



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES, EM
BIORREATOR ROTATIVO COM PULSOS DE AR, PELO
PENICILLIUM UCSENSE S1M29**

Paulo Roberto Reschke

CAXIAS DO SUL

2024

Paulo Roberto Reschke

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES, EM BIORREATOR ROTATIVO
COM PULSOS DE AR, PELO PENICILLIUM UCSENSE S1M29**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
como parte dos requisitos para a obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

CAXIAS DO SUL

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

R431p Reschke, Paulo Roberto

Produção de celulases e xilanases, em biorreator rotativo com pulsos de ar, pelo *Penicillium ucsense* S1M29 [recurso eletrônico] / Paulo Roberto Reschke. – 2024.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Orientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. *Penicillium*. 2. Celulase. 3. Bagaço de cana. I. Dillon, Aldo José Pinheiro, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 582.282.123.2

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

**PRODUÇÃO DE CELULASES E XILANASES, EM BIORREATOR ROTATIVO
COM PULSOS DE AR, PELO PENICILLIUM UCSENSE S1M29**

Paulo Roberto Reschke

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
como parte dos requisitos para a obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia

Aprovada em ___ de _____ de 2024

Banca examinadora

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella
Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP

Prof. Dra. Eloane Malvessi
Universidade de Caxias do Sul – UCS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram a desenvolver esse trabalho, em especial a minha esposa Raíza, família e amigos pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Agradeço também ao pessoal do laboratório de enzimas e biomassas pelo suporte, em especial a Roselei e ao professor Aldo que me orientou e deu ânimo durante essa conquista.

Também gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Devido à crescente demanda por combustíveis e as cada vez mais presentes políticas voltadas a redução das emissões de dióxido de carbono da matriz energética, o etanol vem despontando como alternativa renovável aos combustíveis fósseis. As duas principais matérias primas a nível mundial para a produção de etanol são o milho e a cana-de-açúcar, sendo o Brasil o segundo maior produtor mundial de etanol e utilizando majoritariamente a cana-de-açúcar para essa produção. Na produção do etanol convencional, denominado de primeira geração, é gerado um volume expressivo de resíduos lignocelulósicos, oriundos da palha e bagaço da cana-de-açúcar, que podem ser empregados para a produção de etanol de segunda geração ou etanol celulósico. Para essa produção são necessárias enzimas para a conversão da celulose e hemicelulose presentes nos resíduos lignocelulósicos para açúcares fermentescíveis que, após o processo de fermentação e destilação, darão origem ao etanol combustível. O presente trabalho enfocou o cultivo em estado sólido para a produção dessas enzimas pelo fungo *Penicillium ucsense* utilizando a linhagem SIM29, empregando como substrato bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT), acrescidos de solução de sais, em tambor rotativo de 5,7 litros, com a aplicação de pulsos de pressão e descompressão de ar, como mecanismo adicional para controle da temperatura do biorreator. Os resultados mostraram eficiência do processo de aplicação de pulsos de pressão para alteração da temperatura do biorreator. Os melhores resultados nos cultivos com ausência de pulsos de pressão foram com a proporção de 65 BC: 35 FT, alcançando para celulasas totais 16 FPU g⁻¹ de massa seca, 78 U g⁻¹ de massa seca para endoglicanases, 96 U g⁻¹ de massa seca para β-glicosidases e 324 U g⁻¹ de massa seca para xilanases. Já os cultivos na presença de pulsos de pressão os resultados de FPA e endoglicanases foram superiores para 50 BC: 50 FT, alcançando 17 FPU g⁻¹ de massa seca e 90 U g⁻¹ de massa seca respectivamente, e para β-glicosidases e xilanases foram melhores com 65 BC: 35 FT, alcançando valores 121 U g⁻¹ de massa seca de 277 U g⁻¹ de massa seca, respectivamente. Os dados apresentados que mostraram a produção de celulasas e xilanases em cultivo no estado sólido, em biorreator de bancada, abrem a possibilidade de realização de estudos em escala piloto.

PALAVRAS-CHAVE: etanol de segunda geração; *Penicillium ucsense*; celulasas; bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

Due to the growing demand for fuels and the increasing presence of policies aimed at reducing the emissions of carbon dioxide the energy matrix, ethanol is emerging as a renewable alternative to fossil fuels. The world's two main raw materials for ethanol production are corn and sugar cane, with Brazil being the world's second largest ethanol producer and mostly using sugar cane for this production. In the production of conventional ethanol, known as first-generation ethanol, a significant volume of lignocellulosic waste is generated from sugar cane straw and bagasse, which can be used to produce second-generation ethanol, or cellulosic ethanol. For this production, enzymes are needed to convert the cellulose and hemicellulose present in lignocellulosic waste into fermentable sugars, which after the fermentation and distillation process will give rise to fuel ethanol. This work focused on solid-state fermentation to produce these enzymes by the fungus *Penicillium ucsense* using the S1M29 strain, employing sugar cane bagasse (SCB) and wheat bran (WB) as substrates, plus a salt solution, in a rotating drum with 5,7 liters, with the application of pressure pulses and air decompression, as an additional mechanism for controlling the temperature of the bioreactor. The results show the efficiency of the process of applying pressure pulses to change the temperature of the bioreactor. The best results in the cultivations without pressure pulses were with the ratio of 65 SCB: 35 WB, achieving 16 FPU g⁻¹ of dry mass for total cellulases, 78 U g⁻¹ of dry mass for endoglycanases, 96 U g⁻¹ of dry mass for β -glucosidases and 324 U g⁻¹ of dry mass for xylanases. For the cultivations in the presence of pressure pulses the results for FPA and endoglycanases were higher for 50 SCB: 50 WB, reaching 17 FPU g⁻¹ dry mass and 90 U g⁻¹ dry mass respectively, and for β -glucosidases and xylanases were better with 65 SCB: 35 WB, reaching values of 121 U g⁻¹ dry mass and 277 U g⁻¹ dry mass respectively. The data showed the production of cellulases and xylanases in solid-state cultivation in a benchtop bioreactor, open the possibility of carrying out pilot-scale studies.

KEYWORDS: second generation ethanol; *Penicillium ucsense*; cellulases; sugar cane bagasse.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE EQUAÇÕES	iv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Etanol.....	5
3.2 Biomassas lignocelulósicas e etanol de segunda geração	6
3.3 Enzimas celulolíticas e xilanolíticas.....	9
3.3.1 O fungo <i>Penicillium ucsense</i>	11
3.4 Principais formas de cultivo para a produção de enzimas.....	12
3.5 Biorreatores utilizados para cultivo em estado sólido	14
3.5.1 Pulsos de pressão durante o cultivo em estado sólido	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Linhagem.....	20
4.2 Meio de cultivo.....	20
4.2.1 Meio de manutenção da linhagem	20
4.2.2 Meio para produção de celulases.....	20
4.3 Condições de cultivo	21
4.4 Determinação das atividades enzimáticas	24
4.4.1 Extração enzimática e determinação da umidade.....	24
4.4.2 Determinação da atividade total de celulases	24
4.4.3 Determinação de endoglicanases.....	25
4.4.4 Determinação de β -glicosidases	26
4.4.5 Determinação de xilanases	26
4.5 Análise estatística dos resultados	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Adaptações no biorreator e desenvolvimento de <i>software</i> de monitoramento	28
5.2 Caracterização das matérias primas.....	32
5.3 Atividade de celulases totais.....	34
5.4 Atividade de endoglicanases	38
5.5 Atividade de β -glicosidases	41
5.6 Atividade de xilanases	44

5.7	Varição da temperatura durante o cultivo.....	47
5.8	Varição da temperatura durante os pulsos de pressão	56
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXOS	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do processo de produção do etanol de segunda geração. (O autor)	7
Figura 2: Representação esquemática do ataque enzimático das celulases. (Adaptado de LYND <i>et al.</i> , 2002).....	10
Figura 3: Representação esquemática do ataque enzimático das xilanases. (Adaptado de CHEN <i>et al.</i> , 2015).....	11
Figura 4: Esquema de biorreator de bandejas. (Adaptado de Manan & Webb, 2020)	15
Figura 5: Esquema de tambor com pás. (Adaptado de DURAND 2003)	16
Figura 6: Biorreator utilizado neste projeto. (O autor).....	17
Figura 7: Diagrama birreator para CES equipado com aeração forçada e oscilação de pressão. (ZHANG <i>et al.</i> , 2003).....	18
Figura 8: Ilustração do sistema de aeração do reator. (O autor)	23
Figura 9: Eixo do biorreator antes da modificação. (O autor)	29
Figura 10: Eixo do biorreator após as modificações de vedação. (O autor)	29
Figura 11: Vedação interna biorreator. (O autor).....	30
Figura 12: Vedação interna por <i>O-ring</i> do biorreator. (O autor)	31
Figura 13: Atividades enzimáticas sobre papel de filtro (O autor)	35
Figura 14: Atividades enzimática de endoglicanase. (O autor)	39
Figura 15: Atividades enzimática de β -glicosidases. (O autor)	42
Figura 16: Atividades enzimática de xilanases. (O autor)	45
Figura 17: Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 1. (O autor)	48
Figura 18: Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 1. (O autor).....	48
Figura 19: Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 2. (O autor)	49
Figura 20: Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 2. (O autor).....	49
Figura 21: Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 3. (O autor)	50
Figura 22: Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 3. (O autor).....	51
Figura 23: Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 4. (O autor)	52

Figura 24: Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 4. (O autor).....	53
Figura 25: Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 5. (O autor)	54
Figura 26: Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 5. (O autor).....	54
Figura 27: Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 6. (O autor)	55
Figura 28: Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 6. (O autor).....	56
Figura 29: Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão do cultivo 1 da duplicata da condição 4. (O autor).....	57
Figura 30: Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão do cultivo 2 da duplicata da condição 4. (O autor).....	58
Figura 31: Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão do cultivo 1 da duplicata da condição 5. (O autor).....	58
Figura 32: Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão do cultivo 2 da duplicata da condição 5. (O autor).....	59
Figura 33: Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão do cultivo 1 da duplicata da condição 6. (O autor).....	59
Figura 34: Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão do cultivo 2 da duplicata da condição 6. (O autor).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição lignocelulósica do bagaço de cana-de-açúcar. (O autor).....	33
Tabela 2: Análise granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar. (O autor).....	33
Tabela 3: Análise granulométrica do farelo de trigo. (O autor)	34
Tabela 4: Atividade de FPU obtidas no estudo. (O autor)	36
Tabela 5: Estudos de produção de celulases em cultivos sólidos. (O autor).....	37
Tabela 6: Atividade de endoglicanases obtidas no estudo. (O autor).....	40
Tabela 7: Estudos de produção de endoglicanases em cultivos sólidos. (O autor)	41
Tabela 8: Atividade de β -glicosidases obtidas no estudo. (O autor)	43
Tabela 9: Estudos de produção de β -glicosidases em cultivos sólidos. (O autor).....	43
Tabela 10: Atividade de xilanases obtidas no estudo. (O autor)	46
Tabela 11: Estudos de produção de xilanases em cultivos sólidos. (O autor).....	46

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Determinação de atividade de celulases totais.	25
Equação 2: Determinação de atividade de endoglicanases.	26
Equação 3: Determinação de atividade de β -glicosidases.....	26
Equação 4: Determinação de atividade de xilanases.....	27

1 INTRODUÇÃO

As necessidades humanas quanto à locomoção e transporte vêm demandando cada vez maior volume de combustíveis. A Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), no anuário estatístico de 2023, relatou o consumo de 2,5 milhões de barris de petróleo por dia no Brasil no ano de 2022 (dados do ano de 2023 ainda não disponíveis). Considerando apenas os combustíveis, a comercialização de gasolina C pelas distribuidoras foi de 43 bilhões de litros e de diesel foi de 63,2 bilhões de litros em 2022. Para o etanol hidratado, no mesmo período, a comercialização foi de 15,5 bilhões de litros pelas distribuidoras (Agência Nacional do Petróleo, 2022, 2023).

O etanol brasileiro vem despontando como alternativa aos combustíveis fósseis devido ao seu balanço energético positivo na produção, onde para cada unidade de energia oriunda de combustíveis fósseis usada na produção do etanol são geradas 8 a 9 unidades de energia renovável. Assim, o etanol torna-se uma alternativa viável do ponto de vista das emissões de gases do efeito estufa tanto quando consumido internamente quando exportado, já considerando as emissões geradas no transporte (Antero *et al.*, 2019).

No Brasil a principal matéria-prima para a produção do etanol é a cana-de-açúcar, representando perto de 80% do etanol produzido na safra 2023, seguida do milho que representa quase a totalidade restante (Imprensa, 2023). O processo tem como base a fermentação dos açúcares por leveduras, usualmente *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que na cana-de-açúcar a sacarose está disponível para as leveduras após a moagem, tendo em vista que os açúcares estão presentes no caldo extraído do colmo da cana-de-açúcar, enquanto no milho é necessário um prévio processo hidrolítico, de modo a converter o amido do cereal em glicose e possibilitar a fermentação.

Ambas as biomassas utilizadas geram um volume elevado de resíduos lignocelulósicos durante o processamento, os quais possuem alto teor em polissacarídeos e que, devidamente hidrolisados, originarão açúcares fermentescíveis. O etanol produzido a partir desses resíduos é designado de etanol de segunda geração (E2G), sendo um dos maiores desafios para a sua produção o processo de hidrólise, que pode ser ácida ou enzimática (Florencio *et al.*, 2017).

As principais enzimas empregadas nesse processo são as celulases e as xilanases, sendo as celulases responsáveis pela quebra das ligações glicosídicas β -1-4 da celulose, resultando na liberação de glicose, enquanto as xilanases atuam sobre as xilanas que compõem a hemicelulose, resultando na liberação xilose. Para a produção das celulases e xilanases, uma espécie de fungo que se destaca é o *Penicillium ucsense* (anteriormente definido como *Penicillium echinulatum*), respondendo bem tanto ao cultivo em estado sólido (CES) quanto ao cultivo submerso (CSm) (Dillon *et al.*, 2006).

O CSm é caracterizado pelo cultivo em biorreator com meio líquido suplementado com nutrientes e sob agitação e aeração, onde as células estão dispersas de forma homogênea, sendo o processo mais utilizado a nível industrial para a produção de enzimas. Entretanto, apresenta como desvantagem a necessidade de etapas de processamento *downstream* visando a recuperação, concentração e em determinados casos a purificação das enzimas. Já o CES consiste no crescimento do microrganismo em substrato sólido com umidade suficiente para manter o crescimento e metabolismo do microrganismo (Florencio *et al.*, 2022). Apresenta como vantagem em relação ao CSm à utilização à tecnologia do E2G a possibilidade de não necessitar a recuperação e concentração das enzimas, devido à similaridade do substrato do CES aos resíduos lignocelulósicos utilizados para produção do E2G, possibilitando a utilização de todo o volume do meio reacional para aportar as enzimas produzidas, reduzindo custos de processamento *downstream* e o custo final com enzimas para o processo.

Como desvantagem o CES apresenta maior dificuldade para o escalonamento do processo, em se tratando do emprego de biorreatores do tipo tambor, uma vez que a dissipação de calor ocorre apenas pelas paredes do biorreator e pelo fluxo de aeração, causando aumento da temperatura na parte interna como consequência do metabolismo microbiano. Uma alternativa para otimizar a dissipação de calor seria o uso de pulsos de pressão, que pelo maior volume de ar injetado e sua expansão decorrente de descompressão, permitem a remoção de calor do interior do biorreator, inclusive das partes mais internas do meio reacional. Esse maior controle de temperatura possibilitaria um incremento na produção de enzimas nos CES devido a manutenção das condições ideais de temperatura (Florencio *et al.*, 2022).

Assim, no presente trabalho, a estratégia de aplicação de pulsos de pressão foi empregada em biorreator experimental de tambor rotativo, em conjunto com a variação da fonte de carbono, para a produção de celulasas utilizando a linhagem S1M29 de *P. ucsense* visando a obtenção de mais altos valores de atividade de celulasas totais (*Filter Paper Activity* - FPA na sigla em inglês) e xilanases, para aplicação em processos de produção de E2G.

2 OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho teve como objetivo a produção de celulasas e xilanases, a partir do fungo filamentoso *P. ucsense* S1M29, via cultivo em estado sólido, com a aplicação de pulsos de pressão, tendo como objetivos específicos:

- verificar a melhor relação entre bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo para a produção de celulasas e xilanases;
- adaptar o biorreator para a aplicação de pulsos de pressão;
- desenvolver sistema de controle para realização dos pulsos de pressão no biorreator;
- verificar os efeitos de pulsos de pressão realizados em biorreator em relação a atividade enzimática de celulasas e xilanases;
- comparar as temperaturas ao longo dos cultivos com e sem pulsos de pressão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Etanol

Devido a demanda por fontes renováveis de energia a produção de etanol tem aumentado mundialmente, tanto para uso como combustível quanto na indústria química. Os Estados Unidos da América (EUA) se destacam como os maiores produtores globais, com 58 bilhões de litros em 2022, utilizando majoritariamente milho para a produção, seguido pelo Brasil, com 28 bilhões de litros em 2022, sendo a principal matéria prima a cana-de-açúcar. Juntos Brasil e EUA responderam por 80% da produção global de etanol (Renewable Fuels Association, 2024).

Na produção do etanol a partir da cana-de-açúcar, o processo consiste em sua moagem para extração do caldo, cujos açúcares são convertidos a etanol via fermentação alcoólica e, após a destilação, a obtenção do etanol hidratado ou etanol anidro. Para a produção de etanol a partir do milho, processo que está ganhando espaço no Brasil, com crescimento estimado no período 2020 a 2028 de 400%, é realizada a conversão do amido presente no cereal à glicose, normalmente utilizando rota enzimática, que é então fermentada a etanol (Neves *et al.*, 2021; Clifford, 2023).

O principal uso do etanol é na forma de combustível, como etanol anidro, utilizado principalmente para adição na gasolina, ou hidratado, utilizado diretamente para combustão nos motores de ciclo Otto. Com a pandemia da COVID-19 o uso de etanol como sanitizante aumentou expressivamente, tendo um aumento de 1400% entre dezembro de 2019 e fevereiro de 2020, sendo um mercado com expectativa de duplicar o faturamento entre 2019 e 2027 (Aggarwal & Kumar, 2022).

Além do uso para transportes e como sanitizante, o etanol é uma matéria prima para diversos processos industriais, como a produção de acetaldeído, etileno, butadieno e ácido acético. Ainda há o uso do etanol como matéria prima para a produção de ácidos orgânicos e aminoácidos, como o ácido L-glutâmico e a L-lisina, mostrando que o etanol pode ser utilizado tanto em processos químicos tanto em processos biotecnológicos para a produção de compostos de maior valor agregado (Aggarwal & Kumar, 2022).

3.2 Biomassas lignocelulósicas e etanol de segunda geração

As duas principais matérias-primas para a produção de etanol no Brasil geram resíduos ricos em material lignocelulósico: palha e bagaço na cana-de-açúcar e palha e sabugo no milho (Müller *et al.*, 2019). Os resíduos do processo a partir da cana-de-açúcar são tradicionalmente utilizados no Brasil para a produção de energia, tanto vapor quanto geração de eletricidade. O milho gera coprodutos no processamento como grãos secos (*Dried Distillers Grains*) e úmidos de destilaria (*Wet Distillers Grains*) (DDG e WDG na sigla em inglês), utilizados para nutrição animal, e os resíduos lignocelulósicos provenientes não são utilizados comercialmente, servindo apenas como cobertura vegetal para o plantio direto (Antero *et al.*, 2019). Estes resíduos lignocelulósicos gerados têm em torno de 60 a 70% de polissacarídeos na sua composição e, como forma alternativa de aproveitamento, processos de conversão destas biomassas em açúcares fermentescíveis vêm sendo desenvolvidos. Tais açúcares, por sua vez, por fermentação tanto das hexoses quanto das pentoses, podem originar etanol (Pereira Jr. *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2019).

Atualmente, no Brasil, duas empresas operam na produção e comercialização de E2G: a GranBio (São Paulo, Brasil), com sua planta industrial localizada em São Miguel dos Campos (AL) e inaugurada em 2014, sendo a primeira empresa do hemisfério sul a produzir E2G,

contando com uma capacidade de 30 milhões de litros do combustível por ano (Granbio, 2021); e a Raízen (São Paulo, Brasil), uma *join-venture* entre a Shell e a Cosan, com uma capacidade de produção de 120 milhões de litros de E2G anuais. A produção de E2G da Raízen conta com duas unidades industriais, inauguradas em 2014 e 2024, ambas integradas a unidades produtoras de etanol de primeira geração (E1G), possuindo ainda sete unidades em fase de construção e um plano de expansão com previsão de 20 unidades nos próximos 10 anos. No processo produtivo da Raízen, é utilizado como matéria-prima bagaço e palha de cana-de-açúcar, utilizando pré-tratamento ácido e térmico com hidrólise enzimática (Raízen, 2023).

A tecnologia de uso de biomassa lignocelulósica para a produção de E2G compreende as etapas de pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação, como pode ser visto no esquema apresentado na Figura Figura 1. O objetivo do pré-tratamento é quebrar a estrutura física da biomassa e aumentar a área de contato, facilitando o acesso à celulose e hemicelulose na etapa seguinte, a hidrólise, que pode ser enzimática ou química (Karp *et al.*, 2013).

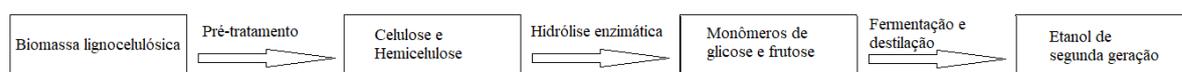


Figura 1. Esquema do processo de produção do etanol de segunda geração.

