



EFEITO DA TAXA DE AERAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FUNGO TERMOFÍLICO CULTIVADO EM ESTADO SÓLIDO EM LEITO EMPACOTADO

NILTON S. C. MAFRA^{1*}, FERNANDA P. CASCIATORI¹

¹Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
*e-mail: nilton.mafra@estudante.ufscar.br

RESUMO – A fermentação em estado sólido (FES) tem sido bastante aplicada para a produção de celulases fúngicas nos últimos anos, com vistas a viabilizar a produção de etanol de segunda geração (E2G). No entanto, algumas limitações ainda precisam ser superadas para tornar economicamente viável a produção dessas enzimas por FES. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da variação da taxa de aeração sobre o perfil de temperatura e a produção de dióxido de carbono (CO₂) e como esses fatores interferem na produção enzimática em um biorreator de leito empacotado (BLE). Para tanto, foram realizados experimentos utilizando o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b cultivado em bagaço de cana e farelo de trigo na proporção de 7:3 m/m, com umidade de 75 % e temperatura de 45°C, sob vazões de 1 e 0,5 vvm. As análises mostraram que os perfis de temperatura e que a produção de CO₂ 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 CO₂ acumulado, o que acabou por promover maior produção enzimática. Assim, a operação com 1 vvm mostrou-se aplicável e vantajosa, para produção de enzimas.

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 1ª geração (obtido a partir da fermentação de caldos de cana-de-açúcar e de sorgo sacarino) e bioetanol de 2ª geração ou BE2G (obtido a partir de subprodutos agroindustriais e biomassa lignocelulósica em geral (Junqueira *et al.* 2017). No Brasil, uma matéria-prima abundante para conversão a BE2G é o bagaço de cana-de-açúcar (BC), um subproduto da rota de

produção de do etanol (BE1G) (Rodrigues *et al.* 2022).

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).

No cenário atual, o BE2G emerge como uma das principais alternativas para utilização da biomassa vegetal existente, 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 lignino-celulósica, tornando as fibras de celulose e hemicelulose mais disponíveis para a hidrólise (Casciatori; Casciatori-Frassatto, 2018).

Apesar das vantagens apresentadas pela rota enzimática, o alto custo das enzimas é um entrave para sua implementação em escala industrial, podendo corresponder a 40% do custo total de produção de BE2G (Salomão et al., 2019).

Assim, focando na síntese bioquímica de BE2G, a produção de enzimas úteis a essa cadeia na própria planta (*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 de fermentação empregados para a produção de enzimas, a fermentação em estado sólido (FES) apresenta diversas vantagens sobre a fermentação submersa (FSm), especialmente para o cultivo fúngico (Thomas et al. 2013).

No entanto, apesar de seu excelente potencial de aplicação, a FES ainda não se consolidou como uma alternativa industrial de sucesso, principalmente devido à falta de equipamentos industriais disponíveis e otimizados. De forma que o desenvolvimento de biorreatores vem sendo bastante investigado nos últimos anos, envolvendo ensaios em escala de bancada e piloto. Biorreatores de leitos fixos são os mais comumente aplicados na FES devido ao seu projeto simples, custo reduzido e baixas exigências de manutenção (Rodrigues et al. 2022).

Considerando o aumento de escala de bioprocessos de FES, é necessário um biorreator apropriado. Nesse contexto, vale lembrar os leitos empacotados. Vários estudos vêm sendo conduzidos para produção de biocompostos microbianos nestes biorreatores, com destaque à produção de variadas enzimas (Casciadori; Thoméo, 2015). Um dos principais problemas na operação desta classe de biorreatores é a remoção deficiente do calor metabólico gerado, em decorrência de fatores associados ao substrato, ao microrganismo e à operação do sistema (Zanelato et al. 2012)

Os microrganismos que mais se adaptam a esse biorreator 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 estado sólido, bem como em fermentações submersas, como enzimas lignocelulolíticas, incluindo endoglucanase (Singh, 2016).

