

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Produção de celulasas e xilanases por *Penicillium echinulatum* em
processo submerso utilizando biorreatores com agitação mecânica
e *airlift* de circulação interna**

CARLA ELIANA TODERO RITTER

Caxias do Sul

2009

CARLA ELIANA TODERO RITTER

Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em processo submerso utilizando biorreatores com agitação mecânica e *airlift* de circulação interna

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Co-orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Caxias do Sul

2009

CARLA ELIANA TODERO RITTER

**Produção de celulases e xilanases por *Penicillium echinulatum* em
processo submerso utilizando biorreatores com agitação mecânica
e *airlift* de circulação interna**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 01 DE DEZEMBRO DE 2009.

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Orientador

Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira
Co-orientador

Prof. Dr. Elba Pinto da Silva Bon

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray-Laguna

*Aos anjos que Deus me confiou: Guilherme e Natália
e ao meu amado esposo André.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo Dillon.

Ao Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira.

Ao Prof. MSc. José Callef

À Profa. Dra. Ana Rosa Costa Muniz

Ao Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray-Laguna.

À Profa. Dra. Marli Camassola.

À doutoranda MSc. Fernanda Bettin.

À Dra. Roselei Claudete Fontana.

À Rosangela Festugato e à Marielsa Secco.

Aos meus colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos.

Ao laboratório IBRAVIN.

Aos vigilantes do IB.

Por descortinar o saber, pelo carinho, pela paciência, pelo exemplo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vii
NOMENCLATURA	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Fontes de energias renováveis e suas implicações	3
2.2 Celulases	4
2.3 Xilanases	5
2.4 Indutores enzimáticos	6
2.5 Sorbitol	9
2.6 Processos de produção enzimática	10
2.6.1 Processo submerso	10
2.6.1.1 Biorreatores com agitação mecânica	11
2.6.1.2 Biorreatores <i>airlift</i>	15
2.7 Transferência de oxigênio	17
2.8 Condições de crescimento celular e produção de celulases e xilanases	18
2.8.1 Efeito do pH	19
2.8.2 Estabilidade térmica	20
2.8.3 Uso de surfactantes e antiespumantes	21
2.8.4 Meio de cultivo	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Micro-organismo	24

3.2 Soluções	24
3.2.1 Solução de micronutrientes	24
3.2.2 Solução de celulose intumescida 2,5%	24
3.2.3 Solução de sais	25
3.2.4 Tampão citrato 1 M	25
3.2.5 Solução bactericida	25
3.2.6 Antiespumante	25
3.2.7 Soluções para determinação de FPA, endoglicanases, β-glicosidases, xilanases e consumo de sorbitol	25
3.2.6.1 Solução de ácido dinitrosalicílico (DNS)	26
3.2.6.2. Solução de carboximetilcelulose 2%	26
3.2.6.3. Solução de salicina 1%	26
3.2.6.4 Solução para determinação de sorbitol	26
3.3 Meios de cultivo	27
3.3.1 Meio sólido para crescimento e manutenção das linhagens	27
3.3.2 Meio para controle de contaminantes	27
3.3.3 Meio líquido para produção de celulasas e xilanases	27
3.4 Procedimentos para determinação da biomassa, atividade enzimática e consumo de sorbitol	28
3.4.1 Determinação da biomassa expressa em DNA	28
3.4.2 Dosagens enzimáticas para determinação de FPA	28
3.4.3 Determinação de endoglicosidases	29
3.4.4 Determinação de β-glicosidases	29
3.4.5 Determinação de xilanases	29
3.4.6 Determinação de sorbitol	30
3.5 Cultivos submersos para produção de celulasas em frascos sob agitação	31
3.6 Cultivos em biorreator com agitação mecânica	31

3.7 Cultivos em biorreator <i>airlift</i>	32
3.8 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	34
3.9 Velocidade de circulação do meio	34
3.10 Determinação da viscosidade	35
3.11 Estimativa da demanda de oxigênio pelo método dinâmico	35
3.12 Determinação da produtividade volumétrica enzimática	37
3.13 Análise estatística dos resultados	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Cultivo submerso em frascos sob agitação	38
4.1.1 Produção de celulasas e xilanases em cultivo submerso em frascos sob agitação contendo sorbitol como fonte de carbono solúvel	39
4.1.2 Utilização de celulose concomitantemente com sorbitol e lactose	42
4.1.3 Produção de celulasas e xilanases em função da concentração de celulose e sorbitol e pesquisa do tempo de adição da celulose	46
4.1.4 Otimização para a produção de celulasas e xilanases em função da concentração de celulose, de sorbitol e do tempo de adição da celulose	51
4.1.5 Suplementação de meio de cultivo em ensaios realizados em frascos sob agitação	63
4.2 Produção de celulasas e xilanases em biorreator com agitação mecânica	71
4.2.1 Ensaios em biorreator com agitação mecânica em regime de batelada	71
4.2.2 Ensaios em biorreator com agitação mecânica em regime de batelada alimentada	85
4.2.3 Ensaios de cultivo em biorreator de agitação mecânica em regime de batelada alimentada com volume variável	99
4.3 Produção de celulasas e xilanases em biorreator <i>airlift</i> de circulação interna	105
4.3.1 Influência do crescimento celular na velocidade de circulação do meio	105
4.3.2 Produção enzimática de celulasas e xilanases em reator <i>airlift</i> com diferentes composições de fonte de carbono	110

4.3.3. Influência do tempo de adição de celulose em biorreator <i>airlift</i>	117
4.4 Cultivos em frascos sob agitação utilizando bagaço de cana-de-açúcar e sorbitol	123
5 CONCLUSÕES	128
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de biorreatores <i>airlift</i>.	15
Figura 2. Representação da dissolução do oxigênio da bolha de ar até a célula.	17
Figura 3. Etapas da reação do manitol para obtenção de composto corado.	30
Figura 4. Biorreatores <i>airlift</i> de circulação interna e com agitação mecânica utilizados nos ensaios.	34
Figura 5. Produção de FPA e variação do pH em meios contendo celulose e sorbitol em frascos sob agitação recíproca.	40
Figura 6. Produção de endoglicanase em meios contendo celulose e sorbitol em frascos sob agitação recíproca.	41
Figura 7. Produção de β-glicosidase e xilanase em meios contendo celulose e sorbitol em frascos sob agitação recíproca.	42
Figura 8. Produção enzimática de FPA em cultivo submerso em frascos sob agitação recíproca em meios contendo sorbitol, lactose e celulose.	43
Figura 9. Produção enzimática de xilanase em cultivo submerso em frascos sob agitação recíproca em meios contendo sorbitol, lactose e celulose.	44
Figura 10. Produção enzimática β-glicosidase e endoglicanase em cultivo submerso em frascos sob agitação recíproca em meios contendo sorbitol, lactose e celulose.	45
Figura 11. Atividade enzimática sobre papel filtro em cultivo submerso de <i>Penicillium echinulatum</i> em meios contendo sorbitol e com a adição de celulose em 12 e 36 horas de processo.	46
Figura 12. Atividade enzimática sobre papel filtro em cultivo submerso de <i>Penicillium echinulatum</i> em meios com e sem sorbitol e com a adição de celulose em 0, 24 e 48 horas de processo.	47
Figura 13. Variação do pH em cultivo submerso de <i>Penicillium echinulatum</i> em meio contendo sorbitol e com a adição de celulose em 12, 24 e 36 horas de processo.	48
Figura 14. Produção enzimática de endoglicanase em cultivo submerso de <i>Penicillium echinulatum</i> em meios contendo sorbitol e com a adição de celulose em 12 e 36 horas de processo.	49
Figura 15. Produção enzimática de xilanase em cultivo submerso de <i>Penicillium echinulatum</i> em meios contendo sorbitol e com a adição de celulose em 12 e 36 horas de processo.	49