Fonte: O autor.

A hidrólise química, apesar de viável para o processo, gera alguns subprodutos que são indesejáveis para a subsequente fermentação, por isso normalmente é utilizada apenas no pré-tratamento do material, de forma mais branda, para auxiliar na exposição das fibras de celulose e hemicelulose para o ataque das enzimas na hidrólise enzimática (Megala *et al.*, 2020). A hidrólise enzimática emprega celulasas e xilanases para a quebra do material e a liberação dos monômeros de açúcares e é um processo conduzido em condições brandas de temperatura e

pressão, o que possibilitaria que o processo de fermentação ocorresse simultaneamente ao processo de hidrólise, embora comumente ocorram em etapas separadas. O processo de fermentação e sacarificação simultâneas reduz a inibição da hidrólise pelo acúmulo de glicose no meio, já que a mesma é fermentada a etanol (Costa *et al.*, 2021).

A etapa de fermentação alcoólica é tradicional à indústria e já utilizada para a produção do E1G, tanto de cana-de-açúcar quanto de milho, onde é empregada a levedura *S. cerevisiae* na metabolização de sacarose e glicose, respectivamente, sendo que para a produção do E2G com rendimentos elevados há a demanda por leveduras adicionais vinculadas à conversão das pentoses, as quais não são metabolizadas por cepas selvagens de *S. cerevisiae* (Martins *et al.*, 2018). Rech *et al.* (2022) estudaram fermentações associando *S. cerevisiae* CAT-1 e *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CMY-303, obtendo rendimentos satisfatórios em etanol na fermentação de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar (BC). A utilização de engenharia metabólica em *S. cerevisiae* também tem se mostrado um potencial para fermentação conjunta de glicose e xilose (Nijland & Driessen, 2020).

Alguns estudos buscam não apenas integrar as etapas de hidrólise e fermentação, mas uni-las. Em pesquisa conduzida por Procopio (2017), parte do genoma de *Acremonium strictum*, microrganismo isolado do cerrado brasileiro, foi empregado na geração de vetor adicionado à cepa de *S. cerevisiae*. O vetor agiu para a expressão das celulasas produzidas pelo fungo na levedura, expressando, assim, celulasas durante a fermentação alcoólica e atingindo valores superiores de produção de etanol em meios contendo polissacarídeos não diretamente fermentescíveis.

Assim, tendo em vista o aumento do volume de etanol produzido integrando a produção de E1G e E2G, faz-se relevante o aproveitamento das biomassas lignocelulósicas por meio da sua conversão a etanol. A produção total de etanol, somando o E1G e E2G, com o mesmo volume de cana-de-açúcar, pode aumentar em até 40% utilizando a biomassa das variedades

atualmente cultivadas (Pacheco, 2011). Se considerado o uso de outras variedades de cana-de-açúcar, como a Flex I e Flex II da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) ou as variedades de cana energia da GranBio, com maiores teores de sacarose na planta ou maiores valores de biomassa lignocelulósica, o volume final de etanol pode ser ainda mais elevado (Ramos, 2022).

3.3 Enzimas celulolíticas e xilanolíticas

Na etapa de hidrólise para a produção de E2G diversos grupos enzimáticos estão envolvidos. O principal grupo é o das celulases, que na classificação EC (*Enzyme Commission*) pertencem ao grupo EC 3.2.1.x, onde o “x” varia conforme a enzima avaliada (NC-IUBMB, 2024). São responsáveis pela quebra da celulose no material lignocelulósico e podem ser divididas em três grupos que atuam de forma sinérgica sobre o substrato (Florencio *et al.*, 2017).

As endoglicanases (EC 3.2.1.4) atuam de forma aleatória no interior da estrutura amorfa da celulose, liberando oligossacarídeos de diferentes tamanhos. As exoglicanases atuam nas extremidades da celulose e dos oligossacarídeos liberados pelas endoglicanases e são divididas em celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e glucano-hidrolases (EC 3.2.1.74) (Lynd *et al.*, 2002). As glucano-hidrolases liberam como produto de sua reação monômeros de glicose. Já as celobiohidrolases liberam como produto celobiose, que é um dissacarídeo formado por monômeros de glicose ligados por ligações β -1,4. A celobiose, por sua vez, sofre a ação do terceiro grupo das celulases, as β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que também possuem ação sobre outras celodextrinas, liberando monômeros de glicose (Lynd *et al.*, 2002). Uma representação esquemática desse processo pode ser vista da Figura Figura 2.

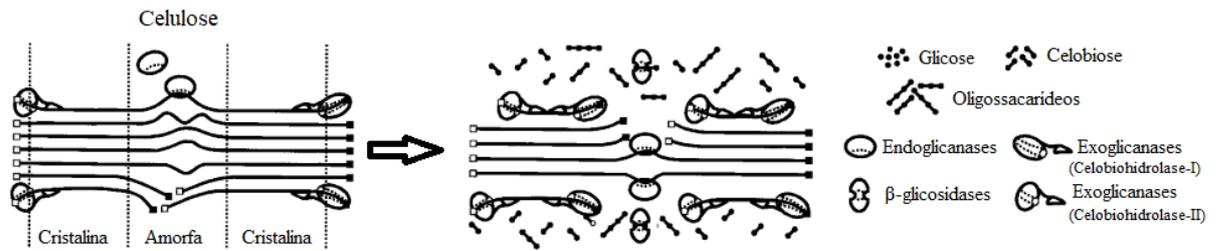


Figura 2. Representação esquemática do ataque enzimático das celulases.

Fonte: Adaptado de LYND *et al.*, 2002.

Apesar da importância das celulases para o processo, sendo a celulose o principal constituinte dos materiais lignocelulósicos, as xilanases também se destacam na hidrólise do complexo, devido ao seu importante papel na degradação das hemiceluloses (Silva, 2014). As duas principais enzimas desse grupo são as endoxilanases (E.C.3.2.1.8), responsáveis pela quebra aleatória da molécula de xilana em oligômeros de xilose, e as β-xilosidases (E.C.3.2.1.37), responsáveis pela hidrólise dos xilooligômeros em monômeros de xilose. A Figura 3 representa esse ataque das xilanases ao substrato.

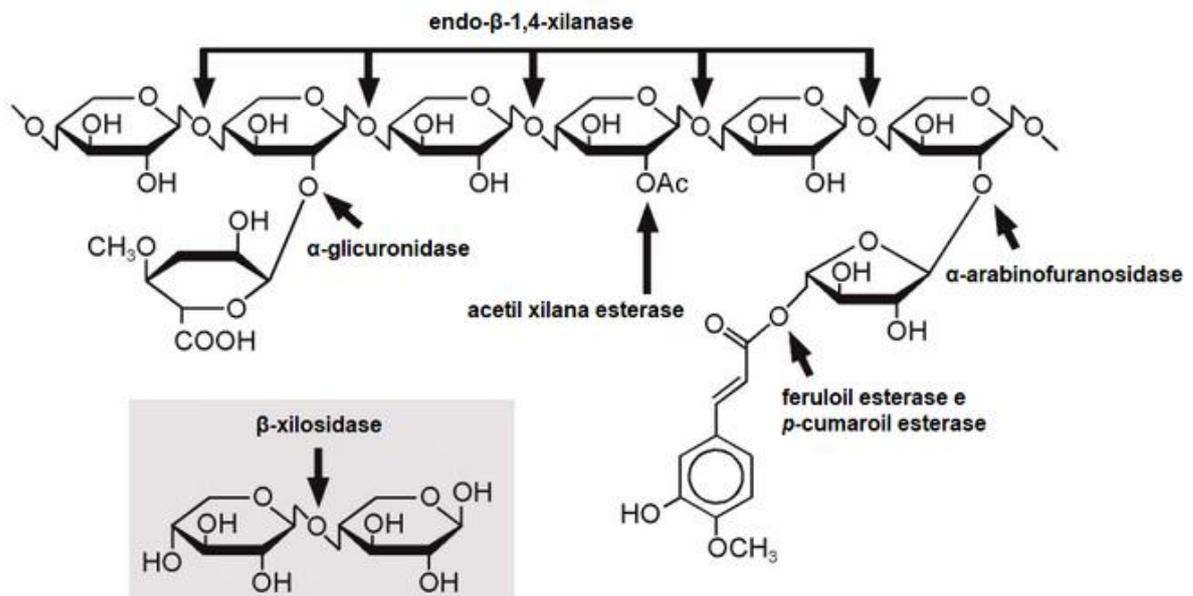


Figura 3. Representação esquemática do ataque enzimático das xilanases.

Fonte: Adaptado de CHEN *et al.*, 2015

3.3.1 O fungo *Penicillium ucsense*

Dentre as linhagens de fungos promissoras para a produção de celulases estão os mutantes da linhagem selvagem 2HH de *P. ucsense*, que passou por programa de melhoramento genético visando aumentar a produção das celulases, sendo o último mutante descrito o S1M29, tendo como característica a mais alta produção de celulases e celobiohidrolases desta espécie (Dos Reis *et al.*, 2013; Dillon *et al.*, 2011; Dillon *et al.*, 2006; Dillon *et al.*, 1992). A linhagem S1M29, tal como a 9A02S1, apresenta relação favorável entre a atividade de β -glicosidases e FPA para permitir a hidrólise da celulose (MARTINS *et al.*, 2008; DILLON *et al.*, 2011).

De modo geral, a maioria dos processos de hidrólise de material lignocelulósico utilizam celulases produzidas por *T. reesei*, apesar de sua parcial deficiência em β -glicosidases (Lynd *et al.*, 2002). Para contornar este obstáculo, pode-se recorrer à utilização de cepas de *Aspergillus* spp. ou de *Penicillium* spp. como substitutos para o *T. reesei* (Vaishnav *et al.*, 2018). Ainda, com o advento das técnicas de análise genômica, a comparação do genoma e secretoma da

linhagem 2HH de *P. ucsense* com o seu mutante S1M29 pode apontar estratégias para aumentar a expressão de genes vinculados à produção de celulases (Lenz, 2020). Assim, além do uso de espécies promissoras a produção de enzimas, há a possibilidade de obtenção de cepas ainda mais promissoras através de mutações específicas induzidas.

3.4 Principais formas de cultivo para a produção de enzimas

A maioria das enzimas comercializadas são produzidas a partir de CSm, devido a escalabilidade do processo e facilidade no controle a nível industrial, sendo o CES empregado majoritariamente para a produção de alimentos fermentados. O CES está sendo pesquisado como alternativa ao CSm para a produção de enzimas, principalmente oriundas de fungos filamentosos, já que o meio sólido é mais próximo a condição selvagem do fungo, esperando-se assim atingir maior produção de enzimas (Soccol *et al.*, 2017).

O CES tem sido considerado também devido a possibilidade de utilização de resíduos lignocelulósicos oriundos de matérias-primas de custo reduzido ou, inclusive, sem valor comercial, como resíduos do setor agropecuário, a exemplo do BC, quando não utilizado para a produção de eletricidade, cascas de arroz, bem como capim-elefante (Sisti *et al.*, 2021; Behera & Ray, 2016; Aggarwal & Kumar, 2022). Assim, o CES agrega valor aos resíduos agrícolas não utilizados, além de minimizar problemas de poluição advindos da deposição destes no ambiente, tornando a produção de enzimas mais econômica do que no CSm (Singhania *et al.*, 2015).

Tsao *et al.* (2000) utilizaram uma associação de espiga de milho moída, FT e solução mineral para a produção de β -glicosidases por CES utilizando *Aspergillus niger*. Foram obtidos valores de atividade de β -glicosidases de 215 U g⁻¹ de substrato sólido.

Já Latifian *et al.* (2007) utilizaram farelo de arroz como suporte e nutriente para estudos de CES e determinação de FPA, com *Trichoderma reesei* QM9414 e *T. reesei* MCG7, mutante da cepa QM9414. Para a linhagem QM9414, o valor máximo de FPU observado foi de 1,2 U g⁻¹ de substrato seco, com o pH inicial de 5,0, umidade de 70% no meio e temperatura de 30 °C; enquanto para a MCG7 foi verificado FPU de 2,3 U g⁻¹, também com pH inicial de 5,0.

Oberoi *et al.* (2010) verificaram o uso de bagaço de Kinnow, citrus cultivado na Ásia, com resíduos abundantes, mas com baixo teor de celulose se comparado a cana-de-açúcar, isoladamente ou suplementado com FT, como substrato para CES visando a produção de celulasas com *T. reesei* RUT C30. Quando a proporção de Kinnow e FT foi 4:1 (*m/m*), FPU de 13,4 U g⁻¹ de massa seca foi atingida.

Roussos *et al.* (1991) estudaram o aumento de escala para CES com *Trichoderma harzianum* utilizando como substrato BC e FT (8:2 (*m/m*)), com e sem a utilização de pré-tratamento. Foram determinadas FPA e endoglicanases, com os maiores resultados de atividade enzimática de 16,1 FPU e 204,4 U g⁻¹ de massa seca, respectivamente, no tempo de 48h com a utilização de pré-tratamento.

Camassola & Dillon (2010) realizaram CES associando BC *in natura* e FT, além de solução mineral, na produção de celulasas com *Penicillium echinulatum* 9A02S1. Com exceção das endoglicanases, as maiores atividades foram encontradas no terceiro dia de cultivo, sendo 45 FPU g⁻¹ de massa seca obtido na proporção 6:4 (*m/m*) (BC: FT), β-glicosidases de 40 U g⁻¹ de massa seca para a proporção 0:10 (*m/m*) e de 29 U g⁻¹ de massa seca para proporção de 2:8 (*m/m*) e xilanases de 36 U g⁻¹ de massa seca na proporção 6:4 e 37 U g⁻¹ de massa seca na proporção de 4:6 (*m/m*). As endoglicanases apresentaram maiores atividades no quarto e quinto dia de fermentação, atingindo para a proporção de 6:4 (*m/m*) 290 e 276 U g⁻¹ de massa seca, respectivamente.

Em 2024, Boondaeng e colaboradores utilizaram *Aspergillus* sp. IN5 em CES para a produção de celulases, otimizando os parâmetros de cultivo, sendo o substrato resíduos de soja, temperatura de incubação 35°C, pH 7,0 e tempo de cultivo de 5 dias. Como resultados foram obtidos 0,26 U g⁻¹ substrato para celulases totais, 3,32 U g⁻¹ para endoglicanases e 196,09 U g⁻¹ para β-glicosidases.

3.5 Biorreatores utilizados para cultivo em estado sólido

Dentre os modelos de reatores para CES, os que mais se destacam são os de bandejas e tambores, possuindo diferentes variações de cada um desses modelos. Um modelo de reator de bandeja, mostrado na Figura Figura 4, apresenta as bandejas do reator perfuradas, permitindo a transferência de massa. Além desse sistema proposto por Manan & Webb (2020) também existem sistemas cujas bandejas possuem sistema de troca térmica, para além da troca de ar, como patenteado por Durand (2003).

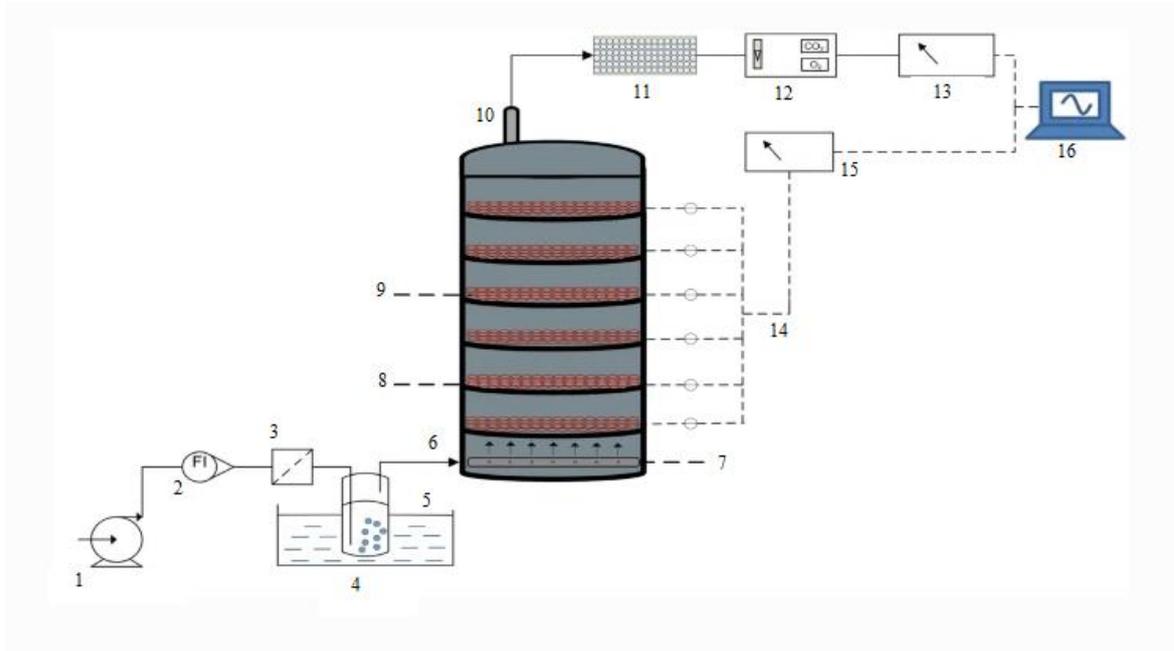


Figura 4. Esquema de biorreator de bandejas. 1. Compressor de ar. 2. Rotâmetro. 3. Filtro de ar. 4. Banho de água. 5. Tanque de umidificação. 6. Entrada de ar. 7. Bocal de aeração. 8. Bandeja de malha. 9. Substrato. 10. Saída de ar. 11. Sílica gel. 12. Analisador de gases. 13. Registrador de dados. 14. Termopar do tipo K. 15. Registrador de dados de temperatura. 16. Computador.

Fonte: Adaptado de Manan & Webb, 2020

Os modelos de biorreatores do tipo tambor constituem-se de cilindros onde a fermentação ocorre no interior dos mesmos e são distribuídos em dois grupos, estáticos ou rotativos, sendo que nos modelos estáticos podem existir agitadores internos, normalmente do tipo pás. Um exemplo de tambor estático dotado de pás para agitação é mostrado na Figura 5. Segundo Durand (2003), o CES a nível piloto e em escala industrial são menos comuns devido à quantidade crítica do volume de substrato, o que implica na dificuldade de remoção de calor gerado. O meio sólido torna-se compactado ou cria canais preferenciais de ar, fatores que interferem na transferência de massa. Ainda é importante a resistência dos microrganismos à agitação mecânica, especialmente para tambor com pás, devido à agitação promovida pelo biorreator.

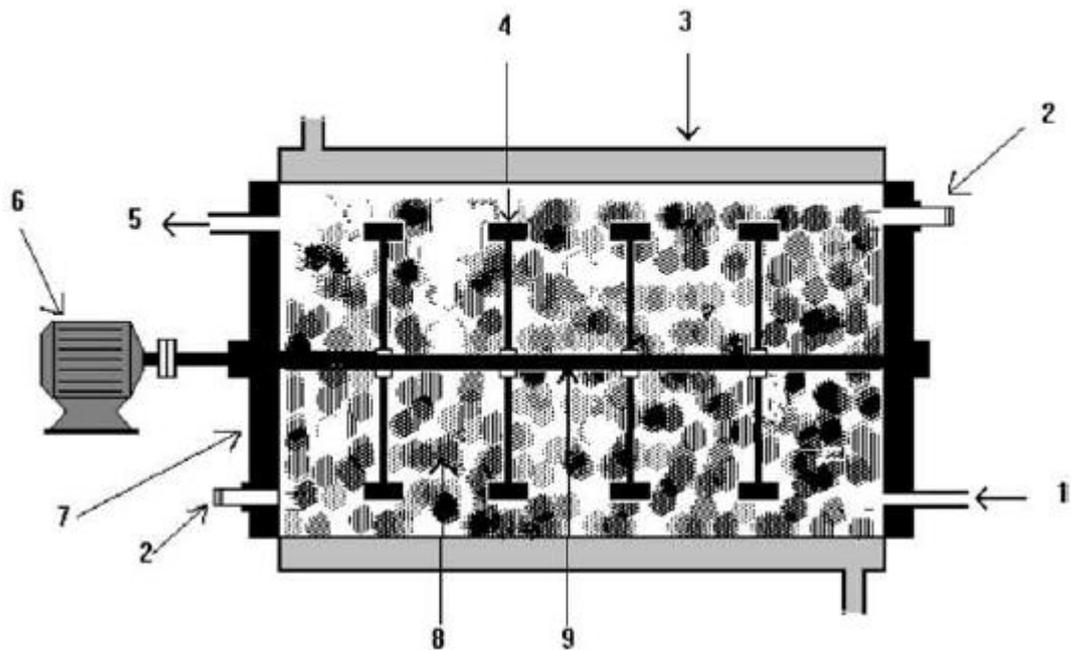


Figura 5. Esquema de tambor com pás. 1. Entrada de ar. 2. Sensor de temperatura. 3. Jaqueta de água. 4. Pás. 5. Saída de ar. 6. Motor para agitação. 7. Biorreator. 8. Meio sólido. 9. Eixo de agitação.

Fonte: Adaptado de Durand, 2003

O equipamento empregado para os experimentos, mostrado na Figura 6, possui registro de modelo de utilidade no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), sob o registro MU 891075-2 (Polidoro *et al.*, 2009), sendo constituído por biorreator tipo tambor rotativo de 5,7 L, dotado de chicanas para melhor homogeneizar o meio, sendo o tambor removível do equipamento para possibilitar sua esterilização em autoclave e inoculação em capela de fluxo laminar. Possui sistema de controle de temperatura por banho termostático, onde uma resistência elétrica mantém a temperatura da água do banho-maria que, por sua vez, transmite calor por convecção para o reator, possuindo ainda controle de rotação, permitindo variar a velocidade de rotação do tambor e o tempo que ele permanece rotacionando.