Nesse contexto, a definição das melhores condições de fermentação é muito importante e, em particular, a compreensão do efeito da aeração nas produções microbianas. A aeração está diretamente relacionada à disponibilidade e à transferência de oxigênio ao meio de cultivo (Ambrozim, 2019). Devido a isso, o uso da aeração forçada em FES melhora a respiração microbiana e promove maior crescimento celular, além de remover dióxido de carbono e controlar a temperatura e, assim, pode proporcionar maior rendimento enzimático (Farinas et al. 2018; Pirota et al. 2016).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da variação da taxa de aeração sobre o perfil de temperatura e a produção de dióxido de carbono (CO₂) e como esses fatores interferem na produção enzimática em um biorreator leito empacotado (BLE) em estado sólido utilizando como microrganismo o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo e substrato

Utilizou-se como microrganismo o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, já empregado por Oliveira et al. (2020) e Rodrigues (2021). 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). Esses frascos foram armazenados em câmara BOD 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 utilização de uma ponteira para auxiliar na suspensão dos esporos. Posteriormente, foi realizada a padronização em uma concentração

de 10^7 esporos/g de sólido seco a partir da contagem de esporos em câmara de Neubauer.

Uma solução nutriente foi preparada por meio da mistura de sais nas seguintes composições (m/v): 0,35 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 % de KH_2PO_4 , 0,05 % de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % de CaCl_2 e 0,1 % de Tween 20 (Zanelato et al., 2012). O pH do meio foi ajustado para 5,0 com uso de solução de NaOH e HCl.

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. O farelo de trigo foi adquirido no comércio local de São Carlos-SP. Ambos os materiais foram acondicionados em sacos de polietileno de parede espessa e mantidos em câmara de refrigeração até sua utilização.

Biorreator de Leito Empacotado (BLE)

Os ensaios fermentativos foram realizados em um biorreator cilíndrico de leito empacotado encamisado construído de forma modular em aço inox, mesmo equipamento empregado por Rodrigues (2021). O ar foi fornecido por um compressor e filtrado para separação de impurezas de alta granulometria, passou por válvula de agulha e medidor de vazão. Finalmente, o ar foi umidificado em coluna encamisada preenchida com esferas de vidro e água. O biorreator foi orientado verticalmente e operado em batelada com um módulo fermentativo, conforme pode ser visto na Figura 1.

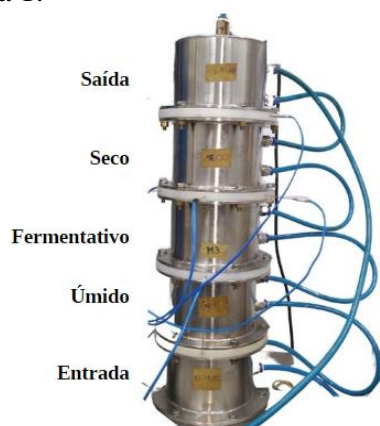


Figura 1: Bioreator de leito empacotado (BLE).

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. 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 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.

A proporção de substrato utilizado no módulo fermentativo foi de 7:3 BC:FT (m/m) de acordo com Zanelato *et al.* (2012), sendo possível acomodar 130 g (massa seca) por módulo. A inoculação deste com a suspensão de esporos foi feita em um saco plástico, seguida de mistura manual, após o que o material foi empacotado no módulo fermentativo segundo a técnica de empacotamento simples descrita por Casciatori *et al.* (2014). A umidificação deste meio foi feita com a mesma solução salina utilizada por Rodrigues (2021), acrescida de lactose, fonte de carbono facilmente metabolizável, na concentração (m/v) de 15 %, que tem potencial de indução da produção de celulasas, com base em estudos de Gomes *et al.* (2020), até a umidade de 75% (base úmida). De acordo com a literatura, a temperatura ideal de produção de celulasas pelo fungo *M. thermophila* é 45°C , com tempo de cultivo de 96 h. Durante o cultivo, foram realizados testes com aeração de 0,5 e 1,0 vvm no módulo reacional.