- Figura 16.** Produção enzimática de xilanase em cultivo submerso de *Penicillium echinulatum* em meios com e sem sorbitol e com a adição de celulose em 0, 24 e 48 horas de processo e em meio com sorbitol como única fonte de carbono. 50
- Figura 17.** Produção enzimática de β -glicosidase em cultivo submerso de *Penicillium echinulatum* em meios com e sem sorbitol e com a adição de celulose em 0, 24 e 48 horas de processo e em meio contendo sorbitol como única fonte de carbono. 51
- Figura 18.** Superfície de resposta da atividade sobre papel filtro em função da concentração de sorbitol e celulose em cultivo submerso de cinco dias em frasco sob agitação por *Penicillium echinulatum*. 54
- Figura 19.** Valores observados X valores estimados de FPA no quinto dia de cultivo. 56
- Figura 20.** Superfície de resposta de FPA por *Penicillium echinulatum* em função da concentração de celulose e do tempo de adição em cultivo submerso em frascos sob agitação de cinco dias. 57
- Figura 21.** Valores observados X valores estimados de xilanase no quinto dia de cultivo, com variação explicada de 92%. 58
- Figura 22.** Superfície de resposta da atividade de xilanase no quinto dia de cultivo em frascos sob agitação por *Penicillium echinulatum* em função da concentração de celulose e de sorbitol. 59
- Figura 23.** Superfície de resposta da atividade de xilanase em frasco sob agitação por *Penicillium echinulatum* em função da concentração de celulose e do tempo de adição no 5º dia de cultivo. 60
- Figura 24.** Superfície de resposta da atividade de endoglicanase no quinto dia de cultivo em frascos sob agitação por *Penicillium echinulatum* em função da concentração de celulose e de sorbitol. 61
- Figura 25.** Superfície de resposta da produção de endoglicanase em cultivo submerso de quatro dias em frascos sob agitação com *Penicillium echinulatum* em função do tempo de adição e da concentração de celulose. 63
- Figura 26.** Cinética de produção de FPA em frascos sob agitação com alimentação no segundo, terceiro e quarto dias de cultivo. 65
- Figura 27.** Cinética de produção de endoglicanase em frascos sob agitação com alimentação no segundo, terceiro e quarto dias de cultivo. 67
- Figura 28.** Cinética de produção de β -glicosidase em frascos sob agitação com alimentação no segundo, terceiro e quarto dias de cultivo. 68
- Figura 29.** Cinética da produção de xilanase em frascos sob agitação com alimentação no segundo, terceiro e quarto dias de cultivo. 71

- Figura 30.** Produção enzimática de FPA, β -glicosidase, xilanase e endoglicanase, consumo de sorbitol e crescimento de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 0,75% (m/v) de celulose em biorreator com agitação mecânica. 72
- Figura 31.** Produção enzimática de FPA, β -glicosidase, xilanase e endoglicanase, pH e crescimento de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 1% (m/v) de celulose em biorreator com agitação mecânica 75
- Figura 32.** Produção enzimática de FPA, β -glicosidase, xilanase e endoglicanase, consumo de sorbitol e crescimento de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol em biorreator com agitação mecânica 77
- Figura 33.** Crescimento de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol em diferentes condições operacionais de aeração e agitação. 78
- Figura 34.** Produção de FPA (A) e crescimento (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 2% (m/v) e 3% (m/v) de celulose. 79
- Figura 35.** Perfil de atividade de endoglicanase (A) e β -glicosidase (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 2% (m/v) e 3% (m/v) de celulose. 80
- Figura 36.** Atividade de xilanases em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 2% (m/v) e 3% (m/v) de celulose. 81
- Figura 37.** Perfil de atividade enzimática de FPA e endoglicanase (A), xilanase e β -glicosidase (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* em meios contendo 1% (m/v) de sorbitol e 1% (m/v) de celulose em biorreator com agitação mecânica. 82
- Figura 38.** Crescimento celular, consumo de sorbitol (A) e variação do pH (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol e 1% (m/v) de celulose em biorreator com agitação mecânica 83
- Figura 39.** Variação do consumo de oxigênio dissolvido (%) em meios inoculados cel1m, sorb1m, cel0,75m, cel3, cel1sorb1 em função do tempo. 84
- Figura 40.** Produção enzimática de FPA, β -glicosidase, xilanase e endoglicanase e crescimento de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol e alimentado com 1% (m/v) de celulose em 26 horas em biorreator com agitação mecânica. 86
- Figura 41.** Perfil de crescimento celular, consumo de sorbitol, atividade enzimática de FPA, β -glicosidase, xilanase e endoglicanase de cultivo com *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol, alimentado com 1% (m/v) de celulose após 48 horas de cultivo. 89
- Figura 42.** Concentração celular, consumo de sorbitol (A) e variação do pH (B) e atividade enzimática no cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com 91

agitação mecânica em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol, alimentado com 1,7% (m/v) de celulose após 48 horas.

Figura 43. Perfil de concentração celular, atividade enzimática e pH de cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 1% (m/v) de celulose em 12 horas de cultivo 93

Figura 44. Perfil de concentração celular, consumo de sorbitol e atividade enzimática de cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 0,75% (m/v) de celulose após 36 horas de cultivo. 95

Figura 45. Perfil de concentração celular, variação do pH e atividade enzimática em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 1,7% (m/v) de celulose após 36 horas de cultivo. 97

Figura 46. Perfil de produção enzimática e crescimento celular em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica alimentado com 0,5% (m/v) de celulose em 48, 72 e 96 horas de cultivo, totalizando 2% (m/v) de celulose. 101

Figura 47. Perfil de concentração celular, variação do pH e perfil de atividade enzimática em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 1,75% (m/v) de celulose em 48, 72 e 96 horas em volume variável do biorreator. 104

Figura 48. Velocidade de circulação do meio no *downcomer* e biomassa fúngica em função do tempo em biorreator *airlift* de circulação interna (A). Meio contendo 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol a 0,79 vvm. Concentração celular e velocidade do meio contendo 1% (m/v) de sorbitol (B) e velocidade de circulação do meio contendo 1% (m/v) de celulose, 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol e somente 1% (m/v) de sorbitol (C). 107

Figura 49. Velocidade no *downcomer*, variação do pH e concentração celular com vazão de ar de 0,79 vvm em biorreator *airlift* de circulação interna em função do tempo em meio de cultivo contendo 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol. 108

Figura 50. Concentração celular, viscosidade e consumo de oxigênio dissolvido em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* em meio contendo 0,5% (m/v) de celulose e 0,5% (m/v) de sorbitol. 110

Figura 51. Perfil de atividade de FPA (A) e endoglicanase (B) no cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meios constituídos de celulose e sorbitol como fontes de carbono. 112

Figura 52. Perfil de atividade xilanosídica no cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meios constituídos de celulose e sorbitol como fontes de carbono. 112

- Figura 53.** Perfil de atividade de β -glicosidase no cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meios constituídos de celulose e sorbitol como fontes de carbono. 113
- Figura 54.** Velocidade máxima de produção enzimática em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol (A), cel0,75 (B) e cel1 (C) em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna 115
- Figura 55.** Perfil de concentração celular (A) e atividades enzimáticas (B) obtidas em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 1,75% (m/v) de celulose. 116
- Figura 56.** Concentração celular (A) e atividade de FPA (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado após 30 horas com 0,75% (m/v) de celulose 118
- Figura 57.** Perfil de crescimento celular e atividade enzimática em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 0,75% (m/v) de celulose em 48 horas. 121
- Figura 58.** Produção enzimática de FPA em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em frascos sob agitação recíproca. 124
- Figura 59.** Atividade de xilanases em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em frascos sob agitação recíproca. 125
- Figura 60.** Atividade de endoglicanases em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em frascos sob agitação recíproca 126
- Figura 61.** Atividade de β -glicosidases em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em frascos sob agitação recíproca. 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Indução de celulasas em <i>Trichoderma viride</i>.	8
Tabela 2. Atividade sobre papel filtro no quinto dia de cultivo submerso, em ensaios com variação na concentração de celulose e sorbitol e tempo de adição da celulose ao meio.	53
Tabela 3. Coeficientes de regressão para resposta para atividade FPA.	56
Tabela 4. Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de endoglicanase em cultivo submerso.	62
Tabela 5. Valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) em diferentes condições de agitação em meio não inoculado.	74
Tabela 6. Demanda de oxigênio e máxima velocidade específica de crescimento em biorreator com agitação mecânica em regime em batelada.	85
Tabela 7. Atividade de β-glicosidase em mistura reacional contendo diferentes concentrações de sorbitol.	88
Tabela 8. Velocidade de circulação do meio (U_L) em vazões de ar de 0,49; 0,79 e 1,25 vvm no início do cultivo.	109
Tabela 9. Avaliação de diferentes parâmetros em ensaios realizados com <i>Penicillium echinulatum</i> em biorreator <i>airlift</i> de circulação interna.	114

NOMENCLATURA

CMC – carboximetilcelulose.

CMCase – carboximetilcelulase.

DCCR – delineamento composto central rotacional.

FPA – atividade sobre papel filtro.

FPU – unidades sobre papel filtro.

K_{La} – coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

PVC – policloreto de vinila.

rpm – rotações por minuto.

rps – rotações por segundo.

SSF – sacarificação e fermentação simultâneas.

U_L – velocidade de circulação do meio.

U_{Lr} – velocidade de circulação do meio no *riser*.

VND – velocidade no *downcomer*.

μ_{xm} – máxima velocidade específica de crescimento.

