglucanase (CMCase).

**Figura 4.3.** Extração de enzimas em cultivo sólido em embalagem de polipropileno.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

#### 4.4.2. Cultivos submersos em frascos de Erlenmeyer

Os cultivos de fermentações submersas foram conduzidos em triplicatas em frascos Erlenmeyer de 50 mL autoclavados previamente, contendo 20 mL do caldo de cultivo incorporado das fontes de carbonos testadas, os sólidos suspensos (10% m/v de BC:FT 7:3 m/m) e a solução do pré-inóculo na concentração de  $10^7$  esporos/gss. Os cultivos foram realizados sob agitação em um shaker (incubadora com mesa de agitação orbital) a 250 rpm de agitação e 45°C por 96 horas, como pode ser visto na Figura 4.4.

**Figura 4.4.** Esquema experimental dos cultivos submersos em escala de frascos.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Após os ensaios, os meios cultivados foram filtrados a vácuo, para garantir a retirada da biomassa do Erlenmeyer, e logo após foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos a 5°C. O sobrenadante foi empregado como extrato enzimático bruto para as análises enzimáticas.

#### 4.5. Análise do efeito de adição de compostos ao meio de preparo do inóculo

Com o intuito de aumentar a produção de enzimas do bioprocessamento desenvolvido neste trabalho, foi avaliado o efeito da adição de compostos ao meio de preparo do inóculo, para avaliar se auxiliariam na indução da produção de celulases. Os testes consistiram em adicionar, ao meio Agar-Sabouraud-Dextrose (ASD), carboximetilcelulose (CMC) e lactose (LAC). Para isso, foram realizados ensaios de acordo com o planejamento apresentado na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2.** Planejamento experimental de testes de preparo de inóculo de *M. thermophila*.

Ensaio	Sol. nutriente de Zanelato et al. (2012) com lactose no cultivo	Sol. nutriente de Zanelato et al. (2012) sem lactose no cultivo	Caldo de cultivo de Mandels e Sternberg (1976) em subst. à sol. nutriente
1	ASD+CMC+LAC	ASD+CMC+LAC	-
2	ASD+CMC	ASD+CMC	-
3	ASD+LAC	ASD +LAC	-
4	ASD	ASD	-
5	-	-	ASD

Ao todo, foram testadas, em triplicata, 4 composições de meios de preparo do inóculo

para posterior cultivo com utilização da solução nutriente de Zanelato et al. (2012) com e sem a adição de lactose na concentração de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  ao meio de cultivo. Além disso, foi testado o cultivo empregando a solução de Mandels e Sternberg (1976) em lugar da solução nutriente.

O meio nutriente de Mandels e Sternberg (1976) foi preparado por meio de modificações de Cunha et al. (2015), contendo os seguintes nutrientes (em  $\text{g.L}^{-1}$ ): glicose (10,0);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1,4);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,0);  $\text{CaCl}_2$  (0,3);  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2); Tween 80 (1,0) e solução salina ( $5 \text{ mg.L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $1,6 \text{ mg.L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ;  $1,4 \text{ mg.L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  e  $2,0 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CoCl}_2$ ) ( $1,0 \text{ mL.L}^{-1}$ ), com adição de lactose ao meio nutriente na concentração de  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , como indutor e sem adição de Tween 20.

Utilizando inóculo oriundo dos diferentes meios de crescimento, foram realizados os cultivos e analisada a produção enzimática utilizando a mesma metodologia das etapas de fermentações em escala de frascos para os sistemas sólido e submerso, em triplicata. Ao final de cada cultivo, foram obtidos os extratos enzimáticos para quantificação da atividade de endoglucanase.

#### 4.6. Planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup>

Com intuito de avaliar estaticamente a produção de enzimas através do planejamento experimental foram analisados os efeitos das variáveis independentes concentração de lactose (em valores partindo de  $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) e proporção de substrato (frações mássicas de BC e FT), durante os cultivo em estado sólido e submerso. Os experimentos foram realizados para as 2 variáveis independentes, ou seja, 2<sup>2</sup>, em dois níveis (-1 e +1), e contou ainda com ensaios sob as condições do ponto central (0), para o cálculo de resposta e erro padrão. Os ensaios do planejamento experimental foram realizados em triplicata e as variáveis respostas (dependentes) analisadas foram as atividades de CMCase ( $\text{U.gss}^{-1}$ ).

Assim, o planejamento fatorial consistiu em 27 ensaios. Os níveis e intervalos das variáveis independentes foram escolhidos com base nos resultados dos cultivos em escala de frascos em diferentes condições. A Tabela 4.3 apresenta os níveis das variáveis utilizadas.

**Tabela 4.3.** Variáveis independentes e níveis do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Concentração de Lactose ( $\text{g.L}^{-1}$ )	15,0	30,0	45,0
Proporção BC:FT (m/m)	1:1	7:3	9:1

Foi aplicada uma análise estatística de variância (ANOVA) para identificar o efeito dessas variáveis. A análise dos dados foi realizada com auxílio do Software STATISTICA® 7.0, onde foram determinados os parâmetros de confiança significativos para os cultivos sólidos e submerso com 95% de confiança ( $p < 0,05$ ).

O planejamento fatorial teve por objetivo otimizar os procedimentos operacionais no processo fermentativo e avaliar qual experimento apresentava maior produção de endoglucanase. Além disso, o planejamento experimental visou a otimização do processo, além de avaliar quantitativamente a influência das variáveis de entrada concentração de lactose e proporção de substrato sobre a variável resposta atividade CMC<sub>case</sub> obtida.

#### 4.7. Cinética enzimática de *M. thermophila* em CES em embalagens plásticas

Considerando como a produção de enzimas em CES pode ser afetada por fatores externos, é de fundamental importância analisar como ocorre a secreção dessas enzimas ao longo do tempo. Para isso, o perfil de produção de endoglucanase de *M. thermophila* foi analisado em escala de frascos em embalagens plásticas, conforme descrito anteriormente, adicionando-se em cada embalagem plástica 5 g de substrato na proporção de BC:FT 7:3 (m/m) com adição da solução nutriente incorporada de lactose na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>.

A cinética foi realizada de 0 a 96 horas para obter o período ideal do bioprocessamento e identificar o ponto de atividade máxima de endoglucanase. O intervalo de tempo e a temperatura foram definidos considerando os resultados de Rodrigues et al. (2022). Os cultivos foram feitos de acordo com o planejamento apresentado na Tabela 4.4, em triplicata.

**Tabela 4.4:** Planejamento da cinética de cultivo sólido de *M. thermophila* em meio com lactose.

Temperatura (°C)	Tempo de retirada das amostras (h)				
45	0	24	48	72	96

#### 4.8. Testes com soro de leite em cultivos sólido e submerso

A produção de enzimas microbianas utilizando soro de leite foi realizada por diversos pesquisadores (Kosikowski, 1979; Feijoo et al., 1999; Romero et al., 2001), e a produtividade enzimática aumentou com o uso deste substrato. Com o objetivo de conhecer a concentração de lactose presente no soro de leite, foi realizada a caracterização química na sua forma *in natura*, após o que foi avaliado o efeito da adição deste sobre o crescimento do microrganismo e a atividade de endoglucanase (CMC<sub>case</sub>).

#### 4.8.1. Caracterização do soro de leite

A determinação da concentração de lactose no soro de leite foi efetuada por meio do método de açúcares redutores totais DNS (ácido-1,3-dinitrosalicílico), adaptado do descrito por Miller (1959). Este método é considerado uma alternativa para determinação de lactose em leite e soro de queijo, por apresentar resultados semelhantes os obtidos pelo método padrão de Somogy-Nelson, que emprega reagentes contendo metais pesados em sua composição e um procedimento dispendioso e demorado (LIMA et al. 2017).

Para isso, foi necessário obter a curva padrão por absorvância em espectrofotômetro. Foi preparada uma solução de lactose a  $1 \text{ g.L}^{-1}$  e, a partir dessa solução mãe, foram realizadas diluições seriadas com água destilada para a obtenção das demais concentrações, variando de  $0,1$  a  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ , concentrações essas baseadas no limite de sensibilidade da técnica do DNS.

Após este procedimento, completou-se o volume para  $1 \text{ mL}$  com água destilada e adicionou-se  $0,5 \text{ mL}$  de DNS. Em seguida, levou-se a mistura a banho-maria a  $100^\circ\text{C}$  por  $5 \text{ min}$ . Após esta etapa, esfriaram-se as amostras em banho de gelo e o volume dos tubos foi ajustado para um total de  $10 \text{ mL}$ . A mistura foi agitada com auxílio de um vórtex (Gehaka AV-1) e mantida em repouso por  $5 \text{ min}$ . Após esse período, a absorvância das amostras foi medida em um comprimento de onda de  $540 \text{ nm}$  utilizando espectrofotômetro Femto® (modelo 700 plus). Como branco, foi utilizada uma solução com as mesmas proporções de reagente utilizado no procedimento anterior, porém sem a adição da solução de lactose. Os dados de absorvância obtidos forneceram a equação da curva padrão e o coeficiente de correlação.

Foi utilizado como substrato o soro de leite proveniente do Laticínio Bonura, localizado na cidade de São Carlos-SP. Para determinar a concentração lactose, realizaram-se as análises com as amostras do soro de leite *in natura* e concentrado. Para tanto, foi necessário obter o soro purificado da amostra concentrada. Uma alíquota de  $1 \text{ mL}$  da amostra de soro de leite *in natura* foi transferida para um Erlenmeyer, seguido da adição de  $1 \text{ mL}$  de hidróxido de bário,  $1 \text{ mL}$  de sulfato de zinco e  $7 \text{ mL}$  de água destilada. A mistura foi centrifugada a  $3000 \text{ rpm}$  durante  $5 \text{ min}$  a  $5^\circ\text{C}$ .

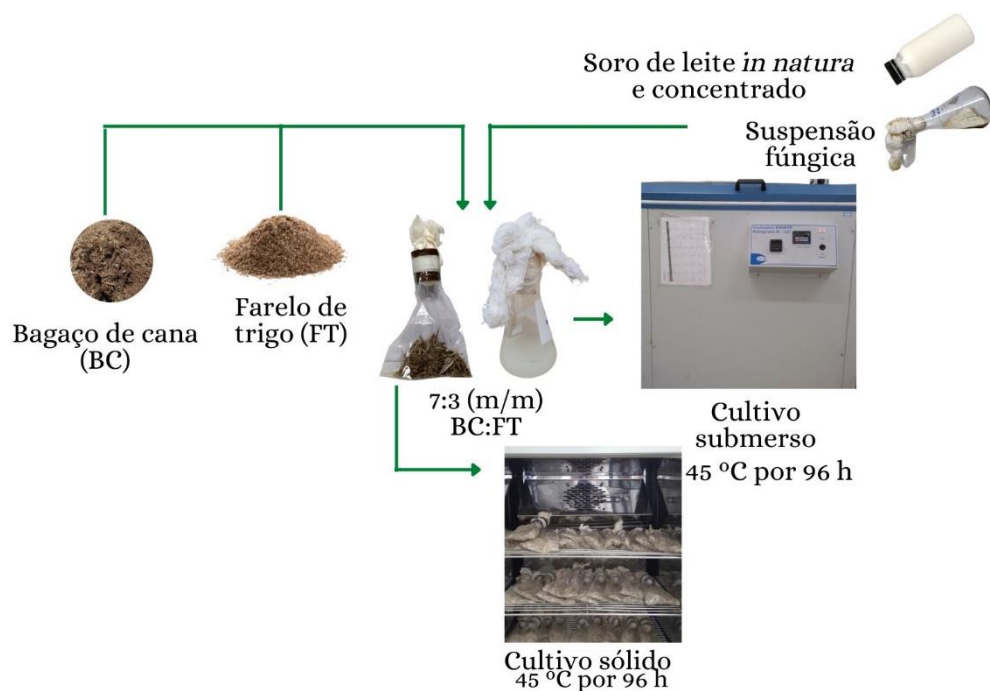
Por fim, aplicou-se a técnica de DNS. Após obter as absorvâncias, os valores foram aplicados na equação da reta determinando-se a concentração das amostras de soro de leite. As absorvâncias foram lidas em triplicatas para cada amostra de soro de leite analisada. Os resultados são expressos em gramas de lactose por litro ( $\text{g.L}^{-1}$ ).



#### 4.8.2. Efeito da adição de soro de leite sobre o crescimento do microrganismo e a atividade de endoglucanase (CMCase)

Com a finalidade de analisar o efeito da adição de soro de leite em substituição à solução de lactose comercial sobre a indução da produção de endoglucanase (CMCase), foram realizados os testes em cultivos sólido e submerso em escala de frascos em triplicata, semelhantes aos descritos anteriormente, mas com a substituição da solução nutriente por soro de leite *in natura* e concentrado, que foi adicionado ao meio de crescimento formado pela mistura de substratos na proporção de 7:3 de BC:FT e adição do inóculo do microrganismo na concentração de  $10^7$  esporos/gss, conforme ilustrado na Figura 4.5. O soro de leite foi esterilizado separadamente a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos e adicionado asépticamente aos meios de cultivo.

**Figura 4.5.** Esquema experimental dos cultivos sólidos e submersos com adição de soro de leite em escala de frascos.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Uma vez concluído o processo fermentativo, a extração das enzimas foi feita para os cultivos sólidos e submerso. Os extratos obtidos foram filtrados e centrifugados (10000 rpm, 15 min,  $5^\circ\text{C}$ ), após o que os sobrenadantes foram empregados como solução enzimática bruta para as análises de atividade de endoglucanase (CMCase).

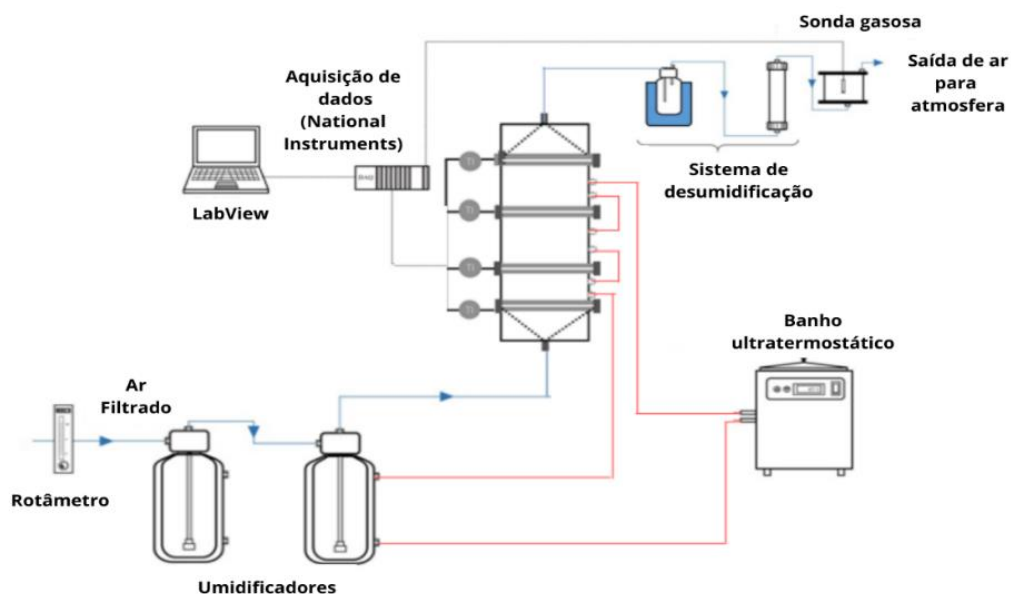
#### 4.9. Efeito da aeração em biorreatores

O efeito da taxa de aeração sobre a produção de enzimas celulolíticas foi avaliado por meio de ensaios realizados em biorreatores de leite empacotado (BLE) para CES e em tanque agitado aerado (TAA) para CSm. Nos dois tipos de cultivo, foi adicionada lactose  $15 \text{ g.L}^{-1}$  sintética por questões operacionais, visto que os ensaios com soro de leite foram realizados na etapa final do trabalho.

##### 4.9.1. Cultivos em estado sólido em biorreator de leite empacotado (BLE)

Os ensaios fermentativos em estado sólido foram realizados em um biorreator cilíndrico de leite empacotado encamisado construído de forma modular em aço inox, sendo o mesmo equipamento empregado por Rodrigues (2021). Neste sistema, o ar foi fornecido por um compressor e filtrado para separação de impurezas de alta granulometria, passou por válvula de agulha e foi direcionado a um medidor de vazão modelo AppliTech® (Asa, Itália). Finalmente, o ar foi umidificado em coluna encamisada recheada com esferas de vidro e com o espaço vazio entre as esferas preenchido por água destilada, mantida na temperatura do processo, garantindo assim a saturação do ar de entrada, conforme pode ser visto na representação esquemática do aparato experimental, Figura 4.6.

**Figura 4.6.** Aparato experimental empregado nos cultivos em estado sólido em BLE.



Fonte: Extraído e adaptado de Rodrigues (2021).

Ao sair do BLE, o ar passava por um sistema de desumidificação composto por um *trap*, no qual a água condensada era coletada por um frasco e, em seguida, passava por uma coluna

de sílica com dimensões de 5,2 cm de diâmetro e 39 cm de altura, com o objetivo de baixar a umidade relativa do ar para no máximo 15%, possibilitando assim a leitura da concentração de CO<sub>2</sub> por sonda (Vaisala Carbocap, Vantaa, Finlândia).

O biorreator foi orientado verticalmente e operado em batelada com um módulo fermentativo, conforme pode ser visto na Figura 4.7. Os módulos empregados na configuração do biorreator têm comprimento 10 cm, diâmetro interno 13 cm e 15 cm de diâmetro externo, sendo o espaço anular utilizado como camisa para circulação de água na temperatura ideal, evitando sobreaquecimento no interior do leito empacotado.

**Figura 4.7.** Biorreator de leito empacotado modular.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Os módulos de entrada e de saída também foram encamisados e possuíam as mesmas dimensões dos módulos intermediários, porém com interior cônico. O módulo de entrada foi preenchido com esferas de vidro para estabelecimento do perfil de escoamento do ar saturado e o módulo de saída foi mantido vazio.

Os módulos acessórios localizados após a entrada e antes da saída foram preenchidos com material inerte (bagaço de cana) úmido e seco, respectivamente. O módulo acessório úmido protege o primeiro módulo inoculado da secagem, já o módulo acessório seco é necessário para absorver gotículas de água condensadas nas paredes do módulo de saída, devido ao contato com ambiente externo a temperatura mais baixa. Ambos os módulos mencionados não foram

inoculados e seu uso foi para proteger o módulo fermentativo da secagem excessiva, no caso da base, e da condensação de umidade, no caso do topo, como realizado por Zanelato (2011) e Casciadori (2015).

A proporção de substrato utilizado no módulo fermentativo foi a mesma utilizada nos ensaios em embalagens plásticas de polipropileno de BC:FT 7:3 (m/m), sendo possível acomodar 130 g da mistura (massa seca) por módulo. A inoculação deste com a suspensão de esporos foi feita em uma embalagem plástica, seguida de mistura manual, após o que o material foi empacotado no módulo fermentativo segundo a técnica de empacotamento solto descrita por Casciadori et al. (2014), segundo a qual os substratos são acomodados suavemente sem provocar a compressão do leito. Além disso, previamente aos cultivos, todos os módulos, assim como o filtro e os umidificadores, foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

A umidificação deste meio foi feita com a mesma solução salina utilizada por Rodrigues (2021), acrescida da fonte de carbono que apresentou melhor indução da produção de celulases, com base em estudos de Gomes et al. (2020) e nos resultados prévios deste trabalho, até a umidade de 75% (base úmida). Durante o cultivo, foram realizados testes com aeração de 0,5 e 1,0 vvm no módulo reacional. Ao final do tempo do processo fermentativo, o material fermentado foi removido do módulo e destinado à extração, visando à recuperação das enzimas celulolíticas produzidas.