Ao final do tempo de cultivo, 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.

Monitoramento da temperatura

Para a análise do perfil de temperaturas 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, 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).

Análise respirométrica

A análise respirométrica foi realizada através da medição da concentração de CO₂ 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, 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 CO₂ produzido (Ci) foi calculada por meio da Equação 1, a partir da área sob a curva de concentração de CO₂ versus tempo de cultivo (Favaro *et al.* 2020).

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

À curva de CO₂ acumulado em função do tempo de cultivo, foi ajustado o modelo de crescimento logístico (Viccini *et al.*, 2001). A despeito 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 (Casciotori, 2014), tendo sua forma integrada representada pela Equação 2.

$$X = \frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m}{X_0} - 1\right)e^{-\mu t}} \quad (2)$$

A condição inicial utilizada foi em $t = 0$, $X = X_0$.

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 R² (coeficiente de determinação) dos ajustes realizados.

Atividade enzimática

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi determinada de acordo com o método de Ghose (1987) adaptado, no qual 0,1 mL de amostra e 0,9 mL de solução 4 % (m/v) de carboximetilcelulose em tampão acetato a 0,1 M em pH 5,0 reagem por 10 minutos a 60°C. A quantificação de açúcares redutores liberados foi determinada segundo Miller (1959), com leitura de absorbância a 540 nm.

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 em banho termostático com agitação a 60°C, sendo paralisada por 1,0 mL de DNS.

Com os valores de absorbância aferidos nos testes, foram calculadas a atividade de endoglucanase e a atividade enzimática FPase.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol 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 seco (U/gss).

Análise dos Resultados

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 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados térmicos dos cultivos

A Figura 2 apresenta os perfis de temperatura dos cultivos em duplicata em relação às aerações estudadas no BLE.

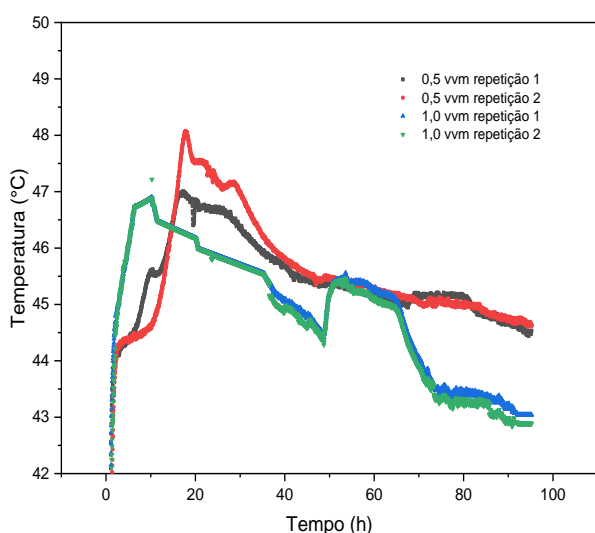


Figura 2 – Perfis temperatura em função do tempo de cultivo.

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. 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 ao calor metabólico gerado em função da disponibilidade de oxigênio. Esta observação também foi encontrada previamente por Zanelato *et al.* (2012).

Os ruídos observados no gráfico são típicos deste tipo de experimento, para o qual não se deve esperar precisão maior que 0,5°C (Herique *et al.* 2022). A Tabela 1 traz os valores das temperaturas máximas em que se avaliou o

efeito da aeração sobre o desempenho do bioprocesso, bem como as comparações estatísticas.

Tabela 1: Análise térmica ao longo do processo fermentativo.

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

numa mesma coluna indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as aerações, respectivamente.