RESUMO

Complexos celulolíticos possuem aplicações principalmente nas indústrias alimentícia, do vestuário e do papel; entretanto, seu uso de maior potencial é a hidrólise da celulose, componente dos resíduos lignocelulósicos, visando à produção do etanol. Dentre os micro-organismos produtores de celulasas, destacam-se os mutantes do gênero *Trichoderma*, que são os mais estudados e utilizados industrialmente. Mutantes de *Penicillium echinulatum* também estão entre os micro-organismos atualmente estudados para a produção de celulasas. Neste trabalho, são apresentados dados de produção de celulasas por *P. echinulatum* em cultivos submersos em frascos agitados e em biorreatores com agitação mecânica e *airlift* de circulação interna, na presença de celulose e sorbitol. A caracterização do meio e o tempo de adição do indutor e fontes de carbono também foram estudados, inicialmente, em frascos sob agitação recíproca. As condições que apresentaram os melhores resultados em frascos foram testadas em biorreatores com agitação mecânica e *airlift*. Estudaram-se condições hidrodinâmicas, como velocidade de fluxo e aeração em biorreator *airlift* para a otimização da produção de celulasas, bem como composições de meios em biorreator com agitação mecânica, onde o oxigênio dissolvido foi mantido em níveis mínimos de 20% da saturação. Como indicadores de avaliação, foram realizadas análises enzimáticas de FPA (atividade sobre papel filtro), β -glicosidase, endoglicanase e xilanase; concentração de biomassa; consumo da fonte de carbono e variação do pH. Os resultados obtidos em frascos sob agitação mostraram que sorbitol, ao ser empregado como substituto parcial da celulose, apresenta vantagem na produção enzimática e na reologia do cultivo. Também, constatou-se que o tempo de adição da celulose influencia a produção enzimática em cultivos submersos e que a lactose, associada ao sorbitol, promove maiores títulos enzimáticos. Em relação ao uso dos biorreatores, verificaram-se melhores resultados em *airlift* para o meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 0,75% (m/v) de celulose, quando comparado ao biorreator com agitação mecânica. Ensaio com alimentação em três estágios não apresentaram resultados relevantes quanto à produção enzimática e à produtividade volumétrica. Testes iniciados com sorbitol e alimentados com celulose apresentaram melhores resultados com relação aos realizados em regime de batelada. Ensaio iniciados com 0,25% (m/v) de sorbitol apresentaram maior produtividade volumétrica quando comparados aos iniciados com 1% (m/v). Constatou-se que a celulose pode ser substituída, também, por uma fonte de carbono insolúvel, de baixo custo e de fácil obtenção, o bagaço de cana de açúcar. Em frascos sob agitação, a atividade de celulasas e xilanases em cultivos com bagaço apresentaram atividade similar a cultivos contendo celulose cristalina.

ABSTRACT

Cellulolytic enzymes have many uses, particularly in the food, textile, and paper industries. However, their major potential use is in the hydrolysis of cellulose – a component of lignocellulosic residues – for ethanol fuel production. Among the cellulase-producing microorganisms, mutants of the *Trichoderma* genus are the most studied and most widely used in the industry. *Penicillium echinulatum* mutants are also among those microorganisms currently being studied for cellulase production. The present study provides data on cellulase production by *P. echinulatum* in submerged culture in flasks under agitation and in stirred tank and internal circulation airlift bioreactors, in the presence of cellulose and sorbitol. Medium composition and supplementation timing of inducers and carbon sources, initially for flasks under agitation, were also studied. Assay conditions showing the best results in flasks were tested in bioreactors with mechanical agitation and airlift. Hydrodynamic conditions, such as flow speed and aeration in airlift bioreactor for cellulase production optimization, as well as medium formulations in bioreactor with mechanical agitation, with oxygen maintained at a minimum 20% saturation level, were studied. Enzymatic analyses of FPA (filter paper activity), β -glucosidase, endoglucanase, and xylanase; biomass concentration; carbon source consumption; and pH variation were used as evaluation indicators. Results obtained in flasks under agitation showed that sorbitol might be used as a partial substitute of cellulose, in favor of enzymatic production and cultivation rheology. It was further observed that cellulose supplementation influences the enzymatic production in submerged cultures, and that lactose in association with sorbitol produces higher enzymatic titers. With regard to bioreactors, the best results were obtained with the airlift bioreactor for a medium containing 0.25% (w/v) sorbitol and 0.75% (w/v) cellulose, when compared to the bioreactor with mechanical agitation. Assays with 3-phase supplementation did not show any relevant results with regard to enzymatic production and volumetric productivity. Assays initiated with sorbitol and supplemented with cellulose showed better results when compared to those conducted in the batch-production model. Assays initiated with 0.25% (w/v) sorbitol showed higher volumetric productivity compared to those initiated with 1% (w/v) sorbitol. It was found that cellulose might be replaced by sugar cane bagasse, a low-cost and readily available source of insoluble carbon.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a preocupação com questões ambientais visando o desenvolvimento sustentável é mundial. Dentro deste enfoque, a catálise enzimática representa uma alternativa tecnológica em diversos aspectos relacionados à diminuição de energia e à redução da geração de efluentes. Os complexos enzimáticos celulolíticos, além da aplicação no amaciamento de tecidos, usos em alimentos, extração de óleos e em detergentes, apresentam grande potencial de aplicação na liberação de açúcares fermentescíveis de lignocelulósicos, principalmente visando a obtenção de etanol. Como fonte de lignocelulósicos podem ser utilizados resíduos agrícolas como sabugo e palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar, trigo e soja. O uso desta biomassa para a produção de energia deve contribuir para a redução da emissão de gases de efeito estufa, principalmente do dióxido de carbono, ocorrendo substituição do uso de combustíveis fósseis.

As celulasas constituem um complexo enzimático composto por três enzimas hidrolíticas: as endo- β -1,4-glicanases, que hidrolisam as ligações glicosídicas ao acaso na fibra de celulose; as exo- β -1,4-glicanases ou celobio-hidrolases, que agem nas extremidades redutoras e não redutoras de polímeros gerados pela ação das endoglicanases, liberando oligossacarídeos e celobiose; e as β -1,4-glicosidases, que hidrolisam oligossacarídeos e celobiose a glicose.

Mutantes ou recombinantes genéticos de *Trichoderma reesei* são a fonte de celulasas mais intensamente estudada e utilizada comercialmente. Estes micro-organismos estão sendo utilizados para a produção de preparados enzimáticos visando a hidrólise de lignocelulósicos pelas principais empresas da área de tecnologia enzimática, como a Novozymes e a Genecor. Um outro micro-organismo que também vem despertando interesse como produtor de celulasas é o *Penicillium echinulatum*. Mutantes desta espécie já são empregados comercialmente para a produção de preparados enzimáticos visando o tratamento do *blue jeans* e apresentam, também, potencial para

serem utilizados na hidrólise de lignocelulósicos, visando a produção de etanol.

A produção das celulasas ocorre em cultivo submerso e em cultivo sólido. Neste último, o próprio sistema de cultivo admite altas concentrações do substrato indutor, enquanto o cultivo líquido, para atingir altos títulos enzimáticos, precisa de altas concentrações do substrato que, neste caso, é a celulose, um substrato insolúvel. Nestas condições, a viscosidade do meio aumenta, interferindo, também, na reologia da suspensão.

Uma alternativa para diminuir a viscosidade em cultivos submersos é o emprego de uma fonte de carbono solúvel. A lactose é uma fonte de carbono atualmente estudada para esta finalidade em *T. reesei*, com grande sucesso. Entretanto, este dissacarídeo não apresenta capacidade de indução de celulasas em *P. echinulatum*.

Outras fontes de carbono, como os poliois glicerol e sorbitol, permitem o crescimento de *T. reesei* sem causar repressão. O emprego do sorbitol, juntamente com a celulose, não causa efeito de repressão catabólica na produção de celulasas em *P. echinulatum*.

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o emprego de sorbitol na formulação de meios para a produção de celulasas e xilanases por *P. echinulatum*, utilizando cultivos em frascos sob agitação, em biorreator com agitação mecânica e em biorreator *airlift* de circulação interna, buscando-se atingir os seguintes objetivos específicos:

- avaliar formulações de meio de cultivo com sorbitol visando melhoria nas atividades enzimáticas de celulasas e xilanases;
- verificar a influência do tempo de adição e da concentração de celulose na produção de celulasas em frascos agitados e em biorreatores *airlift* de circulação interna e com agitação mecânica;
- comparar os resultados obtidos em biorreator com relação à produtividade volumétrica e à produção enzimática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fontes de energias renováveis e suas implicações

Mudanças no comportamento da sociedade do século XXI são necessárias, devido ao aumento na demanda de combustíveis para transporte, aquecimento e processos industriais. Desta forma, há uma previsão de restrição ao consumo de combustíveis não renováveis, como o petróleo, em função do seu custo e disponibilidade. Este combustível, como outros, causa danos ambientais que geram mudanças climáticas, além de conflitos entre países em função da disputa pelo petróleo.

Uma solução renovável é o uso da energia solar na forma de biomassa, representada por resíduos lignocelulósicos para a produção de biocombustíveis, principalmente o etanol. Segundo Sun & Cheng (2002), em geral, os materiais lignocelulósicos utilizados para a produção de etanol podem ser divididos em seis grupos:

- resíduos agrícolas, como bagaço de cana, palha, caule e folhas de milho, palha de trigo, palha e casca de arroz, palha de cevada, bagaço de sorgo;
- madeira macia;
- madeira, como pinus e árvores coníferas;
- resíduos de celulose, como papel jornal, papel de escritório e papel reciclado;
- biomassa herbácea, como alfafa, gramíneas e ervas perenes resistentes à seca;
- resíduos sólidos municipais.