Para tanto, realizou-se a adição de água destilada ao meio fermentado (10 mL por grama de substrato sólido seco inicial). O material fermentado foi coletado numa embalagem plástica para realização da extração sólido-líquido, com auxílio de leve agitação e mistura do fermentado em contato com a água. Em seguida, o líquido foi separado do sólido por filtração e centrifugação a frio. O sobrenadante foi tomado como solução enzimática bruta para as análises de atividade enzimática endoglucanase (CMCase) e FPase.

#### **4.9.2. Monitoramento da temperatura**

Para a análise do perfil de temperatura ao longo do tempo de cultivo no biorreator, foram utilizados termopares tipo T, instalados através de flanges posicionadas na entrada e na saída do módulo fermentativo, de modo que a extremidade dos sensores foi posicionada no centro radial do biorreator, como pode ser observado na Figura 4.8, permitindo acompanhar a temperatura ao longo do processo.

Os sinais foram registrados por meio do sistema de aquisição de dados da *National Instruments* COMPAQ-DAQ, gerenciado por uma rotina do *software Labview* (*National Instruments*, Austin, USA).

**Figura 4.8.** Posição do termopar para acompanhamento da temperatura.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

#### **4.9.3. Umidade**

Após o cultivo, foi determinada a umidade final dos sólidos fermentados, com auxílio de balança determinadora de umidade por infravermelho modelo M5 Thermo da marca Bel Engineering (Monza, Itália), na qual foram colocados 2 g de amostra, que foram secos até 0,1% de umidade a 110°C. A amostragem foi feita de forma randômica, através da retirada de uma pequena porção do material cultivado oriundo de cada módulo do BLE.

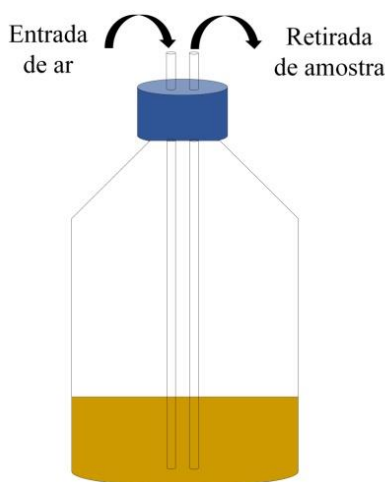
#### **4.10. Cultivos submersos em biorreator de tanque agitado aerado (TAA)**

A realização dos cultivos submersos foi feita conforme metodologia descrita por Rodrigues (2021), que utilizou um frasco Schott de 2 L adaptado para servir como TAA, contendo no seu interior 800 mL de caldo de cultivo com uma concentração inicial de inóculo de  $10^7$  esporos/gss. A composição do caldo foi a mesma utilizada na escala de frasco. A aeração do frasco foi conduzida por meio de um sistema de ar composto por filtro de algodão e em seguida por filtro HEPA, tendo sido realizados testes com aeração de 0,5 e 1,0 vvm. Ao sair do frasco, o ar foi seco ao passar por uma coluna de sílica e então foi direcionado ao sensor de CO<sub>2</sub>. A entrada de ar e a amostragem foram realizadas através de mangueiras que foram colocadas até o fundo do frasco, como mostra a Figura 4.9.

A retirada de amostras foi efetuada utilizando uma seringa, sendo que antes e após esse procedimento foi injetado ar, a fim de limpar a mangueira e impedir a coleta de amostra não representativa. Para evitar contaminações, o sistema foi mantido vedado pelo emprego de uma tampa hermética e de pinças nas mangueiras. Filtros HEPA foram colocados em todas as

mangueiras de entrada e saída de ar. O frasco, o caldo, os filtros e todas as mangueiras foram autoclavados a 121°C por 20 minutos previamente aos cultivos.

**Figura 4.9.** Sistema utilizado no cultivo submerso.



Fonte: Extraído de Rodrigues (2021).

A agitação do meio e o controle da temperatura foram realizados através de um *shaker* (incubadora com mesa de agitação orbital). A temperatura foi mantida em 45°C e a velocidade de agitação foi de 250 rpm. O tempo total do cultivo foi de 96 h e um volume de 10 mL foi retirado a cada 24 horas de cultivo, para determinação da atividade de endoglucanase e do teor de proteínas solúveis. Devido à presença do farelo e do bagaço, insolúvel no meio, ficou impossibilitada a medição de crescimento de biomassa por métodos convencionais (contagem e peso seco). A partir dos dados obtidos ao longo do tempo de cultivo, foi plotado um gráfico de CO<sub>2</sub> em função do tempo, a fim de se determinar o crescimento celular de forma indireta, como será descrito adiante.

#### **4.11. Determinações analíticas**

##### **4.11.1. Concentração de proteínas solúveis**

A determinação da concentração de proteínas solúveis foi feita com base no método de Bradford (1976) modificado, segundo o qual 20 µL das amostras de extrato reagiram com 1 mL do reagente de Bradford por 5 minutos a temperatura ambiente. A concentração de proteínas foi determinada pela correlação entre a leitura da absorbância e concentração de proteínas em solução padrão de albumina bovina a 595 nm.

#### **4.11.2. Atividade de endoglucanase e papel de filtro**

As atividades enzimáticas, detalhadas a seguir, foram analisadas de acordo com metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987), com algumas modificações. Tais procedimentos são adequados para determinação de celulases de fungos, e todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada de acordo com o método de Ghose (1987) adaptado, segundo o qual 0,1 mL de amostra e 0,9 mL de solução 4% (m/v) de carboximetilcelulose (CMC) em tampão acetato a 0,1 M com pH 5,0 reagiram por 10 minutos a 60°C em um banho termostático, sendo a reação interrompida pela adição de 1 mL do reagente DNS (ácido-1,3-dinitrosalicílico).

A quantificação dos açúcares redutores liberados foi realizada segundo a metodologia de Miller (1959), com leitura de absorbância a 540 nm. A solução foi mantida em banho de água em ebulição por 10 minutos, após o que foi imediatamente transferida para banho de gelo, para interromper a reação com DNS. Durante a ebulição, o ácido DNS, ao reagir com os açúcares redutores presentes no meio, altera sua coloração inicialmente amarela para tons castanhos. A intensidade de cor após fervura é diretamente proporcional à concentração de açúcares no meio.

A atividade papel de filtro ou FPase foi quantificada seguindo-se a metodologia empregada por Pinto (2010). Como substrato da reação, foi utilizado papel de filtro Whatman n°1 cortado em tiras 1 x 6 cm (50 mg) imerso em 0,9 mL de tampão acetato 0,2 M (pH 5,0) e 0,1 mL de extrato enzimático bruto. A reação se deu por 1 hora em banho termostático com agitação a 60°C, sendo paralisada por 1,0 mL de DNS. O restante do procedimento foi similar ao exposto para a determinação da atividade endoglucanase.

Com os valores de absorbância aferidos nos testes, foram calculadas as atividades de endoglucanase e FPase. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de glicose por minuto de reação por mL de enzima. Com base no volume de água utilizado para extração das enzimas, na massa de substrato empacotado e na curva-padrão do DNS empregado, os resultados das atividades enzimáticas foram convertidos para unidades por grama de substrato sólido seco inicial (U/gss).

#### **4.11.3. Atividade específica**

A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade enzimática total (CMCase) e a concentração de proteínas solúveis presentes na amostra, conforme a Equação 4.3.

$$A_{Esp} = \frac{A_{enz}}{P} \quad (4.3)$$

onde  $A_{Esp}$  é a atividade enzimática específica (U/mg<sub>proteínas</sub>);  $A_{Enz}$  é a atividade enzimática (U/mL); e  $P$  é a concentração de proteínas solúveis (mg<sub>proteínas</sub>/mL).

#### 4.11.4. Cálculo de parâmetros de cultivo

A fim de comparar o rendimento dos bioprocessos de cultivo sólido e submerso em biorreatores com adição de lactose aos meios de cultivo, foi definido e calculado o fator de rendimento enzimático aparente ( $Y'_{P/S}$ ), descrito pela Equação 4.4:

$$Y'_{P/S} = \frac{A_{Enz}}{C_{lac}} \quad (4.4)$$

onde  $Y'_{P/S}$  é o rendimento enzimático aparente, em U/mg<sub>lactose</sub>;  $A_{Enz}$  é a atividade enzimática de endoglucanase máxima atingida no cultivo (U/mL); e  $C_{Lac}$  é a concentração de lactose inicial (mg/mL) fornecida.

#### 4.11.5. Análise respirométrica

A análise respirométrica foi realizada através da medição da concentração de CO<sub>2</sub> na corrente de saída de ar dos biorreatores, onde o ar foi direcionado para uma coluna empacotada com sílica gel para a remoção de umidade. Posteriormente, o ar foi direcionado para um analisador de gases, utilizando-se para tanto uma sonda Carbocap GMM 220 (Vaisala, Vantaa, Finlândia), gerenciada por uma rotina do Labview®, que fez a leitura e salvou os dados ao longo do tempo de cultivo.

A quantidade cumulativa de CO<sub>2</sub> produzido ( $C_i$ ) foi calculada por meio da Equação 4.5, a partir da área sob a curva de concentração de CO<sub>2</sub> versus tempo de cultivo (FAVARO et al. 2020).

$$C_i = \frac{F \times CO_2 \times (\Delta t) + CO_{2i-1}}{V_m} \quad (4.5)$$

onde  $C_i$  é a quantidade de dióxido de carbono acumulado (mol);  $F$  é a vazão de ar (L/h);  $CO_2$  é a porcentagem volumétrica de dióxido de carbono (%  $L_{CO_2} \cdot L_{gás}^{-1}$ );  $\Delta t$  é o intervalo de tempo



(h); e  $V_m$  é o volume molar dos gases ideais nas Condições Normais de Pressão e Temperatura (22,4 L/mol).

À curva de  $CO_2$  acumulado em função do tempo de cultivo, foi ajustado o modelo de crescimento logístico (VICCINI et al., 2001). Apesar da simplicidade matemática, a equação logística pode representar uma aproximação adequada da curva de crescimento completa em uma única equação, incluindo as fases lag, de crescimento exponencial e estacionária (CASCIATORI, 2015), tendo sua forma integrada representada pela Equação 4.6 (condição inicial de  $X = X_0$  em  $t = 0$ ).

$$X = \frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m}{X_0} - \exp^{-\mu t}\right)} \quad (4.6)$$

onde  $X_m$  é a quantidade máxima de dióxido de carbono (mol);  $X_0$  é a quantidade inicial de dióxido de carbono (mol);  $\mu$  é a constante específica de produção de  $CO_2$  ( $h^{-1}$ ); e  $t$  é o tempo de cultivo (h).

Os ajustes foram realizados no software Microcal Origin® 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, USA), onde se empregou o algoritmo de Levenberg-Marquardt para a busca dos valores dos parâmetros. A adequação do modelo foi determinada com base no valor do  $R^2$  (coeficiente de determinação) dos ajustes realizados.

#### 4.12. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software Minitab® 16 (Minitab Inc., State College, USA). Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e comparações entre médias por teste de Tukey, com nível de confiança 95%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação do efeito indutor de diferentes fontes de carbono

#### 5.1.1. Efeito indutor no cultivo em estado sólido

Os resultados de atividades enzimáticas dos extratos produzidos pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em embalagens plásticas na presença de diferentes fontes de carbono e respectivas concentrações são apresentados na Tabela 5.1, onde constam os valores das médias e dos desvios padrão das triplicatas dos cultivos, além dos resultados sintetizados da comparação de médias por teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). As atividades estão expressas em unidades de atividade enzimática por grama de substrato sólido seco inicial (U/gss).

**Tabela 5.1.** Atividade de endoglucanase (CMCase) na presença de diferentes fontes de carbono e respectivas concentrações em cultivo sólido em embalagens de polipropileno.

Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Atividade de endoglucanase (U.gss <sup>-1</sup> )				
	Glicose	Frutose	Lactose	Sacarose	Controle
5	42,10 (±19,20) <sup>F</sup>	144,48(±8,19) <sup>BC</sup>	195,00(±17,70) <sup>AB</sup>	112,07(±15,45) <sup>DE</sup>	
10	38,20 (±18,50) <sup>F</sup>	125,10(±15,52) <sup>CD</sup>	197,50 (± 6,88) <sup>AB</sup>	67,90 (±22,30) <sup>DEF</sup>	153,00(±23,80) <sup>ABC</sup>
15	47,90 (±27,30) <sup>F</sup>	154,80(±45,10) <sup>ABC</sup>	209,89 (±15,24) <sup>A</sup>	52,42 (± 12,88) <sup>EF</sup>	

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A partir dos dados obtidos experimentalmente, foi possível observar que, dentre as fontes de carbono utilizadas, a lactose proporcionou os melhores resultados quantitativos de produção de endoglucanase (CMCase), em comparação aos outros açúcares adicionados ao meio de cultivo, sendo este efeito potencializado pelo aumento de sua concentração. O maior valor foi obtido no ensaio com concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>, igual a 209,89 ± 15,24 U/gss. Tal resultado concorda com os reportados por Gomes et al. (2020) e Madeles et al. (1999), que observaram que a lactose apresentou efeito indutor quando comparada com outras fontes de carbono, monossacarídeos e dissacarídeos, também sendo o efeito aumentado pelo aumento da concentração.

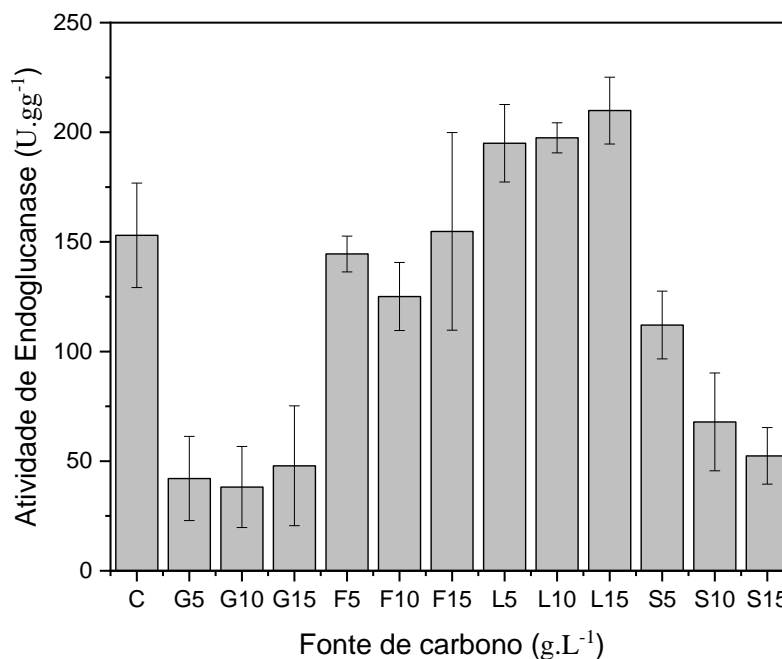
Um fato que pode explicar a produção satisfatória no cultivo controle, realizado sem adição de uma fonte de carbono sintética, é o fato de os próprios substratos bagaço de cana e farelo de trigo atuarem como fonte de indução na produção da enzima, sobretudo devido ao alto teor de celulose presente no bagaço de cana. Reiteram essa hipótese os resultados de Rodrigues

(2021), que testou diferentes composições de substrato para a produção de CMCase por *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. A autora concluiu que o substrato BC:FT 1:1 (m/m) continha quantidades de proteínas e fontes de carbono facilmente assimiláveis, oriundas do farelo, que auxiliavam o desenvolvimento do fungo, porém quantidade de celulose insuficiente para induzir a produção de celulasas, sendo observadas maiores atividades CMCase na proporção de 7:3, a mesma utilizada no presente estudo.

Apesar de os resíduos lignocelulolíticos utilizados no presente estudo se apresentarem como substratos promissores para o crescimento das linhagens fúngicas e produção de enzimas celulolíticas, esses podem não ser suficientes para fornecer todos os nutrientes necessários para o microrganismo para a produção máxima da enzima (BRIJWANI et al., 2010). Deste modo, a adição de nutrientes sintéticos ao meio pode melhorar o crescimento celular e induzir a produção de enzimas.

Em relação às outras fontes de carbono utilizadas, pode-se observar uma produção quantitativamente maior na presença de frutose na concentração de  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , o que foi confirmado por meio do teste de Tukey, alcançando para todas as concentrações atividades próximas às dos extratos obtidos na presença de lactose e no cultivo controle. As demais fontes de carbono prejudicaram a produção de endoglucanase em comparação ao controle, o que pode ser explicado devido a repressão enzimática na via metabólica para produção deste tipo de enzima. Por isso, na presença de glicose, foram obtidos extratos com as menores atividades enzimáticas, como pode ser visto na Figura 5.1.

No cultivo de fungos filamentosos, a disponibilidade de fontes de carbono mais facilmente metabolizáveis regula a produção de enzimas hidrolíticas. Segundo Ivanova et al. (2013) e Gomes et al. (2020), a lactose deve mimetizar substâncias presentes no ambiente que sinalizam a disponibilidade de biomassa vegetal para o fungo. No entanto, a lactose não é facilmente encontrada no habitat natural dos fungos porque não é um componente da parede celular da planta. Apesar dos mecanismos de indução da lactose ainda serem desconhecidos, os mesmos autores especulam que a base para a indução pela lactose pode ser devido às ligações  $\beta$  entre glicose e galactose, que são açúcares presentes nos polissacarídeos da planta, como é o caso dos substratos utilizados no presente estudo. Esses  $\beta$ -galactosídeos podem servir de sinal ao fungo para a presença de celulose no meio.

**Figura 5.1.** Atividades endoglucanase (CMCase) obtidas ao final dos cultivos sólidos.

\* C: Controle; G: Glicose; F: Frutose; L: Lactose; S: Sacarose, (5,10;15): Concentração (g.L<sup>-1</sup>).

Fang et al. (2008) relataram que a lactose atuou como um potente indutor de celulases em cultivos do fungo *Acremonium cellulolyticus*. Ademais, os resultados obtidos neste presente trabalho estão de acordo com o estudo de Sen et al. (1983), que estudaram a biossíntese de enzimas extracelulares pelo fungo *Myceliophthora thermophila* D-14 cultivado na presença de glicose, CMC, lactose e celobiose. Os resultados revelaram um efeito repressor na síntese de celulases com uso de glicose e sacarose, indicando que o dissacarídeo lactose e o controle atuaram como indutor positivo para produção de enzimas.

### 5.1.2. Efeito indutor no cultivo submerso

Os cultivos submersos com agitação foram realizados distinguindo-se as fontes de carbono no meio composto pela mistura de substratos insolúveis e solução nutriente (caldo de cultivo). Em alguns dos frascos, após o período de 96 horas, formou-se uma fina camada de micélio na superfície do meio de cultivo, de aparência cotonosa e coloração branca, conforme pode ser visto na Figura 5.2. Dessa forma, pressupõe-se que a presença de fontes de carbono adicionais no meio contendo bagaço de cana e farelo de trigo (BC:FT 7:3 m/m) forneça melhor condição nutricional para a secreção de enzimas celulolíticas e o crescimento fúngico em relação ao meio sem a presença desses açúcares. Isso pode ser devido ao fato de os açúcares utilizados serem mais rapidamente assimilados do que os provenientes da quebra da celulose presente no bagaço, associada a hemicelulose e à lignina (PEREZ et al. 2019).