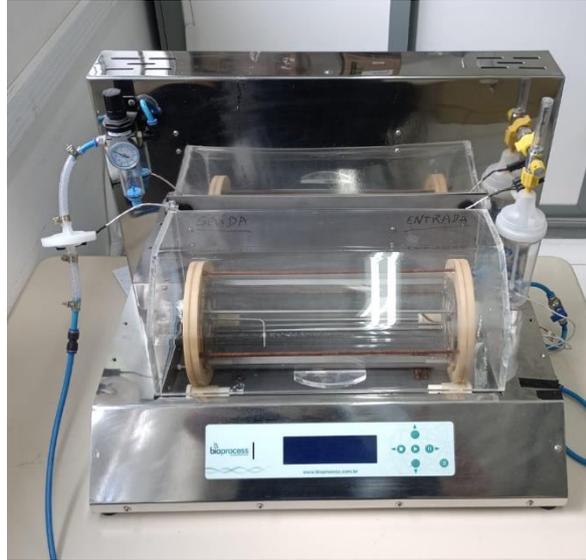


Figura 6. Biorreator utilizado neste projeto.

Fonte: O autor

3.5.1 Pulsos de pressão durante o cultivo em estado sólido

Devido à cinética de transferência de calor e de massa, com a admissão de oxigênio necessário ao microrganismo e a retirada do gás carbônico produzido, alterações na configuração do biorreator são necessárias com o aumento de escala em processos de CES. Zhang *et al.* (2003) buscaram otimizar a transferência de calor e massa durante CES em reator cilíndrico vertical de ácido inoxidável com placa perfurada na base para aeração. Para tanto, foi testado a adição de oscilação de pressão e a introdução de ar forçado através do meio sólido constituído de palha de trigo (explodida a vapor) e farelo de trigo (FT) na proporção de 9:1 (*m/m*). A aeração forçada e o aumento da pressão foram obtidos por abertura e fechamento periódico das válvulas de entrada e saída (Figura 7). A pressão foi obtida pela abertura da entrada de ar e fechamento da saída, sendo que pressão decrescia e atingia rapidamente a pressão atmosférica quando era aberta a saída de ar. Empregando a linhagem *Penicillium decumbens* JUA10, foram analisados FPA e β -glicosidases, que atingiram 15 FPU e 51 U g⁻¹

de meio seco, respectivamente, para os cultivos com presença de pulsos de pressão e 10 FPU e 24 U g⁻¹ de meio seco, respectivamente, para os cultivos controle (Zhang *et al.*, 2003).

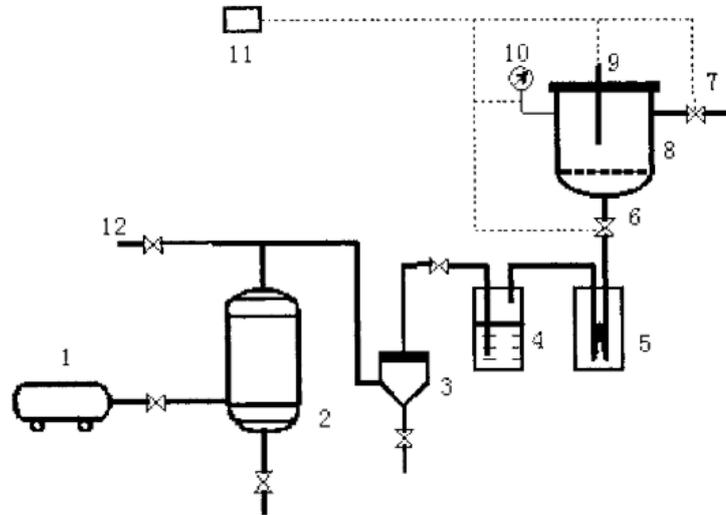


Figura 7. Diagrama birreator de 3 L para CES equipado com aerção forçada e oscilação de pressão. 1. Compressor de ar. 2. Separador de óleo. 3. Filtro de ar. 4. Humidificador de ar. 5. Dispositivo de aquecimento de ar. 6. Válvula de entrada de ar. 7. Válvula de saída de ar. 8. Biorreator. 9. Sensor de temperatura. 10. Manômetro. 11. Controlador. 12. Vapor.

Fonte: Zhang *et al.*, 2003

O uso de pulsos de pressão ou descompressão, apesar de não ser usual no cultivo de fungos, é um processo já estabelecido na indústria enológica. Na termovinificação, por exemplo, há um aquecimento da uva desengaçada a 85 °C para facilitar a extração da cor e dos compostos fenólicos. Sobre esse processo existem variantes, como a “*Flash détente*”, sistema onde a uva, após aquecimento e maceração de 30 min, é submetida a um pulso de vácuo, onde ela acaba por sofrer uma fragmentação e fragilização das estruturas celulares, facilitando a liberação dos compostos fenólicos, taninos e antocianinas. Tal fragilização se deve à vaporização e expansão instantânea da água da uva, concomitantemente ao arrefecimento das uvas até 30 °C (Escudier, 2002).

Outro processo similar é a “*Thermo-détente*”, onde neste processo, na sequência do aquecimento das uvas na termovinificação tradicional, ocorre uma compressão das mesmas em cilindros, originando uma pressão de 3 a 5 bar. Após um período de retenção sob pressão de 30 a 45 min, esses cilindros são submetidos à súbita descompressão. Os objetivos são os mesmos da “*Flash détente*”, apresentando normalmente maiores rendimentos de compostos fenólicos, antocianinas e taninos (Davaux & Oubart, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagem

A linhagem utilizada no presente trabalho, *P. ucsense* S1M29, classificada anteriormente como *P. echinulatum* (Lenz *et al.*, 2022), foi obtida a partir da linhagem 9A02S1 (Dillon *et al.*, 2011), ambas mutantes provenientes do programa de melhoramento genético da linhagem parental 2HH, isolada do trato intestinal de *Anobium punctatum* em 1979 (Carrau *et al.*, 1981). S1M29 faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

4.2 Meio de cultivo

4.2.1 Meio de manutenção da linhagem

O meio de manutenção da linhagem (MML) consiste em meio sólido que contém 1,25% (*m/v*) de celulose intumescida, 2% (*m/v*) de ágar, e 10% (*v/v*) de solução de sais de Mandels & Reese concentrada 10 vezes. Esta última inclui (*m/v*): 2% de KH_2PO_4 , 1,4% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, 0,3% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,3% de CaCl_2 , dissolvidos em água destilada e acrescidos de 0,1% (*v/v*) de solução de micronutrientes, composta por (*m/v*): 5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,56% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,48% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2% de CoCl_2 em água destilada (Dillon *et al.*, 2006).

4.2.2 Meio para produção de celulases

O meio para produção de celulases (MPC) foi formulado com diferentes concentrações de BC e FT, acrescido de solução de sais de Mandels & Reese, concentrada 20 vezes. As concentrações de BC e FT foram variadas durante os cultivos nas proporções de 50 a 80% (*m/m*) para o BC, com a massa total de sólidos fixada em 200 g para os cultivos de modo

a permitir espaço suficiente no interior do reator para agitação do meio durante as rotações, sendo adicionado 1 mL da solução de sais para cada grama de substrato seco. O meio foi autoclavado no reator de cultivo, de modo a esterilizar tanto o tambor quanto o meio, por 45 min a 121 °C e 1 atm, sendo que o inóculo consistiu em suspensão de esporos em água destilada, realizado logo após o resfriamento em capela de fluxo, utilizando a abertura da tampa lateral do reator, sendo a umidade do meio no momento da inoculação de 66%.

O BC utilizado foi proveniente da destilaria Casa Bucco (Bento Gonçalves, Brasil), sendo a cana-de-açúcar orgânica da variedade caiana. O bagaço obtido após a moagem foi seco à sombra e triturado em moinho de facas elétrico (marca Trapp®, Jaraguá do Sul, Brasil) até a granulometria desejada. O FT foi obtido em comércio local de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul.

4.3 Condições de cultivo

Para o crescimento e produção de enzimas por *P. ucsense* utilizou-se três formulações do meio MPC, baseadas nas proporções de biomassa: 50% de BC e 50% de FT; 80% de BC e 20% de FT; e 65% de BC e 35% de FT, proporções estas baseadas em cultivos preliminares no biorreator com resultados não divulgados, sendo os cultivos realizados na presença e ausência de pulsos de pressão. Portanto, existiram seis condições de cultivo, sendo os experimentos realizados em duplicata. Fixou-se uma rotação de 5 RPM por 5 min após a inoculação, para homogeneização do meio, seguida por rotações periódicas a cada 30 min, 5 RPM por 1 min, durante as primeiras 48 h, conforme testes preliminares, não publicados, no biorreator de tambor. A temperatura dos ensaios foi mantida a 30 °C.

O inóculo foi obtido do crescimento da linhagem S1M29 de *P. ucsense* em tubos inclinados contendo meio MML, durante sete dias, à 30 °C. Suspensão de esporos em água foi

preparada e inoculada em meio MPC, conforme descrito no item 4.2.2, de modo a atingir a concentração de 1×10^6 esporos g^{-1} de meio seco. A aeração para o cultivo foi definida em 1 L min^{-1} , sendo o ar injetado no reator após a passagem em filtro Acro® 50, de Politetrafluoroetileno (PTFE) com tamanho de poro de $0,2 \mu\text{m}$ (Pall Corporation, North Hempstead, EUA) e umidificado com umidificador de ar Unitec (São Paulo, Brasil), através de borbulhamento em água destilada esterilizada antes da introdução no biorreator.

Os pulsos de pressão foram produzidos utilizando sistema composto por duas válvulas solenoides, comandadas via *software*, responsáveis pelo câmbio da fonte de ar do sistema, alternando entre a aeração convencional e os pulsos de pressão. A pressão para os pulsos foi definida em 180 kPa e o tempo do reator sob pressão definido em 30 s, sendo que o reator recebeu adaptações para melhorar o sistema de vedação, as quais serão discutidas nos resultados.

A Figura 8 apresenta os dois caminhos possíveis para a alimentação de ar no reator, sendo que o ar ao sair do compressor passa por um regulador de pressão, fixado no nível de 180 kPa de pressão manométrica utilizada para os pulsos, seguindo então para o filtro. O ar filtrado então segue o fluxo de acordo com o posicionamento das válvulas, sendo a primeira possibilidade a aeração convencional, onde ele passa então por rotâmetro para controlar a vazão de ar a ser injetada no reator e então umidificado, ingressando no reator. A segunda possibilidade é quando o ar é direcionado para a criação de pulsos de pressão, onde o ar ingressa diretamente no reator, sendo realizada a alternância entre as válvulas de entrada e o fechamento da válvula de saída do reator durante os 30 s de duração do pulso, sendo novamente aberta a válvula de saída ao final do pulso e reestabelecido a via da aeração convencional.

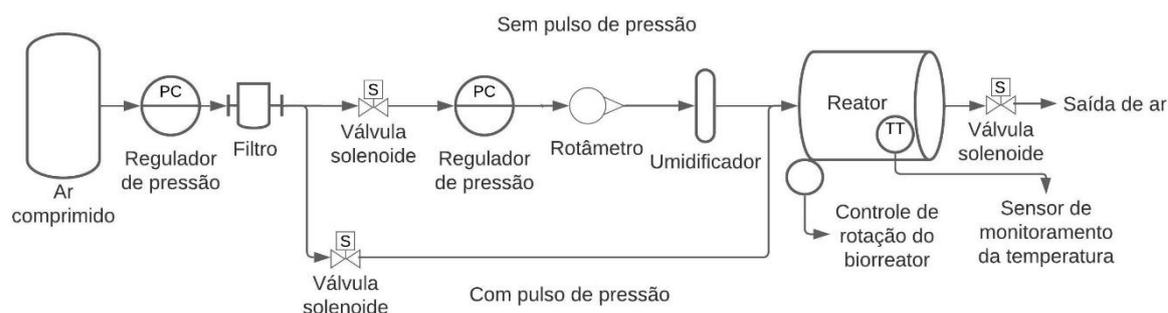


Figura 8. Ilustração do sistema de aeração do reator.

Fonte: O autor

O *software* para comando das válvulas e aquisição de dados foi desenvolvido por mim como parte deste projeto, sendo programado em Python, estando disponível em anexo, utilizando um microcontrolador Arduino (Ivrea, Itália), modelo Leonardo, para interface. O sistema foi responsável pela aquisição de dados de temperatura, estando o sensor de temperatura tipo PT100 localizado no interior do biorreator, próximo a linha do eixo e deslocado para o lado da saída de ar, sendo o sensor fixo da tampa do biorreator, sendo as leituras de temperatura realizadas a cada 10 s durante os períodos de aeração e 05 s durante os pulsos de pressão. O *software* também realizou o controle da agitação do biorreator, acionando a rotação do tambor no tempo previsto e o acionamento das válvulas para alternância entre aeração convencional e pulsos de pressão.

O tempo de cultivo foi definido como 108 h, quando ocorreram as coletas para a determinação das atividades enzimáticas, baseado em trabalhos do grupo de pesquisa com o mesmo microrganismo (Menegol *et al.*, 2017; Basso *et al.*, 2014; Camassola & Dillon, 2010; Scholl *et al.*, 2015). A agitação foi realizada durante as primeiras 48 h, período em que o fungo apresenta menor crescimento e menor chance de danificar o micélio pela agitação, e

permanecendo estáticos nas 60 h restantes. Os pulsos de pressão foram aplicados apenas a partir de 48 h, quando já existia a produção de calor pela massa fúngica.

4.4 Determinação das atividades enzimáticas

4.4.1 Extração enzimática e determinação da umidade

O meio após o cultivo (massa úmida) foi congelado para armazenagem até o final do experimento. Para a extração das enzimas o meio foi descongelado, sob refrigeração, e a extração da enzima ocorreu em frascos Erlenmeyer (250 mL), em duplicata, sendo adicionado 8 g da massa úmida homogeneizada, 30 mL de água destilada e 51 mL de tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,8. O meio permaneceu em repouso por 12 h e foi agitado em agitador recíproco por 30 min, sendo o sobrenadante centrifugado. Para a determinação da umidade 1,5 g de amostra foram secas em estufa a $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$, até massa constante, e calculada a umidade pela diferença da massa inicial e final, que corresponde a água evaporada.

4.4.2 Determinação da atividade total de celulases

Para a determinação da atividade total das celulases utilizou-se o ensaio de FPA, adaptada à partir da metodologia desenvolvida por Mandels *et al* (1976) (Camassola & Dillon, 2012). As reações foram conduzidas em placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL), onde foram adicionados 50 μL do extrato enzimático diluído 5 vezes e 100 μL de tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,8. Essa mistura foi incubada a $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, para ambientação e, então, feita a adição de 5 mg de papel filtro Whatman n° 1, em tiras de 1 cm x 0,6 cm. As microplacas permaneceram incubadas por 60 min para a reação enzimática.

A interrupção da reação foi realizada com a adição de 300 µL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), seguida de incubação a 100 °C por 5 min para ocorrência da reação. Após o resfriamento, 100 µL da reação foi adicionado em microplacas contendo 200 µL de água destilada, sendo analisada a absorbância em espectrofotômetro ($\lambda=545$ nm). A atividade enzimática foi quantificada utilizando curva padrão de glicose de 0-2 mg mL⁻¹ (Miller, 1959). As amostras foram analisadas em triplicata e utilizaram a Equação 1 para a quantificação da atividade enzimática, onde na equação a e b são coeficientes da equação da reta e FD o fator de diluição.

$$UI = \left(\frac{abs-a}{b} \right) \cdot FD \cdot 0,185 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

Equação 1: Determinação de atividade de celulases totais.

4.4.3 Determinação de endoglicanases

A atividade enzimática das endoglicanases foi determinada em placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL), onde foram adicionados 2 µL do extrato enzimático diluído 20 vezes e 48 µL de tampão citrato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,8. Após ambientação a 50 °C por 10 min foi adicionado 50 µL de solução de carboximetilcelulose 2% (m/v), diluída no mesmo tampão. A reação enzimática foi realizada a 50 °C por 30 min, com interrupção pela adição de DNS, tal como consta no item 4.4.1 A absorbância das amostras foi analisada em espectrofotômetro ($\lambda=545$ nm) e a atividade enzimática determinada por regressão linear utilizando curva padrão de glicose idêntica ao item anterior (Ghose, 1987; Miller, 1959). A equação utilizada para determinação da atividade enzimática é apresentada na Equação 2, onde a e b são os coeficientes da equação da reta e FD o fator de diluição.

$$UI = \left(\frac{abs-a}{b} \right) \cdot FD \cdot 0,185 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

Equação 2: Determinação de atividade de endoglicanases.

4.4.4 Determinação de β -glicosidases

Para a determinação da atividade enzimática das β -glicosidases, utilizou-se como substrato o p -nitrofenil- β -D- glicopiranosídeo. Mistura contendo 90 μ L do substrato (4 mg mL⁻¹ em tampão citrato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,8) e 10 μ L do extrato enzimático diluído 5 vezes foi incubada por 30 min a 50 °C, em microplaca de 96 poços, com a reação interrompida pela adição de 200 μ L de solução de carbonato de sódio a 10% (m/v) e a absorbância das amostras medida em espectrofotômetro ($\lambda=405$ nm). A determinação da atividade enzimática das β -glicosidases presentes no extrato foi feita por regressão linear utilizando o p -nitrofenol para a construção da curva padrão, com concentração de 0-2 mmol L⁻¹ (Ahmed *et al.*, 2018). A Equação 3 foi utilizada para determinação da atividade enzimática, sendo os valores a e b os coeficientes da reta, FD o fator de diluição, V_R o volume da reação, t o tempo da reação e V_E o volume da enzima.

$$UI = \frac{\left(\frac{abs-a}{b} \right) \cdot FD \cdot V_R}{t \cdot V_E} \text{ mmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

Equação 3: Determinação de atividade de β -glicosidases.

4.4.5 Determinação de xilanases

O ensaio para a determinação da atividade enzimática das xilanases foi realizado em placas de polipropileno de 96 poços (com volume individual de 1,5 mL) contendo 10 μ L da solução enzimática diluída 5 vezes e 90 μ L de solução de xilana a 1% (m/v), preparada em tampão citrato de sódio 0,05 mol L⁻¹, pH 4,8. A mistura foi incubada a 50 °C por 5 min, sendo

interrompida com adição de DNS conforme o item 4.4.1 (Bailey *et al.*, 1992; Miller, 1959). A absorbância das amostras foi analisada em espectrofotômetro ($\lambda=545$ nm) e a atividade enzimática determinada por regressão linear utilizando curva padrão de xilose (0-10 mmol L⁻¹) e utilizando a Equação 4, sendo os valores a e b os coeficientes da reta e FD o fator de diluição.

$$UI = \frac{\left(\frac{abs-a}{b}\right).FD}{5} \cdot 10 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$$

Equação 4: Determinação de atividade de xilanases.

4.5 Análise estatística dos resultados

Os dados dos cultivos para as atividades enzimáticas foram representados em gráficos de barra com a visualização do desvio padrão e utilização do teste *t* de Student, para a comparação entre os tratamentos, para um nível de significância $p<0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho constitui-se nos primeiros dados de produção de celulasas em biorreator de tambor rotativo, com uma linhagem de *P. ucsense*, onde até então os cultivos sólidos com esta espécie haviam sido realizados apenas em tubos de cilíndricos de base plana (12 X 3 cm), vidro, contendo 2 g de substrato seco, umedecido com meio de sais para 67% umidade, como descrito em Dillon *et al* (2006), Camassola & Dillon (2007) e Dillon *et al* (2008).

Para o desenvolvimento do trabalho, o biorreator utilizado corresponde ao modelo de utilidade UM 8901075-2. Este passou por modificações na sua estrutura física, de modo a permitir a aplicação dos pulsos de pressão, além da construção de sistema de monitoramento e registro da temperatura do cultivo. O sistema de monitoramento foi necessário para o

acompanhamento das variações de temperatura durante os pulsos de pressão, de modo a obter o perfil de como ocorre a variação da temperatura durante a ocorrência do pulso.

Para avaliar a influência da aplicação de pulsos de pressão e seus efeitos na produção de enzimas do complexo das celulasas e xilanases, em biorreator de cultivo sólido, foram realizados ensaios com o meio formulado com as diferentes proporções de BC e FT descritas no item 4.2.2.

5.1 Adaptações no biorreator e desenvolvimento de *software* de monitoramento

O modelo de biorreator utilizado tem o corpo do cilindro rotativo de vidro, com as tampas laterais confeccionadas em polímero autoclavável. No centro das tampas, como pode ser observado na Figura 9 e na Figura 10, estão situadas as ligações para a alimentação de ar e a conexão do sensor de temperatura, sendo na Figura 9 apresentado o sistema antigo, onde havia apenas o encaixe de vedação do eixo no disco da lateral do biorreator. Na Figura 10 verifica-se a modificação realizada, onde foi adicionado um retentor de modo a evitar a fuga de ar pelo eixo do biorreator quando na presença de pulsos de pressão. Ainda é possível visualizar na Figura 10 o sensor de temperatura do tipo PT100, localizado no último quarto do reator, para o lado da saída de ar. Além do retentor foi desenvolvido um sistema de trava para o eixo, que utiliza uma chaveta fixada na parte interna, como visto na Figura 11, que no momento do pulso de pressão impede que o eixo seja desludado da posição.