A produção de etanol a partir de lignocelulósicos ocorre em várias etapas. Uma delas mostra a necessidade de hidrólise do material lignocelulósico. Este material pode ser submetido a tratamento físico, químico e/ou biológico e as enzimas envolvidas neste processo são as celulasas e xilanases. A vantagem da hidrólise enzimática com relação às outras está no fato de esta não

necessitar de utilitários caros, como eletricidade, sistemas de resfriamento e gás, além de evitar a corrosão dos equipamentos (Sun & Cheng, 2002).

A hidrólise enzimática envolve, segundo Bansal *et al.* (2009), os seguintes passos: absorção da celulase no substrato via ligações dominantes, localização de ligações suscetíveis de hidrólise na superfície do substrato, formação do complexo enzima-substrato, hidrólise de ligações β -glicosídicas, desorção da celulase do substrato e, por fim, hidrólise da celobiose a glicose. A presença de produtos de inibição e a mudança nas propriedades do substrato podem afetar o processo de hidrólise.

2.2 Celulases

Celulases são complexos enzimáticos secretados por micro-organismos como fungos e bactérias, podendo, também, estar presentes no sistema digestório de gastrópodes. Este complexo pode liberar glicose do polissacarídeo celulose, que é a substância orgânica renovável mais abundante na natureza. A celulose é, portanto, composta de unidades de β -D-glicose, presente principalmente nas células vegetais, como constituinte da parede celular (Mansfield *et al.*, 1999).

Três são os componentes majoritários do sistema enzimático das celulases: endo- β -1,4-glicanase (EG I, EG II, EG III e EG V; EC 3.2.1.4), que hidrolisa ligações glicosídicas em fibras de celulose ao acaso; exo- β -1,4glicanase (CBH I e CBH II; EC 3.2.1.91), que age sobre extremidades reductoras e não reductoras de polímeros e β -1,4 glicosidase (BG I e BG II; EC 3.2.1.21), que hidrolisa oligossacarídeos e celobiose a glicose. Existe uma ação sinérgica, na qual a ação de duas ou mais enzimas combinadas é maior que a soma das atividades individuais. Este sinergismo depende da natureza do substrato, afinidade do componente celulase com o substrato, concentração da enzima e proporção entre os componentes enzimáticos (Mansfield *et al.*, 1999).

Segundo Dillon (2004), as celulases são utilizadas comercialmente principalmente no descoramento e amaciamento de tecidos e em formulações de detergentes domésticos e industriais, com o objetivo de quebrar as microfibrilas que se separam das fibras principais dos tecidos de fibras naturais, dando o aspecto desbotado por refletir mais intensamente a luz que incide no tecido. Neste processo, as microfibrilas indesejáveis, já desestruturadas pelo tempo e ligadas a sujidades são removidas, restituindo o brilho ao tecido. Quando celulases são adicionadas ao detergente, o custo deste é de aproximadamente 0,4% maior (Bhat, 2000). Segundo Said & Pietro (2002), as celulases podem, também, ser empregadas na extração de pigmentos e alcalóides, na produção de sucos e produtos estimulantes de digestão.

Enzimas comerciais, como a *Olivex*[®] (pectinase com níveis de celulase e hemicelulase produzida por *Aspergillus aculeatus*), são usadas para a extração de óleo de oliva. Estudos revelam que a eficiência do complexo só ocorre na presença das três enzimas e que a eficiência cai drasticamente quando são utilizadas separadamente. Outra aplicação das celulases é a sua adição em alimentos para animais, pois eliminam fatores não nutricionais em grãos e vegetais e favorecem a digestibilidade do alimento, além de casos relatados de aumento de peso do animal e maior rendimento de leite em bovinos (Bhat, 2000).

Atualmente, a celulase apresenta grande interesse para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção de etanol e está contida em preparações farmacêuticas com o objetivo de auxiliar a digestão.

2.3 Xilanases

As xilanases atuam no componente hemicelulose da parede celular dos vegetais; conhecidas como 1,4- β -D-xilana-xilano-hidrolases (EC 3.2.1.8), constituem um grupo de enzimas produzidas

por fungos, leveduras e bactérias e são aplicadas na indústria de alimentos para animais, no processamento de alimentos e na indústria de polpa de papel (Xiong *et al.*, 2005). Na indústria de polpa de papel, a xilanase remove a xilana proveniente do complexo carboidrato-lignina, reduzindo o consumo de produtos a base de cloro, que causam grande poluição ambiental (Bhat, 2000).

As formulações com xilanases para rações animais são utilizadas, principalmente, para liberar nutrientes das fibras de hemicelulose que não foram degradadas ou liberar nutrientes que permaneceram bloqueados por estas fibras. Isto resulta em diminuição da viscosidade, aumentando a digestibilidade do alimento. (Xiong *et al.*, 2005).

Resíduos celulósicos podem ser empregados, alternativamente, como substrato para a produção de celulasas e xilanases, devido à presença de carboidratos complexos. Techapun *et al.* (2003) em estudos realizados com *Streptomyces* sp. AB106 cultivado com bagaço de cana em reator de 5 litros, verificou máxima atividade de xilanase de 16 UI/mL com aeração de 1 vvm e 150 rpm. Quando utilizado o regime de batelada alimentada, houve um grande incremento na atividade (32 UI/mL) durante o segundo ciclo de alimentação.

2.4 Indutores enzimáticos

A síntese de celulasas está sujeita à indução pelo substrato (celulose cristalina) e à repressão por uma fonte de carbono mais facilmente utilizável (glicose). A celobiose é efetiva em algumas espécies, dependendo de sua concentração (em geral, altos índices não são indutivos, mas níveis baixos, sim). A lactose pode ser um bom indutor, apesar de não ser encontrada naturalmente no meio de cultivo de fungos celulolíticos (Magnelli & Forchiassin, 1999; Pardo & Forchiassin, 1999).

Em estudos sobre a indução por lactose em *Penicillium echinulatum*, Camassola *et al.* (2004) sugeriram mecanismos diferenciados para a produção de FPA (atividade sobre papel filtro) e

β -glicosidases, ocorrendo indução somente para β -glicosidases e possibilitando a redução da concentração de celulose na composição do meio de cultivo, com reflexos positivos na diminuição dos problemas de transferência de oxigênio e reologia.

Fang *et al.* (2008) afirmaram que a lactose é um poderoso indutor para *Acidothermus cellulolyticus*, pois provocou aumento do rendimento de celulases por estimular a atividade de várias proteínas com atividade celulolíticas. Quando substituíram parte da celulose *SolkaFloc*[®] por soforose, não ocorreu mudança significativa na produção de FPA, enquanto que a adição de celobiose, sorbose, galactose e ácido lactobiônico provocaram redução na atividade enzimática.

Mandels *et al.* (1976) observaram aumento na atividade de celulases em cerca de 100 vezes quando soforose é adicionada ao meio de cultivo. Sternberg & Mandels (1979) verificaram que as β -glicosidases possuem elevados títulos na presença de soforose e que esse dímero proporciona máxima indução a 28°C e pH 3, condição que reduz drasticamente a atividade das β -glicosidases. Também verificaram que baixas concentrações de lactose, celobiose e glicose (abaixo de 1 μ g/mL) não induzem a formação de celulase e que a temperatura de 39°C exerce um efeito letal sobre as células.

Segundo Mandels & Weber (1969), para *Trichoderma viride*, existe uma ampla variedade de fontes indutoras de celulases, tal como se observa na Tabela 1.

Tabela 1. Indução de celulasas em *Trichoderma viride* (Mandels & Weber, 1969).

Substrato indutor	C1	Cx	C1/Cx
Amido	0,0	0,0	0,0
Celobiose	7	8,5	0,8
Fibra de algodão	8,8	4,3	2,0
Glicerol	0,0	0,0	0,0
Glicose	0,0	0,0	0,0
Lactose	1,0	4,8	0,2
Soforose	12	28	0,4
<i>SolkaFloc</i>	8,8	10,3	0,9
Tecido de algodão	10	8,3	1,2

C1 (mg de açúcares redutores liberados de 2,5% de algodão após 24 horas a 50°C).

Cx (mg de glicose liberada de 0,5% de carboximetilcelulose em 30 minutos a 50°C pelo filtrado enzimático).

Morikawa *et al.* (1995) investigou o efeito sinérgico de diversos açúcares na formação de celulasas e constatou que glicose, frutose, maltose e sorbitol não favorecem a formação destas enzimas em *Trichoderma reesei* PC-3-7.

Camassola & Dillon (2007) sugeriram o uso de metilxantinas nos meios de cultivo de *P. echinulatum* 2HH e 9A02S1 para incrementar a produção de β -glicosidases e FPA, principalmente a cafeína e teofilina.

Quando glicose ou xilose são utilizadas no meio, em substituição a xilo-oligossacarídeos, o rendimento enzimático é baixo (15 U/mL), indicando que estes polissacarídeos são necessários para a indução da síntese de xilanases (Samain *et al.*, 1997).