Não foi observada diferença significativa entre as temperaturas máximas atingidas, conforme apresentado na Tabela 1. A máxima temperatura registrada foi em torno de 47,0 °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 relataram um aumento na temperatura de somente 2°C. Em ambos os trabalhos, a temperatura da camisa também foi mantida a 45°C.

Ademais, a variação de temperatura ao longo do tempo foi baixa, indicando boa homogeneidade térmica para esse tipo de reator, 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 um meio poroso com alta porosidade para seu cultivo.

Análise respirométrica

A Figura 4 apresenta os perfis de concentração de CO₂ em duplicata ao longo do tempo de cultivo. Observa-se que os perfis de concentração de CO₂ 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.

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 qual de respiração foi máxima.

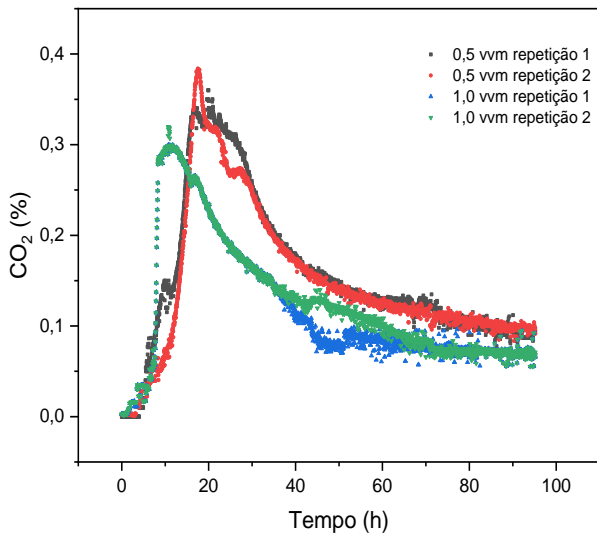


Figura 3 - Perfis de concentração de CO₂ em função do tempo de cultivo em duplicata.

A partir do gráfico da Figura 3, é possível observar que a maior concentração de CO₂ se deu na vazão de 0,5 vvm, com valor em torno de $0,3719 \pm 0,0168$ (%v/v), enquanto que na maior taxa de aeração o valor encontrado foi de $0,3097 \pm 0,0141$ (%v/v). De acordo com Casciadori (2015), esse pico de concentração de CO₂ se dá exatamente no momento de maior temperatura atingida no cultivo do fungo *Myceliophthora thermophila* IID3b, o que corrobora com os resultados do presente estudo. Ressalte-se que os ruídos observados nos valores adquiridos de CO₂ no final da curva, referentes aos instantes onde 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 CO₂ é não necessitar de amostragem do meio de cultivo, pré-tratamentos e análises químicas do fermentado, podendo ser realizadas medidas online (Casciadori, 2015). A partir dos dados de CO₂, também é possível determinar as velocidades da reação através do ajuste de um modelo de cinética aos dados de CO₂ acumulado ao longo do tempo. Dentre os modelos, a equação da logística representa melhor o crescimento fúngico em FES (Viccini *et al.* 2001).

A Figura 4 apresenta a representação gráfica do modelo de regressão logística ajustado aos pontos experimentais dos ensaios

com taxa de aeração de 1 e 0,5 vvm, respectivamente.

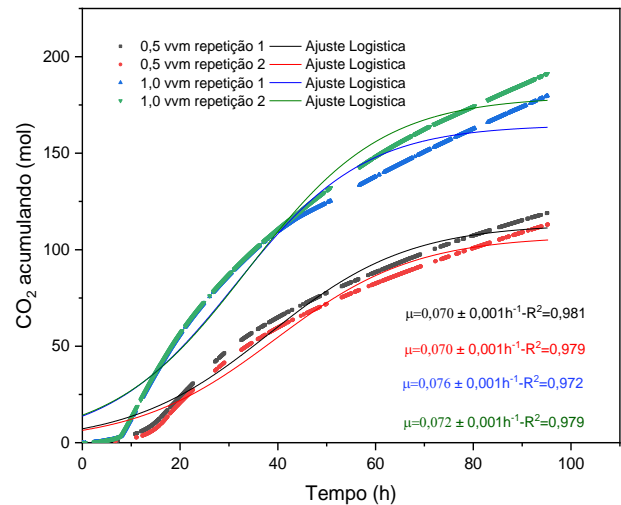


Figura 4 – Ajuste do modelo de regressão logística aos dados de CO₂ acumulado em duplicata.