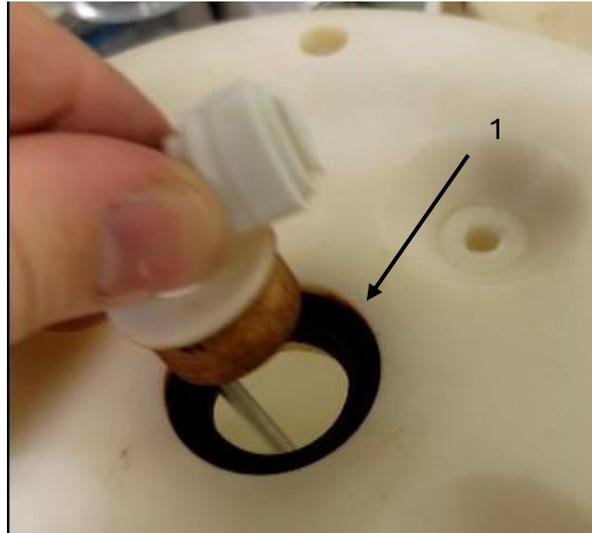


Figura 9. Eixo do biorreator antes da modificação. 1. Rolamento do eixo do biorreator.

Fonte: O autor

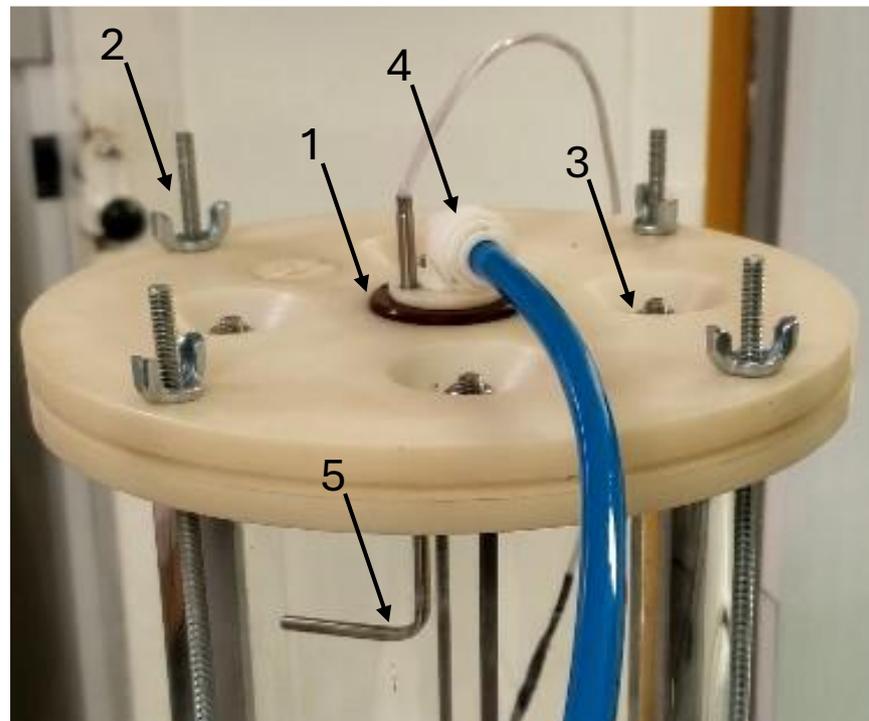


Figura 10. Eixo do biorreator após as modificações de vedação. 1. Retentor para vedação do eixo do biorreator. 2. Sistema de fechamento atualizado, pela parte externa do biorreator. 3. Parafusos selando o antigo sistema de fechamento do biorreator. 4. Sistema de aeração do biorreator. 5. Sensor de temperatura do tipo PT100.

Fonte: O autor

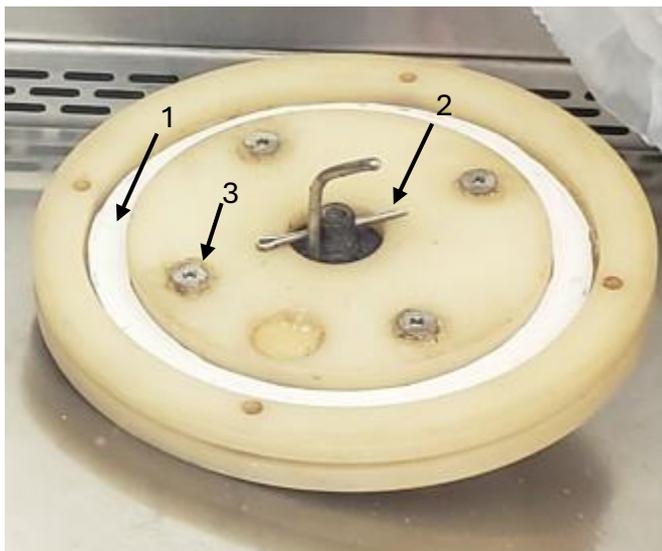


Figura 11. Vedação interna biorreator com manta de silicone e chave de fenda no eixo do biorreator. 1. Manta de silicone para vedação do vidro/corpo do biorreator. 2. Chave de fenda para fixação do eixo do biorreator nos momentos dos pulsos de pressão. 3. Vedação do sistema antigo de fechamento do biorreator.

Fonte: O autor

O fechamento do corpo cilíndrico em vidro do biorreator com as tampas laterais foi modificado como pode ser visto na Figura 12 e na Figura 11. Na Figura 12, verifica-se o sistema antigo de vedação do biorreator, onde existe um anel tipo *O-ring* para realizar a vedação do corpo de vidro do biorreator junto a tampa. Esse anel não apresentava vedação suficiente, sendo que mesmo sem a presença de pulsos de pressão, apenas aeração convencional, havia fuga de ar neste local, como pode ser visto na Figura 12. Vedação interna por *O-ring* do biorreator. 1. Anel tipo *O-ring* para fechamento do biorreator (antigo sistema). 2. Bolhas de ar com biorreator submerso e submetido a aeração. 3. Sistema antigo de fechamento do biorreator.

Fonte: O autor, no lado esquerdo do reator, onde vemos bolhas de ar com o reator submerso e submetido a aeração convencional. O fechamento era realizado por meio de parafusos que fixavam a parte interna do biorreator (conjunto metálico dotada de chicanas) as tampas, pressionando-as contra o corpo de vidro e sustentando o conjunto interno.



Figura 12. Vedação interna por *O-ring* do biorreator. 1. Anel tipo *O-ring* para fechamento do biorreator (antigo sistema). 2. Bolhas de ar com biorreator submerso e submetido a aeração. 3. Sistema antigo de fechamento do biorreator.

Fonte: O autor

Na Figura 11 verifica-se o novo sistema de vedação do biorreator, que utiliza uma manta de silicone cortada em forma de anel, abrangendo todo o rebaixe da tampa do biorreator de modo a permitir que ela vede completamente junto ao corpo cilíndrico de vidro. Também pode ser observado que os antigos orifícios de fechamento, na parte interna da tampa, foram fechados e selados. Na Figura 10 é possível observar o novo sistema de fechamento do biorreator, onde foram utilizadas barras do comprimento do biorreator para permitir que o fechamento seja num sistema de compressão das tampas contra o corpo do biorreator.

Também houve a adição de válvulas solenoides para o controle do fluxo de ar conforme a Figura 8, sistema para regular a pressão de entrada de ar no reator e troca do sensor de temperatura que estava com os cabos danificados.

Para o monitoramento das temperaturas durante o cultivo, rotação do biorreator e realização dos pulsos de pressão de forma controlada e padronizada foi desenvolvido um *software* para controle desses processos, que é apresentado no anexo 1. Esse *software* realiza a leitura da temperatura no interior do biorreator a cada 10 s, controla o sistema de rotação para que ele seja desligado após 48 h de cultivo e a partir de 48 h de cultivo realizada um pulso de pressão de 30 s a cada 30 min, reduzindo o intervalo de leitura da temperatura para 5 s durante a ocorrência do pulso de pressão.

5.2 Caracterização das matérias primas

Para a caracterização do BC foram avaliados os teores de celulose, hemicelulose, lignina, extraíveis e cinzas. Os dados são apresentados na Tabela 1, condizentes aos citados em literatura (Vivian *et al.*, 2022; Rezende *et al.*, 2011; Pessoa *et al.*, 1998). Enquanto o teor de celulose fica bastante próximo ao citado para BC in natura, parte da hemicelulose pode ter sido degradada durante o armazenamento, pois o bagaço úmido sofreu fermentação natural durante o processo de secagem, o que pode também explicar o valor ligeiramente mais alto de extraíveis obtido no presente trabalho. Os teores mais baixos de cinzas observados no presente trabalho podem ser devidos ao BC ser oriundo de uma pequena destilaria, onde o processamento é realizado de forma diferente, reduzindo drasticamente as impurezas como poeira, solo e outras partículas oriundas do processo de colheita e transporte.

Tabela 1. Composição lignocelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.

Componente	Porcentagem (%)
Celulose	32,9
Hemicelulose	17,5
Lignina	18,1
Extraíveis	26,1
Cinzas	0,9

Fonte: O autor

A análise granulométrica foi realizada tanto para o BC quanto para o FT, utilizando peneiras de tecido metálico com as seguintes malhas: 1,7 mm, 1,18 mm, 600 μm , 250 μm , 125 μm e fundo. As peneiras utilizadas são de marca Didática SP (Guarulhos, Brasil) e o agitador eletromagnético marca Bertel (Caieiras, Brasil). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela Tabela 2 para o BC e na Tabela Tabela 3 para o FT.

Tabela 2. Análise granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar.

Dimensão da malha	Porcentagem (%)
1,7 mm	33
1,18 mm	3
600 μm	20
250 μm	32
125 μm	8
Passante/Fundo	4

Fonte: O autor

Tabela 3. Análise granulométrica do farelo de trigo.

Dimensão da malha (mm)	Porcentagem (%)
1,7 mm	6
1,18 mm	11
600 μm	35
250 μm	32
125 μm	15
Passante/Fundo	1

Fonte: O autor

Essa distribuição fica dentro do esperado para os substratos, sendo a distribuição do FT mais homogênea, principalmente devido ao fato do mesmo ser processado industrialmente e o BC como foi processado apenas em moinho, sem etapas posteriores de peneiramento e reprocessamento de algumas frações, tem sua granulometria mais variada. Para os cultivos essa variação não possui implicações grandes, pois apesar da variação dentro das distribuições das peneiras, a granulometria geral é similar. Também é positivo a parcela mais grossa do BC pois ajuda na estruturação do meio para o CES.

5.3 Atividade de celulases totais

A partir de amostras extraídas dos cultivos sólidos (Figura 13) verifica-se que, embora não tenha existido significâncias estatísticas, que as médias das atividades enzimáticas das amostras, após 108 h de cultivo, foram superiores nos ensaios onde ocorreram pulsos de pressão nas condições 4 em relação a 1 (50 BC: 50 FT) e 5 em relação a 2(80 BC: 20 FT). Para as condições 3 e 6 (65 BC: 35 FT), verifica-se que aparentemente não houve alteração nos valores médios de FPA, quando da aplicação de pulsos de pressão.

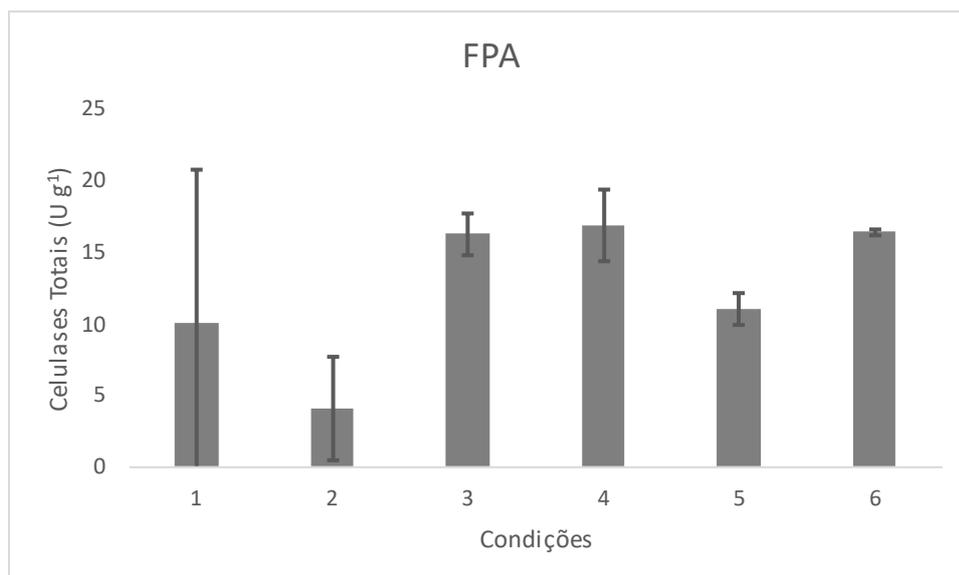


Figura 13. Atividades enzimáticas sobre papel de filtro obtidas em biorreator de cultivo sólido, com ou sem pulsos de pressão, a partir da linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Condições 1 (50 BC: 50 FT), 2 (80 BC: 20 FT) e 3 (65 BC: 35 FT) realizadas sem pulsos de pressão. Condições 4 (50 BC: 50 FT), 5 (80 BC: 20 FT) e 6 (65 BC: 35 FT), realizadas com pulsos de pressão. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo, U g⁻¹: unidade grama de matéria seca. As condições 1x4, 2x5, 3x6 não diferiram entre si pelo teste de Student a 5%.

Em relação a influência das combinações das fontes de carbono sobre a FPA, verifica-se que as condições 2 e 5 (80 BC: 20 FT), com menor proporção de FT, apresentaram os menores valores médios de FPA, independente da presença de pulsos de pressão, sugerindo a importância do FT para a produção enzimática possivelmente como consequência do desenvolvimento fúngico.

Comparando a condição 1 (50 BC: 50 FT) e a condição 3 (65 BC: 35 FT), ambas sem pulso de pressão, é possível verificar que a condição 3 apresenta maior valor médio de FPA que a condição 1, embora sem significância estatística, mas podendo sugerir que há um valor limite para o benefício do FT para o crescimento do fungo e produção de enzimas. Comparando os resultados de FPA das condições 4 (50 BC: 50 FT) e 6 (65 BC: 35 FT), onde estiveram presentes os pulsos de pressão, com os valores de FPA das condições 1 (50 BC: 50 FT) e 3 (65 BC: 35 FT), podemos verificar que os valores de FPA para 4 e 6 ficaram mais próximos,

sugerindo que a menor atividade para a condição 1 pode ser resultante de maior compactação do meio de cultivo.

Essa compactação pode ser devida ao maior teor de FT, pela distribuição granulométrica com partículas menores do FT e pela presença de amido, que contribui para essa compactação sendo esse efeito possivelmente reduzido pela presença do pulso de pressão na condição 4. Já a menor diferença entre as médias de FPA entre as condições 3 e 6 (65 BC: 35 FT) pode ser justificada por um balanço mais adequado entre FT e BC, levando a um meio com baixa compactação que favoreceu o crescimento do fungo mesmo na ausência de pulso de pressão. A Tabela 4 apresenta os resultados para FPU para melhor comparação.

Tabela 4. Atividade de FPU obtidas no estudo.

Condição	FPU g ⁻¹ de massa seca
1 (50 BC: 50 FT) sem pulso de pressão	10,1
2 (80 BC: 20 FT) sem pulso de pressão	4,1
3 (65 BC: 35 FT) sem pulso de pressão	16,3
4 (50 BC: 50 FT) com pulso de pressão	16,9
5 (80 BC: 20 FT) com pulso de pressão	11,0
6 (65 BC: 35 FT) com pulso de pressão	16,5

Fonte: O autor

O valor de 17 FPU g⁻¹ de massa seca, maior média de FPA desde estudo, obtida na condição 4, é inferior aos 20 FPU g⁻¹ de massa seca obtidos por Dillon *et al* em 2006, em CES com FT, com o mutante 9A02D1 de *P. ucsense*, e inferiores aos 33 FPU g⁻¹ de massa seca obtidos por Camassola e Dillon em 2007, em CES contendo BC e FT (1:1), com o mutante 9A02 de *P. ucsense*. Entretanto, a atividade enzimática obtida nesse trabalho foi superior aos 10 FPU g⁻¹ de massa seca obtidos por Dillon *et al* 2008, com FT como fonte de carbono,

empregando a linhagem BP2, um produto de fusão de protoplastos entre *P. ucsense* e *T. harzianum*.

Os menores valores de FPU g⁻¹ de massa seca, comparativamente aos dados de Dillon *et al*, (2006) e de Camassola & Dillon (2007), podem ser devidos ao sistema de cultivo empregado, pois a linhagem S1M29 foi avaliada inicialmente para a produção enzimática em CSm e não em CES. Ainda assim, os dados do presente trabalho corroboram a existência de grande potencial do emprego de linhagens de *P. ucsense* para a produção de enzimas celulolíticas, visto que os CES desde trabalho foram realizados com biorreator de tambor rotativo e uma quantidade de sólidos de mais de 500 vezes a utilizada por Dillon *et al*, (2006) e Camassola e Dillon (2007), deixando ainda espaço para otimizações neste sistema de cultivo para elevar a produção enzimática.

Quando os resultados do presente trabalho são comparados com dados publicados por diferentes pesquisadores, tanto CES quanto CSm, observamos o potencial das linhagens de *P. ucsense* para a produção de celulasas, já que a FPU obtida neste trabalho está próxima as obtidas anteriormente, como visto na Tabela 5.

Tabela 5. Estudos de produção de celulasas em cultivos sólidos

Microrganismo	Fontes de carbono	FPU g ⁻¹	Referências
S1M29 <i>P. ucsense</i>	BC e FT (50:50)	17	Presente trabalho
9A02S1 <i>P. ucsense</i>	FT	20	Dillon <i>et al</i> (2006)
9A02S1 <i>P. ucsense</i>	BC e FT (50:50)	32,89	Camassola e Dillon (2007)
BP2 fusionante de <i>P. ucsense</i> e <i>T. harzianum</i>	FT	10	Dillon <i>et al</i> (2008)
CCM F-470 <i>T. harzianum</i>	BC e FT (80:20)	20	Roussos <i>et al</i> (1991)

<i>T. harzianum</i>	PT e FT (80:20)	18	Deschamps <i>et al</i> (1985)
<i>P. decumbens</i>	PT e FT (90:10)	15,2	Mo <i>et al</i> (2004)
ATCC 26921 <i>T. reesei</i>	CS	4	Brijwani e Vadlani (2011)
MCG77 <i>T. reesei</i>	FT	2,3	Latifan <i>et al</i> (2007)
Rut C-30 <i>T. reesei</i>	PM	13	Oberoi <i>et al</i> (2008)
QM9414 <i>T. reesei</i>	FA	11,6 2,3	Salimi e Hamidi-Esfahani (2009)
CECT 2414 <i>T. reesei</i>	FA, CA e PA (1:1:1)	1,4	Darabzad <i>et al</i> (2018)

BC (bagaço de cana-de-açúcar); FT (farelo de trigo); PT (palha de trigo); CS (casca de soja); FA (farelo de arroz); CA (casca de arroz); PA (palha de arroz); PM (polpa de mandarina) Fonte: O autor

Diferentes pontos não foram avaliados pela impossibilidade de retirar amostras durante o cultivo com este modelo de biorreator, visto que as condições internas de temperatura seriam alteradas, prejudicando os estudos para o efeito da indução de pressão e descompressão.

5.4 Atividade de endoglicanases

Tal como para FPA, a análise dos dados de atividade de endoglicanases (Figura 14), embora tenham ocorrido grandes desvios nos tratamentos, também sugere uma influência positiva do uso de pulsos de pressão aplicados ao biorreator, visto que as médias das atividades de endoglicanases foram superiores nos cultivos de mesma composição de substrato. O destaque fica para a comparação entre o valor das médias das condições 1 e 4 (50 BC: 50 FT), e 2 e 5 (80 BC: 20 FT). AS condições 3 e 6 (65 BC: 35 FT) apresentaram valores médios semelhantes.

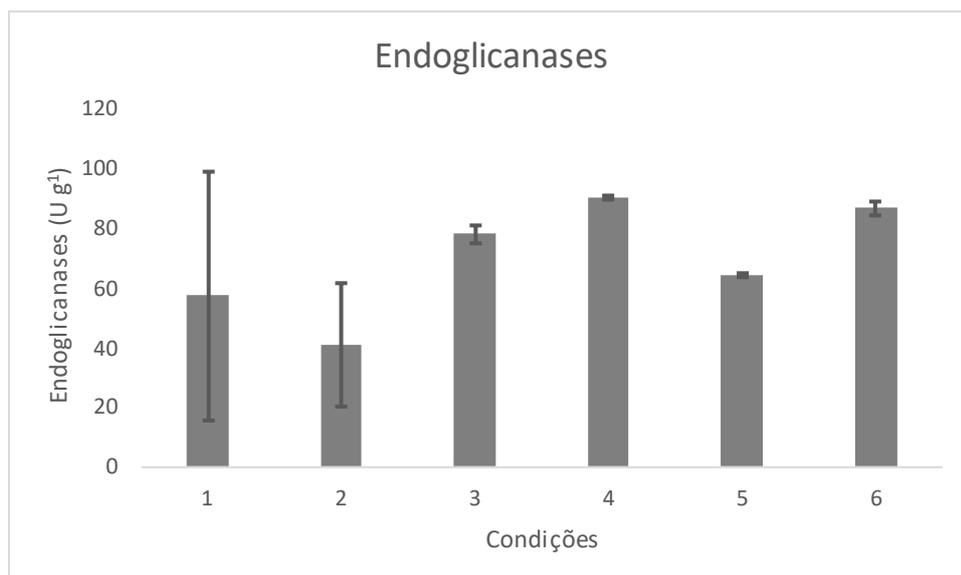


Figura 14. Atividades enzimática de endoglicanases obtida em biorreator de cultivo sólido, com ou sem pulsos de pressão, a partir da linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Condições 1 (50 BC: 50 FT), 2 (80 BC: 20 FT) e 3 (65 BC: 35 FT) realizadas sem pulsos de pressão. Condições 4 (50 BC: 50 FT), 5 (80 BC: 20 FT) e 6 (65 BC: 35 FT), realizadas com pulsos de pressão. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo, U g⁻¹: unidade grama de matéria seca. As condições 1x4, 2x5, 3x6 não diferirem entre si pelo teste de Student a 5%.