Em estudos realizados com *Cellulomonas flavigena*, Noyola & Torre (2001) verificou a redução na atividade enzimática de FPA, xilanase e endoglicanase em cultivo contínuo contendo glicose nas concentrações de 1,2 e 2,5 g/L e celobiose nas concentrações de 0 a 5 g/L.

2.5 Sorbitol

Sorbitol ($C_6H_{14}O_6$) é um poliol secretado por *Zymomonas mobilis* e outros microorganismos para a regulação da pressão osmótica (Silveira & Jonas, 2002) e possui a capacidade de ser metabolizado como fonte de carbono, produzindo massa celular.

Em pesquisas realizadas com alguns mutantes de *T. reesei*, Druzhinina *et al.* (2006) estudou o crescimento em 95 fontes de carbono, incluindo monossacarídeos, dissacarídeos, poliois, aminoácidos e ácidos orgânicos. Os autores verificaram que o crescimento em D-sorbitol é similar ao que ocorre com *Tween* 80[®], sendo que alguns mutantes mostraram maior crescimento utilizando este poliol. Com relação à produção de celulases, concluiu-se que D-sorbitol pode ser utilizado por *T. reesei*, podendo ser convertido a L-sorbose por uma NADP-dependente-cetona-redutase.

Também utilizando sorbitol como fonte de carbono para a produção de celulases, Juhász *et al.* (2005) o consideraram uma fonte neutra, não agindo como indutor e nem como repressor em cultivo de *T. reesei* Rut C-30 realizado com tampão Tris-maleato. Entretanto, Gupta *et al.* (2009) relataram que, em cultivo com *Fusarium solani* F7 contendo 1% (m/v) de sorbitol e 3% (m/v) de resíduos de trigo, a influência do sorbitol na produção de xilanase foi moderada. Este efeito foi similar aos obtidos com galactose, frutose, CMC (carboximetilcelulose) e glicose, tanto para células imobilizadas como para células livres.

Em pesquisa com *Hypocrea atroviridis* IMI 206040, Friedl *et al.* (2008) constataram esporulação acelerada durante a ausência de luz quando comparada à presença deste fator, influenciando o crescimento fúngico. Também constataram que a adição de dibutilil-cAMP em meio contendo sorbitol não proporciona diferença na esporulação com relação à presença ou ausência de luz.

Em estudos realizados com *Hypocrea jecorina*, Pail *et al.* (2004) verificaram que ocorre relevante crescimento celular em meios contendo D-sorbitol, similar a galactitol e D-talitol, enquanto que em D-alitol e L-iditol não houve crescimento. Também verificaram a oxidação, em pH 8,6, de D-sorbitol a L-frutose. Quando compraram a constante de especificidade do substrato (K_{cat}/K_M) em L-arabinitol, verificaram que esta foi máxima quando comparada às demais hexoses, atingindo 201 M/s, já em D-sorbitol e L-sorbitol, as constantes apresentaram variações, de 3,01 e 0,10 M/s, respectivamente.

2.6 Processos de produção enzimática

2.6.1 Processo submerso

Atualmente, apenas 5% das enzimas comercialmente importantes são produzidas por fermentação em estado sólido. Os processos de fermentação submersa dominam a produção da maioria das enzimas microbianas comerciais, principalmente, porque o controle do processo e a esterilização são mais favorecidos neste sistema.

A fermentação submersa envolve o crescimento de um micro-organismo em suspensão em um meio líquido, no qual vários nutrientes estão dissolvidos ou suspensos, como partículas sólidas. Há muitos tipos de sistemas de reatores viáveis para a fermentação submersa, que podem ser classificados em sistemas de misturas por agitadores mecânicos, com bombas externas, colunas de bolhas e *airlift*.

Para a construção do biorreator, no entanto, é necessária a utilização de critérios para a seleção do material que será utilizado. Bommarius *et al.* (2008) verificaram que 24% de celulasas e 42% de β -glicosidase ficam adsorvidas no vidro onde o experimento é realizado. Esta adsorção com o vidro pode ser prevenida com a adição de pequena quantidade de albumina bovina, que evita a

adsorção de celulasas e não afeta a atividade enzimática. Os autores constataram que os tubos de polipropileno dos frascos de *Eppendorf* também adsorvem muita celulase.

Quanto às formas de operação, os processos fermentativos em meio líquido podem ser divididos em três regimes principais: descontínuo (ou batelada), descontínuo alimentado (semicontínuo ou batelada alimentada) e contínuo. Os processos descontínuos são os mais utilizados e apresentam como vantagens poucos problemas de contaminação e mutações, devido ao inóculo ser renovado ou tratado após cada batelada; facilidade de operação e concentrações elevadas de produtos no meio. Entretanto têm como desvantagens produtividade baixa, inibição por substrato e pelo produto e tempos mortos para limpeza e esterilização (Silveira & Molina, 2002).

Já os processos descontínuos alimentados apresentam como vantagens ausência de inibição pelo substrato e facilidade de operação, podendo apresentar inibição pelo produto e necessidade de maior conhecimento do processo microbiológico. Finalmente, os processos contínuos apresentam maior risco de contaminação, maior necessidade de controle e menor concentração de produto no meio de fermentação (Silveira & Molina, 2002).

2.6.1.1 Biorreatores com agitação mecânica

Denominam-se “biorreatores”, “reatores bioquímicos” ou ainda “reatores biológicos” os reatores nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores. Esses biocatalisadores podem ser enzimas ou células vivas (células microbianas, animais ou vegetais). Assim, é possível classificar os biorreatores em dois grandes grupos: biorreatores nos quais as reações ocorrem na ausência de células vivas e nos quais as reações se processam na presença das mesmas (Schmidell & Facciotti, 2001).

O reator com agitação mecânica é o mais amplamente empregado em cultivos microbianos, constituindo cerca de 90% do total de reatores utilizados industrialmente (Schmidell & Facciotti,

2001). Consiste em um tanque cilíndrico, no qual são comuns as relações entre a altura e o diâmetro de 2:1 ou 3:1. Normalmente, o reator é equipado com chicanas, cuja função é evitar a formação de vórtices durante a agitação de líquidos. A agitação é proporcionada pelo eixo central do fermentador, disposto ao longo de sua altura, contendo uma série de turbinas, que podem ser de diferentes tipos.

Embora sejam os mais utilizados, os biorreatores com agitação mecânica não são os mais adequados para cultivos de fungos filamentosos, devido à taxa de cisalhamento causada pela agitação das turbinas. Em estudos com *T. reesei*, Ganesh *et al.* (2000) verificou que o aumento na desativação da enzima ocorre com o aumento da agitação. Em seu trabalho, FPA teve uma redução de 3,3% na atividade quando a agitação foi de 8,3 rps, e quando a agitação foi de 16,7 rps, a desativação correspondeu a 6,9%.

Chipeta *et al.* (2008) verificaram a influência da agitação no crescimento e na produção de xilanase em cultivo com *Aspergillus oryzae* tendo como fonte de carbono água residuária proveniente da indústria de polpa de celulose. Os pesquisadores concluíram que, utilizando turbinas *Rushton*, o aumento na velocidade de 1,46 para 3,12 m/s não produz significativa mudança na atividade de xilanase. Entretanto, a biomassa foi afetada, sendo maior quando a velocidade foi de 1,56 m/s. A 3,12 m/s, a atividade máxima de xilanase foi de 94 UI/mL e a biomassa atingiu 2,6 g/L. Quando a velocidade foi de 1,56 m/s, a atividade de xilanase e a biomassa foram de 89 U/mL e 3,5 g/L, respectivamente. Além dessas considerações, grande quantidade de energia é necessária para promover a homogeneidade do meio e a transferência de oxigênio, bem como a manutenção da temperatura do cultivo. Também, é necessária a manutenção da assepsia do meio durante o cultivo, o que requer dispositivos complexos. Desta forma, outras configurações de biorreatores, como coluna de bolhas (Schugerl *et al.*, 1977) e *airlift* (Chisti & Moo-Young, 1987), podem ser empregados como alternativa para a solução de tais problemas.

Para produção de celulasas em grande escala por *T. reesei* ZU-02, Liming & Xueliang (2003), utilizando um biorreator com agitação mecânica de 30 m³, obtiveram atividade máxima de celulase de 5,48 UI/mL, tendo como substrato 40 g/L de resíduos de milho. Observou-se que o pico de atividade ocorreu em 3 dias, tempo mais curto quando comparado aos verificados em frascos agitados, nas mesmas condições. Constatou-se, também, que a uma razão carbono/nitrogênio correspondente a 8 estimula a atividade sobre papel filtro.

Em biorreator com agitação mecânica de 20 litros e operando com 11 litros, Watson *et al.* (1984) obteve rendimento máximo de 57 UI/mL de FPA em regime de batelada alimentada. Em seu trabalho com *T. reesei*, utilizou vazão de 1 g/L/h e a produtividade volumétrica atingiu 201 UI/L/h.