Por meio da Figura 4, 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 CO₂ 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 CO₂ acumulado, pode-se perceber uma maior quantidade produzida de CO₂ 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.

A produção total acumulada de CO₂ em 96 horas foi de 246,61 kg CO₂ para 1vvm e de 207,14 kg CO₂ para 0,5 vvm. Na Tabela 2, estão apresentados os valores médios das velocidades de produção de CO₂ para ambos os casos em estudo.

Observa-se que não houve diferença estatística entre os valores da constante específica de crescimento (μ) para as duas taxas de aeração. Resultados semelhantes foram obtidos por Casciadori (2015), que estimou um

valor de μ igual a $0,06 \text{ h}^{-1}$ para *M. thermophila* I-1D3b em taxas de aeração menores sob as mesmas condições aqui empregadas.

Tabela 2: Constantes específicas de produção de CO_2 de acordo com as taxas de aeração.

Aeração (vvm)	Constantes específicas μ (h^{-1})
1,0	$0,074 \pm 0,003^A$
0,5	$0,070 \pm 0,001^A$

* Letras maiúsculas diferentes e letras maiúsculas iguais numa mesma coluna indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as aerações, respectivamente.

Henrique *et al.* (2022) avaliaram experimentalmente o crescimento de *Myceliophthora thermophila* M.7.7 também em BC:FT 7:3 e obtiveram valores de μ na faixa de $0,07 \text{ h}^{-1}$. Os resultados encontrados mostram que as condições propostas de aeração tendem a favorecer o desenvolvimento do microrganismo.

Atividade 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 3.

Tabela 3: Atividade de endoglucanase e PFase, em U/gss, em relação a taxa de aeração.

Aeração (vvm)	Endoglucanase (CMCase) (U/gss)	PFase (U/gss)
1,0	$203,60 \pm 35,50^A$	$11,70 \pm 1,95^A$
0,5	$129,24 \pm 19,79^B$	$10,16 \pm 3,01^A$

* Letras maiúsculas diferentes e letras maiúsculas iguais numa mesma coluna indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as aerações, respectivamente.

Pode-se observar um aumento da atividade enzimática com o aumento da aeração analisada. Os maiores valores médios foram obtidos no ensaio com aeração de 1,0 vvm, $203,60 \pm 35,50 \text{ U/gss}$ para endoglucanase e $11,70 \pm 1,95 \text{ U/gss}$ para FPase. Essa diferença

de atividades pode estar relacionada a fatores biológicos e/ou bioquímicos do microrganismo, o que é corroborado pela maior produção de CO_2 .

Os resultados de atividade enzimática obtidos no presente estudo foram superiores quando comparados a estudos similares reportados na literatura, como os de Rodrigues *et al.* (2022) e Henrique *et al.* (2022), que realizaram cultivos com *M. thermophila* I-1D3b em BC:FT 7:3 com taxas de aeração de 0,97 e 1,0 vvm, respectivamente, com valores de endoglucanase iguais a $158,3 \text{ U/gss}$ para o cultivo com aeração de 0,97 vvm e $140,0 \text{ U/gss}$ para o cultivo com 1,0 vvm, indicando que a aeração de 1 vvm utilizada no presente estudo favoreceu maior produção de endoglucanase, bem como a utilização da lactose como indutor. Esse dissacarídeo atua como indutor positivo, uma vez que a lactose possui ligações glicosídicas similares às do polímero de celulose.