Embora sem diferenças estatísticas, nota-se comparando as médias da condição 1 (50 BC: 50 FT) e condição 3 (65 BC: 35 FT), ambas sem pulso de pressão, que a condição 3, de menor proporção de FT, apresenta maior valor médio de endoglicanases, reforçando a ideia de que exista um valor limite de concentração do FT para que exista um benefício à atividade enzimática em cultivos sem pulsos de pressão. Já comparando as condições 4 (50 BC: 50 FT) e 6 (65 BC: 35 FT), mesmas proporções de BC e FT das condições 1 e 3, mas com presença de pulsos de pressão, verifica-se que as médias de endoglicanases ficaram mais próximas, sugerindo que as médias mais baixas da condição 1 podem ser devidos a maior compactação do meio, pelo maior teor de FT, sendo esse efeito reduzido pela presença do pulso de pressão na condição 4.

As condições 2 e 5 (80 BC: 20 FT), com menor proporção de FT, apresentaram os menores valores médios de endoglicanases, independente da presença de pulsos de pressão,

apoiando a sugestão da importância do FT para o desenvolvimento do fungo. Essa suposição fica mais evidente quando comparados os resultados obtidos para as condições com presença de pulsos de pressão, onde os cultivos 4 e 6, com maiores teores de FT, mostraram-se estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação ao cultivo 5, com menor teor de FT. Os resultados podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade de endoglicanases obtidas no estudo.

Condição	U g ⁻¹ de massa seca
1 (50 BC: 50 FT) sem pulso de pressão	57,4
2 (80 BC: 20 FT) sem pulso de pressão	40,9
3 (65 BC: 35 FT) sem pulso de pressão	78,2
4 (50 BC: 50 FT) com pulso de pressão	90,6
5 (80 BC: 20 FT) com pulso de pressão	64,6
6 (65 BC: 35 FT) com pulso de pressão	87,0

Fonte: O autor

Quando os resultados de atividade de endoglicanases obtidos nesse trabalho, de 91 U g⁻¹ de massa seca, são comparados com os valores apresentados na literatura, como visto na Tabela 7, observamos que as atividades enzimáticas são mais baixas em relação aos 198 g⁻¹ de massa seca obtidas por Deschamps *et al* (1985), e as 282 U g⁻¹ de massa seca obtidas por Camassola & Dillon (2007), resultado esse obtido com outra cepa do mesmo microrganismo. Ainda assim, a atividade de endoglicanases ainda ficou superior ou similar a obtida por outros pesquisadores, como as 45 U g⁻¹ de massa seca obtidas por Brijwani & Vadlani (2011) ou as 17 U g⁻¹ de massa seca obtidas por Oberoi *et al* (2008).

Tabela 7. Estudos de produção de endoglicanases em cultivos sólidos

Microrganismo	Fontes de carbono	U g ⁻¹	Referências
S1M29 <i>P. ucsense</i>	BC e FT (50:50)	91	Presente trabalho
9A02S1 <i>P. ucsense</i>	BC e FT (50:50)	282	Camassola e Dillon (2007)
CCM F-470 <i>T. harzianum</i>	BC e FT (80:20)	60	Roussos <i>et al</i> (1991)
<i>Aspergillus</i> sp. IN5	Resíduos de soja	3	Boodaeng <i>et al</i> (2024)
<i>T. harzianum</i>	PT e FT (80:20)	198	Deschamps <i>et al</i> (1985)
ATCC 26921 <i>T. reesei</i>	CS	45	Brijwani e Vadlani (2011)
Rut C-30 <i>T. reesei</i>	PM	17	Oberoi <i>et al</i> (2008)
QM9414 <i>T. reesei</i>	FA	20 e 94	Salimi e Hamidi-Esfahani (2009)

BC (bagaço de cana-de-açúcar); FT (farelo de trigo); PT (palha de trigo), CS (casca de soja); FA (farelo de arroz); CA (casca de arroz); PA (palha de arroz); PM (polpa de mandarina) Fonte: O autor

5.5 Atividade de β -glicosidases

Para a atividade das β -glicosidases (Figura 15) verifica-se a existência de influência positiva dos pulsos de pressão para a produção da enzima ($p < 0,05$), quando comparados os cultivos com as mesmas proporções de BC e FT (1x4, 2x5 e 3x6), tal qual foi sugerido quando da comparação das médias nos cultivos de celulases totais (FPA) e endoglicanases.

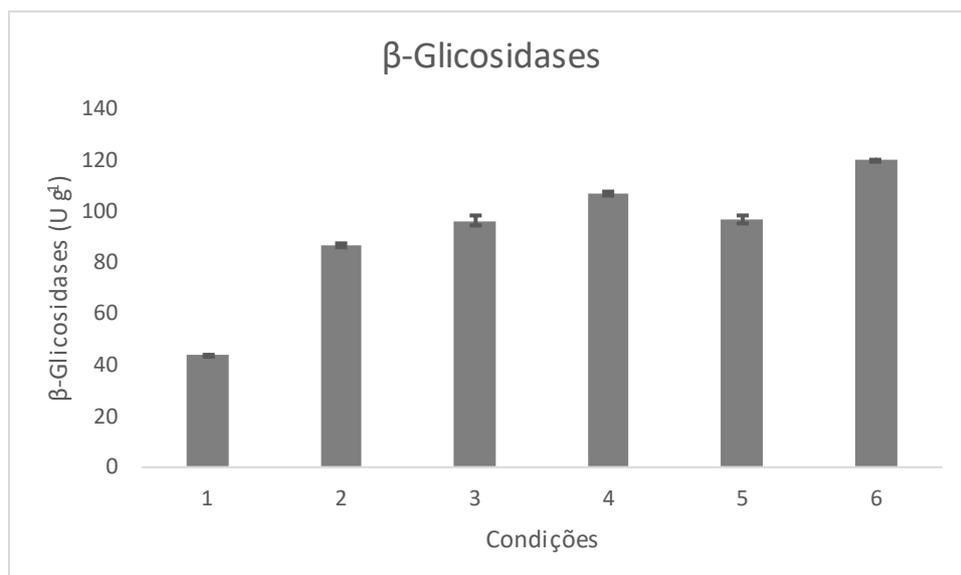


Figura 15. Atividades enzimática de β -glicosidases obtida em biorreator de cultivo sólido, com ou sem pulsos de pressão, a partir da linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Condições 1 (50 BC: 50 FT), 2 (80 BC: 20 FT) e 3 (65 BC: 35 FT) realizadas sem pulsos de pressão. Condições 4 (50 BC: 50 FT), 5 (80 BC: 20 FT) e 6 (65 BC: 35 FT), realizadas com pulsos de pressão. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo, U g⁻¹: unidade grama de matéria seca. As condições 1x4, 2x5, 3x6 diferirem entre si pelo teste de Student a 5%.

O aumento de atividade mais expressivo em decorrência da presença dos pulsos de pressão é observado para as condições 1 e 4 (50 BC: 50 FT), condição com maior proporção de FT. Para essas condições, tanto a atividade de celulases totais quando a de endoglicanases, como visto anteriormente, haviam sugerido que o mais alto teor de FT promovia uma compactação do meio, podendo aparentemente os pulsos de pressão reverter esse efeito de compactação, como também pode estar ocorrendo para β -glicosidases, resultando em maiores atividades enzimáticas.

Já as condições 2 e 5 (80 BC: 20 FT), com menor proporção de FT, apresentaram menor variação entre os cultivos com presença e ausência de pulsos de pressão, sugerindo que para proporções baixas de FT, para as β -glicosidases, a influência dos pulsos de pressão é reduzida. Para as condições 3 e 6 (65 BC: 35 FT) observamos um aumento nos valores de β -glicosidases no cultivo com presença de pulso de pressão, sendo o cultivo 6 o que apresentou a maior

produção enzimática ($p < 0,05$), 121 U g⁻¹ de massa seca. As atividades enzimáticas para todos os ensaios podem ver vistos na Tabela 8.

Tabela 8. Atividade de β -glicosidases obtidas no estudo.

Condição	U g ⁻¹ de massa seca
1 (50 BC: 50 FT) sem pulso de pressão	44,3
2 (80 BC: 20 FT) sem pulso de pressão	87,1
3 (65 BC: 35 FT) sem pulso de pressão	96,5
4 (50 BC: 50 FT) com pulso de pressão	107,0
5 (80 BC: 20 FT) com pulso de pressão	97,1
6 (65 BC: 35 FT) com pulso de pressão	120,6

Fonte: O autor

Quando comparados os resultados obtidos com os valores da literatura, conforme apresentado na Tabela 9, vemos que a atividade de β -glicosidases foi superior aos valores da literatura para a maioria dos cultivos.

Tabela 9. Estudos de produção de β -glicosidases em cultivos sólidos

Microorganismo	Fontes de carbono	U g ⁻¹	Referências
S1M29 <i>P. ucsense</i>	BC e FT (50:50)	121	Presente trabalho
<i>Aspergillus</i> sp. IN5	Resíduos de soja	196	Boodaeng <i>et al</i> (2024)
9A02S1 <i>P. ucsense</i>	FT	22	Dillon <i>et al</i> (2006)
9A02S1 <i>P. ucsense</i>	BC e FT (50:50)	59	Camassola e Dillon (2007)
BP2 Fusionante de <i>P. ucsense</i> e <i>T. harzianum</i>	FT	42	Dillon <i>et al</i> (2008)

<i>T. harzianum</i>	PT e FT (80:20)	18	Deschamps <i>et al</i> (1985)
<i>P. decumbens</i>	PT e FT (90:10)	51	Mo <i>et al</i> (2004)
ATCC 26921 <i>T. reesei</i>	CS	1	Brijwani e Vadlani (2011)
Rut C-30 <i>T. reesei</i>	PM	1	Oberoi <i>et al</i> (2008)

BC (bagaço de cana-de-açúcar); FT (farelo de trigo); PT (palha de trigo), CS (casca de soja); FA (farelo de arroz); CA (casca de arroz); PA (palha de arroz); PM (polpa de mandarina). Fonte: O autor

Para a condição 1 (50 BC: 50 FT), sem pulsos de pressão, temos uma atividade de 44 U g⁻¹, resultado próximo aos valores encontrados na literatura, enquanto os demais resultados se apresentam superiores, atingindo até os 121 U g⁻¹ de massa seca da condição 6. Importante salientar a grande diferença entre as massas empregadas nos meios de produção entre os trabalhos, pois todos apresentaram menos de 18 g de meio úmido, enquanto o presente trabalho realizou-se com 200 g de meio seco.

5.6 Atividade de xilanases

Os dados de atividade enzimática das xilanases (Figura 16) sugerem que não houve alteração devido aos pulsos de pressão nos cultivos. Comparando as condições 1 e 4 (50 BC: 50 FT) as médias de atividade enzimática ficaram muito próximas, para as condições 2 e 5 (80 BC: 20 FT) houve aumento da média de atividade, enquanto para as condições 3 e 6 (65 BC: 35 FT) houve redução da média de atividade de xilanases.

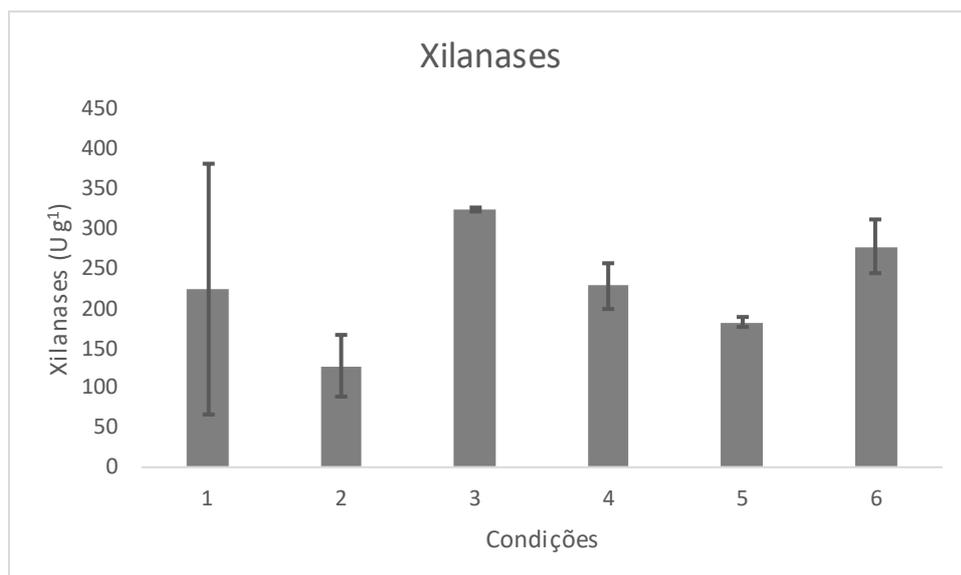


Figura 16. Atividades enzimática de xilanases obtida em biorreator de cultivo sólido, com ou sem pulsos de pressão, a partir da linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Condições 1 (50 BC: 50 FT), 2 (80 BC: 20 FT) e 3 (65 BC: 35 FT) realizadas sem pulsos de pressão. Condições 4 (50 BC: 50 FT), 5 (80 BC: 20 FT) e 6 (65 BC: 35 FT), realizadas com pulsos de pressão. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo, U g⁻¹: unidade grama de matéria seca. As condições 1x4, 2x5, 3x6 diferirem entre si pelo teste de Student a 5%.

Por sua vez, levando em conta apenas as fontes de carbono e comparando as condições 1 (50 BC: 50 FT), 2 (80 BC: 20 FT) e 3 (65 BC: 35 FT) ou 4 (50 BC: 50 FT), 5 (80 BC: 20 FT) e 6 (65 BC: 35 FT), verifica-se que a menor média de atividade enzimática ocorreu nos cultivos 2 e 5, com 80% BC e 20% FT, indicando que para a atividade enzimática de xilanases a fonte mais rica em proteínas (FT) apresenta maior relevância. As atividades de xilanases são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Atividade de xilanases obtidas no estudo.

Condição	U g ⁻¹ de massa seca
1 (50 BC: 50 FT) sem pulso de pressão	225,0
2 (80 BC: 20 FT) sem pulso de pressão	127,4
3 (65 BC: 35 FT) sem pulso de pressão	324,0
4 (50 BC: 50 FT) com pulso de pressão	228,2
5 (80 BC: 20 FT) com pulso de pressão	182,4
6 (65 BC: 35 FT) com pulso de pressão	277,5

Fonte: O autor

Na Tabela 11, para propósito de comparação, encontram-se alguns valores de atividade de xilanases descritos na literatura, maiores ou menores em relação ao presente trabalho, possivelmente consequência da linhagem de fungo, mas também do processo de cultivo envolvendo o meio de cultivo e o sistema de fermentação utilizado.

Tabela 11. Estudos de produção de xilanases em cultivos sólidos

Microrganismo	Fontes de carbono	U g ⁻¹	Referências
S1M29 <i>P. ucsense</i>	BC e FT (50:50)	324	Presente trabalho
9A02S1 <i>P. ucsense</i>	BC e FT (50:50)	10	Camassola e Dillon (2007)
<i>T. reesei</i> LCB 48	BSS e FT (50:50)	548	Silva (2019)
S1M29 <i>P. ucsense</i>	CE, FA e FS (91,7:5:3,3)	415	COSTA <i>et al.</i> , (2021)
<i>T. reesei</i> RUT C30	CE, FA e FS (91,7:5:3,3)	60	COSTA <i>et al.</i> , (2021)

BC (bagaço de cana-de-açúcar); FT (farelo de trigo); PT (palha de trigo), CS (casca de soja); FA (farelo de arroz); CA (casca de arroz); PA (palha de arroz); BSS (bagaço de sorgo sacarino). Fonte: O autor

5.7 Variação da temperatura durante o cultivo

A variação da temperatura durante os cultivos foi monitorada durante todo o período, em intervalos de 10 s durante aeração convencional e 5 s durante os pulsos de pressão, sendo apresentados os gráficos da duplicata de cultivo, tendo então para condição dois gráficos, cultivo 1 e cultivo 2. Não é possível identificar uma relação direta entre a atividade enzimática obtida e as temperaturas dos cultivos.

Para a condição 1 (50 BC: 50 FT) a variação na temperatura é apresentada na Figura 17 e Figura 18, onde verifica-se que existe uma variação da temperatura ao longo do experimento. No cultivo 1 podemos ver que a temperatura ficou um pouco abaixo dos 30 °C, sendo a média para o cultivo de 27 °C, enquanto para o cultivo 2 a temperatura ficou mais próximo dos 30 °C, sendo a média para o cultivo de 29 °C. Para todas as atividades enzimáticas, com exceção de β -glicosidases, as atividades no cultivo 2 foram superiores ao cultivo 1.

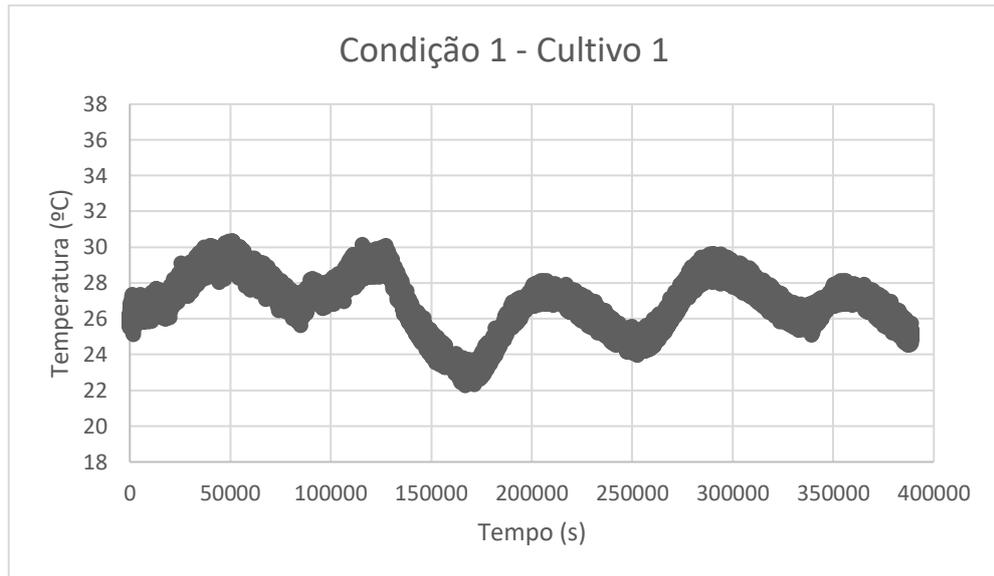


Figura 17. Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 1 (50 BC: 50 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

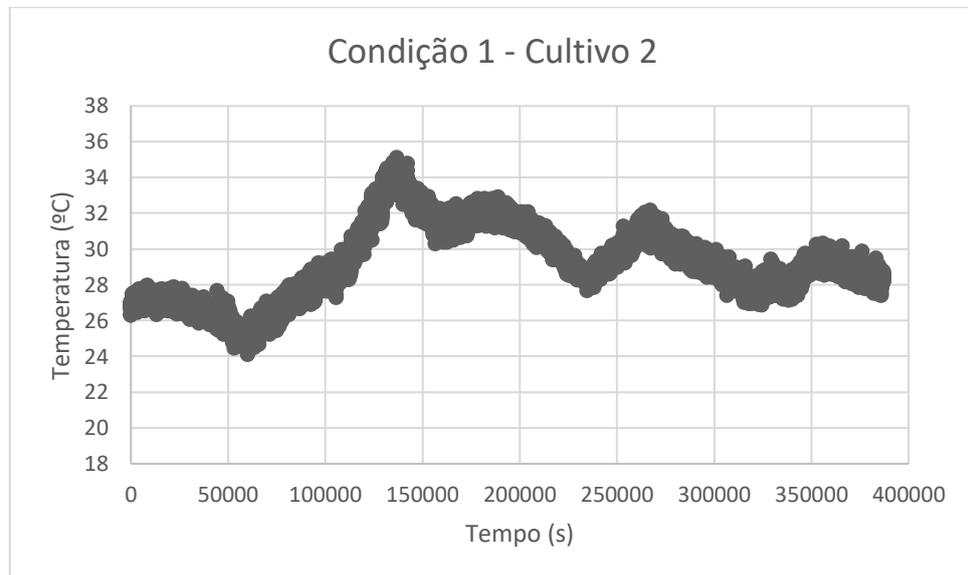


Figura 18. Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 1 (50 BC: 50 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

Para a condição 2 (80 BC: 20 FT) a variação na temperatura é apresentada na Figura 19 e Figura 20, onde também pode-se verificar variação da temperatura no decorrer dos cultivos. Nesses cultivos o comportamento da temperatura diferiu da condição de um modo que o cultivo 1 ficou com a temperatura mais próxima de 30 °C, sendo a média para

o cultivo de 28 °C, enquanto para o cultivo 2 a temperatura ficou mais baixa, sendo a média para o cultivo de 26 °C. Na condição 2, as atividades enzimáticas ficaram mais próximas entre si mas ainda ligeiramente superiores no cultivo 2 em relação ao cultivo 1.