Ahamed & Vermette (2008) verificou um aumento na atividade de FPA em cultivo em biorreator com culturas mistas de *Aspergillus niger* e *T. reesei* em meio contendo com 5% (m/v) de celulose e 0,5% (m/v) de extrato de levedura. FPA máxima, em meio contendo somente *A. niger*, foi de 3,4 U/mL, enquanto que o cultivo com ambas as linhagens mostrou 7,1 U/mL. Nesta situação, a produtividade volumétrica para o cultivo misto foi de 1,9 vezes superior ao monocultivo com *A. niger*. Para a atividade de endoglicanase, também se observou aumento na produtividade volumétrica enzimática, 1,5 vezes superior ao monocultivo.

Visando a otimização da aeração e agitação para melhorar a produção de xilanase por *Streptomyces* sp. Ab106, Techapun *et al.* (2003), estudou a influência do tempo de adição do meio em cultivo submerso com resíduos agrícolas. Verificou-se que a adição sucessiva de três ciclos causa lise celular, indicando o uso de reator *airlift*, uma vez que a alta taxa de agitação muda a morfologia do micro-organismo e há alta produtividade no segundo ciclo quando comparada com o inicial, sendo a atividade final e a inicial, 32 e 15 UI/mL, respectivamente. Também, segundo os autores, a aplicação de planejamento experimental proporcionou uma produção máxima de xilanase de 16 IU/mL a 150 rpm e fluxo de ar de 1vvm.

Kim *et al.* (1996), em estudos com *A. niger* KKS, constatou a produção de 0,75 UI/mL de FPA, 3,6 U/ml de β -glicosidase e 85 U/mL de xilanase em cultivo em biorreator com agitação mecânica utilizando 20g/L de casca de arroz. Em cultivo alimentado, o resultado foi superior para todas as enzimas analisadas.

Em estudos com *T. reesei* Rut C-30, Hendy *et al.* (1984) mostraram a conveniência de utilização do regime de batelada alimentada para obter melhores títulos enzimáticos e rendimentos na produção de celulases, em relação aos processos em batelada e contínuo. Estes autores verificaram, em cultivo em batelada, títulos próximos a 8 FPA/mL com 5% (m/v) de *SolkaFloc* 200[®] como fonte de carbono. Quando concentrações de 7,5 a 10% (m/v) da fonte de carbono foram utilizadas em batelada, a atividade de celulases não foi alterada, mas houve diminuição da produtividade (FPA/L/h) devido à baixa velocidade de crescimento, ocasionada por dificuldades de agitação e aeração. Entretanto, em batelada alimentada, com *SolkaFloc*[®] peletizada adicionada em diferentes regimes de alimentação, de forma contínua ou intermitente, até 100 g.L⁻¹ de celulose, foram obtidos títulos enzimáticos superiores a 25 U.mL⁻¹ de FPA e produtividades superiores a 100 U/L/h. Verificou-se que, em taxas maiores de alimentação, houve diminuição dos títulos enzimáticos, mas aumento na produtividade devido à diminuição no tempo de cultivo.

Sternberg & Dorval (1979) realizaram bateladas empregando concentrações de 2 a 8% (m/v) de celulose em estudos com *T. reesei* QM9414, mantendo o pH acima de 3 e com adições de NH₄OH. Os autores verificaram picos de FPA em torno de 2,4 (4^o dia); 3,2 (5^o dia); 4 (6^o dia) e 4 U/mL (6^o dia), para os cultivos com 2, 4, 6 e 8% (m/v) de celulose, respectivamente. O regime de batelada alimentada também proporcionou maiores títulos enzimáticos e maiores produtividades em *Penicillium occitanis*. Estes resultados foram obtidos adicionando-se *Avicel* a cada 20 ou 48 horas, o que possibilitou títulos enzimáticos superiores a 20 U e produtividade de 128 FPA/L/h, enquanto o regime em batelada mostrou títulos de apenas 9 FPA e produtividade de 80 FPA/L/h (Chaabouni *et al.*, 1995).

2.6.1.2 Biorreatores *airlift*

Biorreatores *airlift* possuem o volume de líquido dividido em duas zonas distintas, onde somente uma recebe a injeção de ar. A diferença de gás *holdup* entre a zona aerada e a zona não aerada resulta numa diferença de densidade do líquido entre essas regiões, causando a circulação do fluido no biorreator por uma ação *airlift* (Chisti, 1989). A parte do biorreator que contém a mistura gás-líquido em fluxo ascendente é denominada de *riser* e a região que contém o líquido em fluxo descendente é o *downcomer*.

Existem dois tipos básicos de biorreatores *airlift*: os de circulação interna e os de circulação externa, podendo ser subdivididos em função de seus detalhes (Figura 1).

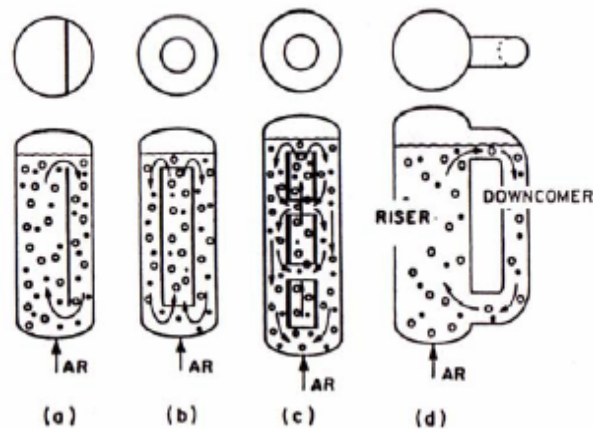


Figura 1. Tipos de biorreatores *airlift*. Circulação interna com cilindro dividido (a), com tubo concêntrico (b) e com tubo concêntrico dividido (c). Circulação externa (d).

As características reológicas do meio líquido são particularmente afetadas em cultivos com fungos filamentosos. Gluzcs & Michalski (1994), em estudo com *A. niger* em biorreator *airlift*, observaram aumento na biomassa fúngica e uma significativa influência nas propriedades reológicas do meio. Também observaram aumento na viscosidade, afetando fortemente a dissolução do oxigênio no meio.

Os biorreatores de circulação externa apresentam menor variedade de configuração, mas permitem mais adequações com relação aos desenhos das conexões horizontais entre o *riser* e o

downcomer, particularmente na conexão do topo. Modificações adicionais podem ser introduzidas no topo do biorreator, onde a eficiência do separador de gás pode influenciar significativamente o desempenho do biorreator (Siegel *et al.*, 1986). Além disso, a possibilidade de ter-se um escoamento horizontal no biorreator de circulação externa permite uma melhor separação do gás, com influência no comportamento geral do biorreator (Bello *et al.*, 1985).

Para Bello *et al.* (1985), o reator *airlift* pode ser empregado em cultivos mais viscosos ao contrário dos biorreatores tipo torre de bolhas. Entretanto, Gouveia *et al.* (2003) verificaram que o coeficiente de transferência de massa é afetado por pequenas mudanças na geometria do reator, principalmente no volume livre existente no topo do mesmo. Quando este volume é próximo a zero, a transferência de massa é suficiente para o alto crescimento celular, com demanda elevada no consumo de oxigênio, podendo operar como reator de mistura.

Para caracterizar hidrodinamicamente um reator *airlift* de circulação externa, Pedrini *et al.* (1996) verificou que o aumento do gás *holdup* é decorrente da velocidade do gás e é influenciado pela velocidade superficial do líquido. Esta influência é diferenciada em relação ao regime de bolhas dominantes. Quando o regime de bolhas é homogêneo, o aumento da velocidade do gás causa um aumento na velocidade do líquido e também no gás *holdup*.

Em estudo com *Streptomyces clavuligerus*, Cerri *et al.* (2005) obtiveram maior concentração de produtos em *airlift* de circulação interna quando comparado com o biorreator com agitação mecânica. Bakker *et al.* (1993) desenvolveram um reator *airlift* múltiplo com três zonas *riser* com tubos concêntricos. O meio é adicionado no compartimento central, evitando o excesso de material, e quando este se aproxima dos aeradores, sobe pelo *riser*, segue outras sucessivas voltas, sendo retirado pela parte superior do reator.

Em estudo comparativo entre biorreatores com *A. niger* KKS, Kim *et al.* (1996) verificou, em cultivo alimentado com casca de arroz em biorreator *airlift* de circulação externa, resultados de

FPA de 0,76 UI/mL, rendimento de 7,4 UI/L/h e produtividade 40% maior que a obtida em biorreator com agitação mecânica. Em relação à β -glicosidase, a máxima atividade obtida foi de 4 U/mL, 20% maior que a obtida em biorreator com agitação mecânica.

Em estudo de tratamento de efluente gasoso contendo hexano e utilizando planejamento experimental, Oliveira (2005) otimizou as condições de número, diâmetro de orifícios e distâncias destes ao centro do difusor de ar em *airlift* de circulação interna. Constatou-se que o diâmetro do difusor (seis furos) deveria ser de 9,4 cm para obtenção de 22 segundos de tempo de mistura.