Para as duas diferentes enzimas quantificadas (CMCase e PFase), a análise de variância ($\alpha = 0,05$) indica que a variável taxa de aeração do biorreator tem efeito significativo sobre a variável resposta. Contudo, 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 FPA, que expressa a atividade conjunta do complexo de enzimas celulolíticas, foi estatisticamente igual para as aerações, o que denota que a taxa de aeração em 1 vvm foi mais eficiente para a produção de enzimas secretadas para o meio de cultivo.

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 E2G, assim como na obtenção de nanocelulose (Katayama *et al.* 2022).

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, e que 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.

CONCLUSÕES

Com os dados demonstrados nesse trabalho, é possível concluir que o biorreator de leite empacotado não apresentou um aumento de temperatura expressivo, indicado um bom controle térmico, com um aumento de apenas 2°C. Com respeito à vazão de aeração, a maior taxa melhorou o desempenho da produção enzimática e não causou desnaturação enzimática por cisalhamento, atingindo-se $203,60 \pm 35,50$ U/gss de atividade endoglucanase e $11,70 \pm 1,95$ U/gss de FPase.

Estes resultados evidenciam que a aeração é um fator de grande importância na otimização das condições da fermentação sólida. Dessa forma, a FES nas condições propostas de aeração, temperatura, substrato e umidade mostrou-se eficiente para uma possível produção em nível industrial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001). Também agradecem o apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo e Biocombustíveis – ANP – e da Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP – por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Petróleo e Gás – PRH-ANP/MCTI, e em particular ao PRH 39, 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.

NOMENCLATURA

BC - bagaço de cana
BE2G - bioetanol de segunda geração

BLE - biorreator de leite empacotado
C - dióxido de carbono acumulado (mol)
CO₂ - dióxido de carbono (% v/v)
F - vazão de ar (L/h)
FES- fermentação em estado sólido
FT - farelo de trigo
R² - coeficiente de determinação
t - tempo (h)
V_m - volume molar dos gases ideais nas Condições Normais de Pressão e Temperatura, 22,4 (L/mol)
vvm - volume de ar por volume de meio por minuto
X₀ - concentração inicial de dióxido de carbono (mol)
X_m - concentração máxima de dióxido de carbono (mol)
μ - Constantes específicas (h⁻¹)
Δt - diferença do tempo (h)