**Figura 5.2.** Cultivo submerso de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em Erlenmeyer.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

A atividade de endoglucanase (CMCase) do caldo de cultivo foi avaliada ao final do tempo de 96 h. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 5.2. Cabe mencionar que alguns desvios foram bastante altos, mostrando ampla variação experimental na determinação da atividade enzimática de um mesmo extrato.

**Tabela 5.2.** Atividade de endoglucanase (CMCase) na presença de diferentes fontes de carbono e respectivas concentrações em cultivo submerso.

Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Atividade de endoglucanase (U.gss <sup>-1</sup> )				
	Glicose	Frutose	Lactose	Sacarose	Controle
5	22,14 (±3,19) <sup>CD</sup>	27,59(±16,06) <sup>BCD</sup>	11,83(±12,11) <sup>D</sup>	5,78 (±0,53) <sup>D</sup>	
10	13,05 (±2,62) <sup>D</sup>	12,75 (±3,78) <sup>D</sup>	21,53(±12,72) <sup>CD</sup>	4,57 (±0,53) <sup>D</sup>	78,46 (±6,18) <sup>AB</sup>
15	7,30 (±1,39) <sup>D</sup>	67,90(±46,10) <sup>ABC</sup>	119,00(±38,80) <sup>A</sup>	9,11 (±1,39) <sup>D</sup>	

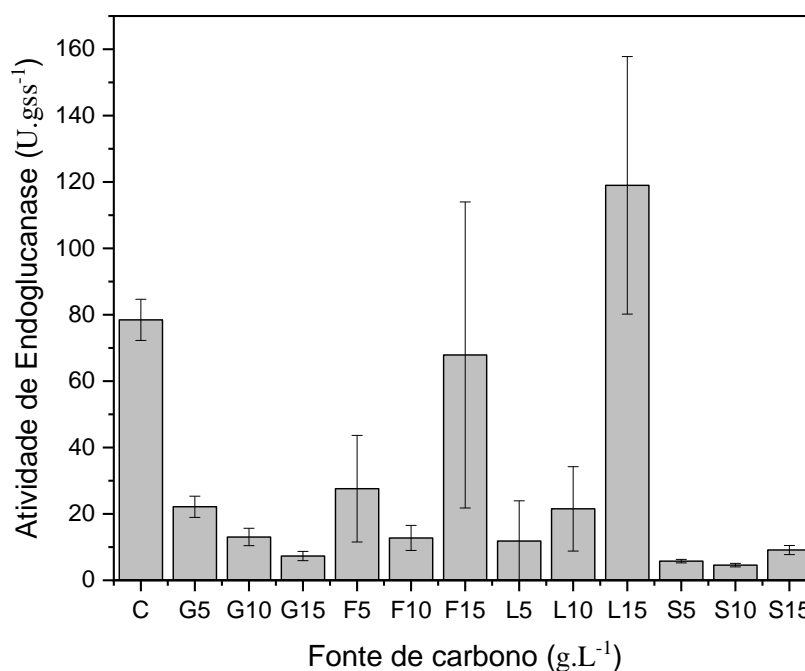
\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Pode-se observar, por meio da Tabela 5.2, que dentre as fontes de carbono utilizadas, assim como no CES, a lactose proporcionou maior biossíntese de atividade de endoglucanase na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>, atingindo 119,00 (± 38,80) U/gss. A lactose, por ser solúvel, não interferiu na reologia do meio e não causou repressão catabólica, o que pode explicar o fato de ter favorecido a máxima produção de enzimas na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>.

Em relação ao cultivo na presença de outros açúcares como glicose, sacarose e frutose, foi observada uma baixa ou moderada produção enzimática, detectando-se apenas vestígios de atividade no filtrado da cultura, com valores próximos ou abaixo do controle. Chandra et al. (2007) observaram que a adição de açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) favoreceu o rápido crescimento de massa celular e promoveu a síntese de celulases. Entretanto, no presente

trabalho, as concentrações de sacarose e glicose no meio não favoreceram a produção enzimática. Esse resultado pode ser melhor visto através da Figura 5.3, onde é possível verificar que, para quase todas as concentrações analisadas de glicose, sacarose e frutose, ocorreu uma baixa produção enzimática, com exceção da concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> de frutose.

**Figura 5.3.** Valores de atividade de endoglucanase obtidos ao final dos cultivos submersos de *M. thermophila*.



\* C: Controle; G: Glicose; F: Frutose; L: Lactose; S: Sacarose, (5,10;15): Concentração (g.L<sup>-1</sup>).

Gomes et al. (2020) relataram que o sistema celulolítico microbiano é suscetível à repressão catabólica em concentrações excessivas de açúcares simples, como glicose, maltose e sacarose. No caso dos meios contendo essas fontes de açúcares, é provável que sua presença na suplementação do caldo tenha provocado esse efeito repressor.

De acordo com De Vries et al. (2011), fontes de carbono facilmente metabolizadas, como glicose e sacarose, reprimem a síntese de celulases, responsáveis pela degradação de vários polissacarídeos. Para o fungo, essa repressão é benéfica, porque a fonte de carbono mais energética é usada e nenhuma energia extra é desperdiçada na síntese de outros sistemas catabólicos. Os mesmos autores relataram que esse mecanismo de regulação pode ser desencadeado por várias fontes de carbono, mas a glicose é considerada uma das fontes mais repressivas.

O uso do CES tem se mostrado particularmente vantajoso para o crescimento de fungos

termofílicos, uma vez que simula o habitat natural destes microrganismos. No CES, os metabólitos são produzidos pelos fungos diretamente sobre substratos insolúveis em água, como materiais lignocelulósicos, na presença de quantidades variáveis de água. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando maiores atividades em comparação ao processo de cultivo submerso (GOMES et al., 2020), como foi observado no presente trabalho. Mandels et al. (1960) também verificaram comportamento similar para a produção de celulasas pelo fungo *Trichoderma viride* e pelo basideomiceto QM806. Quando crescidos a 0,5% (m/v) de monossacarídeos e dissacarídeos, em cultura submersa, foi observada uma baixa ou até mesmo inexistente produção.

Diante dos resultados encontrados, é possível concluir que a adição de lactose ao meio fermentativo teve influência positiva direta no metabolismo responsável pela produção da enzima. Cabe destacar ainda que, apesar de a lactose ser a única fonte de carbono de origem animal utilizada, esta não apresenta risco de conter príons que possam vir a afetar uma futura produção de BE2G (GOMES et al., 2020).

Deste modo, na sequência deste trabalho, foram realizados cultivos em biorreatores variando a taxa de aeração, fixando-se a adição de lactose  $15 \text{ g.L}^{-1}$  na solução nutriente ou no caldo de cultivo, tendo em vista que esta concentração proporcionou os melhores resultados de indução da produção da enzima endoglucanase. Deve-se considerar que esse resultado foi obtido com o extrato enzimático bruto, ou seja, o mesmo não passou por nenhum processo de purificação química, apenas por tratamentos físicos (filtração e centrifugação), o que é interessante do ponto de vista econômico, uma vez que as etapas *downstream* contribuem para um aumento do custo final do bioproduto.

## **5.2. Avaliação da suplementação de meios de preparo de inóculo**

Nestes ensaios, o objetivo foi avaliar se o microrganismo seria capaz de se desenvolver como um inóculo com maior capacidade de produção de endoglucanase, quando este fosse preparado já na presença de indutores de síntese da enzima. Para tanto, ao meio de preparo do inóculo Agar-Sabouraud-Dextrose (ASD), foi testada a adição de uma mistura de carboximetilcelulose (CMC) e lactose (Lac). Os inóculos obtidos a partir dos diferentes meios de propagação foram em seguida utilizados para cultivos sólido e submerso na ausência e presença de lactose  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , assim como utilizando o meio de Mandels e Sternberg (1976) como solução nutriente ou como caldo de cultivo. A Tabela 5.3 apresenta os resultados obtidos da produção de CMCcase nos cultivos em estado sólido e submerso.

**Tabela 5.3.** Atividade de endoglucanase (CMCase) ao final dos cultivos de *M. thermophila* a partir de inóculos crescidos em diferentes composições de meio.

<b>Atividade de endoglucanase em cultivo sólido (U.gss<sup>-1</sup>)</b>				
<b>Solução nutriente</b>	<b>ASD+CMC</b>	<b>ASD+Lac</b>	<b>ASD+CMC+Lac</b>	<b>ASD</b>
<b>Com lactose</b>	101,81 (± 4,57) <sup>C</sup>	191,0 (± 18,6) <sup>AB</sup>	184,2 (±33,6) <sup>AB</sup>	191,4 (±22,7) <sup>AB</sup>
<b>Sem lactose</b>	38,82 (± 15,87) <sup>D</sup>	103,6 (± 40,2) <sup>C</sup>	131,5 (± 17,5) <sup>BC</sup>	12,78 (±4,20) <sup>D</sup>
<b>Mandels e Sternberg</b>	-	-	-	138,15(±4,57) <sup>BC</sup>
<b>Atividade de endoglucanase em cultivo submerso (U.gss<sup>-1</sup>)</b>				
<b>Caldo de cultivo</b>	<b>ASD+CMC</b>	<b>ASD+Lac</b>	<b>ASD+CMC+Lac</b>	<b>ASD</b>
<b>Com lactose</b>	50,91 (± 2,47) <sup>C</sup>	95,04 (± 9,4) <sup>AB</sup>	92,2 (±16,9) <sup>AB</sup>	96,2 (±11,3) <sup>AB</sup>
<b>Sem lactose</b>	19,26 (± 7,87) <sup>D</sup>	52,30 (± 20,1) <sup>C</sup>	65,73 (± 8,65) <sup>BC</sup>	6,94 (±2,10) <sup>D</sup>
<b>Mandels e Sternberg</b>	-	-	-	69,20(±2,27) <sup>BC</sup>

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Dessa forma, comparando os resultados dos ensaios em cultivo sólido e submerso, é possível observar que as duas apresentaram maiores valores de produção de CMCase no meio composto pela solução salina de Zanelato et al. (2012) incorporada de lactose, apresentando uma diferença significativa para meio sem lactose para quase todos os ensaios. Com relação ao efeito da composição dos meios de preparo do inóculo, ASD, ASD+Lac e ASD+CMC+Lac, foram alcançados valores de atividade enzimática similares, sem diferença significativa entre os cultivos empregando inóculos crescidos nos diferentes meios.

Perez et al. (2020) cultivaram linhagem de fungos em cultivo submerso em um meio composto por ASD, CMC e por sua mistura e observaram que maiores atividades enzimáticas foram obtidas no meio formado pela mistura das duas substâncias. Contudo, no presente estudo, foi observado que o desenvolvimento do inóculo em ASD suplementado não levou a aumento da produção enzimática na etapa posterior de cultivo. Sendo assim, optou-se por seguir os experimentos com inóculo desenvolvido apenas em meio ASD, sem necessidade de suplementação. Com relação ao meio de cultivo, optou-se por continuar a empregar a solução nutriente de Zanelato et al. (2012) acrescida de lactose 15g.L<sup>-1</sup> para os testes de aumento de escala para biorreatores, devido a este ser um meio de menor teor de sais utilizados, o que pode vir a diminuir os custos em uma possível utilização em escala industrial, ao passo que a adição



de lactose favoreceu de forma significativa a produção enzimática.

### 5.3. Planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup>

Com base nos resultados dos ensaios iniciais em escala de frascos, foram selecionados os níveis a serem utilizados para um planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> em triplicata. O objetivo foi identificar, a partir das respostas, as condições de cultivos que permitiriam obter uma maior produção de enzimas para um posterior uso em escala de biorreatores. Os fatores analisados foram a concentração de lactose e a proporção de substrato. A variável resposta analisada foi a atividade de endoglucanase (CMCase).

A Tabela 5.4 apresenta os fatores utilizados no planejamento experimental e os resultados obtidos da produção de CMCase nos cultivos em estado sólido e submerso.

**Tabela 5.4:** Resultados do planejamento fatorial dos cultivos em estado sólido e submerso de *M. thermophila* para atividade de endoglucanase.

<b>Cultivo em estado sólido (U.gss<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Concentração de lactose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>BC:FT 7:3 m/m</b>	<b>BC:FT 1:1 m/m</b>	<b>BC:FT 9:1 m/m</b>
<b>15</b>	244,74 (±13,72) <sup>Aa</sup>	212,64 (±20,67) <sup>Aa</sup>	45,48 (±10,96) <sup>Ab</sup>
<b>30</b>	172,67(±20,87) <sup>Aa</sup>	166,01 (±24,80) <sup>Aa</sup>	29,13 (± 14,12) <sup>Ab</sup>
<b>45</b>	147,23 (±29,87) <sup>Ba</sup>	162,98 (±14,19) <sup>Aa</sup>	27,92 (±6,88) <sup>Ab</sup>
<b>Cultivo submerso (U.gss<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Concentração de lactose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>BC:FT 7:3 m/m</b>	<b>BC:FT 1:1 m/m</b>	<b>BC:FT 9:1 m/m</b>
<b>15</b>	122,84 (±13,72) <sup>Aa</sup>	106,74 (±10,34) <sup>Aa</sup>	22,36(±10,96) <sup>Ab</sup>
<b>30</b>	86,67 (±20,87) <sup>Aa</sup>	83,35(±12,41) <sup>Aa</sup>	14,55(±14,12) <sup>Ab</sup>
<b>45</b>	73,23 (±15,57) <sup>Ba</sup>	81,05 (±7,19) <sup>Aa</sup>	13,54 (±6,88) <sup>Ab</sup>

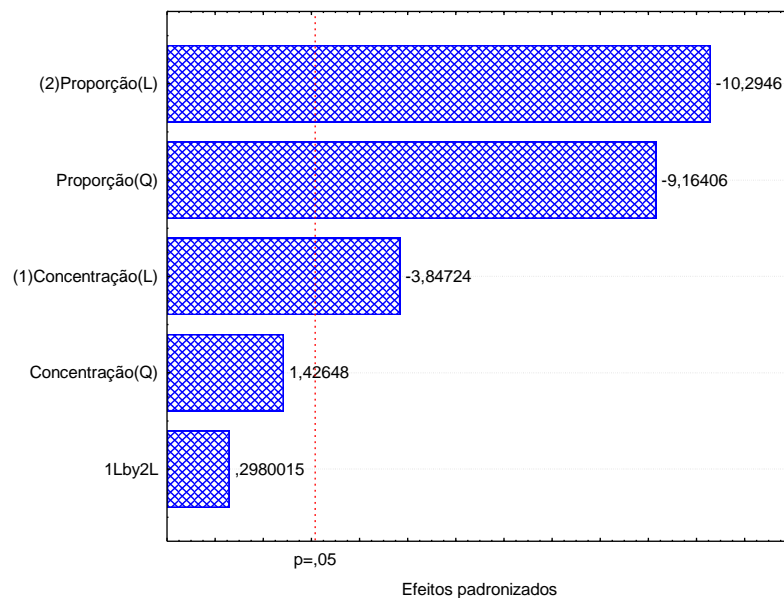
\*Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ); Letras iguais indicam que as médias não diferem significativamente entre si (ao nível de 5% de significância).

Observa-se na Tabela 5.4 que a atividade de endoglucanase após o término de cada ensaio diminuiu numericamente com o aumento da concentração de lactose, sendo que para os cultivos sólido e submerso os maiores valores foram obtidos na concentração de 15g.L<sup>-1</sup>, iguais a 244,74 e 122,84 U.gss<sup>-1</sup>, respectivamente. É possível observar a proximidade nos valores de atividade de CMCase para os ensaios realizados na proporção de 7:3 e 1:1 (m/m) por meio do

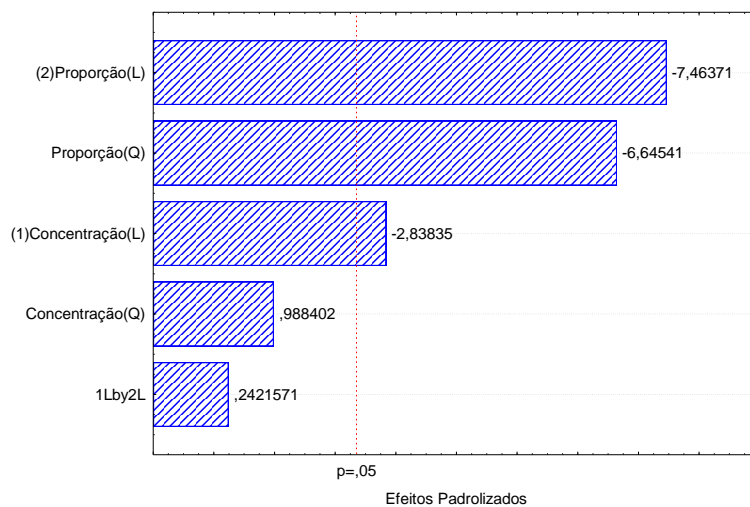
teste Tukey, o que indica que nessas condições ocorre uma maior secreção de enzimas para meio extracelular quando empregada a lactose como fonte de carbono indutora nessas proporções.

Nas Figuras 5.4 (a) e (b), estão apresentados os diagramas de Pareto para avaliação dos efeitos das variáveis independentes nas respostas dos ensaios sólido e submerso. Aquelas que foram estatisticamente significativas ultrapassam a reta vertical, sendo que esta reta é indicativa do limite de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

**Figura 5.4.** Diagrama de Pareto para a atividade de endoglucanase (CMCase) nos cultivos sólido (a) e submerso (b).



(a)



(b)

Com base nas Figuras 5.4 (a) e (b), é possível confirmar que em ambos os cultivos as variáveis proporção de substrato e concentração de lactose apresentaram uma influência significativa em relação à resposta dos ensaios, em termo linear. A literatura reporta alguns trabalhos que mostram a influência dessas variáveis independentes na produção de enzimas (SADHU et al. 2013; LUGANI et al. 2015; SHAJAHAN et al. 2017).

Os sinais negativos para a proporção (-10,2946 e -7,4637) e concentração (-3,8472 e -2,8383) nos cultivos sólido e submerso, respectivamente, indicam que o aumento no valor dessas variáveis leva a redução da atividade CMC<sub>ase</sub> alcançada.