2.7 Transferência de oxigênio

O objetivo principal de um sistema de agitação e aeração é o fornecimento de oxigênio para a manutenção da atividade respiratória de um conjunto de células. Existem muitas resistências associadas a esse transporte, conforme mostra a Figura 2.

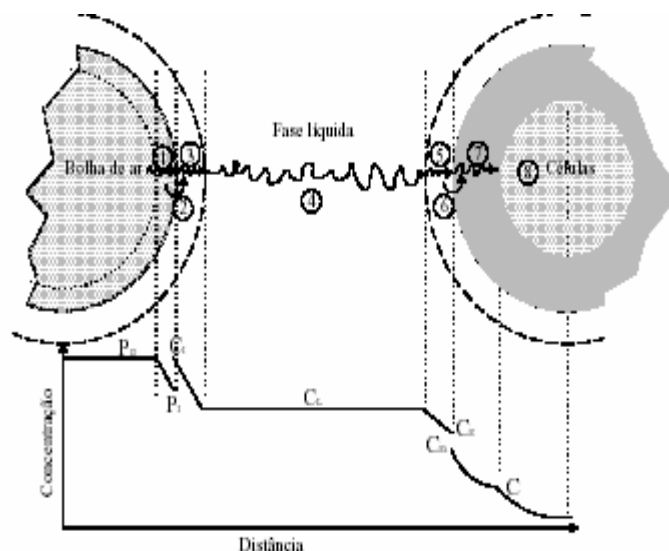


Figura 2. Representação da dissolução do oxigênio da bolha de ar até a célula (Fazolo, 2001). Resistência 1 (migração de uma bolha do interior do volume de gás para sua interface). Resistência 2 (difusão da bolha através da interface do volume de gás para o meio). Resistência 3 (dissolução da bolha no meio). Resistência 4 (migração da bolha através do meio até o micro-organismo). Resistência 5 (migração da bolha para o filme líquido ao redor do micro-organismo). Resistência 6 (difusão da bolha através da interface do micro-organismo). Resistência 7 (migração da bolha no interior do micro-organismo). Resistência 8 (utilização da bolha para reações bioquímicas).

Segundo Schmidell & Facciotti (2001), a resistência mais significativa ficaria por conta da velocidade de reação enzimática da respiração, ou seja, na dependência da atividade e na concentração dos complexos enzimáticos e protéicos que efetuam a reação. De acordo com Fazolo (2001), a avaliação da transferência e do consumo de oxigênio passa pela análise da relevância de cada uma das resistências, baseando-se nos seguintes parâmetros: coeficiente de transferência de massa gás-líquido, coeficiente de transferência de massa líquido-sólido, coeficiente de difusividade do oxigênio através da parede celular e velocidade de consumo de oxigênio pelos micro-organismos. No caso de fungos filamentosos, há resistência adicional em termos de difusão do oxigênio para as células mais internas dos aglomerados (Schmidell & Facciotti, 2001).

Rossi (2006) afirma que a viscosidade do meio pode influenciar na transferência de oxigênio. Normalmente, os meios de cultivo apresentam-se como fluidos newtonianos (possuindo comportamento similar à água); porém, ao eliminarem metabólitos e produtos, os micro-organismos e o uso de sólidos aumentam a viscosidade, tornando o fluido não-newtoniano.

Schell *et al.* (2001) investigaram a influência das condições de operação, tamanho do biorreator e transferência de oxigênio durante a produção de celulases. Constataram que a transferência de oxigênio é desfavorecida em meios com alta viscosidade, pois a área de interface gás/líquido é reduzida devido ao aumento no tamanho da bolha de gás e, conseqüentemente, o tempo de residência desta bolha de gás no líquido é menor, diminuindo o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}).

2.8 Condições de crescimento celular e produção de celulases e xilanases

Para que a produção enzimática e o crescimento ocorram, vários parâmetros devem ser monitorados e controlados, desde o desenvolvimento do inóculo até o final da fermentação. Para tanto, em biorreatores e em frascos sob agitação, parâmetros como pH, velocidade de agitação,

fluxo de ar, temperatura, taxa de alimentação, fonte de nutrientes e controle da quantidade de espuma precisam ser cuidadosamente monitorados.

2.8.1 Efeito do pH

O pH é um fator que influencia a atividade enzimática e o crescimento. Segundo Camassola *et al.* (2004), as celulases responsáveis pela atividade sobre papel filtro de *P. echinulatum* são enzimas ácidas. As atividades máximas em tampões citrato e acetato ocorreram em pH 4,8. Já para β -glicosidase, a maior atividade ocorreu em pH entre 4 e 4,5 em ambos os tampões. Acima deste pH, a atividade decresce.

Em cultivo contendo glicose em biorreator de 10 litros, Brown & Halsted (1975) verificou a influência do pH inicial no cultivo com *T. viride* QM9123. Constatou que a maior biomassa foi obtida em pH 4 em 40 horas de cultivo, coincidindo com tempo de consumo total da glicose. Quando o pH foi reduzido a 2,5, não houve crescimento, enquanto que, em cultivo com pH 2,7, ocorreu uma fase lag de aproximadamente 30 horas. No mesmo estudo, em pH não controlado, observou-se que, a fase lag de crescimento ocorre entre pH 4 e 5. Chipeta *et al.* (2008) constataram a influência do pH no crescimento e na produção de xilanase por *A. oryzae* em água residuária de indústria de polpa de papel em biorreator operando com 8,5 litros de volume. Constataram que a máxima taxa de produção de xilanase, atividade de xilanase e máxima velocidade específica de crescimento foram de 13,1 U/mL, 199 U/mL e $0,39 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, em pH 7,5. Entretanto, com o cultivo sem controle de pH, ocorre a redução na velocidade específica de crescimento para $0,356 \text{ h}^{-1}$, sendo a FPA de 0,06 FPU, inferior ao cultivo em pH 7,5 que atingiu valor de 0,07 FPU.

Já para *F. solani* F7, o pH ótimo para a produção de xilanase foi de 5,0 para células imobilizadas e 5,5 para cultivo com células livres; em pH acima ou abaixo destes valores, a produção de xilanase é significativamente inferior (Gupta *et al.*, 2009).

2.8.2 Estabilidade térmica

A temperatura é outro fator determinante nos cultivos fúngicos. Segundo Ryu & Mandels (1980), a faixa da temperatura ótima de crescimento para *Trichoderma* está entre 32 e 35°C, enquanto que a temperatura de produção de enzimas está entre 25 e 28°C. Corroborando com estes dados, Gupta *et al.* (2009), verificaram que a temperatura ótima para produção de xilanase é 30°C, próxima à temperatura ambiente, onde a máxima atividade enzimática foi de 58,8 U/mL para células imobilizadas e 69,88 U/mL para células livres.

Latifian *et al.* (2007) verificaram que a temperatura ótima de produção de celulases em estado sólido para as linhagens de *T. reesei* QM9414 e MCG77 foi na faixa de 25 a 30°C, com teor de umidade entre 55 e 70%.

Quanto à estabilidade térmica do complexo enzimático, Camassola *et al.* (2004), em estudos realizados com *P. echinulatum*, verificaram alta estabilidade, agregando valor ao complexo enzimático. Essa característica possibilita variadas aplicações, onde se necessitam de elevados tempos para a hidrólise. Há significativa redução da atividade enzimática na primeira hora de incubação devida, provavelmente, à presença de proteases. Também, altas atividades enzimáticas foram obtidas entre 50 e 60°C, sugerindo que estas enzimas são adequadas para utilização na indústria têxtil, onde alguns processos ocorrem em temperaturas similares. A atividade de β -glicosidase aumenta em função da temperatura, mas entre 55°C e 60°C o aumento não é proporcional, ocorrendo constância de valores.

2.8.3 Uso de surfactantes e antiespumantes

Helle *et al.* (1993), em estudos com surfactantes, verificou um incremento na taxa de hidrólise em *Sigmacell* 100[®] quando biosurfactantes, como soforolipídios e *Tween* 80[®] foram

utilizados, através da análise de açúcares redutores. Também constatou que a hidrólise de bagaço de cana tratado por explosão a vapor mostrou um aumento de 67% na presença de soforolipídeos.

A utilização do surfactante não iônico *Tween 20*[®] foi analisada por Alkasrawi *et al.* (2003), sendo que sua adição em até 2,5 g/L em cultivo simultâneo de sacarificação e fermentação (SSF) com madeira pré-tratada com vapor, incrementa em 8% o rendimento de etanol, reduzindo o tempo para atingir a máxima concentração no processo. A atividade enzimática também aumentou na fração líquida ao final da SSF.

Domingues *et al.* (1999), em cultivos submersos realizados com *T. reesei* Rut C-30 verificou, em frascos agitados, que o uso de *Tween 80*[®] inibe a formação de *pellets* do micro-organismo, sendo considerado benéfico. O autor salientou que condições que induzem a formação de *pellets* provocam a redução nas concentrações de proteína e FPA.