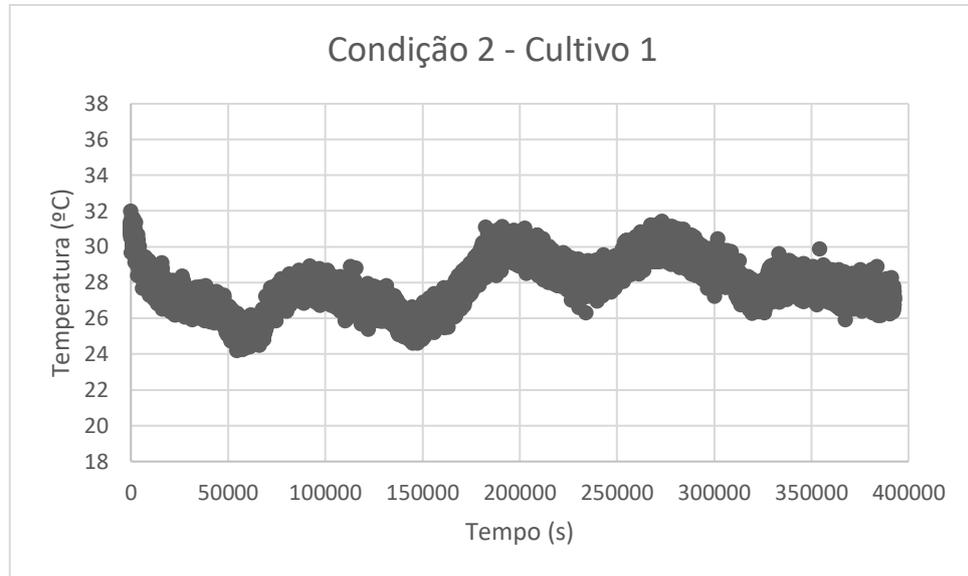


Figura 19. Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 2 (80 BC: 20 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

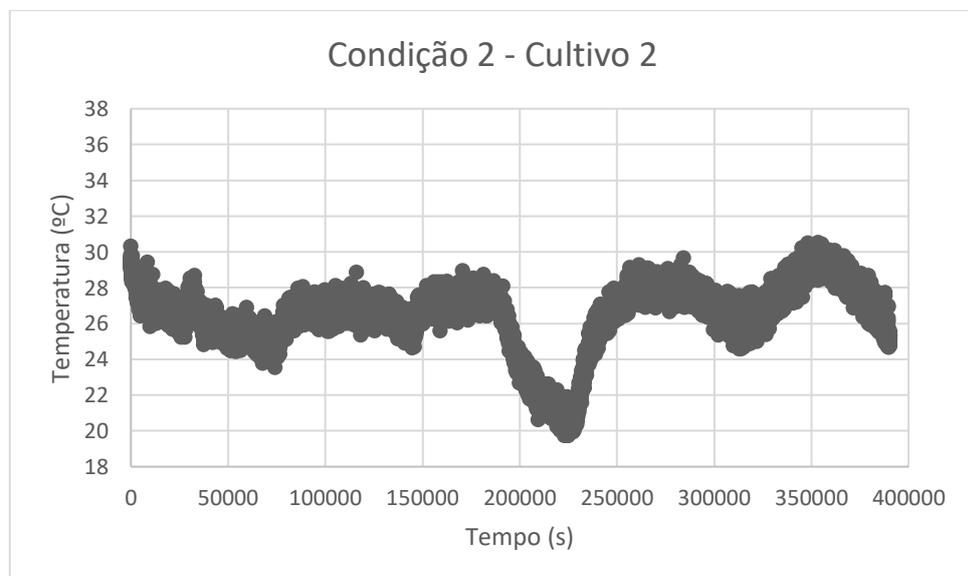


Figura 20. Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 2 ((80 BC: 20 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

Para a condição 3 (A65 BC: 35 FT) a variação das temperaturas ao longo do cultivo são apresentadas na Figura 21 e Figura 17 e Figura 22 e Figura 18, onde também verifica-se variação da temperatura no decorrer dos cultivos. No cultivo 1 podemos ver uma maior variação que no cultivo 2, apesar de ambas as médias da temperatura ficarem em 28 °C. As atividades enzimáticas também ficaram próximas entre os cultivos, com uma maior variação apenas para xilanases.

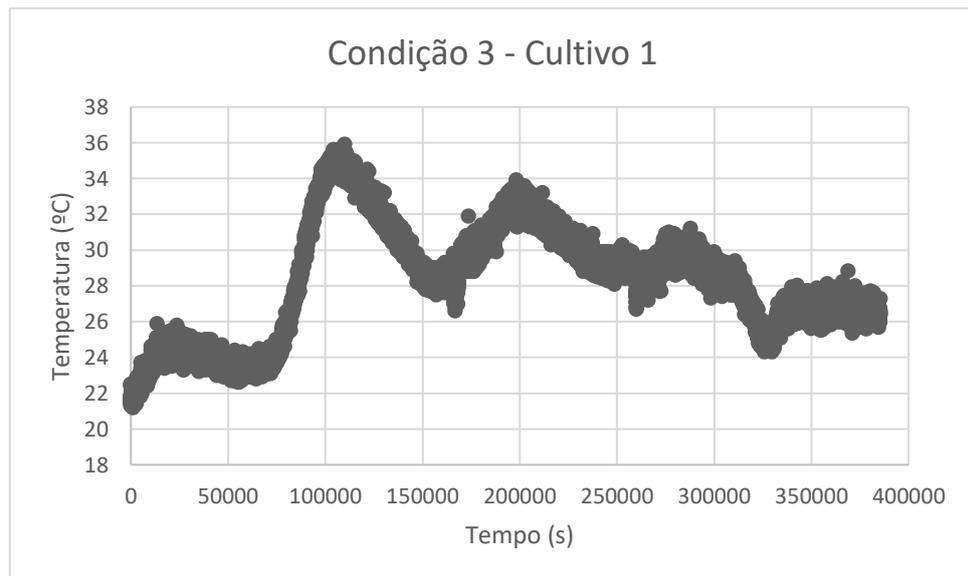


Figura 21. Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 3 (65 BC: 35 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

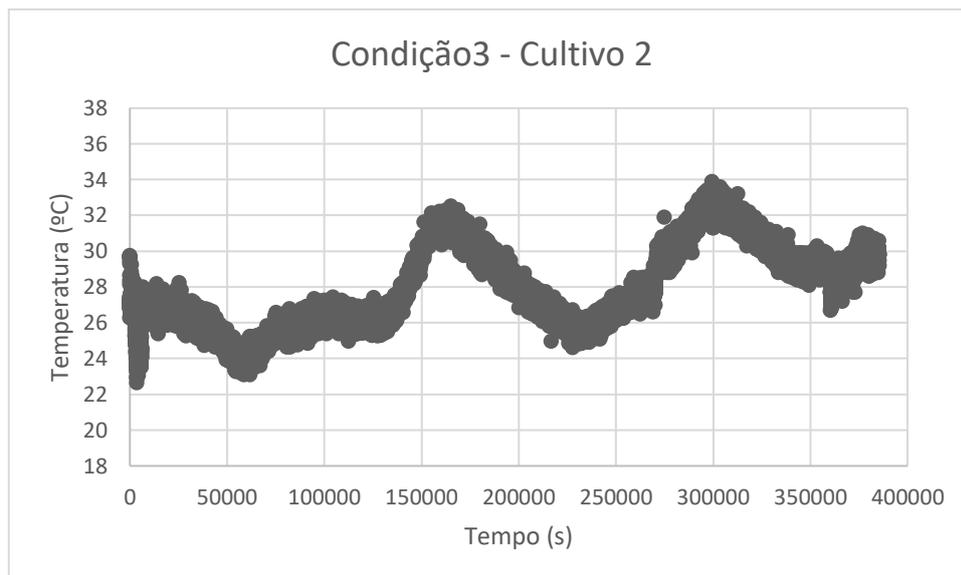


Figura 22. Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 3 (65 BC: 35 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

Para condições 4, 5 e 6, que ocorreram com o uso de pulsos de pressão para retirada do calor gerado pelo metabolismo do fungo no decorrer do cultivo, a partir do tempo de 172800 s (48 h) podemos ver um comportamento diferente da temperatura nos cultivos, apresentando, como esperado, oscilações mais intensas na temperatura, causadas pela presença dos pulsos de pressão. Um controle de temperatura similar foi aplicado por Mo *et al.* (2004) em cultivo sólido para produção de celulases por *P. decumbens*, onde a pressão obtida pela aeração forçada, seguida de descompressão aplicado em um leito fixo foi utilizada para o controle de temperatura do cultivo. Apesar do uso de pulsos de pressão para controle de temperatura, os autores não monitoraram a temperatura numa escala pequena de tempo, tal como realizado no presente trabalho.

A condição 4 (50 BC: 50 FT), apresentada nas Figuras Figura 23 e Figura 24, demonstra bem o comportamento de maior oscilação a partir do início do uso dos pulsos de pressão. Apesar desse sistema de controle adicional de temperatura através dos pulsos de pressão, ainda se verifica variação da temperatura que foi apresentada nas condições 1 a 3. As médias de

temperatura com o uso dos pulsos de pressão não parecem sofrer alteração, já que para o primeiro cultivo da condição 4 a temperatura média ficou em 28 °C e para o segundo em 29 °C. As atividades enzimáticas para essa condição ficaram similares para β -glicosidasases e endoglicanases, superiores no cultivo 2 para xilanases e superiores no cultivo 1 para FPU, o que reforça a não interferência da diferença na média da temperatura na atividade enzimática obtida.

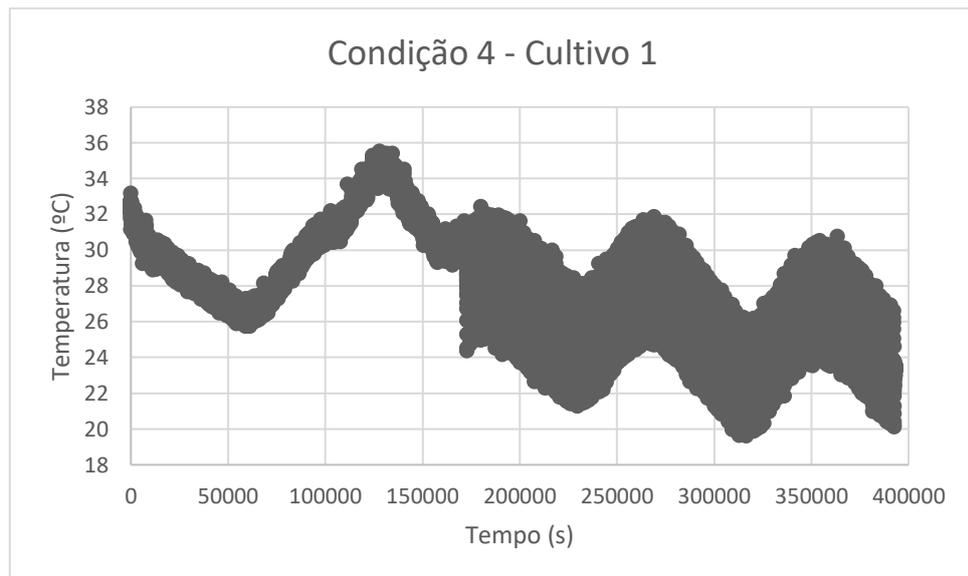


Figura 23. Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 4 (50 BC: 50 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Presença de pulsos de pressão a partir de 172800 s (48 h). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

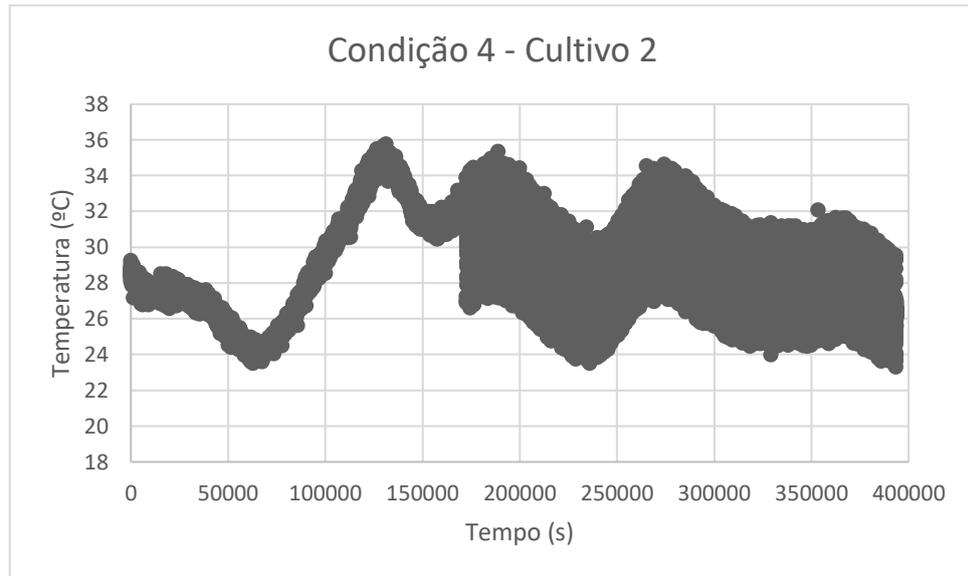


Figura 24. Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 4 (50 BC: 50 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Presença de pulsos de pressão a partir de 172800 s (48 h). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

Para a condição 5 (80 BC: 20 FT), os cultivos apresentam uma média de temperatura de 28 °C. As oscilações provocadas pela presença de pulsos de pressão são mais presentes no cultivo 1, como visto na Figura 25 que no cultivo 2, visto na Figura 26, ainda que isso não altere a média de temperatura do cultivo, seguindo como nos demais muito próximas as médias de temperaturas. As atividades enzimáticas, de forma similar as demais condições, foram próximas para endoglicanases, ligeiramente superiores no cultivo 1 para FPU e superiores no cultivo 2 para β -glicosidases e xilanases.

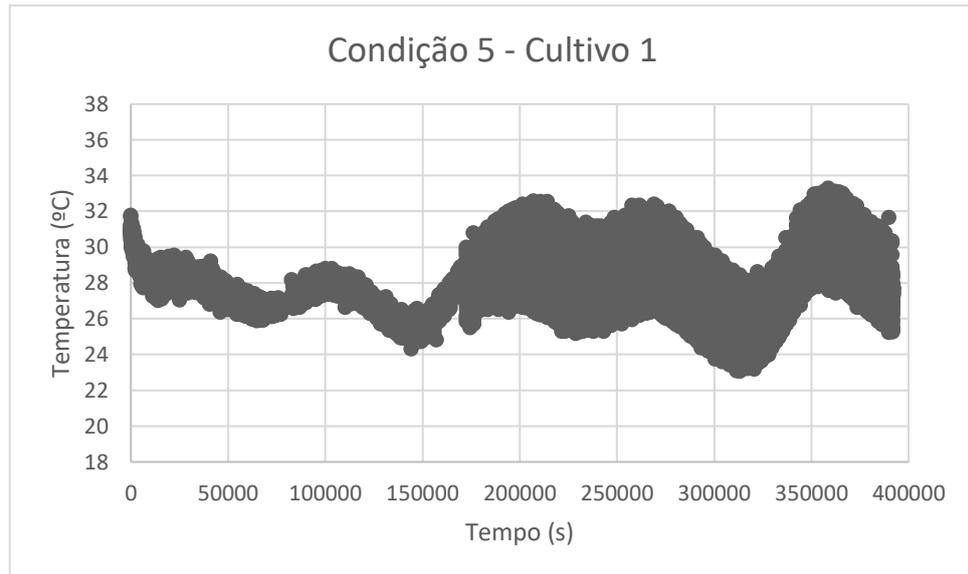


Figura 25. Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 5 (80 BC: 20 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Presença de pulsos de pressão a partir de 172800 s (48 h). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

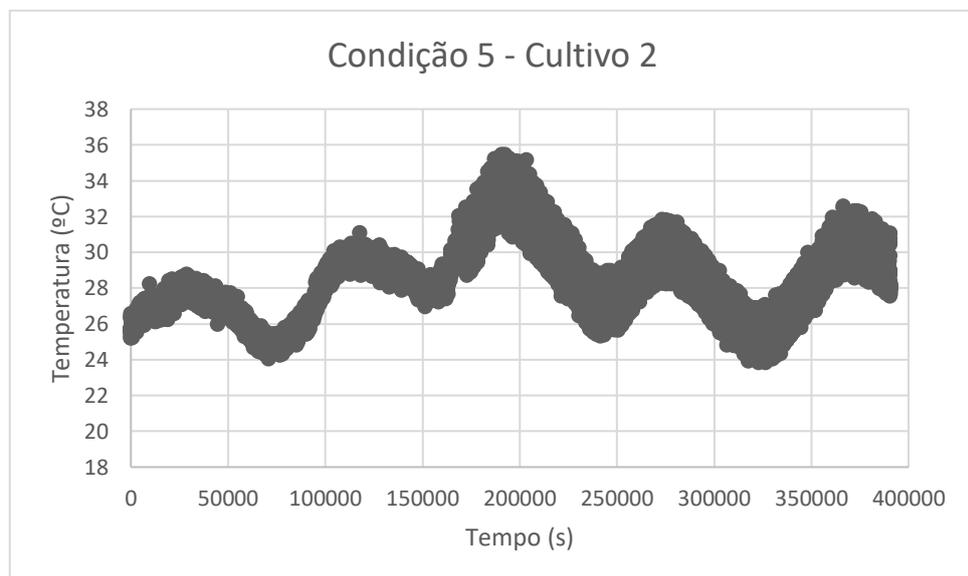


Figura 26. Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 5 (80 BC: 20 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Presença de pulsos de pressão a partir de 172800s (48h). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

Para a condição 6 (65 BC: 35 FT) podemos ver na Figura 27 (cultivo 1) e na Figura 28 (cultivo 2) a variação na temperatura ao longo do CES. A análise dos dados das temperaturas obtidas pelo monitoramento revela que o cultivo 1 da condição 6 foi o cultivo que apresentou

o maior pico de temperatura, de 36,62 °C, no tempo de 130274 s (36,18 h), apesar de outros cultivos também atingiram temperaturas próximas. Mesmo com esse pico de temperatura, a média do cultivo ficou próxima aos demais, em 28 °C, sendo a média para o cultivo 2 de 27 °C. Nessa condição, com exceção das xilanases, que foram ligeiramente superiores para o cultivo 2, as atividades enzimáticas foram muito similares.

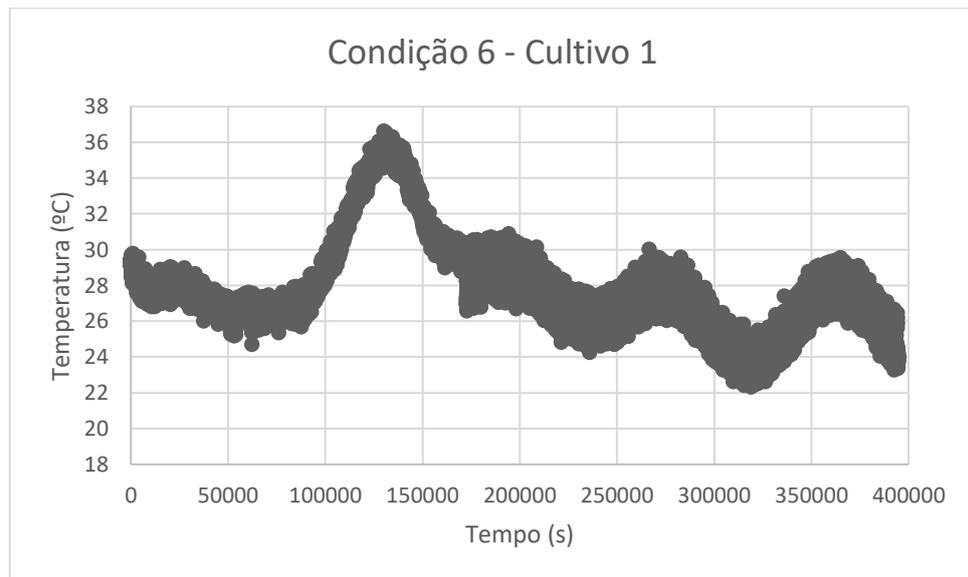


Figura 27. Temperatura ao longo do primeiro cultivo para a condição 6 (65 BC: 35 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Presença de pulsos de pressão a partir de 172800 s (48 h). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

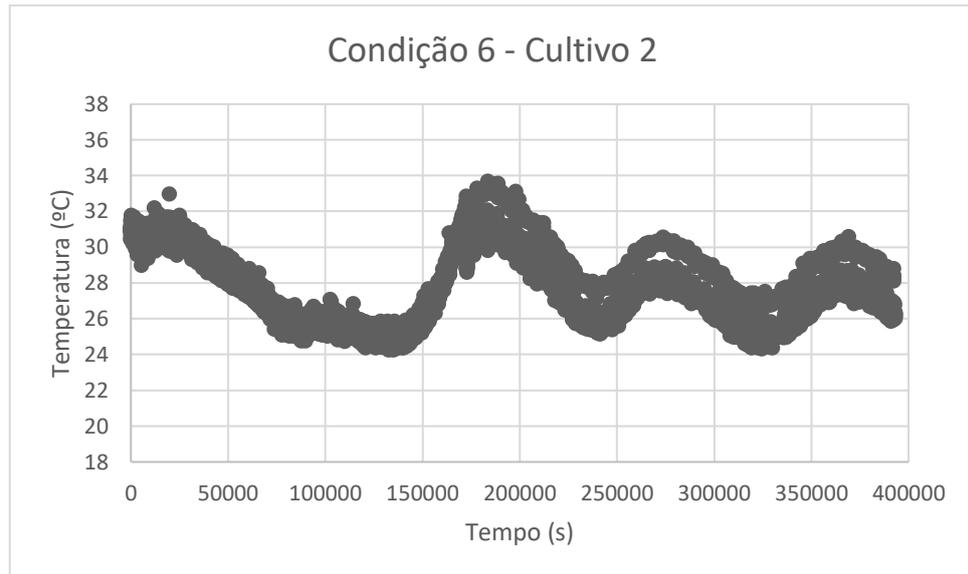


Figura 28. Temperatura ao longo do segundo cultivo para a condição 6 (65 BC: 35 FT) em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Presença de pulsos de pressão a partir de 172800 s (48 h). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

A elevação da temperatura a valores de 36 °C e sua detecção mostra a importância do acompanhamento da temperatura e emprego de pulsos de pressão, como alternativa para o controle de temperatura. Apesar do volume do biorreator ser maior que os ensaios anteriores, não é provável a presença de pontos com temperatura muito diferente da registrada pelo sensor de temperatura em microclimas no interior do biorreator, por conta da aeração constante e tamanho do mesmo, sendo que em biorreatores maiores seriam necessários mais pontos para medição da temperatura.