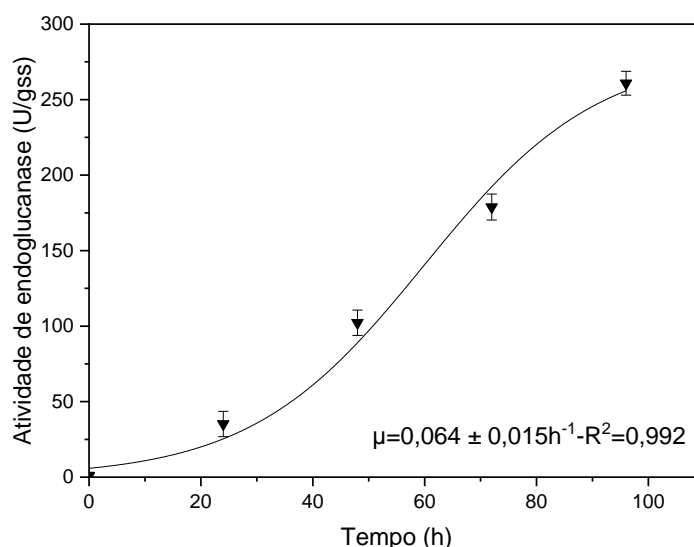
A interação entre a concentração e a composição do substrato não apresentou influência estatística significativa para o intervalo de confiança de 95%. Com base nos dados obtidos, é possível observar que a concentração apresenta efeito negativo, indicando que aumentar a concentração de lactose para valores maiores do que 15 g.L<sup>-1</sup> não incrementa o efeito indutor da produção da enzima, sendo o mesmo válido para o aumento da proporção de bagaço de cana na composição do substrato de 9:1, onde indica que há uma faixa ideal para produção de endoglucanases, que acima ou abaixo de 7:3 a produção é inibida. Com relação à concentração de lactose, os presentes resultados estão de acordo com os de Gomes et al. (2020), ao passo que em relação à proporção bagaço e farelo, os resultados concordam com Zanelato et al. (2012).

#### 5.4. Cinética de crescimento de *M. thermophila* em cultivo em estado sólido

Uma alternativa para se avaliar o crescimento microbiano no CES é correlacioná-lo com a atividade metabólica por meio da atividade de enzimas extracelulares (MITCHELL et al., 2006). A Figura 5.5 apresenta o resultado do ajuste da equação da logística na cinética enzimática dos cultivos sólidos do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em BC:FT 7:3 (m/m) em embalagens de polipropileno, onde é possível identificar as fases típicas de crescimento deste microrganismo. A velocidade específica de produção de endoglucanase ( $\mu$ ) é indicada junto ao respectivo gráfico, assim como o valor do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) do modelo ajustado.

O modelo logístico ajustou-se bem aos dados experimentais e resultou em altos valores de coeficientes de determinação ( $R^2$ ). O valor da velocidade específica de aumento da atividade foi  $\mu = 0,064 \text{ h}^{-1}$ , em relação às medidas realizadas, o que confirma o relato de Rodrigues et al. (2022), que também reportou que a equação logística foi a que melhor se ajustou aos dados cinéticos de endoglucanase de *Myceliophthora thermophila* em CES com  $R^2 > 0,99$  e boa descrição da cinética de crescimento na temperatura de 45°C, mas no caso da autora sem a adição de lactose.

**Figura 5.5:** Ajuste da equação da logística aos pontos experimentais do cultivo em estado sólido de *M. thermophila* para atividade de endoglucanase.



Palma (2003) realizou o cultivo do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* em escala de frascos e em reatores de coluna para produção de xilanases, empregando como substrato bagaço de mandioca e farelo de arroz na proporção 7:3 (m/m). A velocidade específica de crescimento enzimática determinada por Palma foi  $0,0061 \text{ h}^{-1}$ , inferior à do presente trabalho ( $0,064 \text{ h}^{-1}$ ), demonstrando a alta velocidade na produção de enzimas nas condições do presente estudo.

A partir da Figura 5.5, é possível observar que a curva cinética apresenta comportamento crescente similar a estudos realizados por Casciatori et al. (2015) e Gomes et al. (2020). O ajuste da equação da logística permitiu visualizar a evolução microbiana ao longo das 96 horas de cultivo, com a fase lag parecendo estar compreendida nas primeiras 20 horas, a exponencial se estendendo de 20 até aproximadamente 90 horas e, por fim, com a fase a estacionária se iniciando a partir de 90 horas de cultivo. Já em 96 horas, tem-se a atividade máxima, que possivelmente seria seguida de uma redução característica deste tipo de cinética, embora o modelo não preveja a fase de decaimento.

Zanelato (2011) cultivou o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b nos mesmos substratos e condições empregados neste trabalho, em um tempo de 144 h. O autor observou que a atividade de endoglucanase obtida aumenta acentuadamente durante as primeiras 48 h de cultivo e estabiliza após 96 h. O maior valor de atividade de endoglucanase foi obtido no tempo de 96 horas com valor de 260,84 U/gss. Tal resultado está de acordo com o previsto por Rodrigues et al. (2020), que havia estabelecido o tempo de 96 h como ótimo para obtenção de endoglucanase a partir do CES deste mesmo microrganismo a  $45^{\circ}\text{C}$ , empregado os mesmos

substratos, sendo obtidos valores na faixa de 290,0 U/gss.

Poucos artigos estão disponíveis na literatura sobre a cinética de crescimento de fungos termofílicos em CES para propósitos industriais, sendo importante conhecer tais cinéticas para melhoria de produtividade, e nenhum trabalho foi encontrado para o cultivo com lactose como fonte indutora em meio de substrato de bagaço de cana, o que mostra a importância do presente estudo para uma possível aplicação em nível industrial. Esse dado é importante, por exemplo, para se estabelecer um menor tempo de cultivo dos fungos que apresentaram maior velocidade de crescimento (BENOCCI et al. 2017; SAMAL et al. 2017; FAVARO et al. 2020).

## 5.5. Teste com soro de leite como fonte de lactose

### 5.5.1. Caracterização do soro de leite

A caracterização do soro de leite *in natura* foi realizada com o objetivo de conhecer a concentração de lactose presente no soro, e avaliar a possibilidade de aproveitamento deste resíduo como fonte do açúcar indutor. A composição de lactose pode variar de acordo com a qualidade e o tipo de leite utilizado, bem como com o processo de coagulação empregado na produção de diferentes tipos de queijo. As médias dos resultados das análises químicas por açúcares redutores totais (DNS) do soro *in natura* e concentrado, assim como a equação da curva padrão, são apresentadas na Tabela 5.5.

**Tabela 5.5.** Resultados da análise química do soro de leite *in natura* e concentrado.

Soro de leite	Concentração de açúcares redutores (g.L <sup>-1</sup> )
<i>In natura</i>	8,20 (± 0,72) <sup>B</sup>
<b>Concentrado</b>	30,76 (± 0,87) <sup>A</sup>
$C_{\text{lactose}} \text{ (g/L)} = 1,2265 \text{ Abs}_{540} + 0,0304$	$R^2 = 0,9922$

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Considerando os dados apresentados na Tabela 5.5, o teor de lactose do soro de leite *in natura* está na faixa de valores reportados por Rachow (2019), Mossamann et al. (2020) e Baldasso et al. (2022) para suas respectivas amostras de soro de leite *in natura* (8,46; 5,58 e 5,0 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente).

Pode-se observar que a etapa de concentração do soro de leite *in natura* resultou de fato em um aumento do teor de lactose em mais de 3 vezes, o que é interessante do ponto de vista

industrial. O aumento da concentração pelo método empregado era esperado porque a retirada do teor de água implica na quebra das interações do açúcar com a água, o que contribui para um aumento do teor de lactose. Com o aumento da concentração das amostras, ocorre um aumento do teor de sólidos totais (BERNARDI, 2020), concordando com estudos realizados por Prazeres et al. (2013), que reportaram incremento do teor de lactose com o aumento da concentração de sólidos solúveis da amostra.

Sendo assim, o método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) mostrou-se satisfatório e indicado para a quantificação de lactose no soro, sendo possível elaborar uma curva padrão com coeficiente angular adequado e com boa linearidade. Além disso, por meio deste método, foi possível quantificar a concentração de lactose na amostra de soro de leite *in natura* e após a realização de uma etapa de concentração dos sólidos solúveis no material.

### 5.5.2. Avaliação da adição de soro de leite sobre o crescimento do microrganismo e a atividade de endoglucanase (CMCase)

Os cultivos sólidos e submersos foram realizados utilizando como fonte de carbono soro de leite *in natura* e concentrado em substituição a lactose sintética (comercial). Após o período de 96 horas, formou-se uma fina camada de micélio na superfície do meio de cultivo submerso, opaca e de coloração verde-amarelada, enquanto nos cultivos sólidos foi possível observar o crescimento do fungo por meio da aparência cotonosa nos sacos de polipropileno, conforme pode ser visto na Figura 5.6.

**Figura 5.6.** Aparência dos cultivos sólido e submerso de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b após as 96 horas de cultivo.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Uma das maiores desvantagens da utilização das fontes de carbono sintéticas é o custo destes insumos. O uso de meios de cultivo mais econômicos é, portanto, de grande importância para a redução dos gastos envolvidos com a produção de enzimas. Neste trabalho, foi utilizado um meio de cultura contendo o soro de leite, um resíduo da indústria de laticínios, para o crescimento do microrganismo e a indução de secreção da celulase, visto que o resíduo é rico no açúcar que melhor induziu a atividade de endoglucanase.

A fim de definir a melhor concentração deste resíduo, sua quantidade foi variada no meio de cultura e os resultados das análises de atividade de endoglucanase (CMCase) estão mostrados na Tabela 5.6, onde constam os valores das médias e dos desvios padrão das triplicatas dos cultivos sólidos e submersos e de duas formas de controle: sem adição de lactose ao meio (controle negativo) e outro com a utilização de lactose sintética na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> (controle positivo), além dos resultados da comparação de médias por teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

**Tabela 5.6.** Atividade de endoglucanase (CMCase) ao final dos cultivos de *M. thermophila* a partir de inóculos crescidos no meio formado por soro de leite.

<b>Atividade de endoglucanase do cultivo sólido (U.gss<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Concentração de lactose no soro de leite (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Uso do soro de leite</b>	<b>Controle sem lactose (negativo)</b>	<b>Controle com lactose sintética (positivo)</b>
<b>8</b>	139,36 ( $\pm 14,87$ ) <sup>B</sup>		
<b>15</b>	255,04 ( $\pm 2,77$ ) <sup>A</sup>	149,65 ( $\pm 11,10$ ) <sup>B</sup>	244,74 ( $\pm 13,72$ ) <sup>A</sup>
<b>Atividade de endoglucanase do cultivo submerso (U.gss<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Concentração de lactose no soro de leite (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Uso do soro de leite</b>	<b>Controle sem lactose (negativo)</b>	<b>Controle com lactose sintética (positivo)</b>
<b>8</b>	56,99 ( $\pm 12,89$ ) <sup>B</sup>		
<b>15</b>	138,39 ( $\pm 14,87$ ) <sup>A</sup>	79,37 ( $\pm 1,39$ ) <sup>B</sup>	127,82 ( $\pm 9,61$ ) <sup>A</sup>

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Avaliando-se o efeito das concentrações de lactose e da forma de cultivo para a secreção de enzimas celulases, foi possível verificar que a maior concentração de lactose proveniente do soro de leite em 15 g.L<sup>-1</sup> proporcionou o alcance da maior atividade de endoglucanase para ambas as formas de cultivos (sólido e submerso). Cardoso et al. (2008) utilizaram soro de leite em cultivo submerso com o objetivo de substituir fontes de carbono. Esses pesquisadores constataram que o soro de leite foi uma ótima fonte alternativa para indução da produção de

celulases, reportando o alcance de uma atividade de 408,20 U/mL a um custo de produção bem menor comparado ao obtido empregando fontes sintéticas. Falleiros et al. (2015) avaliaram a utilização de permeado de soro de leite e observaram comportamento similar de produção de enzimas em cultivos sólidos.

Comparando-se os ensaios na concentração de lactose de 15 g.L<sup>-1</sup> advinda de soro, sólido (255,04 U.gss<sup>-1</sup>) e submerso (138,04 U.gss<sup>-1</sup>), com o controle realizado com lactose sintética, sólido (244,74 U.gss<sup>-1</sup>) e submerso (127,82 U.gss<sup>-1</sup>), observa-se que não ocorreu uma diferença significativa em ambas as formas de cultivo, o que mostra a grande perspectiva da utilização do soro como fonte do indutor em substituição à lactose sintética para a produção de enzimas celulolíticas. Corroboram com esses resultados estudos da literatura para a produção de enzimas β-galactosidase com uso de subprodutos da rota de produção de leite, como soro de leite por Bosso et al. (2019), permeado de soro por Hein (2015) e soro de leite por Ferreira (2019). Entretanto, ao utilizar o soro de leite como fonte de carbono para produção de uma protease alcalina de um novo isolado de *Bacillus sp.* L21, os autores constataram que este resíduo proporcionou menor atividade específica da enzima (TARI et al., 2006), possivelmente devido ao fato de o soro também aportar maior quantidade de proteínas solúveis ao meio de cultivo.

A menor atividade enzimática no controle realizado sem a presença de uma fonte de lactose já era esperada, visto que a lactose atuou como fonte de indução da biossíntese de enzimas celulolíticas para o meio extracelular, o que contribui para uma maior atividade, como havia sido observado nos ensaios com adição de lactose aos meios de cultivo sólido e submerso e na literatura (BEZERRA et al., 2021; CUNHA et al., 2012; SILVA, 2017; PANDEY; NEGI, 2020). Ao se avaliar os ensaios realizados com soro de leite na concentração de 8 g.L<sup>-1</sup> (*in natura*), observa-se atividade enzimática mais baixa em comparação à concentração de 15 g.L<sup>-1</sup>, o que também está de acordo com os resultados que já haviam sido encontrados com uso de diferentes concentrações de lactose sintética, parecendo a concentração do açúcar de 15 g.L<sup>-1</sup> ser a ideal para favorecer a secreção das enzimas de interesse.

## **5.6. Avaliação do efeito da taxa específica de aeração em biorreatores**

Nesta etapa do trabalho, foram realizados ensaios experimentais em escala ampliada, variando-se a taxa de aeração em biorreatores. Para o cultivo em estado sólido, foi utilizado biorreator de leite empacotado (BLE); para cultivo submerso, foi utilizado tanque agitado aerado (TAA).

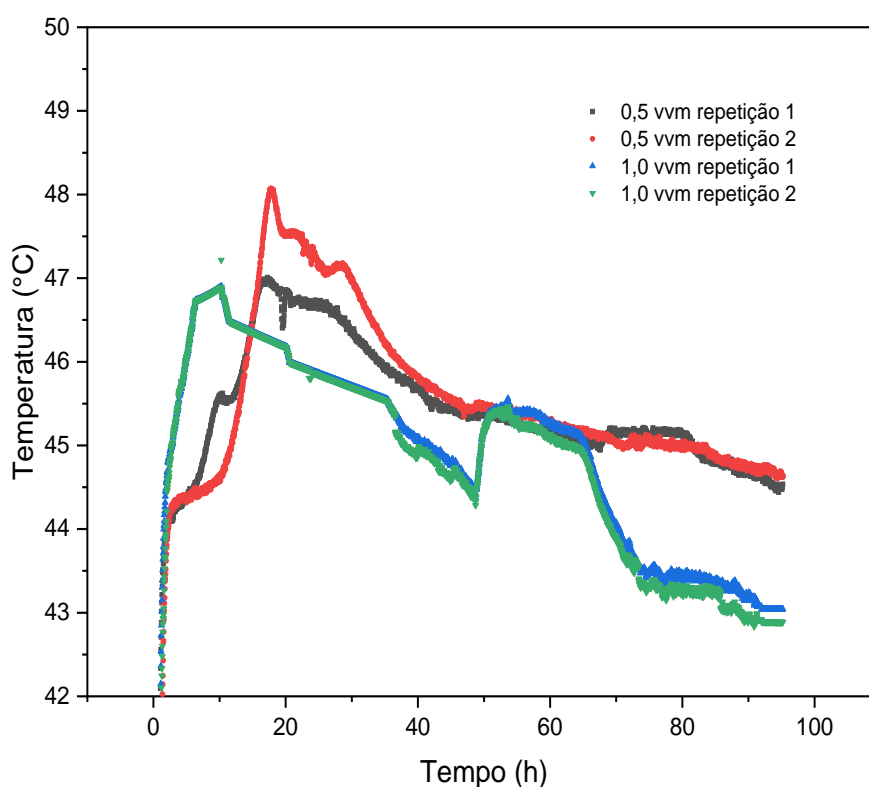


## 5.6.1. Cultivos em estado sólido em biorreator de leito empacotado (BLE)

### 5.6.1.1. Resultados térmicos dos cultivos

A Figura 5.7 apresenta os perfis de temperatura dos cultivos em duplicata para duas taxas de aeração empregadas no BLE. É possível observar que as temperaturas médias registradas ao longo dos cultivos se mantiveram em torno de 45°C, considerada como a temperatura ideal do processo.

**Figura 5.7.** Perfis de temperatura do cultivo em estado sólido em BC:FT 7:3 m/m de *M. thermophila* em BLE.



Também se nota um retardamento do pico de temperatura no cultivo com aeração em 0,5 vvm, que ocorre por volta de 18 horas, enquanto no cultivo com aeração em 1 vvm esse pico ocorreu em 10 horas. Tal comportamento está associado ao deslocamento da fase de crescimento dos microrganismos e conseqüentemente do acúmulo do calor metabólico gerado em função da maior ou menor disponibilidade de oxigênio. Esta observação também foi encontrada previamente por Zanelato et al. (2012) e será corroborada quando da análise do gráfico de desprendimento de gás carbônico ao longo desses cultivos, na seção seguinte.

Os ruídos observados no gráfico são típicos deste tipo de experimento, para o qual não se deve esperar precisão maior que 0,5°C (HENRIQUE et al., 2022). A Tabela 5.7 traz os valores das temperaturas máximas atingidas e do tempo médio para alcance do pico de temperatura, com base no que se avaliou o efeito da aeração sobre o desempenho térmico do bioprocessamento, por meio de comparações estatísticas.

**Tabela 5.7.** Análise térmica ao longo do processo fermentativo BLE.

<b>Aeração (vvm)</b>	<b>Temperatura máxima (°C)</b>	<b>Tempo médio (h)</b>
<b>1,0</b>	47,06 ± 0,22 <sup>A</sup>	10,3 ± 0,1 <sup>A</sup>
<b>0,5</b>	47,54 ± 0,75 <sup>A</sup>	17,6 ± 0,4 <sup>B</sup>

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Não foi observada diferença significativa entre as temperaturas máximas atingidas, conforme apresentado na Tabela 5.7. A máxima temperatura registrada foi em torno de 47°C, não havendo, portanto, ocorrido superaquecimento considerável no interior do biorreator, nem mesmo quando fora empregada a menor taxa de aeração, 0,5 vvm. Resultados semelhantes foram encontrados por Zanelato et al. (2012) e Perez et al. (2021), que também relataram um aumento na temperatura de somente 2°C no cultivo do mesmo fungo, porém sem a adição de lactose à solução nutriente. Em ambos os trabalhos, a temperatura da camisa foi igualmente mantida a 45°C.