REFERÊNCIAS

- ALAZI, E.; KNETSCH, T.; DI FALCO, M.; REID, I. D.; ARENTSHORST, M.; VISSER, J.; RAM, A. F. (2018), 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.
- AMBROZIM, F. M. (2019), Estudo das condições de fermentação em estado sólido para produção de celulasas utilizando biomassa de cacau. Centro de Ciências Agrárias e engenharias, Universidade Federal do Espírito Santo, (Dissertação Mestrado).
- CASCIATORI, F. P. (2015), Produção de celulasas fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leite fixo. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, (Tese de Doutorado).
- CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI-FRASSATTO, P. A. (2018), 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.
- CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; TABOGA, S. R.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. (2014), Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. *Chemical Engineering Journal*, v. 255, p. 214–224.
- FARINAS, C. S. (2015), 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.
- FARINAS, C. S.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. (2018), 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.
- FAVARO, C. P.; BARALDI, I. J.; CASCIATORI, F. P.; FARINAS, C. S. (2020), β -Mannanase production using coffee industry waste for application in soluble coffee processing. *Biomolecules*, v. 10, n. 2, p. 227.
- FRASSATTO, P. A. C. (2020), Formulação de coquetéis de enzimas produzidas por fungos em cultivo sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. PPGQ/UNESP- São José do Rio Preto-SP, (tese de doutorado).
- GHOSE, T. K. (1987), Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268.
- GOMES, A. C. S.; CASCIATORI, F. P.; GOMES, E.; NUNES, C. C. C.; MORETTI, M. M. S.; THOMÉO, J. C. (2020), Growth kinetics of *Myceliophthora thermophila* M.7.7 in solid-state cultivation. *Journal of Applied Microbiology*.
- HENRIQUE, J. P.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. (2022), Automatic system for monitoring gaseous concentration in a packed-bed solid-state cultivation bioreactor. *Chemical Engineering Science*, v. 259, p. 117793.
- JUNQUEIRA, T. L.; CHAGAS, M. F.; GOUVEIA, V. L.; REZENDE, M. C.; WATANABE, M. D.; JESUS, C. D.; BONOMI, A. (2017), Techno-economic analysis and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons. *Biotechnology for biofuels*, v. 10, p. 1-12.
- KATAYAMA, E.; RODRIGUES, N. A.; BILATTO, S.; CASCIATORI, F. P.; FARINAS, C. S. (2022), 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.
- MILLER, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.
- MORAIS, M. C.; FERRARI, B. M.; BORGES, C. D.; CHERUBIN, M. R.; TSAI, S. M.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. (2019), Does sugarcane straw removal change the abundance of soil microbes?. *BioEnergy Research*, v. 12, n. 4, p. 901-908.
- OLIVEIRA, S. P.; RODRIGUES, N. A.; CASCIATORI-FRASSATTO, P. A.; CASCIATORI, F. P. (2020), 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.
- PEREZ, C. L., CASCIATORI, F. P., THOMÉO, J. C. (2021), Improving enzyme production by solid-state cultivation in packed-bed bioreactors by changing bed porosity and airflow distribution. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 44, p. 537-548.
- PINTO, A. S. S. (2021), Mitigação dos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa vegetal: impacto técnico-econômico-ambiental de diferentes

- rotas de processo na biorrefinaria. PPGEQ/UFSCAR- São Carlos-SP, (Tese Doutorado).
- PINTO, T. O. P. (2010), Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *thermomycetes lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e aplicação na sacarificação do bagaço de cana de açúcar com diferentes pré-tratamentos. IBLCE/UNESP- São José do Rio Preto, (Dissertação Mestrado).
- PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; FONSECA, R. F.; PAIXÃO, D. A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; FARINAS, C. S. (2016), Bioprocess developments for cellulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 33, p. 21-31.
- RODRIGUES, N. A.; KATAYAMA, E.; CASCIATORI, F. P. (2022), Alternative strategies to perform solid-state cultivation in a multilayer packed-bed bioreactor: continuous and cyclic operations. Chemical Engineering Journal, v. 448, p. 137726.
- RODRIGUES, N. A. (2021), Avaliação experimental de diferentes modos de operação de um biorreator de leito empacotado multicamadas para produção de celulases por cultivo em estado sólido. PPGEQ/UFSCAR- São Carlos-SP, (dissertação de mestrado)
- SALOMÃO, G. S. B., AGNEZI, J. C., PAULINO, L. B., HENCKER, L. B., DE LIRA, T. S., TARDIOLI, P. W., PINOTTI, L. M. (2019), 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.
- SINGH, B. (2016), *Myceliophthora thermophila* syn. *Sporotrichum thermophile*: a thermophilic mould of biotechnological potential. Critical reviews in biotechnology, 36(1), 59-69.
- THOMAS, L., LARROCHE, C., PANDEY, A. (2013), Current developments in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, v. 81, p. 146-161.
- VICCINI, G.; MITCHELL, D. A.; BOIT, S. D.; GERN, J. C.; ROSA, A. S.; COSTA, R. M.; DALSENTER, F. D. H.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. (2001), Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. Food Technology Biotechnology, v. 39, p. 271-294.
- ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; THOMÉO, J. C. (2012), Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora sp.* I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. Brazilian Journal of Microbiology, v. 43, p. 1536-1544.