5.8 Variação da temperatura durante os pulsos de pressão

Como pode ser visto avaliando a variação da temperatura ao longo do cultivo, quando na ocorrência dos pulsos de pressão a temperatura do biorreator sofreu uma oscilação mais pronunciada. Essa oscilação foi plotada em um gráfico específico para melhor visualização de como a temperatura no interior do biorreator se comportou em decorrência dos pulsos de pressão. Para esses gráficos os pulsos foram plotados em paralelo (o tempo 0 representa o início

de cada pulso de pressão do cultivo), de modo a mostrar como a temperatura oscilou no biorreator durante os pulsos. Assim, é possível visualizar a alteração da temperatura durante cada pulso de pressão do cultivo, vendo que a temperatura teve um perfil de variação similar durante cada pulso, independentemente do tempo de cultivo em que o pulso foi aplicado.

Esses gráficos demonstrando os pulsos de pressão são apresentados nas Figuras Figura 29 a Figura 34, onde nos 30 segundos iniciais do gráfico está representado o pulso de pressão, onde o reator recebe o ar a pressão elevada e é mantido a pressão de 180 kPa. Nesse período ocorreu elevação da temperatura, na ordem de 2 a 3 °C, que pode ser explicada pela homogeneização do calor, que estava presente na parte interna do substrato – antes impedido da dissipação pela baixa troca gasosa promovida pelo substrato, seguido de queda de forma pouco acentuada, 1 a 2 °C, até o final dos 30 s da aplicação do pulso. Após os 30 s onde a pressão foi mantida no interior do biorreator, no momento da descompressão do mesmo, houve rápida queda na temperatura, 4 a 5 °C em 5 s, seguido de aumento gradual durante o ciclo de aeração até a faixa dos 30 °C.

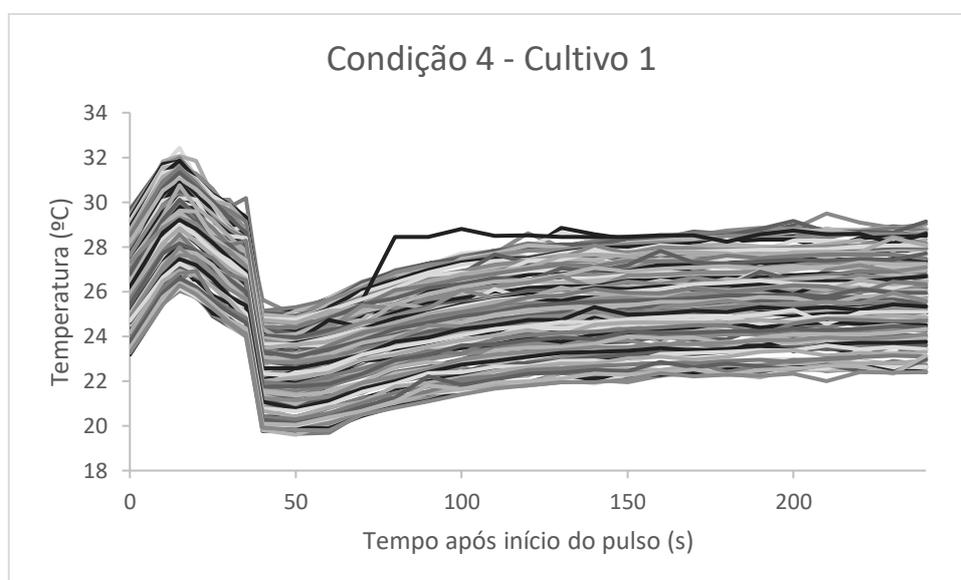


Figura 29. Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucseense*. Cada linha representa um pulso de

pressão do cultivo 1 da duplicata da condição 4 (50 BC: 50 FT). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

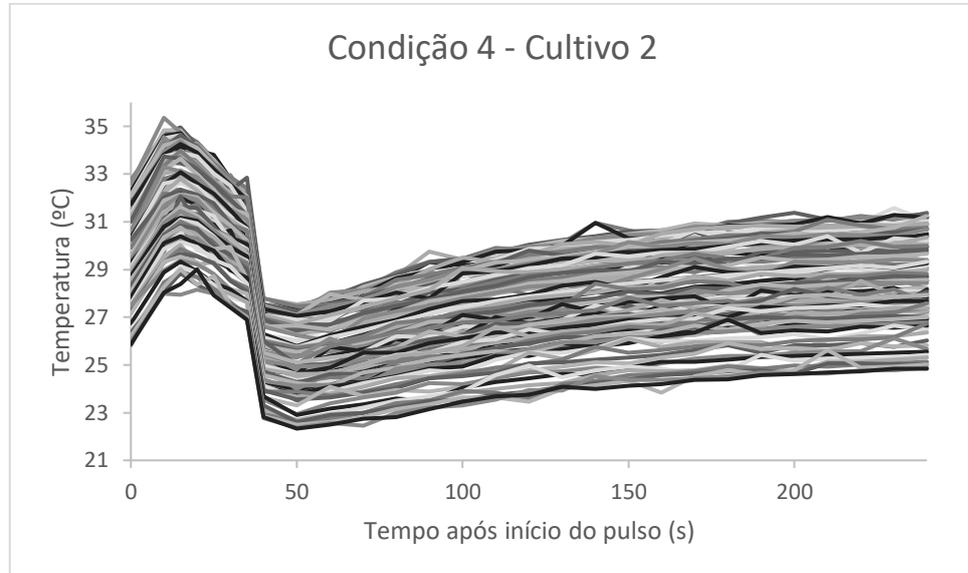


Figura 30. Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Cada linha representa um pulso de pressão do cultivo 2 da duplicata da condição 4 (50 BC: 50 FT). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

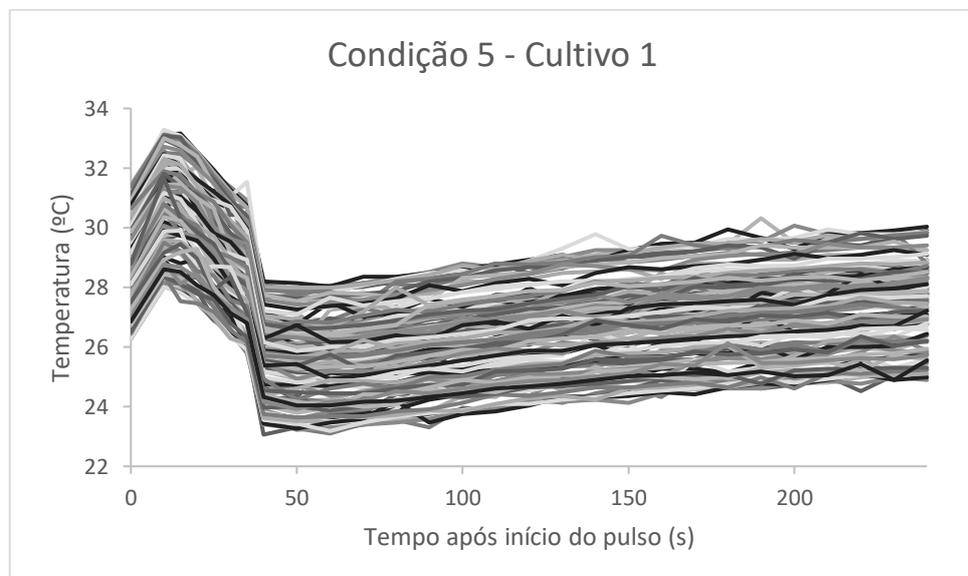


Figura 31. Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Cada linha representa um pulso de pressão do cultivo 1 da duplicata da condição 5 (80 BC: 20 FT). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

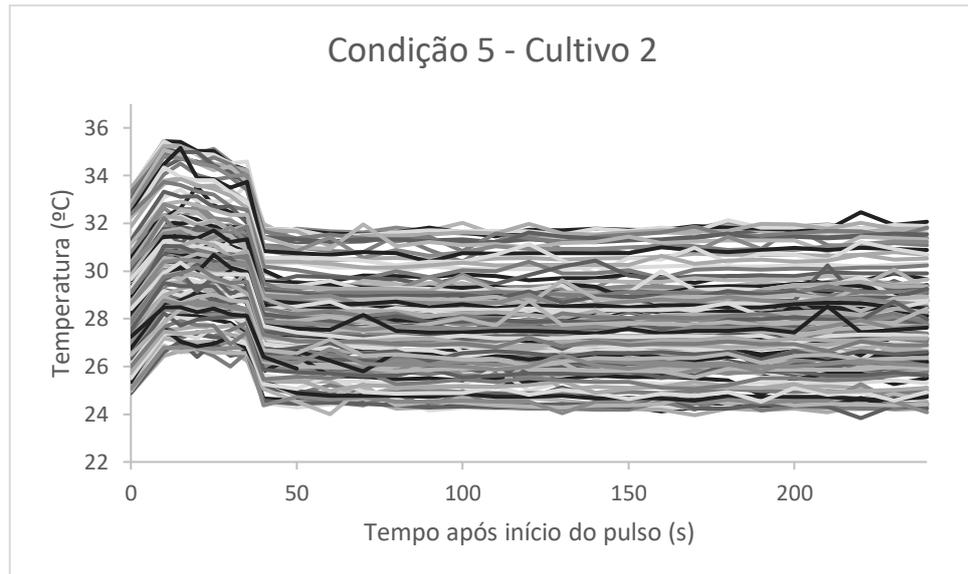


Figura 32. Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Cada linha representa um pulso de pressão do cultivo 2 da duplicata da condição 5 (80 BC: 20 FT). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

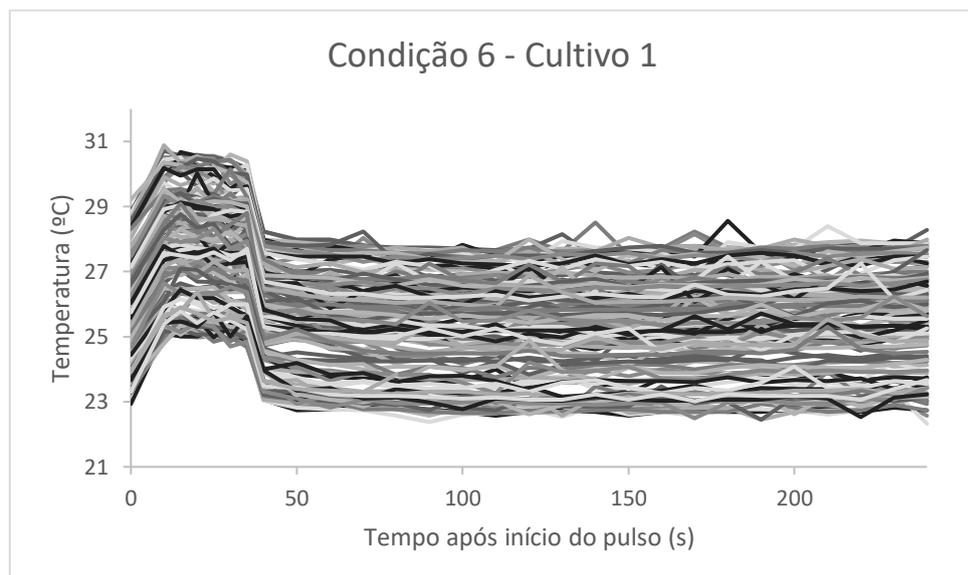


Figura 33. Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Cada linha representa um pulso de pressão do cultivo 1 da duplicata da condição 6 (65 BC: 35 FT). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

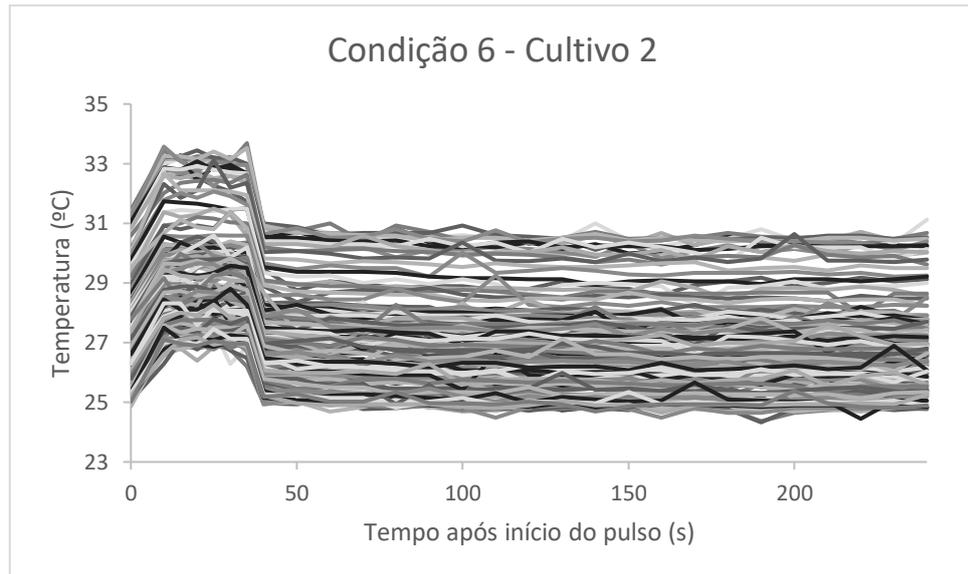


Figura 34. Temperaturas observadas em cada ocorrência de pulso de pressão em biorreator de cultivo sólido com a linhagem S1M29 de *P. ucsense*. Cada linha representa um pulso de pressão do cultivo 2 da duplicata da condição 6 (65 BC: 35 FT). BC: bagaço de cana-de-açúcar, FT: farelo de trigo.

A queda de temperatura observada no momento de descompressão do biorreator poderia ser explicada pela primeira lei da termodinâmica, onde devido a rápida descompressão do sistema ele tem um comportamento similar ao de uma expansão adiabática, onde a temperatura do ar diminui pela diminuição da energia interna e energia cinética média das moléculas, além do arraste de calor pelo ar aquecido saindo do biorreator.

Desta maneira, nas Figuras Figura 29 a Figura 34 está demonstrado as variações de temperaturas citadas causadas pelos pulsos de pressão. Para a condição 4 (50 BC: 50 FT), conforme as Figuras Figura 29 e Figura 30, verificam-se comportamentos bem similares entre si e bem claro o fenômeno descrito anteriormente. Já a condição 5 (80 BC: 20 FT) (Figuras Figura 31 e Figura 32), existe uma diferença no comportamento entre as duplicatas, sendo a Figura 31 mais similar ao comportamento apresentado na condição 4 e a Figura 32 com comportamento mais próximo ao apresentado na condição 6 (65 BC: 35 FT), que pode ser vista nas Figuras Figura 33 e Figura 34.

Finalizando, embora não tenham existido diferenças estatisticamente diferentes, e mesmo assim assumindo a possibilidade de poder existir atividades enzimáticas maiores nos cultivos com pulso de pressão, em relação as condições em que estes não foram empregados, verificado pelas maiores médias para algumas enzimas, pelo menos três hipóteses podem ser propostas. A primeira é que o resfriamento do meio, principalmente da parte mais interna, favoreceu o metabolismo que resultou na maior produção de celulases por *P. ucsense*. A segunda é que a pressão exercida sobre as células, ou a rápida descompressão, acabou por promover algum dano ou stress às mesmas, ativando algum mecanismo que levou ao aumento da produção enzimática. Já a terceira hipótese se refere a possibilidade de os pulsos de pressão de alguma forma facilitarem o desprendimento da enzima, aumentando a solubilização das mesmas durante a fase de extração.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no desenvolvimento do presente trabalho demonstram a possibilidade de produção de celulases e xilanases, a partir do fungo filamentoso *P. ucsense* S1M29, em biorreator de laboratório de cultivo no estado sólido, utilizando diferentes proporções de BC e FT e a aplicação de pulsos de pressão para o controle do calor interno do equipamento, com algumas conclusões adicionais.

- A melhoria da vedação do biorreator no presente trabalho permitiu o uso de pulsos de pressão;
- O sistema de controle e tomada de dados foi efetivo e permitiu um monitoramento contínuo do CES, obtendo dados mais significativos que o sistema original do biorreator e com menor erro humano;
- O uso de pulsos de pressão pode ser positivo para atividade enzimática de celulases e xilanases para algumas combinações de BC e FT;
- Embora não confirmado pela estatística, a proporção de 65 BC: 35 FT proporcionou as maiores médias de atividades de celulases e xilanases para os cultivos na ausência de pulsos de pressão;
- Nos cultivos com presença de pulsos de pressão os valores médios para atividade enzimática de celulases totais e de endoglicanases foram similares para as proporções de 65 BC: 35 FT e 50 BC: 50 FT, enquanto para as β -glicosidases e xilanases na proporção de 65 BC: 35 FT os valores médios foram superiores.
- Os pulsos de pressão embora não tenham resultado em mudança na temperatura média dos cultivos quando comparados aos cultivos controle, provocaram mudança da temperatura na ocasião da aplicação, com possíveis reflexos positivos na atividade enzimática medida.

Os resultados obtidos nos cultivos mostraram que é possível diminuir a temperatura do cultivo sólido no fermentador através da aplicação de pulsos de pressão. Como sugestão para trabalhos futuros pode ser avaliado um controle com pulsos de pressão mais frequentes, modificações no biorreator que permitam amostragens, determinação dos parâmetros cinéticos do microrganismo, submeter o fungo a um pulso de vácuo parcial, além de avaliar através de uso de pressões mais elevadas o possível mecanismo de estresse celular causado pelo aumento da pressão.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, BIOCOMBUSTÍVEIS, G. N. E. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2022**. Rio de Janeiro, 2022.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, BIOCOMBUSTÍVEIS, G. N. E. **Anuário estatístico brasileiro de petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2023 - Dados parciais**. Rio de Janeiro, 2023.
- AGGARWAL, N. K.; KUMAR, N. **Bioethanol Production : Past and Present**. 2022.
- AHMED, A.; NASIM, F. UL H.; BATOOL, K.; BIBI, A.; RAFI, S. Characterization of Thermophilic β -Glucosidase of Rhizospheric Bacterial Strain (LSKB15) Isolated from Cholistan Desert, Pakistan. **American Journal of Microbiological Research**, v. 6, n. 4, p. 173–180, 2018. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/ajmr/6/4/5>>. Acesso em: 16/11/2021.
- ANTERO, R. V. P.; SILVA, D. B. DA; VALE, A. T. DO. Balanço energético da produção de etanol a partir da cana-de açúcar e aspectos da produção brasileira atual. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 3, p. 399–412, 2019.
- ASSOCIATION, R. FUELS. **Annual Ethanol Production**. 2024. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/markets-and-statistics/annual-ethanol-production>>. Acesso em: 07/03/2024.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.
- BASSO, V.; MACHADO, J. C.; DA SILVA LÉDO, F. J.; et al. Different elephant grass (*Pennisetum purpureum*) accessions as substrates for enzyme production for the hydrolysis of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 71, p. 155–161, 2014.
- BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656–669, 2016. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.090>>. .
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulases and xylanases production by penicillium echinulatum grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 1889–1900, 2010.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulase Determination: Modifications to Make the Filter Paper Assay Easy, Fast, Practical and efficient. , 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports.125>>. Acesso em: 15/11/2021.

CARRAU, J. L.; DILLON, A. J. P.; RIBEIRO, R. T.; ALBA, R. I.; AZEVEDO, J. L. Produção de enzimas celulolíticas por microorganismos. **Anais do Simpósio Internacional de Engenharia Genética**, v. 1, 1981.

CHEN, C. C.; KO, T. P.; HUANG, J. W.; GUO, R. T. Heat- and Alkaline-Stable Xylanases: Application, Protein Structure and Engineering. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, n. 2, p. 95–106, 2015.

CLIFFORD, C. B. How Corn is Processed to Make Ethanol. Disponível em: <<https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/673>>. Acesso em: 7/3/2024.

COSTA, B. E. B.; DA CRUZ, R. S.; RANGEL, F. C.; MENEGHETTI, S. M. P. Virtual Quim. |Vol 13| |No. 1| Rev. Virtual Quim. , v. 13, n. 1, 2021. Disponível em: <<http://rvq.s bq.org.br>>. Acesso em: 10/7/2023.