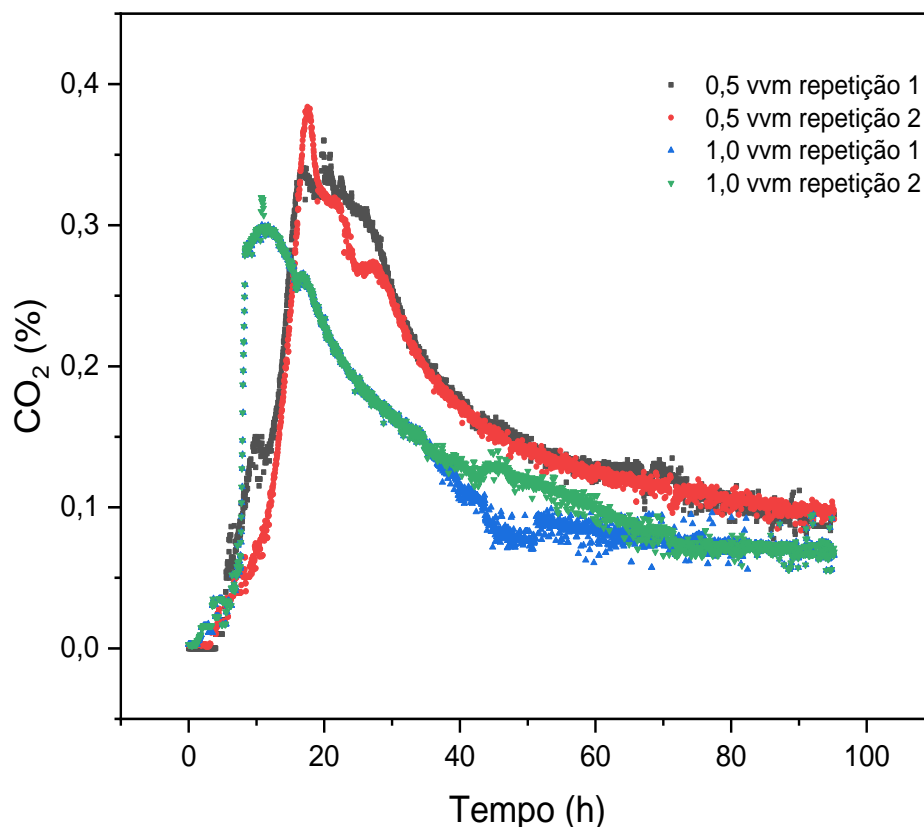
Ademais, a variação de temperatura ao longo do tempo foi baixa, indicando boa homogeneidade térmica para esse tipo de biorreator, um atributo industrial muito interessante. Outro fator que pode ter sido determinante para a homogeneidade térmica do biorreator foi a escolha de um fungo termofílico como agente fermentativo e de uma matriz sólida com alta porosidade para seu cultivo.

### 5.6.1.2. Análise respirométrica

A Figura 5.8 apresenta os perfis de concentração em volume de CO<sub>2</sub> (%) em duplicata ao longo do tempo de cultivo. Observa-se que os perfis de concentração de CO<sub>2</sub> apresentaram o mesmo comportamento dos perfis de temperatura, indicando que a elevação da temperatura nos cultivos com *M. thermophila* foi, de fato, devido à geração de calor metabólico. Assim, tal observação reitera que a máxima geração de calor metabólico pelo fungo levou ao pico de temperatura no processo, tendo ocorrido durante sua fase de crescimento acelerado, durante a

qual a taxa de respiração da cultura foi máxima.

**Figura 5.8.** Perfis de concentração de CO<sub>2</sub> em função do tempo de cultivo em duplicata em BLE.



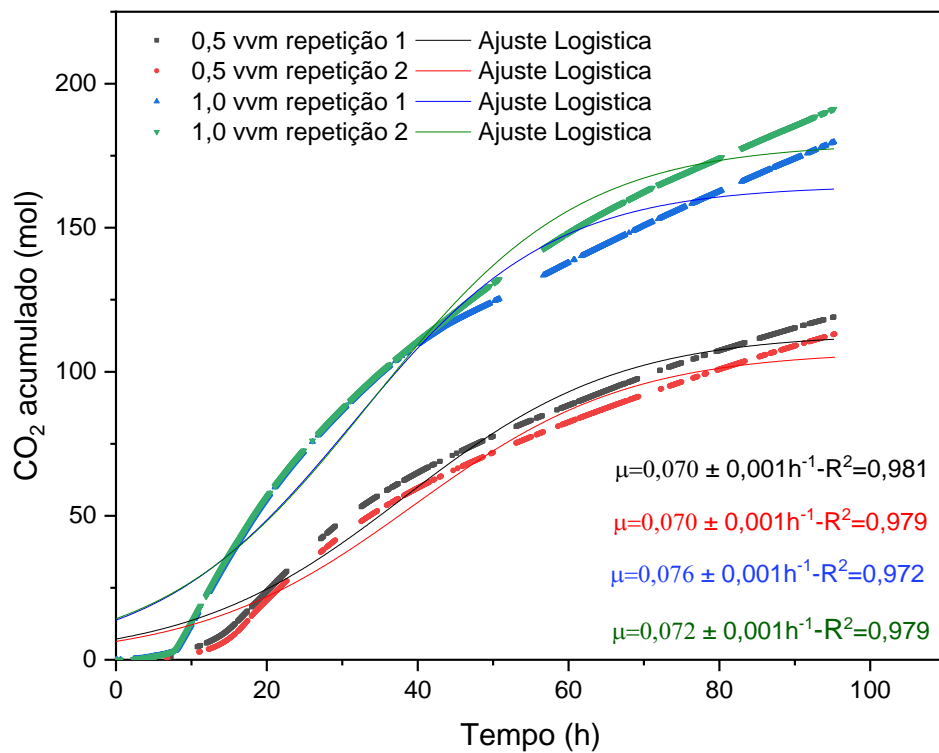
A partir do gráfico da Figura 5.8, é possível observar que a maior concentração em volume de CO<sub>2</sub> se deu na vazão de 0,5 vvm, com valor em torno de  $0,37 \pm 0,02$  (%), enquanto na maior taxa de aeração o valor encontrado foi de  $0,31 \pm 0,01$  (%), o que está associado à maior diluição do CO<sub>2</sub> na corrente gasosa na maior taxa específica de aeração. De acordo com Casciadori (2015), esse pico de concentração de CO<sub>2</sub> se dá exatamente no momento de maior temperatura atingida no cultivo do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, o que corrobora com os resultados do presente estudo. Ressalta-se que os ruídos observados nos valores adquiridos de CO<sub>2</sub> no final da curva, referentes aos períodos nos quais os valores são mais baixos, estão próximos do limite mínimo de detecção da sonda, o que pode interferir nos dados adquiridos.

Uma das vantagens da medida da concentração de CO<sub>2</sub> como indicativo do crescimento durante o CES é não necessitar de amostragem do meio de cultivo, pré-tratamentos e análises químicas do fermentado, podendo ser realizadas medidas online (CASCIATORI, 2015). A

partir dos dados de CO<sub>2</sub>, também foi possível determinar as taxas específicas de crescimento, através do ajuste de um modelo de cinética aos dados de CO<sub>2</sub> acumulado desprendido ao longo do tempo de cultivo. Dentre os modelos, a equação da logística representa melhor o crescimento fúngico em CES (VICCINI et al. 2001) e, portanto, foi escolhida para os ajustes do presente trabalho.

A Figura 5.9 apresenta a representação gráfica do modelo de regressão logística ajustado aos pontos experimentais de gás carbônico acumulado nos cultivos com taxas de aeração de 1 e 0,5 vvm, respectivamente.

**Figura 5.9.** Ajuste do modelo de regressão logística aos dados de CO<sub>2</sub> acumulado em duplicata.



Por meio da Figura 5.9, é possível observar que o modelo de regressão logística se ajustou bem aos dados experimentais e resultou em altos coeficientes de determinação ( $R^2$ ), o que demonstra que a produção de CO<sub>2</sub> foi bem descrita pelo modelo. Estes comportamentos estão coerentes com os resultados encontrados por Rodrigues et al. (2022) que, trabalhando com *Aspergillus niger*, obtiveram valores do coeficiente de determinação próximos dos encontrados no presente estudo, variando de 0,97 a 0,98, aproximadamente. Com respeito ao perfil de CO<sub>2</sub> acumulado, pode-se perceber uma maior quantidade produzida de CO<sub>2</sub> nos ensaios sob a maior taxa de aeração. Isso significa que o crescimento fúngico foi favorecido, tanto pela maior oferta de oxigênio quanto pela maior retirada do sistema de *off gases* e de calor

metabólico, o que também pode estar diretamente relacionado à maior produção de biomassa e maiores atividades enzimáticas atingidas, como será visto nos resultados apresentados adiante.

A produção total acumulada de CO<sub>2</sub> em 96 h foi de 185,53 mol (8,16 kg) para 1 vvm e de 116,06 mol (5,11 kg) para 0,5 vvm. Na Tabela 5.8, estão apresentados os valores médios das velocidades de produção de CO<sub>2</sub> para ambos os casos em estudo. Observa-se que não houve diferença estatística significativa entre os valores da constante específica de crescimento ( $\mu$ ) para as duas taxas de aeração. Resultados semelhantes foram obtidos por Casciatori (2015), que estimou um valor de  $\mu$  igual a 0,06 h<sup>-1</sup> para *M. thermophila* I-1D3b com taxas de aeração menores sob as mesmas condições aqui empregadas. Henrique et al. (2022) avaliaram experimentalmente o crescimento de *Myceliophthora thermophila* M.7.7 também em BC:FT 7:3 m/m e obtiveram valores de  $\mu$  na faixa de 0,07 h<sup>-1</sup>, similares aos do presente trabalho. Os resultados encontrados mostram que ambas as condições propostas de aeração são favoráveis ao desenvolvimento do microrganismo, suprimindo oxigênio suficiente e proporcionando bom controle térmico.

**Tabela 5.8.** Constantes específicas de produção de CO<sub>2</sub> de acordo com as taxas de aeração em BLE.

Aeração (vvm)	Constantes específicas $\mu$ (h <sup>-1</sup> )
1,0	0,074 ± 0,003 <sup>A</sup>
0,5	0,070 ± 0,001 <sup>A</sup>

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.6.1.3. Atividades enzimáticas

Para fins de avaliação do efeito da taxa de aeração sobre a atividade enzimática, foram consideradas as médias dos ensaios em duplicatas, obtidas no biorreator para as duas taxas de aeração, em vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.9.

**Tabela 5.9.** Atividade de endoglucanase e PFase, em U/gss, em relação às taxas de aeração.

Aeração (vvm)	Endoglucanase (CMCase) (U/gss)	PFase (U/gss)
1,0	203,60 ± 35,50 <sup>A</sup>	11,70 ± 1,95 <sup>A</sup>
0,5	129,24 ± 19,79 <sup>B</sup>	10,16 ± 3,01 <sup>A</sup>

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Pode-se observar um aumento da atividade enzimática endoglucanase com o aumento da aeração analisada. Essa diferença de atividades pode estar relacionada a fatores biológicos e/ou bioquímicos do microrganismo, o que é corroborado pela maior produção de CO<sub>2</sub>.

Os resultados de atividade enzimática obtidos no presente estudo foram superiores quando comparados a estudos similares recentes da literatura, como os de Rodrigues et al. (2022) e de Henrique et al. (2022), que realizaram cultivos com *M. thermophila* I-1D3b em BC:FT 7:3 m/m com taxas de aeração de 0,97 e 1,0 vvm, respectivamente, tendo obtido valores de endoglucanase iguais a 158,3 U/gss para o cultivo com aeração de 0,97 vvm e 140,0 U/gss para o cultivo com 1,0 vvm, indicando que a aeração de 1 vvm utilizada no presente estudo favoreceu maior produção de endoglucanase, quando associada à suplementação do meio de cultivo com lactose como indutor da biossíntese de celulases.

Para as duas diferentes enzimas quantificadas (CMCase e FPase), a análise de variância ( $\alpha = 0,05$ ) indica que a taxa de aeração do biorreator teve efeito significativo apenas sobre uma das variáveis resposta, no caso da CMCase. Logo, pelo teste de Tukey, a atividade CMCase, enzima responsável por atacar a parte amorfa da celulose, foi estatisticamente diferente entre 1 e 0,5 vvm. Já a atividade média de FPase, que expressa a atividade conjunta do complexo de enzimas celulolíticas secretadas pelo fungo, foi estatisticamente igual para as duas taxas de aeração, o que denota que a taxa de aeração em 1 vvm foi mais eficiente para a produção de algumas das enzimas do complexo celulolítico secretadas para o meio de cultivo, mas não de todas, de forma que a atividade sinérgica com as demais enzimas do complexo não foi afetada.

Resultados semelhantes foram relatados por Casciadori (2015) e Frassatto (2020), que também cultivaram *M. thermophila* I-1D3b, e obtiveram uma maior atividade de endoglucanase em relação a FPase. Portanto, pode-se afirmar que o extrato enzimático obtido a partir do processo avaliado no presente trabalho possui grande potencial para ser aplicado na etapa de hidrólise da rota bioquímica de produção de BE2G, assim como na obtenção de nanocelulose (KATAYAMA et al., 2022), neste último caso por ser um extrato caracterizado como rico em endoglucanase.

Cabe lembrar que a matriz sólida permaneceu estática durante todo o processo aqui avaliado e, dessa forma, o desenvolvimento do microrganismo não foi prejudicado por nenhum tipo de atrito. Em nenhum dos cultivos houve contaminação, tornando o processo ainda mais atrativo em âmbito industrial. Essas descobertas trazem informações sobre a relação entre o crescimento do fungo, aeração e síntese de alguns metabólitos, como é o caso das endoglucanases e FPase neste estudo.

#### 5.6.1.4. Umidade

Outra dificuldade na operação de biorreatores de leito empacotado é a possível redução do teor de umidade do meio poroso ao longo do cultivo, o que tem consequências diretas sobre o crescimento fúngico e a produção de metabólitos (GERVAIS; MOLIN, 2003). A Tabela 5.10 mostra os conteúdos de umidade final da matriz sólida (em porcentagem de umidade em base úmida, % b.u.) ao final do tempo de cultivo em cada módulo, sob as taxas de aeração de 0,5 e 1 vvm.

**Tabela 5.10.** Umidade final do meio utilizado nos módulos acessórios de entrada, fermentativo e saída do BLE após os cultivos de *M. thermophila* em estado sólido em BC:FT 7:3 m/m.

Aeração (vvm)	Módulo de entrada (% em b.u.)	Módulo fermentativo (% em b.u.)	Módulo de saída (% em b.u.)
1,0	33,33 ± 1,72 <sup>C</sup>	73,80 ± 1,07 <sup>A</sup>	13,16 ± 0,96 <sup>D</sup>
0,5	61,64 ± 0,17 <sup>ABC</sup>	63,67 ± 0,74 <sup>AB</sup>	52,23 ± 0,12 <sup>BC</sup>

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Sabendo-se que a umidade inicial dos módulos fermentativos foi de 75% (b.u.) em ambas as vazões de operação, pode-se afirmar que nos diferentes ensaios ocorreu a preservação da umidade na faixa superior a 60% nos módulos fermentativos durante os cultivos, o que é confirmado através do teste de Tukey, garantindo assim a manutenção das condições de umidade ótimas para o crescimento do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b (ZANELATO et al., 2012). Um fator primordial que pode ter garantido a saturação do ar e impedido uma secagem excessiva dos módulos fermentativos foi a reposição diária de água nos umidificadores de ar e a não elevação expressiva da temperatura no interior do leito ao longo do cultivo, além da efetividade do módulo de entrada, utilizado como módulo “sacrifício” em caso de possível secagem, o que foi observado para a aeração a 1,0 vvm.

A redução de umidade do meio poroso é decorrente do não-equilíbrio termodinâmico entre os conteúdos de água presentes no ar de percolação e no substrato sólido. Embora o ar possa entrar saturado no leito, se sua temperatura aumentar ao longo do biorreator devido aos gradientes de temperatura decorrentes da atividade metabólica, pode ocorrer secagem do material no decorrer do bioprocessamento (CASCIATORI, 2015).

Em relação aos substratos contidos nos módulos de entrada e saída, observa-se que ocorreu o efeito de secagem e absorção de água, respectivamente, sendo que tal comportamento

já era esperado. Quanto ao módulo de entrada, o ar pode ficar abaixo da saturação entre a coluna de umidificação e a entrada do leito de partículas, passando então a ser capaz de remover água do módulo acessório de entrada. Quanto ao módulo de saída, pode haver condensação de umidade quando o ar encontra o ambiente externo em mais baixa temperatura. Assim, a utilização dos módulos acessórios (entrada e saída) foi capaz de proteger a matriz fermentativa como desejado, uma vez que não foi observada uma variação significativa na umidade do módulo fermentativo e, portanto, não foi prejudicado o metabolismo do fungo. Umsza-Guez (2009) relatou secagens mais intensas dos módulos inferiores e inundação dos módulos do topo do leito, porém sem o uso dos módulos acessórios. Por outro lado, Rodrigues et al. (2022) cultivaram o fungo *M. thermophila* em BLE em condições semelhantes às aqui empregadas, com o uso dos módulos de entrada e saída, e não relataram problemas com a secagem do leito fermentativo, nem com inundação dos módulos próximos ao topo.

#### 5.6.1.5. Proteínas solúveis

A determinação de proteína também tem sido empregada para avaliar o crescimento de microrganismos e a produção de metabólitos no CES (SANTOS, 2007; EDUARDO, 2010; SILVA FILHO, 2005; PARIS, 2008). Em geral, duas alternativas podem ser aplicadas para a evolução do conteúdo proteico do fermentado ao longo do tempo: a determinação do conteúdo total das proteínas ou a obtenção das proteínas solúveis na extração sólido-líquido ao final do tempo de cultivo.

Para o extrato oriundo de cada ensaio, foram realizadas análises em duplicata do teor de proteínas solúveis, pelo método de Bradford. Além da correlação com o crescimento, também através dos valores de proteínas solúveis dos extratos, foi possível obter as atividades específicas, como uma medida da pureza dos extratos, e cujos valores médios calculados encontram-se dispostos na Tabela 5.11.

**Tabela 5.11.** Produção de proteínas solúveis e atividade específica de acordo com as taxas de aeração em BLE.

Aeração (vvm)	Proteínas solúveis (mg/L)	Atividade endoglucanase específica (U/mg)
1,0	226,06 ± 6,31 <sup>A</sup>	45,05 ± 0,97 <sup>A</sup>
0,5	256,38 ± 8,83 <sup>A</sup>	23,32 ± 5,26 <sup>B</sup>

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p < 0,05).



Apesar de a taxa de aeração de 0,5 vvm ter apresentado maior teor de proteínas solúveis, a diferença dos resultados entre as duas vazões de aeração não foi estatisticamente significativa ( $\alpha = 5\%$ ). No entanto, em termos de atividade específica, esta foi significativamente menor na menor taxa de aeração. Isso pode significar que, sob oferta de oxigênio mais restrita, o fungo produziu uma maior diversidade de proteínas solúveis, mas não elevou sua produção de enzimas com atividade endoglucanase, o que reforça a importância da boa aeração para o propósito do presente estudo.

### 5.6.2. Cultivos submersos em biorreator tipo tanque agitado aerado (TAA)

Os fungos filamentosos, em cultivo submerso, podem crescer sob a forma de pellets (aglomerado de células) ou na forma dispersa (concentrado de hifas e agregados), dependendo das condições de cultivo e da própria linhagem (FAHEINA JÚNIOR, 2012). Neste trabalho, o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b cresceu sob a forma dispersa, levando a um aumento na viscosidade do meio ao longo do tempo de cultivo. A Figura 5.10 apresenta uma foto do frasco adaptado como TAA para o cultivo submerso do fungo *M. thermophila*.

**Figura 5.10.** Sistema utilizado no cultivo submerso, imagem real ao final do tempo de 96 h.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Foi observado que ao longo do período de 96 h ocorreu crescimento celular acentuado do microrganismo no meio de cultivo, o que denota a boa capacidade do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em produzir celulases a partir de substratos lignocelulósicos suspensos em meio líquido e o bom efeito indutor da lactose como fonte de carbono adicional na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> também em sistema de cultivo submerso.