COSTA, P. C.; ECHER DOS REIS, E.; SALGUEIRO DE CARVALHO, L.; et al. Making the Process of Enzyme Production in Solid-State Cultivation Cleaner and More Sustainable - Reuse of Raw Materials and a Syringe-Type Bioreactor Enter in the Scene. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 9, n. 42, p. 14134–14142, 2021.

DAVAUX, F.; OUBART, C. THERMO-DETENTE: UMA NOVA ABORDAGEM À TERMOVINIFICAÇÃO. **Wine Internet Technical Journal**, , n. 7, p. 1–7, 2009.

DILLON, A. J. P.; BETTIO, M.; POZZAN, F. G.; ANDRIGHETTI, T.; CAMASSOLA, M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 48–53, 2011. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2011.05026.x>>. Acesso em: 22/11/2021.

DILLON, A. J. P.; TORESAN, S. O. P.; BARP, L. P. Isolation of cellulase-producing mutants from a *Penicillium* sp strain denominated 3MUV24. **Revista brasileira de Genética**, v. 15, n. 3, p. 491–498, 1992.

DILLON, A. J. P.; ZORGI, C.; CAMASSOLA, M.; HENRIQUES, J. A. P. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and β -glucosidase activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 6, p. 740–746, 2006.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 113–125, 2003. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X02001249>>. .

ESCUDIER, J.-L. UNE VALORISATION SUPPLEMENTAIRE DU RAISIN EN AMELIORANT LES EXTRACTIONS : LA FLASH-DETENTE (PART. 1). **Wine Internet Technical Journal**, , n. 1, p. 1–5, 2002.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. DESAFIOS RELACIONADOS À PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS CELULOLÍTICAS NA HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1082–1093, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170104>>. .

FLORENCIO, C.; BORTOLETTO-SANTOS, R.; FAVARO, C. P.; et al. Advances in the Production and Formulation of Microbial Inoculants for a More Sustainable Agriculture. **Química Nova**, v. 45, n. 9, p. 1133–1145, 2022.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987. Disponível em: <<http://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/427823/PBI5214/Ghose1987mediasatividadecelulase.pdf>>. Acesso em: 15/11/2021.

GRANBIO. Histórico GranBio. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br/conteudos/historico-granbio/>>. Acesso em: 6/12/2021.

IMPrensa, I. Produção recorde de etanol de milho é apresentada ao Mapa. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/producao-recorde-de-etanol-de-milho-e-apresentada-ao-mapa>>. Acesso em: 6/3/2024.

KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: A Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 679–689, 2013.

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

LENZ, A. R. **O projeto genoma de *Penicillium echinulatum* 2HH e S1M29: a genômica viabilizando a descoberta de conhecimento**, 2020. Universidade de Caxias do Sul. Disponível em: <<https://repositorio.ucs.br/xmlui/handle/11338/6801>>. Acesso em: 22/11/2021.

LENZ, A. R.; BALBINOT, E.; DE ABREU, F. P.; et al. Taxonomy, comparative genomics and evolutionary insights of *Penicillium ucsense*: a novel species in series *Oxalica*. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 115, n. 8, p. 1009–1029, 2022. Springer International Publishing. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10482-022-01746-4>>. .

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

MARTINS, G. M.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; BEZZERRA-BUSSOLI, C.; et al. The isolation of pentose-assimilating yeasts and their xylose fermentation potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 162–168, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.014>>. Acesso em: 16/5/2023.

MARTINS, L. F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; RAMOS, L. P. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1417–1424, 2008.

MEGALA, S.; REKHA, B.; SARAVANATHAMIZHAN, R. Chemical and non-chemical pre-treatment techniques for bio ethanol production from biomass. **International Journal of Energy and Water Resources**, v. 4, n. 2, p. 199–204, 2020. Springer International Publishing. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42108-020-00064-7>>. .

MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Use of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) as substrate for cellulase and xylanase production in solid-state cultivation by *Penicillium echinulatum*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 691–700, 2017.

- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. Disponível em: <<https://sci-hubtw.hkvisa.net/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 16/11/2021.
- MO, H.; ZHANG, X.; LI, Z. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 1293–1297, 2004.
- MÜLLER, C.; MILANI, L. M.; GIEHL, A.; et al. Resíduos De Cana-De-Açúcar E Milho Como Matéria Prima Do Etanol 2G: Atualidades E Perspectivas. **Impactos das Tecnologias na Engenharia Química** 3. p.8–22, 2019.
- NC-IUBMB, N. C. OF THE I. U. OF B. AND M. B. Historical Introduction - NC-IUBMB. Disponível em: <<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/history.html>>. Acesso em: 15/6/2024.
- NEVES, M. F.; MILAN, P.; MARQUES, V. N.; et al. Etanol de Milho: Cenário Atual e Perspectivas para a Cadeia no Brasil. **Unem**, , n. May, p. 116, 2021.
- NIJLAND, J. G.; DRIESSEN, A. J. M. Engineering of Pentose Transport in *Saccharomyces cerevisiae* for Biotechnological Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 2020. Frontiers Media S.A.
- OBEROI, H. S.; CHAVAN, Y.; BANSAL, S.; DHILLON, G. S. Production of cellulases through solid state fermentation using kinnow pulp as a major substrate. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 4, p. 528–536, 2010.
- PACHECO, T. F. **Embrapa- circular técnica, 04**. A Importância da Produção de Etanol. , 2011.
- PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **SERIES ON BIOTECHNOLOGY**. 1º ed. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.
- PESSOA, A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. ACID HYDROLYSIS OF HEMICELLULOSE FROM SUGARCANE BAGASSE. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 3, p. 291–297, 1998. Brazilian Society of Chemical Engineering. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/bjce/a/7GX9BLM47S9dgRjQ66ttyGK/>>. Acesso em: 2/10/2024.
- POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M.; GELAIN, L. Carta patente nº MU 8901075-2. , 2009. Brasil: República Federativa do Brasil.

PROCOPIO, D. P. ESTUDO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE CELULASES DE *ACREMONIUM STRICTUM* EM LINHAGENS DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VISANDO A PRODUÇÃO DE BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO. , v. 11, n. 1, p. 92–105, 2017.

RAÍZEN. Etanol de segunda geração: potencial e oportunidades. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/blog/etanol-de-segunda-geracao>>. Acesso em: 7/3/2024.

RAMOS, C. S. GranBio e Nuseed unem forças para desenvolver cana-energia | Agronegócios | Valor Econômico. Disponível em: <<https://valor.globo.com/agronegocios/noticia/2022/09/08/granbio-faz-parceria-com-nuseed-em-cana-energia.ghtml>>. Acesso em: 11/7/2023.

RECH, F. R.; FONTANA, R. C.; ROSA, C. A.; et al. Ethanol production via co-fermentation of C6 and C5 sugars from steam-pretreated sugarcane bagasse hydrolysates using non-GM yeasts *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Spathaspora hagerdaliae* UFMG-CMY-303. **Biomass Conversion and Biorefinery** 2022, p. 1–10, 2022. Springer. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-022-02751-3>>. Acesso em: 14/11/2022.

DOS REIS, L.; FONTANA, R. C.; DA SILVA DELABONA, P.; et al. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 597–603, 2013. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.124>>. .

ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B. K. Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system. **Micol. Neotrop. Apl.**, v. 4, n. January 1991, p. 83–98, 1991. Disponível em: <http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins%7B%5C_%7Dtectes/pleins%7B%5C_%7Dtectes%7B%5C_%7D6/b%7B%5C_%7Dfdi%7B%5C_%7D35-36/40205.pdf>. .

SCHOLL, A. L.; MENEGOL, D.; PITARELO, A. P.; et al. Elephant grass pretreated by steam explosion for inducing secretion of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 solid-state cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 97–107, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.051>>. .

SILVA, M. J. DA. **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução**, 2014. Universidade Federal de Pernambuco.

SILVA, R. D. E. A. **Produção de enzimas celulolíticas e xilanolítica a partir do bagaço do sorgo sacarino por fermentação semissólida e submersa.**, 2019.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; THOMAS, L.; et al. Industrial Enzymes. **Industrial Biorefineries and White Biotechnology**. p.473–497, 2015. Elsevier.

SISTI, L.; GIOIA, C.; TOTARO, G.; et al. Valorization of wheat bran agro-industrial byproduct as an upgrading filler for mycelium-based composite materials. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 113742, 2021. Elsevier.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F. DA; LETTI, L. A. J.; et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52–71, 2017. Sociedade Brasileira de Biotecnologia. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>>. .

TSAO, G. T.; GONG, C. S.; CAO, N. J. Repeated Solid-Phase Fermentation and Extraction for Enzyme Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, p. 505–524, 2000.

VAISHNAV, N.; SINGH, A.; ADSUL, M.; et al. *Penicillium*: The next emerging champion for cellulase production. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, p. 131–140, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003>>. .

VIVIAN, M. A.; DOS SANTOS, J. R. S.; SEGURA, T. E. S.; DA SILVA, F. G.; BRITO, J. O. Characterization of sugarcane bagasse and its potential for energy generation and cellulosic pulp. **Madera y Bosques**, v. 28, n. 1, 2022.

ZHANG, X.; MO, H.; ZHANG, J.; LI, Z. A solid-state bioreactor coupled with forced aeration and pressure oscillation. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 5, p. 417–420, 2003.

ANEXOS

1. Código desenvolvido para o controle do reator.

```
#Carregar firmata no Arduino
#Importar bibliotecas e módulos
import pyfirmata
import time
import yagmail

#Criando a placa do Arduino no código
try:
    placa = pyfirmata.Arduino('COM3') #Verificar qual porta está conectado
except:
    print ('Erro: Verificar conexão ou porta USB.')

#500.000 segundos em 6 dias (aproximadamente)
hora_inicial = time.time()
hora_atual = time.time()

pt_in = 0 #PT 100 na entrada do reator
pt_in1 = 0 #Auxiliar 1 do PT 100 de entrada
pt_in2 = 0 #Auxiliar 2 do PT 100 de entrada
pt_in3 = 0 #Auxiliar 3 do PT 100 de entrada
pt_out = 0 #PT 100 na saída do reator
pt_out1 = 0 #Auxiliar 1 do PT 100 de saída
pt_out2 = 0 #Auxiliar 2 do PT 100 de saída
pt_out3 = 0 #Auxiliar 3 do PT 100 de saída
a_aux = 0 #Porta analógica para filtrar a leitura. Ligado diretamente no terra.
```

```

pulso_ativo = "Pulso_Ativo" #Auxiliar para sinal do pulso
pulso_inativo = "Pulso_Inativo" #Auxiliar para sinal do pulso

#Criação do .txt para gravar os dados
with open('leituras_entrada_pt_100.txt','w') as txt_entradas:
    txt_entradas.write('Hora real;Tempo transcorrido;Leitura PT100\n')
with open('leituras_saida_pt_100.txt','w') as txt_saidas:
    txt_saidas.write('Hora real;Tempo transcorrido;Leitura PT100\n')

#Logando ao servidor do e-mail
email = yagmail.SMTP(user='email.mestrado.paulo@gmail.com', password='xxxxxxx')
num_email = 1

#Criação do contador para envio do e-mail
#Número para loop que seja mais ou menos igual a meia hora de código rodando.
#Configurar de acordo com o bloco de leitura. 1800 e 500000 para uma leitura por segundo
loop = 0
loops = []
while loop <= 500000:
    loops.append(loop)
    loop += 360
#print(loops)
loop = 0

pulso = 0
pulsos = []
while pulso <= 500000:
    pulsos.append(pulso)
    pulso += 181 #Número ímpar só para acontecer menos de na mesma volta e-mail e pulso
#print(loops)
pulso = 181

```

```
#Fazer a leitura do PT100

it = pyfirmata.util.Iterator(placa)
it.start()

#Habilitando a leitura
placa.analog[0].enable_reporting()
placa.analog[2].enable_reporting()
placa.analog[5].enable_reporting()
#placa.digital[8].enable_reporting()
#placa.digital[9].enable_reporting()
#placa.digital[10].enable_reporting()

print('Inicializando conexão')
time.sleep(5)

print ('Conexão iniciada')

placa.digital[2].write(0) #Seta o pino digital 2 para alto para abrir/ativar relé de agitação do
reator

while (hora_atual - hora_inicial) <= 20: #172800 corresponde à dois dias, tempo inicial da
fermentação sem pulso

    hora_atual = time.time()

    time.sleep(1)

    pt_in1 = (placa.analog[5].read()) #Recebe duas vezes a leitura como forma de descartar a
primeira leitura

    time.sleep(1)

    pt_in1 = (placa.analog[5].read())

    time.sleep(1)

    pt_in2 = (placa.analog[5].read())
```

```

time.sleep(1)
pt_in3 = (placa.analog[5].read())
pt_in = (((pt_in1 + pt_in2 + pt_in3) / 3) - 0.2) * 125

with open('leituras_entrada_pt_100.txt','a') as txt_entradas:
    txt_entradas.write('{};{};{} \n'.format(hora_atual,(hora_atual - hora_inicial),pt_in))

time.sleep(1)
a_aux = (placa.analog[2].read()) #Leitura para evitar interferência. Pino ligado ao terra.

time.sleep(1)
pt_out1 = (placa.analog[0].read()) #Recebe duas vezes a leitura como forma de descartar a
primeira leitura
time.sleep(1)
pt_out1 = (placa.analog[0].read())
time.sleep(1)
pt_out2 = (placa.analog[0].read())
time.sleep(1)
pt_out3 = (placa.analog[0].read())
pt_out = (((pt_out1 + pt_out2 + pt_out3) / 3) - 0.2) * 125

with open('leituras_saida_pt_100.txt','a') as txt_saidas:
    txt_saidas.write('{};{};{} \n'.format(hora_atual,(hora_atual - hora_inicial),pt_out))

time.sleep(1)
a_aux = (placa.analog[2].read()) #Leitura para evitar interferência. Pino ligado ao terra.

#print('Leitura entrada: {} Leitura saída: {}'.format(pt_in,pt_out))

#Enviar email com os .txt
loop +=1
pulso +=1

```

```

for i in loops:
    if i == loop:
        try:
            email.send(to='email.mestrado.paulo@gmail.com', subject='Fermentação x-x de
xx/xx/xx, email nº {}'.format(num_email), contents=""Fermentação x-x
                200 g de meio sendo xx/xx, xxg de bagaço e xxg de farelo
                200 ml sol de sais 20x
                1x10na6 esporos por grama de meio, em 200ml de água
                vazão de ar, 1l por minuto
                agitação em 5rpm a cada 30min por dois dias
                agitado 5 min inicial", attachments=['leituras_entrada_pt_100.txt',
leituras_saida_pt_100.txt'])
            num_email += 1
            #print ('Email enviado')
        except:
            print('Email nº {} não enviado'.format(num_email))
    else:
        pass
else:
    pass

placa.digital[2].write(1) #Seta o pino digital 2 para baixo para fechar/desligar relé de agitação
do reator

while (hora_atual - hora_inicial) >= 20: #172800 corresponde à dois dias, tempo inicial da
fermentação sem pulso

#Aplicar o pulso de pressão
for i in pulsos:
    if i == pulso:
        hora_atual = time.time()

        time.sleep(1)

```

```

    pt_in1 = (placa.analog[5].read()) #Recebe duas vezes a leitura como forma de descartar
a primeira leitura

```

```

    time.sleep(1)

```

```

    pt_in1 = (placa.analog[5].read())

```

```

    time.sleep(1)

```

```

    pt_in2 = (placa.analog[5].read())

```

```

    time.sleep(1)

```

```

    pt_in3 = (placa.analog[5].read())

```

```

    pt_in = (((pt_in1 + pt_in2 + pt_in3) / 3) - 0.2) * 125)

```

```

    with open('leituras_entrada_pt_100.txt','a') as txt_entradas:

```

```

        txt_entradas.write('{};{};{};()\n'.format(hora_atual,(hora_atual
hora_inicial),pt_in,pulso_ativo))

```

```

    time.sleep(1)

```

```

    a_aux = (placa.analog[2].read()) #Leitura para evitar interferência. Pino ligado ao terra.

```

```

    time.sleep(1)

```

```

    pt_out1 = (placa.analog[0].read()) #Recebe duas vezes a leitura como forma de
descartar a primeira leitura

```

```

    time.sleep(1)

```

```

    pt_out1 = (placa.analog[0].read())

```

```

    time.sleep(1)

```

```

    pt_out2 = (placa.analog[0].read())

```

```

    time.sleep(1)

```

```

    pt_out3 = (placa.analog[0].read())

```

```

    pt_out = (((pt_out1 + pt_out2 + pt_out3) / 3) - 0.2) * 125)

```

```

    with open('leituras_saida_pt_100.txt','a') as txt_saidas:

```

```

        txt_saidas.write('{};{};{};()\n'.format(hora_atual,(hora_atual
hora_inicial),pt_out,pulso_ativo))

```

```

    time.sleep(1)

```

```

a_aux = (placa.analog[2].read()) #Leitura para evitar interferência. Pino ligado ao terra.

pulso +=1

placa.digital[5].write(0)
time.sleep(0.5)
placa.digital[9].write(1)
time.sleep(0.5)

for j in range(3):

    hora_atual = time.time()

    time.sleep(1)
    pt_in1 = (placa.analog[5].read()) #Recebe duas vezes a leitura como forma de
descartar a primeira leitura
    time.sleep(1)
    pt_in1 = (placa.analog[5].read())
    time.sleep(1)
    pt_in2 = (placa.analog[5].read())
    time.sleep(1)
    pt_in3 = (placa.analog[5].read())
    pt_in = (((pt_in1 + pt_in2 + pt_in3) / 3) - 0.2) * 125

    with open('leituras_entrada_pt_100.txt','a') as txt_entradas:
        txt_entradas.write('{};{};{};\n'.format(hora_atual,(hora_atual
hora_inicial),pt_in,pulso_ativo))

    time.sleep(1)

a_aux = (placa.analog[2].read()) #Leitura para evitar interferência. Pino ligado ao
terra.

```

```

    time.sleep(1)
    pt_out1 = (placa.analog[0].read()) #Recebe duas vezes a leitura como forma de
descartar a primeira leitura
    time.sleep(1)
    pt_out1 = (placa.analog[0].read())
    time.sleep(1)
    pt_out2 = (placa.analog[0].read())
    time.sleep(1)
    pt_out3 = (placa.analog[0].read())
    pt_out = (((pt_out1 + pt_out2 + pt_out3) / 3) - 0.2) * 125

    with open('leituras_saida_pt_100.txt','a') as txt_saidas:
        txt_saidas.write('{};{};{};()\n'.format(hora_atual,(hora_atual
hora_inicial),pt_out,pulso_ativo))

    time.sleep(1)
    a_aux = (placa.analog[2].read()) #Leitura para evitar interferência. Pino ligado ao
terra.

    pulso +=1

    placa.digital[5].write(1)
    time.sleep(0.5)
    placa.digital[9].write(0)
    time.sleep(0.5)

    hora_atual = time.time()

    time.sleep(1)
    pt_in1 = (placa.analog[5].read()) #Recebe duas vezes a leitura como forma de descartar a
primeira leitura
    time.sleep(1)

```

```

pt_in1 = (placa.analog[5].read())
time.sleep(1)
pt_in2 = (placa.analog[5].read())
time.sleep(1)
pt_in3 = (placa.analog[5].read())
pt_in = (((pt_in1 + pt_in2 + pt_in3) / 3) - 0.2) * 125

with open('leituras_entrada_pt_100.txt','a') as txt_entradas:
    txt_entradas.write('{};{};{} \n'.format(hora_atual,(hora_atual - hora_inicial),pt_in))

time.sleep(1)
a_aux = (placa.analog[2].read()) #Leitura para evitar interferência. Pino ligado ao terra.

time.sleep(1)
pt_out1 = (placa.analog[0].read()) #Recebe duas vezes a leitura como forma de descartar
a primeira leitura
time.sleep(1)
pt_out1 = (placa.analog[0].read())
time.sleep(1)
pt_out2 = (placa.analog[0].read())
time.sleep(1)
pt_out3 = (placa.analog[0].read())
pt_out = (((pt_out1 + pt_out2 + pt_out3) / 3) - 0.2) * 125

with open('leituras_saida_pt_100.txt','a') as txt_saidas:
    txt_saidas.write('{};{};{} \n'.format(hora_atual,(hora_atual - hora_inicial),pt_out))

time.sleep(1)
a_aux = (placa.analog[2].read()) #Leitura para evitar interferência. Pino ligado ao terra.

#print('Leitura entrada:{} Leitura saída:{}'.format(pt_in,pt_out)) #Comentar depois no
código oficial

```

```

#Enviar email com os .txt
loop +=1

for i in loops:
    if i == loop:
        try:
            email.send(to='email.mestrado.paulo@gmail.com', subject='Fermentação x-x de
xx/xx/xx, email nº {}'.format(num_email), contents=""Fermentação x-x
                200 g de meio sendo xx/xx, xxg de bagaço e xxg de farelo
                200 ml sol de sais 20x
                1x10na6 esporos por grama de meio, em 200ml de água
                vazão de ar, 1l por minuto
                agitação em 5rpm a cada 30min por dois dias
                agitado 5 min inicial", attachments=['leituras_entrada_pt_100.txt',
'leituras_saida_pt_100.txt'])
            num_email += 1
            #print ('Email enviado')
        except:
            print('Email nº {} não enviado'.format(num_email))
        else:
            pass

    pulso +=1

else:
    pass

#Desabilitando a leitura
placa.analog[0].disable_reporting()
placa.analog[2].disable_reporting()
placa.analog[5].disable_reporting()
time.sleep(0.5)

```

```
#Fechando conexão com a placa  
placa.exit()  
print('Placa desconectada')
```