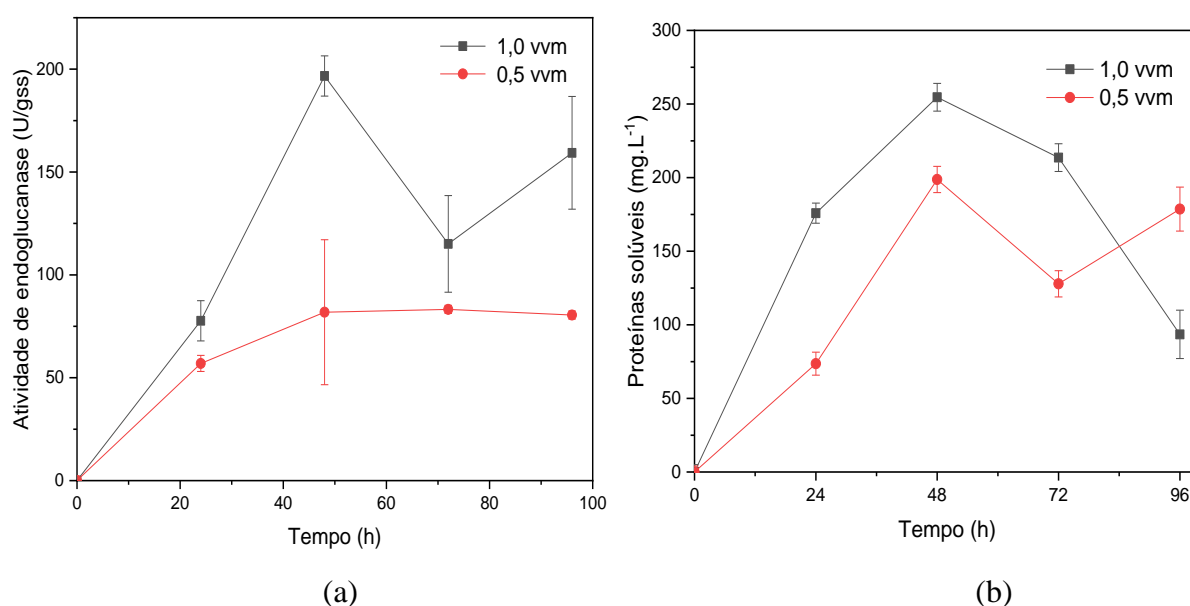
Resultados obtidos por Domingues et al. (2001) demonstraram que o crescimento na

forma de esporos em meio líquido facilita a adesão dos fungos ao material celulósico, auxiliando na obtenção de uma maior produtividade de enzimas celulolíticas. Este fenômeno possivelmente está relacionado à limitação da transferência de oxigênio dentro dos pellets (BUFFO et al., 2020), cuja formação não foi observada no presente trabalho.

### 5.6.2.1. Atividades enzimáticas e concentração de proteínas solúveis

As Figuras 5.11 (a) e (b) mostram os resultados do acompanhamento da atividade de endoglucanase e proteínas solúveis ao longo do tempo de cultivo do fungo *M. thermophila* com taxas de aeração de 1,0 e 0,5 vvm, quando o dissacarídeo lactose foi usado como fonte de carbono para suplementar o caldo de cultivo no biorreator tipo tanque agitado aerado (TAA). As análises são a média das três repetições e as barras de erro representam o desvio padrão.

**Figura 5.11.** Produção de endoglucanase (a) e proteínas solúveis (b) ao longo do cultivo submerso de *M. thermophila* com lactose ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) em TAA com taxa de aeração de 1,0 e 0,5 vvm.



Ao analisar a Figura 5.11, nota-se que os maiores valores de endoglucanase e proteínas solúveis foram observadas na aeração de 1 vvm, sendo reduzida praticamente à metade no cultivo conduzido com 0,5 vvm. É possível observar um crescimento acentuado tanto de atividade enzimática quanto do teor de proteínas solúveis nas primeiras 48 h dos cultivos, evidenciando que a produção enzimática foi associada ao crescimento, sendo provável que o microrganismo tenha consumido a lactose contida no meio durante a fase inicial de crescimento,

levando ao rápido crescimento observado nessa fase. Por sua vez, o teor de proteínas diminuiu rapidamente após esse período, o que pode ser atribuído à depleção de nutrientes necessários ao metabolismo do microrganismo, ou ainda ao acúmulo de metabólitos secundários, levando a uma redução na produtividade e à degradação de uma parte das proteínas inicialmente produzidas como fontes de carbono e de nitrogênio (LIMA et al. 2017).

Com o decorrer do tempo de cultivo entre 48 e 96 h, a atividade de CMC<sub>ase</sub> oscilou um pouco, mas permaneceu praticamente constante, sobretudo na menor aeração, coincidindo com o que ocorreu em relação à concentração de proteínas solúveis, haja vista que existe uma correlação direta entre os parâmetros analisados. O uso da aeração de 1 vvm, que proporcionou maior disponibilidade de oxigênio no sistema, pode explicar as maiores produções das enzimas de interesse e de outras proteínas observadas nos ensaios com essa taxa de aeração, ao mesmo tempo em que a degradação ao final do cultivo foi maior, provavelmente devido à maior concentração final de células.

É necessário destacar que o sistema utilizado no cultivo submerso em TAA foi realizado em condições com agitação, o que pode estar relacionado ao comportamento observado na Figura 5.11. Gomes et al. (2020) observaram que o fungo *M. thermophila* produzia pouca biomassa em meio submerso quando submetido a agitação em mesa orbital, ainda que em baixas frequências.

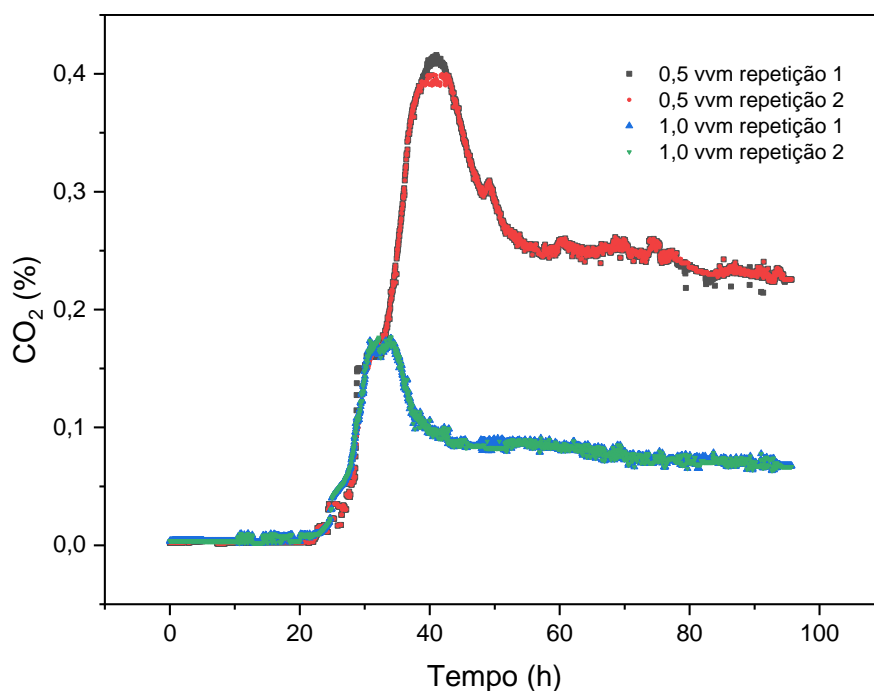
Rocha (2010) avaliou a produção de celulase por diferentes linhagens de *A. niger* e mostrou que a maior produção de enzimas ocorreu com 72 h de cultivo. Considerando que neste trabalho a produção máxima de celulase foi obtida em 48 h, 2/3 do tempo descrito pelos autores, observa-se que a linhagem de *M. thermophila* apresenta grande potencial para produção desta enzima, visto que se obteve uma atividade bem superior em um intervalo de tempo mais curto, o que implica em mais alta produtividade, o que é de interesse industrial.

Munhoz et al. (2017) e Gomes et al. (2020) também verificaram comportamento similar com uma outra linhagem do mesmo fungo em sua fase inicial de crescimento em relação à produção de celulasas e proteínas solúveis, atingindo a máxima produção em 48 h, tendo os autores também correlacionado diretamente a biossíntese dos bioprodutos ao crescimento fúngico.

#### **5.6.2.2. Análise respirométrica**

Foi realizada a aquisição *online* da porcentagem volumétrica de CO<sub>2</sub> da corrente gasosa de saída do biorreator TAA. A Figura 5.12 apresenta em duplicata os perfis de concentração de CO<sub>2</sub> em função do tempo de cultivo e da taxa de aeração.

**Figura 5.12.** Perfis de concentração de CO<sub>2</sub> em função do tempo de cultivo em duplicata.

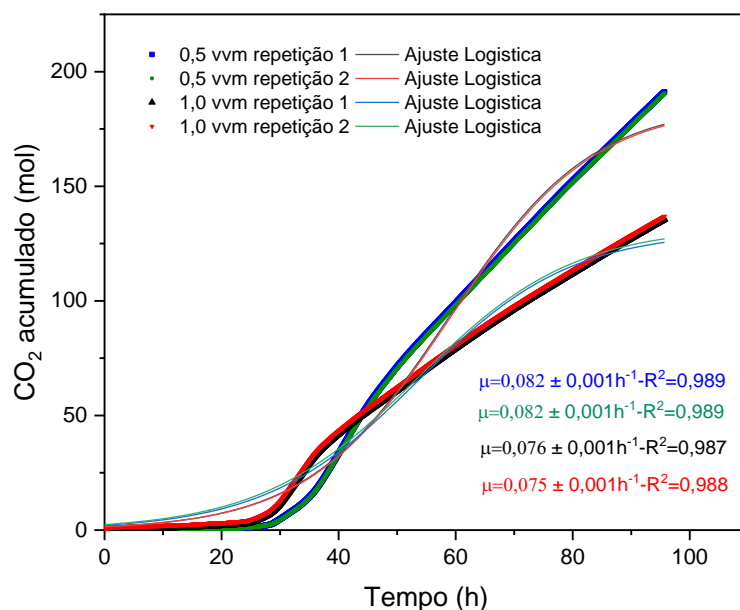


Observa-se que os perfis de concentração de CO<sub>2</sub> apresentaram comportamento similar ao observado nos ensaios no BLE, indicando que a mudança no sistema de cultivo não alterou de forma significativa o comportamento da cultura em relação às taxas de aeração. Sob taxa de aeração de 0,5 vvm, foram alcançados os maiores valores de concentração de CO<sub>2</sub>,  $0,41 \pm 0,01$  (%) em cerca de 42 h de cultivo, devido ao fato de o gás carbônico ter ficado mais diluído na corrente gasosa com taxa de aeração de 1 vvm, cujo valor máximo de  $0,18 \pm 0,01$  (%) foi atingido em 34 h de cultivo. Tais resultados concordam com o estudo de Henrique et al. (2020), no qual foi observado que a menor taxa de aeração proporcionou aumento na concentração de CO<sub>2</sub>, ao mesmo tempo em que se notou maior acúmulo de calor metabólico gerado em taxas de aeração menores que 360 L/h, visto que maiores vazões de aeração também contribuem para melhor arrefecimento do caldo de cultivo, por meio da remoção de calor evaporativo.

As inflexões observadas nos valores adquiridos podem estar relacionadas aos instantes nos quais foram realizadas retiradas de amostras para análise enzimática e de proteínas solúveis, o que pode ter perturbado parcialmente o equilíbrio gasoso no sistema. Cabe mencionar ainda que, nesta parte do estudo, não foi realizado monitoramento de temperatura no meio, em decorrência de questões operacionais. Além disso, no cultivo submerso agitado, é incomum a formação de gradientes de temperatura. Mesmo que haja, da mesma forma que na CES, a geração de calor metabólico, essa energia é facilmente dissipada e a homogeneidade térmica é restabelecida pela agitação do caldo.

A Figura 5.13 apresenta os ajustes em duplicata do modelo de regressão logística aos dados de CO<sub>2</sub> acumulado nos ensaios de cultivo submerso sob taxas de aeração de 1 e 0,5 vvm, respectivamente.

**Figura 5.13.** Ajuste do modelo de regressão logística aos dados de CO<sub>2</sub> acumulado em duplicata do biorreator TAA para as duas taxas de aeração.



Na Figura 5.13, é possível observar que o modelo utilizado se ajustou bem também aos dados experimentais do sistema de cultivo submerso, com valores altos de coeficientes de determinação ( $R^2$ ), próximos de 0,99, os quais se assemelham aos obtidos no BLE. Ademais, em relação ao perfil de CO<sub>2</sub> acumulado, observa-se uma maior quantidade produzida de CO<sub>2</sub> com uso da taxa de aeração de 1 vvm, o que reforça o fato observado no cultivo sólido de que a maior oferta de oxigênio e a melhor remoção de *off gases* favorece o metabolismo do fungo, estando diretamente relacionada a uma maior produção de biomassa celular e do bioproduto de interesse.

Na Tabela 5.12, estão apresentados os valores médios das velocidades específicas de produção de CO<sub>2</sub> ( $\mu$ ) para ambas as taxas de aeração. Observou-se uma diferença significativa entre os valores da constante específica de crescimento no sistema de cultivo submerso para as duas taxas de aeração, sendo que a aeração de 1,0 vvm proporcionou maior valor de constante específica de crescimento, o que corrobora com o fato de o cultivo a esta condição ter apresentado uma maior produção de CMCase ao longo do tempo de cultivo, com aumento acelerado da atividade nas primeiras 48 h. Além disso, esses resultados são próximos dos

valores de  $\mu$  anteriormente obtidos em BLE. Tais resultados concordam ainda com os obtidos por Rodrigues (2021), que estimou um valor de  $\mu$  igual a  $0,07 \text{ h}^{-1}$  para *M. thermophila* I-1D3b com taxa de aeração próxima a 1 vvm.

Gomes et al. (2020) avaliaram experimentalmente a cinética de crescimento de *Myceliophthora thermophila* M.7.7 por determinação da concentração de N-acetilglicosamina também em BC:FT 7:3 m/m e obtiveram um valor de  $\mu$  de  $0,120 \text{ h}^{-1}$ , mas essa discrepância pode estar associada à diferença entre os métodos indiretos de estimativa de biomassa. Enquanto a medida por  $\text{CO}_2$  leva em conta somente células viáveis, a medida de N-acetilglicosamina não diferencia células viáveis e não viáveis. Considerando as atividades reportadas naquele trabalho e no presente estudo, pode-se dizer que as condições de suplementação do caldo de cultivo e de aeração propostas neste trabalho tendem a favorecer uma maior produção de endoglucanase no cultivo submerso em tanque agitado aerado.

**Tabela 5.12.** Constantes específicas de produção de  $\text{CO}_2$  de acordo com as taxas de aeração.

Aeração (vvm)	Constantes específicas $\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )
1,0	$0,082 \pm 0,0001^A$
0,5	$0,076 \pm 0,0001^B$

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.7. Comparação dos rendimentos aparentes dos cultivos em biorreatores

Na Tabela 5.13, estão apresentados, de forma comparativa, os resultados obtidos para os rendimentos aparentes de atividade de endoglucanase a partir de lactose nos cultivos sólidos e submersos em biorreatores com a variação da taxa de aeração. Os cultivos sólidos foram os que proporcionaram a obtenção de maiores valores de fator de rendimento aparente ( $Y'_{P/S}$ ). O maior valor atingido no cultivo sólido ocorreu com a taxa de aeração de 1,0 vvm ( $0,799 \text{ U/mg}$ ) com o uso do biorreator de leito empacotado. Provavelmente esse maior valor observado foi devido à maior facilidade de crescimento do microrganismo utilizado neste meio, o que fica evidenciado devido a ter apresentado a maior atividade enzimática nos resultados anteriores tanto em escala de frascos quanto de biorreatores. Além disso, em termos desse parâmetro, o cultivo sólido mostrou-se menos sensível à taxa de aeração do que o submerso, dada a maior dificuldade de transferência de oxigênio para o caldo de cultivo.

**Tabela 5.13.** Resultados de rendimentos aparentes em cultivos sólido e submerso de *M. thermophila* em meio com lactose com taxas de aeração de 1,0 e 0,5 vvm em biorreatores.

	Cultivo Sólido		Cultivo Submerso	
	1,0 vvm	0,5 vvm	1,0 vvm	0,5 vvm
$Y'_{P/S}$ (U/mg)	0,799± 0,002 <sup>A</sup>	0,678± 0,001 <sup>B</sup>	0,658± 0,002 <sup>C</sup>	0,277± 0,002 <sup>D</sup>

\* Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Como a concentração de inicial de lactose em ambos os meios foi igual, foi possível definir a influência direta da taxa de aeração na produtividade do sistema. Nos cultivos em meio sólido e submerso, foi verificado que a taxa de aeração de 1 vvm proporcionou uma melhoria nos valores do rendimento enzimático aparente pela maior transferência de oxigênio ao meio, o que promoveu também uma melhor remoção do dióxido de carbono gerado ao longo dos cultivos. Os valores de atividade enzimática utilizados foram definidos no pico de produção enzimática, o que ocorreu com um tempo de cultivo de 96 horas e 48 horas para os cultivos sólidos e submersos, respectivamente.

Estes resultados estão de acordo com os trabalhos descritos por Meneghel (2013) e Reginatto (2016), que mostraram que os valores dos rendimentos aparentes para cultivos de *Aspergillus* foram superiores em ensaios nos quais as maiores atividades enzimáticas foram observadas, e que a mistura e as transferências de calor e de massa foram mais eficientes com os maiores valores de aeração, tendo reportado um aumento de 0,67 U/mg para os ensaios sem agitação para 0,83 U/mg com uso de agitação em biorreatores, valores esses próximos aos encontrados no presente trabalho com uso da taxa de aeração de 1,0 vvm para os dois modos de cultivo.

Meneghel et al. (2015) também verificaram que o crescimento de *A. oryzae* IPT-301 em cultivo submerso foi favorecido pela presença de um indutor ao meio de cultivo e que o maior consumo da fonte de carbono indutora levou a uma redução do fator de conversão  $Y'_{P/S}$ , porém a alta concentração de biomassa obtida proporcionou maiores valores de fatores de conversão. Logo, é possível observar que a lactose no meio submerso foi mais facilmente metabolizada pelos microrganismos, o que levou ao pico de produção enzimática no tempo de 48 horas, embora menores valores do fator de conversão tenham sido obtidos quando comparado ao bioprocessamento em estado sólido.

Dessa forma é possível definir sobre as condições utilizadas no presente estudo que o cultivo sólido com uso da taxa de aeração de 1,0 vvm incorporado da lactose com agente indutor na concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> apresentou as melhores condições de crescimento do

microrganismo *M. thermophila*, o que resultou nas maiores atividades de endoglucanase nos ensaios em escala de frascos e com uso de biorreator, o que ficou evidenciado pelos maiores valores obtidos do rendimento aparente ( $Y'_{P/S}$ ) no cultivo em estado sólido com valores 18% maiores que os do cultivo submerso, com uso da maior taxa de aeração.



## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos em cultivos sólido e submerso do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, foi possível avaliar a influência das fontes monoméricas e diméricas de carbono testadas e suas diferentes concentrações sobre a secreção das enzimas celulolíticas, assim como a influência da variação da taxa de aeração nos cultivos em biorreatores aerados.

Os resultados sugerem que as concentrações de fontes de carbono afetam diretamente a produção de endoglucanase ao longo do tempo. O melhor indutor para a síntese de celulase foi a lactose na concentração  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , que apresentou efeito similar para as duas formas de cultivo estudadas em escala de frascos. Nesta condição, foram atingidas atividades endoglucanase de aproximadamente 210 e 120 U/gss em cultivos sólido e submerso, respectivamente, apresentando portanto resultados superiores em sistema de CES.

Quanto aos testes de variação da composição do meio de propagação do inóculo, é possível afirmar que não houve efeito significativo em relação ao inóculo obtido apenas a partir de Agar-Sabouraud-Dextrose (ASD) não suplementado, o que é interessante em termos de custos. Ao testar diferentes níveis superiores de concentração de lactose e proporção de bagaço de cana no meio de cultivo por meio de planejamento fatorial  $2^2$  com triplicata no ponto central, observou-se que os valores ótimos correspondiam aos que já vinham sendo praticados, ou seja, concentração de lactose de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  e proporção de 7:3 BC:FT.

Em relação ao suprimento de lactose proveniente de soro de leite *in natura*, foi possível verificar que o soro de leite com  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de lactose proporcionou o alcance de alta atividade de endoglucanase para ambas as formas de cultivos (sólido e submerso). Comparando-se os ensaios na concentração de  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , sólido ( $255,04 \text{ U.gss}^{-1}$ ) e submerso ( $138,04 \text{ U.gss}^{-1}$ ) com o controle realizado com lactose sintética sólido ( $244,74 \text{ U.gss}^{-1}$ ) e submerso ( $127,82 \text{ U.gss}^{-1}$ ), observa-se que não ocorreu uma diferença significativa para ambas as formas de cultivo, o que mostra a grande perspectiva da utilização do soro em substituição à lactose sintética para indução da produção de enzimas celulolíticas.

Com respeito ao aumento de escala, os dados demonstraram que o biorreator de leite empacotado não foi sujeito a um aumento de temperatura expressivo, indicando um bom controle térmico, tendo-se registrado uma elevação máxima de apenas  $2^\circ\text{C}$  em relação à temperatura ideal de cultivo. Quanto à vazão de aeração, a maior taxa melhorou o desempenho da produção enzimática e não causou desnaturação enzimática por atrito, atingindo-se  $203,60 \pm 35,50 \text{ U/gss}$  de atividade endoglucanase e  $11,70 \pm 1,95 \text{ U/gss}$  de FPase no CES.

Avaliando-se o perfil de  $\text{CO}_2$  desprendido, a produção do gás foi maior na mais alta taxa

de aeração, o que leva a crer que o crescimento fúngico foi favorecido pela maior oferta de oxigênio na taxa de aeração de 1 vvm, o que pode estar diretamente relacionado à maior produção de biomassa. O mesmo comportamento foi observado com a utilização de biorreator tipo tanque agitado aerado para cultivo submerso, com maior produção enzimática sob aeração de 1 vvm. Tais resultados corroboram que a aeração é outro fator de grande importância na otimização das condições de cultivo.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões para futuros trabalhos na área, propõe-se que sejam realizados alguns estudos posteriores, sendo eles:

- Cultivo em estado sólido em escala de frascos empregando embalagens biodegradáveis;
- Realizar o monitoramento da temperatura no cultivo submerso em biorreator tanque agitado aerado (TAA) com uso de termopares tipo T;
- Cultivo em estado sólido em biorreator de leite empacotado (BLE) com percolação de uma corrente gasosa enriquecida em dióxido de carbono, para avaliar o efeito desse gás sobre o metabolismo do fungo e a produção de enzimas;
- Avaliar o cultivo em BLE com uso de mais módulos fermentativos como forma de analisar o comportamento do sistema com o aumento de escala do biorreator;
- Testar diferentes modos de operação do BLE e diferentes formas de aeração do sistema;
- Testar diferentes modos de operação do TAA, como por exemplo realizando batelada alimentada e cultivo contínuo;
- Operar os sistemas de cultivos em estado sólido e submerso em biorreatores de leite empacotado (BLE) e tanque agitado aerado (TAA) com meio nutriente composto por soro de leite *in natura*, para confrontar com os dados obtidos em escala de frascos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-GHARBIA, M. A.; EL-SAWY, N. M.; NASR, A. M.; ZEDAN, L. A. Isolation, optimization and characterization of cellulases and hemicellulases from *Bacillus cereus* LAZ 518 isolated from cow dung using corn cobs as lignocellulosic waste. **Journal of Pharmaceutical and Applied Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2018.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanase por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, 2000.

ALAZI, E.; KNETSCH, T.; DI FALCO, M.; REID, I. D.; ARENTSHORST, M.; VISSER, J.; RAM, A. F. Inducer-independent production of pectinases in *Aspergillus niger* by overexpression of the *D-galacturonic* acid-responsive transcription factor *gaaR*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 6, p.2723-2736, 2018.

AMBROZIM, F. M. **Estudo das condições de fermentação em estado sólido para produção de celulasas utilizando biomassa de cacau**. 2019. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Agrárias e engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2019.

ANDRIĆ, P.; MEYER, A.S.; JENSEN, P.A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocelluloses hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnol Adv.** 28: p. 308–324, 2010.

ASSIS, T. R. **Obtenção de enzimas lignolíticas visando à hidrólise enzimática da fração lignocelulósica de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente**. 2015. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências com ênfase em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

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

BALDASSO, C.; SILVESTRE, W. P.; SILVEIRA, N.; VANIN, A. P.; CARDOZO, N. S. M.; TESSARO, I. C. Ultrafiltration and diafiltration modeling for improved whey protein purification. **Separation Science and Technology**, p.1-10, 2022.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, 2012.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International Journal Biological Macromolecule**.v. 86, p. 656–669. 2016.

BENOCCI, T.; AGUILAR-PONTES, M. V.; ZHOU, M.; SEIBOTH, B.; DE VRIES, R. P. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1-25, 2017.

BERNARDI, F. **Soro de leite-alternativas para o processamento do subproduto**. 2020. 23f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química)-Departamento das Engenharias e Ciências da Computação, Universidade Regional Integrada Do Alto Uruguai, Erechim, 2020.

BEZERRA, P. K. S.; SILVA, O. L.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; PADILHA, C. E. A.; SANTOS, E. S. Cellulolytic enzymes behavior in delignified green coconut residues and enzymatic hydrolysis with enzyme recovery. **Industrial Crops and Products**, v. 172, 2021.

BLOOMBER, Crise energética á parte, empresas copram quantidades recordes de energia limpa. Disponível em: < <https://www.bloomberg.com.br/blog/crise-energetica-a-parte-empresas-copram-quantidades-recordes-de-energia-limpa> >. Acesso em: 15 dez. 2022.

BORIN, G. P.; SANCHEZ, C. C.; DE SOUZA, A. P.; DE SANTANA, E. S.; DE SOUZA, A. T.; LEME, A. F. P.; OLIVEIRA, J. V. D. C. Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. **PLoS One**, v. 10, n. 6, 2015.

BOSSO, A.; TOMAL, A. A. B.; DA SILVA, J. B.; SUGUIMOTO, H. H. Soro de Queijo para Produção de  $\beta$ -Galactosidase. **UNICIÊNCIAS**, v. 23, n. 1, p. 31-37, 2019.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; DE, ORY I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. **Process Biochem**, v. 42, n. 1, p. 98–101, 2007.

BRADFORD, M. M. Um método rápido e sensível para a quantificação de quantidades de microgramas de proteína utilizando o princípio da ligação proteína-corante. **Bioquímica analítica**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v. 45, n.1, p. 120-128, 2010.

BUFFO, M. M.; ESPERANÇA, M. N.; BÉTTEGA, R.; FARINAS, C. S.; BADINO, A. C. Oxygen Transfer and Fragmentation of *Aspergillus niger* Pellets in Stirred Tank and Concentric-Duct Airlift Bioreactors. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 67-74, 2020.

CAMARGO, L. A.; PEREIRA, S. C.; CORREA, A. C.; FARINAS, C. S.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Feasibility of manufacturing cellulose nanocrystals from the solid residues of second-generation ethanol production from sugarcane bagasse. **BioEnergy Research**, v. 9, n. 3, p. 894-906, 2016.

CARDOSO, I.C.; PEREIRA, K.C.; SILVA, N.K.G.; BARBOSA, R.C.; CARDOSO, V.L.; FILHO, U.C. Fermentação do soro do leite por *Aspergillus niger* para produção enzimática. 4ª Semana do Servidor e 5ª Semana Acadêmica, **Universidade Federal de Uberlândia**, 2008.

CARVAJAL, O. H.; ERMÚDEZ, L. E. R. Coyuntura del coronavirus covid-19 en países medianos productores de petróleo; Qué hacer en el caso de Colombia?. **Boletim de Conjuntura (BOCA)**, v. 2, n. 5, p. 63-71, 2020.

CASCIATORI, F. P. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leito fixo.** 2015. 177f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI-FRASSATTO, P. A. Enzymes for the Biochemical Route of Second-Generation Ethanol: Production by Solid-State Cultivation as a Feasible and Sustainable Alternative. **Bioethanol and Beyond: Advances in Production Process and Future Directions**; Brienzo, M., Ed, p. 285-313, 2018.

CASCIATORI, P. A.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C.; PERRONE, O. M.; DA SILVA, R. O. B. E. R. T. O. Hidrólise enzimática de material particulado empregando coquetéis celulolíticos fúngicos. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 1903-1912, 2015.

CASCIATORI, F. P.; BÜCK, A.; THOMÉO, J. C.; TSOTSAS, E. Two-phase and twodimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 103-116. 2016

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; ZANELATO, A. I.; THOMÉO, J. C. Hygroscopic properties of solid agro-industrial by-products used in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 114-123, 2015.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; TABOGA, S. R.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid byproducts applicable for solid-state fermentation: experimental data and effects on process performance. **Chemical Engineering Journal**. v. 255, p. 214-224. 2014.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CHANDEL, A. K.; ALBARELLI, J. Q.; SANTOS, D. T.; CHUNDAWAT, S. P. S. Comparative analysis of key technologies for cellulosic ethanol production from Brazilian sugarcane bagasse at a commercial scale. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 13, n. 4, p. 994-1014, 2019.

CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W.; PAN, X.; BERLIN, A.; SADDLER, J. N.; Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?. **Biofuels**, v. 108, p. 67–93, 2007.

CHOUDHARI, V. G.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M. Application of high-throughput screening for evaluating hydrolytic potential of cellulases. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 9, n. 4, p. 659-667, 2019.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro: **Editora Epub**. 288 p. 2008.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Relatório final da safra 2021/2022. Disponível em:<<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>> Acesso em: 20 setembro 2022.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. Brasília. Safra 2020/21. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 15 dez. 2022.

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

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; FLORENCIO, C.; VASCONCELLOS, V. M. V. M.; FARINAS, C. S.; BADINO, A. C. Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method. **Biochemical Engineering Journal**, n. 97, p. 32-39, 2015.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 2012

DA SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. B. A. *Thermophilic* fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**. v. 118, p. 928-939. 2015

DELABONA, S. P.; PIROTA, R. D. B.; CODIMA, C. A.; TREMACOLDI, C. R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C. S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

DENTI, A. F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, v. 45, n. 171, p. 97-110, 2021.

DE OLIVEIRA, S. P.; ALVAREZ RODRIGUES, N.; CASCIATORI-FRASSATTO, P. A.; CASCIATORI, F. P. Solid-liquid extraction of cellulases from fungal solid-state cultivation in a packed bed bioreactor. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 9, p. 1530-1540, 2020.

DE VRIES, R. P.; NADAL, M.; VAN DEN BRINK, J.; VIVAS-DUARTE, D. A.; STÅLBRAND, H. Fungal degradation of plant oligo-and polysaccharides. **Carbohydrate-Modifying Biocatalysts**, p. 717-784, 2011.

DIAS, P.; PADILHA, I. D. M.; de ARAÚJO, D. A. M.; da SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. D. M. Avaliação de fontes de carbono indutoras da síntese de celulases por um *Bacillus sp.* **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 1026-1033, 2015.

DIAZ, A. B.; BLANDINO, A.; CARO, I. Value added products from fermentation of sugars derived from agro-food residues. **Trends in Food Science and Technology**, v. 71, p. 52-64, 2018.

DOMINGUES, F. C.; QUEIROZ, J. A.; CARBAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 10, p. 771-775, 2001.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of Soil Fungi. London: **Academic Press**, 1980.

DOS SANTOS, H. B.; BEZERRA, T. M. S.; PRADELLA, J. G.; DELABONA, P.; LIMA, D.; GOMES, E.; PRADE, R. *Myceliophthora thermophila* M77 utilizes hydrolytic and oxidative mechanisms to deconstruct biomass. **Amb Express**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

EDUARDO, M. P. **Desempenho e homogeneidade de cultivos em meio sólido de *Monascus sp.* em biorreator do tipo tambor com agitação interna: efeitos do padrão de agitação.** 2010. 144f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999-2042, 2015.

FAHEINA JUNIOR, G. S. **Produção de celulasas por fermentação submersa utilizando micro-organismos prospectados em coleções de culturas nacionais.** 2012. 76f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

FAHEIRA JÚNIOR, G. S. **Produção de celulasas por *Talaromyces almentokiae* CMIAT 055 com uso de materiais lignocelulósicos como indutores.** 2017. 127f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

FALLEIROS, L.; CABRAL, B.; RESENDE, M.; RIBEIRO, E. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de permeado de soro de leite com *Kluyveromyces marxianus*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n. 2, p. 994-1001, 2015.

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

FANG, X.; YANO, S.; INOUE, H.; SAWAYAMA, S. Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 106, n. 2, p. 115-120, 2008.

FARIA, D.; MACHADO, G.; EICHLER, P.; BONEBERG, B.; FERNANDA, R. A. Y. E.; VILARES, M.; SANTOS, F. Farinas, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

FARIA, D.; MACHADO, G.; EICHLER, P.; BONEBERG, B.; FERNANDA, R. A. Y. E.; VILARES, M.; SANTOS, F. Cenários e perspectivas das principais culturas do Rio Grande do Sul em processos de biorrefinaria. **Revista Eletrônica Científica Da UERGS**, v. 2, n. 3, p. 291-306, 2016.



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

FARINAS, C. S.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Enzymatic conversion of sugarcane lignocellulosic biomass as a platform for the production of ethanol, enzymes and nanocellulose. **Journal of Renewable Materials**, v. 6, n. 2, p. 203-216, 2018.

FAVARO, C. P.; BARALDI, I. J.; CASCIATORI, F. P.; FARINAS, C. S.  $\beta$ -Mannanase production using coffee industry waste for application in soluble coffee processing. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 227, 2020.

FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T.; ROCA, E.; LEMA, J. M. Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by *Bjerkandera* sp BOS55. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 86-90, 1999.

FERREIRA, G. N. **Avaliar métodos de extração da  $\beta$ -galactosidase produzida por *Kluyveromyces marxianus* a partir do permeado de soro de leite.** 2019. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia)-Coordenação do Curso Superior de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

FINKLER, A. T. J.; BIZ, A.; PITOL, L. O.; MEDINA, B. S.; LUTHARDT, H.; DE LIMA LUZ JR, L. F.; MITCHELL, D. A. Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 1–12, 2017.

FLORENCIO, C.; CUNHA, F. M.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S.; XIMENES, E.; LADISCH, M. R. Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential fermentation processes: enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. **Enzyme and microbial technology**, v. 90, p. 53-60, 2016.

FRASSATTO, P. A. C.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; SILVA, R. Produção de  $\beta$ -glucosidase por *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus* por cultivo em estado sólido e aplicação de coquetel enzimático para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p.1-11. 2020.

GARG, G.; SINGH, A.; KAUR, A.; SINGH, R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **Biotech**, v. 6, p. 47, 2016.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 85-101, 2003.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GHAZANFAR, M. I. S. B. A. H.; IRFAN, M.; NADEEM, M.; SHAKIR, H. A.; KHAN, M.; ALI, S.; MEHMOOD, T. Isolation of cellulolytic bacteria from soil and valorization of different lignocellulosic wastes for cellulase production by submerged fermentation. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 55, n. 7-8, p. 821-828, 2021.

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

GOMES, A. C. S.; CASCIATORI, F. P.; GOMES, E.; NUNES, C. C. C.; MORETTI, M. M. S.; THOMÉO, J. C. Growth kinetics of *Myceliophthora thermophila* M.7.7 in solid-state cultivation. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.

GÓMEZ-MENDOZA, D. P.; JUNQUEIRA, M.; DO VALE, L. H. F.; DOMONT, G. B.; FERREIRA FILHO, E. X.; SOUSA, M. V. D.; RICART, C. A. O. Secretomic survey of *Trichoderma harzianum* grown on plant biomass substrates. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 4, p. 1810-1822, 2014.

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

GUPTA, V. K.; KUBICEK, C. P.; BERRIN, J. G.; WILSON, D. W.; COUTURIER, M.; BERLIN, A. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. **Trends Biochem. Sci**, v. 41, n. 7, p. 633-645, 2016.

HEIN, K. D. **Suplementação de permeado de soro de leite para produção de etanol**. 2015. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Químicos). Coordenação de Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2015.

HENRIQUE, J. P.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Automatic system for monitoring gaseous concentration in a packed-bed solid-state cultivation bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 259, p. 117793, 2022.

HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; YANO, S.; FANG, X.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 48, v. 2, p. 162-168, 2011.

HO, H.L.; KU, X.N. Kinetic Study of Cell Growth and `Production of Amylase, Cellulase and Xylanase by *Bacillus subtilis* Using Barley Husk as the Prime Carbon Source. **Journal of Advances in Biology & Biotechnology, Hooghly- India**, v. 14, n. 2, p. 1-18, 2017.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

HONG, Y.; NIZAMI, A. S.; POUR BAFRANI, M.; SAVILLE, B. A.; MACLEAN, H. L. Impact of cellulase production on environmental and financial metrics for lignocellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.7, n. 3, p. 303-313, 2013.

HU, J.; 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**, v. 6, n. 5, p. 6233-6239, 2018.

IDRIS, A. S. O.; PANDEY, A.; RAO, S. S.; SUKUMARAN, R. K. Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 265-271, 2017.

IKASARI, L. **Physiological behaviour of *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentation**. 1997. 120f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Escola de Engenharia, The University of Queensland, Queensland, 1997.

IRAM, A.; CEKMECELIOGLU, D.; DEMIRCI, A. Distillers' dried grains with solubles (DDGS) and its potential as fermentation feedstock. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 14, p. 6115-6128, 2020.

IRFAN, M.; MUSHTAQ, Q.; TABSSUM, F.; SHAKIR, H. A.; QAZI, J. I. Carboxymethyl cellulase production optimization from newly isolated thermophilic *Bacillus subtilis* K-18 for saccharification using response surface methodology. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

IVANOVA, C.; BÅÅTH, J. A.; SEIBOTH, B.; KUBICEK, C. P. Systems Analysis of Lactose Metabolism in *Trichoderma reesei* identifies a lactose permease that is essential for cellulase induction. **Plos one**, v. 8, n. 5, p. 1–10, 2013.

JANAS, P.; ZDZISLAW, T.; MLEKO, S. New inducers for cellulases production by *Trichoderma reesei* M-7. *Electronic J. Polish Agric. Univ*, p. 1505-0297, 2002.

JOHNSON, E. A.; SAKAJOH, M.; HALLIWELL, G.; MADIA, A.; DEMAIN, A. L. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system from *Clostridium thermocellum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1125-1132, 1982.

JUTURU, V. e WU, J. C. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.33, p. 188–203, 2014.

KARNAOURI, A.; TOPAKAS, E.; ANTONOPOULOU, I.; CHRISTAKOPOULOS, P. Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 281, 2014.

KATAYAMA, E.; RODRIGUES, N. A.; BILATTO, S.; CASCIATORI, F. P.; FARINAS, C. S. Nanocellulose isolation using a thermostable endoglucanase-rich cocktail from *Myceliophthora thermophila* cultivated in a multilayer packed-bed bioreactor. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-16, 2022.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B. A.; BLANCH, H. W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1083– 1087, 2012.

KOLBUSZ M.A.; DI FALCO M.; ISHMAEL N.; MARQUETEAU S.; MOISAN M.C.; BAPTISTA C.D.S.; POWLOWSKI J.; TSANG A. Transcriptome and exoproteome analysis of utilization of plant-derived biomass by *Myceliophthora thermophila*. **Fungal Genet Biol** v.72, p. 10–20, 2014.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. D.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. D. Química da Madeira. 3a Ed. **Revisada**, Curitiba-Paraná, Universidade Federal do Paraná, 2005.

KOSIKOWSKI, F. V. Our industry today. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 7, p. 1149-1160, 1979.

KUBICEK, C. P.; HARMAN, G. E. **Trichoderma and Gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics**. Taylor & Francis Ltd, 1998.

KUMAR, D. M.; POOVAI, P. D.; KUMAR, C. P.; SAROJA, Y. S.; MANIMARAN, A.; KALAICHELVAN, P. T. Optimization of *Bacillus cereus* MRK1 cellulase production and its Biostoning activity. **Scholars Research Library**, v. 4, n. 3, p. 881-888, 2012.

KUMAR, L.; ARANTES, V.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. **Bioresource technology**, v. 103, n. 1, p. 201-208, 2012.

LEE, J. D. Química inorgânica não tão concisa. 5. ed. São Paulo: **Edgar Blücher**, 1999.

LEITE, P.; SOUSA, D. FERNANDES. H.; FERREIRA, M.; COSTA, A. R.; FILIPE, D.; GONÇALVES, M.; PERES, H.; BELO, I. SALGADO, J. M. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**. v. 27, 2021.

LIMA, J. Y. STAICHAK, G.; VIANA, A. G.; WEINERT, P. L. Substituição da técnica de Somogy-Nelson pela técnica de DNS para dosagem do teor de açúcar redutor (lactose). **Anais do Simpósio de graduação e Pós-Graduação em Química da UEPG**, v.1, 2017.

LIU, G.; ZHANG, J.; BAO, J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 1, p. 133-140, 2016.

LGE. Laboratório genômico e de bioenergia. Disponível em: <<https://www.lge.ibi.unicamp.br/pesquisas/biomassa/>>. Acesso em: 18 de Setembro de 2022.

LOPEZ-RAMIREZ, N.; VOLKE-SEPULVEDA, T.; GAIME-PERRAUD, I.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 291-298, 2018.

LUGANI, Y.; SINGLA, R.; SOOCH, B. S. Optimization of cellulase production from newly isolated *Bacillus* sp. Y3. **Journal of Bioprocessing and Biotechnology**, v.5, n. 264, 2015.

MALLAGUTTI, V. H. **Produção de celulases por fungos filamentosos da Antártica: busca por novo recurso genético para obtenção de bioetanol**. 2015. 43f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2015.

MANDELS, M.; STERNBERG, D. Recent advances in cellulase technology. **Journal of Fermentation Technology**, 54, n. 4, p. 267-286, 1976.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriology**, v. 79, n. 6, p. 816-826, 1960.

MARCO, É. G.; HECK, K.; MARTOS, E. T.; VAN DER SAND, S. T. Purification and characterization of a thermostable alkaline cellulase produced by *Bacillus licheniformis* 380 isolated from compost. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 2359-2370, 2017.

MARRA, I. F.; GEBERT, G. C.; LANGARO, C.; FIORESE, M. L.; HASAN, S. D. M. Efeito do pH, umidade e indutores sobre a produção de celulases por *Trichoderma sp.* em fermentação em estado sólido de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 2, 2015.

MASUI, D. C.; ZIMBARDI, A. L. R. L.; SOUZA, F. H. M.; GUIMARÃES, L. H. S.; FURRIEL, R. P. M.; JORGE, J. A. Production of a xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase and a cellulase-free thermostable xylanase by the thermophilic fungus *Hemicola brevis* var. thermoidea under solid state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 2689-2701, 2012.

MENEGHEL, L. **Avaliação da produção de pectinases por *Aspergillus oryzae* IPT 301 em processo submerso**. 2013. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013.

MENEGHEL, L.; REIS, G.P.; REGINATTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M. Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. **Process Biochem.** v. 49, n.11, p. 1800-1807, 2015.

MENEZES, T.J.B.; LAMO, P.R. de; ARAKAKI, T. Produção do complexo celulolítico C1, Cx por microrganismos. **Coletânea do ITAL**. v.7, p.91-96, 1976.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Solid-State Fermentation Bioreactors - Fundamentals of Design and Operation. 1ª ed. Germany: **Springer**. 2006.

MÉLO, B.C.A. de. **Produção de celulases por fermentação em estado sólido em resíduo de acerola (*Malpighia sp.*) utilizando *Trichoderma reesei***. 2016. 116f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2016.

MENEZES, T.J.B.; LAMO, P.R. de; ARAKAKI, T. Produção do complexo celulolítico C1, Cx por microrganismos. **Coletânea do ITAL**, v.7, p.91-96, 1976.

MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; GARCIA, J. L. F.; REIS, B. L. S. F. S. D. O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. **BNDES Setorial**, n. 35, p. 277-302, 2012.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORAIS, M. C.; FERRARI, B. M.; BORGES, C. D.; CHERUBIN, M. R.; TSAI, S. M.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Does sugarcane straw removal change the abundance of soil microbes? **BioEnergy Research**, v. 12, n. 4, p. 901-908, 2019.

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

MORETTI, M. M. de S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulasas, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis**. 2010. 112f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

MOSSMANN, J.; SARA VIGANÓ, G.; BARBOSA BRIÃO, V. Obtenção e purificação de concentrado proteico de soro por ultrafiltração e diafiltração. **Revista CIATEC-UPF**, v. 12, n. 1, 2020.

MUNHOZ, D. A. C.; SANTOS, A. C. G.; THOMÉO, J.C.; Influência de diferentes fontes de carbono no crescimento e na síntese de celulasas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7". **Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 4, p. 2446-8711, 2017.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bioethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.

NAIR, R. B.; LUNDIN, M.; BRANDBERG, T.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Dilute phosphoric acid pretreatment of wheat bran for enzymatic hydrolysis and subsequent ethanol production by edible fungi *Neurospora intermedia*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 314-323, 2015.

NOVY, V.; SCHMID, M.; EIBINGER, M.; PETRASEK, Z; NIDETZKY, B. The micromorphology of *Trichoderma reesei* analyzed in cultivations on lactose and solid lignocellulosic substrate, and its relationship with cellulase production. **Biotechnol Biofuels**. v. 9, p. 169, 2016.

OLIVEIRA, A. C. D.; WATANABE, F. M. F.; VARGAS, J. V. C.; MARIANO, A. B.; RODRIGUES, M. L. F. Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, 2012.

OLIVEIRA, S. P.; RODRIGUES, N. A.; CASCIATORI-FRASSATTO, P. A.; CASCIATORI, F. P. Solid-liquid extraction of cellulases from fungal solid-state cultivation in a packed bed bioreactor. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 9, p. 1530-1540 2020.

PADILHA, I.Q.M.; CARVALHO, L. C. T.; DIAS, P. V. S.; GRISI, T. C. S. L.; HONORATO DA SILVA, F. L.; SANTOS, S. F. M. Production and Characterization of Thermophilic Carboxymethylcellulase Synthesized by *Bacillus* sp. Growing on Sugarcane Bagasse in Submerged Fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 01, p. 35-42, 2015.

PALMA, M.B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

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

PANDEY, A. K.; NEGI, S. Enhanced cellulase recovery in SSF from *Rhizopus oryzae* SN5 and immobilization for multi - batch saccharification of carboxymethylcellulose. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, 2020.

PARIS, L.D; **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólidos das sojas orgânica, transgênicas e convencional**. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

PENTTILÄ, M.; LIMÓN, C.; NEVALAINEN, H. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications. **Mycology, Handbook of Fungal Biotechnology**, v. 20, 2004.

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

PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Improving enzyme production by solidstate cultivation in packed-bed bioreactors by changing bed porosity and airflow distribution. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1-12. 2020.

PINTO, A. S. S. **Mitigação dos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa vegetal: impacto técnico-econômico-ambiental de diferentes rotas de processo na biorrefinaria**. 2021. 276f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2021.

PINTO, T. O. P. **Produção de Enzimas Celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e Aplicação na sacarificação do bagaço de cana de açúcar com diferentes pré-tratamentos**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; FONSECA, R. F.; PAIXÃO, D. A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; FARINAS, C. S. Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 21-31, 2016.

PITOL, L. O.; BIZ, A.; MALLMANN, E.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor, **Chemical Engineering Journal**, v. 283 p. 1009–1018, 2016.

POLETTO, P.; POLIDORO, T. A.; ZENI, M.; DA SILVEIRA, M. M. Evaluation of the operating conditions for the solid-state production of pectinases by *Aspergillus niger* in a bench-scale, intermittently agitated rotating drum bioreactor. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 92-101, 2017.

PORTO; CAMPOS-TAKAKI; LIMA, F. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour medium. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.60, p.115-122, 1996.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J.; PATANITA, M.; DÔRES, J. Growth and development of tomato plants *Lycopersicon Esculentum Mill.* under different saline conditions by fertirrigation with pretreated cheese whey wastewater. **Water science and technology**, v. 67, n. 9, p. 2033-2041, 2013.

QUEIROZ, C.; DE SOUSA, A. C. B. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51849-51860, 2020.

RACHOW, L. M. **Produção de  $\beta$ -galactosidase a partir do permeado de soro de leite utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36097**. 2019. 84f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia)- Coordenação do Curso Superior de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2019.

RAGHAVARAO, K.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 127–35, 2003.

REGINATTO, C. **Produção e caracterização parcial de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em processo submerso**. 2016. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2016.

REINEHR, C. O.; RIZZARDI, J.; SILVA, M. F.; OLIVEIRA, D. D.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. **Química Nova**, n. 37, p. 454-460, 2014.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 174, 2018.



ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em estado sólido**. 2010. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

RODRIGUES, N. A. **Avaliação experimental de diferentes modos de operação de um biorreator de leito empacotado multicamadas para produção de celulases por cultivo em estado sólido**. 2021. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2021.

RODRIGUES, N. A.; KATAYAMA, E.; CASCIATORI, F. P. Alternative strategies to perform solid-state cultivation in a multilayer packed-bed bioreactor: continuous and cyclic operations. **Chemical Engineering Journal**, v. 448, p. 137726, 2022.

ROELFSEMA, W. A.; KUSTER, B. F. M.; HESLINGA, M. C.; PLUIM, H.; VERHAGE, M. Lactose and derivatives. **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**, 2010.

ROMERO, F.J.; GARCIA, L.A.; SALAS, J.A.; DÍAZ, M.; QUIRÓS, L.M. Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 507-515, 2001.

SADHU, S, GHOSH, P. K.; DE, T. K.; MAITI, T. K. Optimization of cultural condition and synergistic effect of lactose with carboxymethyl cellulose on cellulase production by *Bacillus* sp. isolated from fecal matter of elephant (*Elephas maximus*). **Advances in Microbiology**, v. 03, p. 280–288, 2013.

SALVADOR, D. G. **Sorção e biodegradação do 17-alfa-etinilestradiol e do diclofenaco: estudo da influência da vazão de aeração aplicado ao processo de biorreator com membranas**. 2021. 165f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.

SALES, R. M.; MOURA, R. B.; SILVA, M. F.; MACEDO, G. R.; LÚCIA, F. P. A. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* species. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 4, p. 917-924, 2011.

SALOMÃO, G. S. B.; AGNEZI, J. C.; PAULINO, L. B.; HENCKER, L. B.; DE LIRA, T. S.; TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1-6, 2019.

SAMAL, K.; DASH, R. R.; BHUNIA, P. Tratamento de efluentes por vermifiltração integrada com filtro macrófito: uma revisão. **Jornal de engenharia química ambiental**, v. 5, n. 3, p. 2274-2289, 2017.

SANTOS, E. F. S. D.; SCHAUTZ, L. C. A.; CARDOSO, C. A. L.; ERNANDES, J. R.; BATISTOTE, M. O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. **Ciência e Natura**, p. 9-14, 2013.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H. D.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, J. D. F.; FARIAS, G. C., SANTOS, C. S. R.; E, K. G. S. Parcerias entre Brasil e Estados Unidos na promoção dos biocombustíveis para o desenvolvimento sustentável. **Espacios Públicos**, v. 20, n. 49, p. 43-62, 2022.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 132f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SATHYA, R.; PRADEEP, B.V.; ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agroindustrial wastes. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** v. 14, n. 6, p. 788–794, 2009.

SCHOLL, A. L.; MENEGOL, D.; PITARELO, A. P.; FONTANA, R. C.; ZANDONÁ FILHO, A.; RAMOS, L. P.; CAMASSOLA, M. Elephant grass (*Pennisetum purpureum Schum.*) pretreated via steam explosion as a carbon source for cellulases and xylanases in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 280-291, 2015.

SEN, S.; ABRAHAM, T. K.; CHAKRABARTY, S. L. Induction of cellulase in *Myceliophthora thermophila* D-14. **Can. J. Microbiol.** v. 29, p.1258-1260, 1983.

SHAJAHAN, S.; MOORTHY, I. G.; SIVAKUMAR, N.; SELVAKUMAR, G. Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. **Journal of King Saud University-Science**, v. 29, n. 3, p. 302-310, 2017.

SILVA, F. L. **Produção de enzimas lignocelulolíticas e de bioethanol a partir de resíduos de palha de carnaúba (*Copernicia prunifera*) pré-tratados**. 2017. 157f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal/RN, 2017.

SILVA FILHO, R. C. **Produção de quitosanase por *Aspergillus ochraceus* em cultivo descontínuo submerso**. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Pós Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

SILVEIRA, V. E. M. **Reflexo da pandemia de Covid-19 no mercado de petróleo**. 2022. 28f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Petróleo)- Instituto do Mar, Universidade Federal de São Paulo, Santos, 2022.

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

SINGH, B. *Myceliophthora thermophila* syn. *Sporotrichum thermophile*: a thermophilic mould of biotechnological potential. *Critical reviews in biotechnology*, v. 36, n. 1, p. 59-69, 2016.

SINGH, P.; KIM, Y. J.; ZHANG, D.; YANG, D. C. Síntese biológica de nanopartículas de plantas e microrganismos. **Tendências em biotecnologia**, v. 34, n. 7, p. 588-599, 2016.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 174, 2016.

SINGH, K.; RICHA, K.; BOSE, H.; KARTHIK, L.; KUMAR, G.; BHASKARA RAO, K. V. Statistical media optimization and cellulase production from marine *Bacillus* VITRKHB. **3 Biotech**, v. 4, n. 6, p. 591-598, 2014.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 1-11, 1996.

SMITS, J. P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; VAN SONSBEK, H.M.; KNOL, W. Solidstate fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 46, p. 489-498, 1996.

SOARES, G. A. A corrida com obstáculos do mercado de etanol no Brasil. In: Decarbonization, Efficiency and Affordability: New Energy Markets in Latin America, 7th ELAEE/IAEE Latin American Conference, **International Association for Energy Economics**, 2019.

SOCCOL, C. R. Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L (+) lactique. **Tese de Doutorado**. Compiègne. 1992.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA B. S.; SAINI, H. S. Novel sources of fungal cellulases for efficient deinking of composite paper wast. **Bioresources**, v. 3, n. 1, p. 234-246, 2008.

SREEJA, S. J.; JEBA, M. P. W.; SHARMILA, J. F. R.; STEFFI, T.; IMMANUEL, G.; PALAVESAM, A. Optimization of cellulase production by *Bacillus altitudinis* APS MSU and *Bacillus licheniformis* APS2 MSU, gut isolates of fish *Etroplus suratensis*. **Int. J. Adv. Res. Technol**, v. 2, n. 4, p. 401-406, 2013.

STRICKLAND, T. C.; SOLLINS, P. Improved method for separating light-and heavy-fraction organic material from soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 51, n. 5, p. 1390-1393, 1987.

SUTO, M.; TOMITA, F. Induction and Catabolite Repression Mechanisms of Cellulase in Fungi. **Journal of bioscience and bioengineering**, Vol. 92, No. 4, 305- 311, 2001.

TARI, C.; GENCKAL, H.; TOKATLI, F. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 659-665, 2006.

TAKIMURA, O.; YANAGIDA, T.; FUJIMOTO, S.; MINOWA, T. Estimation of bioethanol production cost from rice straw by on-site enzyme production. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, v. 56, n. 3, p. 150-155, 2013.

TÉBÉKA, I. R. M.; SILVA, A. G. L.; PETRI, D. F. S. Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase. *Langmuir*, v. 25, p. 1582, 2009.

TEIXEIRA, L. M. C. **Estudo de endoglucanase termoestável excretada de *Streptomyces capoamus***. 2018. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

TEIXEIRA, T. S.; SIQUEIRA, F. G. D.; BATISTA, R. D. Enzimas microbianas de desconstrução da parede celular: novas abordagens. *Revista Eletrônica de Energia*, v. 6, n. 1, p. 27-37, 2016.

THAKUR, M. S.; KARANTH, N. G.; NAND, K. Downstream processing of microbial rennet from solid state fermented moldy bran. *Biotechnology advances*, v. 11, n. 3, p. 399-407, 1993.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 81, p. 146-161, 2013.

THOMAS, L.; RAM, H.; SINGH, V. P. Inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus sp.* SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 429-442, 2018.

UMSZA, M. A.; GUEZ, U. Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo, 2009.

UNCTAD. Second Generation Biofuel Markets: State of Play, Trade and Developing Country Perspectives. DEVELOPMENT, U.N.C.O.T.A. **Switzerland: United Nations Publication**: p. 69, 2016.

VANDENBERGHE, L. P.; PANDEY, A.; CARVALHO, J. C.; LETTI, L. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; KARP, S. G.; MARTÍNEZ-BURGOS, W. J.; PENHA, R. O.; HERRMANN, L. W.; RODRIGUES, A. O.; SOCCOL, C. R. Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, p. 1-24. 2020.

VICINI, G.; MITCHELL, D. A.; BOIT, S. D.; GERN, J. C.; ROSA, A. S. da; COSTA, R. M.; DALSENTER, F. D. H.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 39, p. 271-294, 2001.

YAN, K.; JARVIS, C.; GU, J.; YAN, Y. Production and catalytic transformation of levulinic acid: A platform for speciality chemicals and fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 51, p. 986-997, 2015.

ZANELATO, A. I. **Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo**. 2011. 116f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; SILVA, R.; THOMÉO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3B in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 43, p. 1536-1544. 2012.

ZHANG, C.; LI, N.; RAO, L.; LI, J.; LIU, Q.; TIAN, C. Development of an Efficient C-to-T Base-Editing System and Its Application to Cellulase Transcription Factor Precise Engineering in Thermophilic Fungus *Myceliophthora thermophila*. **Microbiology Spectrum**, e02321-21, 2022.

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, 2019.