Nitschke & Pastore (2002) salientaram as funções atribuídas aos surfactantes, de emulsão e solubilização de hidrocarbonetos e substâncias apolares em água, transporte de hidrocarbonetos e aderência e liberação da célula presa ao substrato ou a parede do vaso à superfície. Segundo os autores, isto se deve a uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos micro-organismos, ou seja, a habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. O elemento chave nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsáveis pela aderência das células às superfícies. Os micro-organismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos *habitats* com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis.

O uso de antiespumantes se faz necessário em cultivos em biorreator. Dentre os muitos problemas que a espuma pode acarretar ao processo, Sukan (1998) elenca:

- efeitos físicos: aumento do volume efetivo do biorreator e no gás *holdup*; diminuição no poder de dissipação de gases; redução na transferência de oxigênio e calor; redução na circulação, controle e mistura do meio, bem como redução na viscosidade aparente.
- efeitos biológicos: a deposição de células na parte superior do biorreator, aumentado as chances de contaminação; lise microbiana; mudança no metabolismo, devido à limitação de nutrientes, desnaturação de proteínas, entre outros.

2.8.4 Meio de cultivo

Em relação à atividade de β -glicosidase, Sehnem (2003) verificou que a fonte de nitrogênio influencia a atividade enzimática. Constatou que, com o uso de sulfato de amônio, a atividade é superior em relação a meios contendo nitrato de sódio, nitrato de potássio PA e nitrato de potássio comercial, atingindo um pico de 0,5 UI/mL após seis dias de cultivo em frascos agitados. Já para FPA, o uso de nitrato de potássio comercial no meio apresentou melhores resultados, sendo superiores aos com uso de sulfato de amônio.

Ainda com relação à fonte de nitrogênio, Gupta *et al.* (2009) verificaram que a concentração de 0,3% (m/v) de peptona ao meio de cultivo de *F. solani* F7 é ideal para a produção de xilanases, tanto para células imobilizadas quanto para células livres. Também confirmaram que o uso de nitrato de sódio promove bons resultados no cultivo para a produção desta enzima.

Ahamed (2009) estudou o efeito da composição do meio de cultivo na morfologia e na produção de celulases com *T. reesei* em biorreator com agitação mecânica com volume de 7 litros, pH 4,8 e frequência do agitador de 250 rpm. Neste estudo, a maior produtividade volumétrica de FPA foi de 69,8 U/L/h para o meio contendo 10 g/L de celulose, 10 g/L de glicose e 10 g/L de extrato de levedura, além de solução de sais; a biomassa também foi elevada, correspondendo a 14,7 g/L. Estes dados mostraram ser 2 a 4 vezes superiores aos outros meios testados.

Em relação às fontes de carbono, Duan *et al.* (2004) testaram glicose (2,5; 5 e 10 g/L) e *Whatman* (5 g/L) em frascos sob agitação e em biorreator. Com *Trichoderma pseudokoingii* S-38, verificou-se que a glicose age como inibidor da produção de endoglicanase, enquanto *Whatman* é um forte indutor. A atividade da enzima em meio contendo *Whatman* é mais lenta, atingindo pico em 13 dias; com glicose, o pico ocorreu no segundo dia. Desta forma, os pesquisadores testaram o meio com ambas as fontes de carbono no início do cultivo (5g/L de *Whatman* e 2,5g/L de glicose, sendo suplementado 2,5 g/L de glicose diariamente) e obtiveram 53 UI/L/h e 6,17 UI/mL para produtividade volumétrica e atividade de endoglicanase, respectivamente. A conclusão foi de que a adição de glicose ao meio contendo *Whatman*, inicialmente, promove um aumento na produtividade volumétrica quando comparada a cultivos com uma única fonte de carbono.

Em relação à qualidade do substrato utilizado para hidrólise, Al-Zuhair (2008) investigou o efeito da cristalinidade da celulose na obtenção de açúcares redutores por hidrólise enzimática heterogênea, testando aglomerado de madeira e CMC. Quando comparou a produção de glicose obtida nestes substratos com enzimas de *A. niger*, verificou que somente regiões amorfas do aglomerado de madeira são hidrolisadas rapidamente e que a produção de açúcares redutores é proporcional ao aumento na concentração de substrato.

Shanmughapriya *et al.* (2009) verificaram a produção de celulases alcalinas por *Marinobacter* sp. MSI032 em meio contendo frutose, maltose, sacarose, glicerol, glicose e manose, verificando que houve aumento na produção de CMCase. A presença de maltose no meio aumentou em 195% a produção enzimática quando comparada à referência, meio com CMC. Os autores verificaram, também, que a produção enzimática foi estimulada em pH 6, mas a sua máxima foi em pH 9.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo

Para a obtenção de celulases e xilanases, foi utilizada a linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum* (micro-organismo depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942), tendo como parental a linhagem 2HH, obtida por processo de mutagênese e seleção no Laboratório de Enzimas e Biomassas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

3.2 Soluções

As soluções utilizadas para as análises de atividade enzimática, determinação do consumo de sorbitol, controle de contaminantes e crescimento celular estão especificadas a seguir.

3.2.1 Solução de micronutrientes

Formulada por Mandels & Reese (1957), baseou-se na composição: KH_2PO_4 (2 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,3 g/L); $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (0,3 g/L); CaCl_2 (0,3 g/L); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5 mg/L); $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,56 mg/L); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,4 mg/L). Estes sais são dissolvidos em água até volume de 1 litro. A solução foi armazenada a 4°C.

3.2.2 Solução de celulose intumescida 2,5%

Prepararam-se 200 mL de solução de celulose intumescida a partir de 5 g de celulose em 60 mL de água, que permaneceu sob agitação a 180 rpm por sete dias em frascos Erlenmeyer de 500

mL contendo 20 esferas de vidro. Após adicionaram-se 140 mL de água destilada e a solução foi armazenada sob refrigeração.

3.2.3 Solução de sais

A solução de sais 20 vezes concentrada foi preparada pela adição de KH_2PO_4 (40 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (28 g/L), $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (6 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (6 g/L), CaCl_2 (6 g/L) e 2 mL de solução de micronutrientes em 1 litro de água destilada. Eventualmente, em alguns experimentos, não foi utilizado sulfato de amônio na solução de sais.

3.2.4 Tampão citrato 1 M

Esta solução foi preparada a partir de 105 g de ácido cítrico, 2,5 g de NaOH e completado o volume para 500 mL. Posteriormente, o pH foi ajustado para 4,8 com NaOH, ácido cítrico ou HCl.

3.2.5 Solução bactericida

Foi utilizada uma solução comercial de sulfato de gentamicina 4,4% (*Gentrin*[®] - Produtos Veterinários Ouro Fino, Ribeirão Preto/SP).

3.2.6 Antiespumante

Foi utilizado o antiespumante *Fluent Cane 114*[®], à base de propilenoglicol, produzido pela Dow Brasil SA (São Paulo/SP).

3.2.7 Soluções para determinação de FPA, endoglicanases, β -glicosidases, xilanases e consumo de sorbitol

3.2.6.1 Solução de ácido dinitrosalicílico (DNS)

A solução para dosagem de açúcares redutores, descrita por Miller (1959), é composta por: ácido 3,5-dinitrosalicílico (2,12 g), hidróxido de sódio (3,92 g), tartarato de sódio e potássio (61,2 g), fenol (1,52 g), metabissulfito de sódio (1,66 g) e água destilada (283,3 mL).

3.2.6.2. Solução de carboximetilcelulose 20g/L

Foi preparada em tampão citrato 0,05 M pH 3,8, sendo adicionado 0,1 mL da solução de azida sódica 5g/L.

3.2.6.3. Solução de salicina 10g/L

Foi preparada em tampão citrato 0,05 M pH 4,8, sendo adicionado 0,1 mL da solução de azida sódica 5g/L

3.2.6.4 Soluções para determinação de sorbitol

Para o tampão formato 0,7 M pH 3, foram transferidos 12,6 mL de ácido fórmico em balão volumétrico de 500 mL e adicionados 300 mL de água. O pH foi ajustado para 3 com NaOH 85g/L e completado o volume para 500 mL com água destilada.

Para o preparo da solução de periodato de potássio 3,5 mM, foi pesado 0,4025 g de periodato de potássio, dissolvido com 5 mL de HCl 1 M. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 500 mL e completado o volume com água destilada.

O reagente I foi preparado com 7 g de acetato de amônio dissolvido em 20 mL de água destilada. A solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL, sendo adicionado 0,160 g de tiosulfato de sódio, dissolvido em 10 mL de água. Finalmente, foi adicionado 0,5 mL de acetilacetona e o volume foi completado com água destilada.

3.3 Meios de cultivo

3.3.1 Meio sólido para crescimento e manutenção da linhagem

O meio sólido foi composto pela suspensão de 2,5% de celulose intumescida (500 mL/L), solução de sais (100 mL/L), água destilada (400 mL/L) e ágar (20 g/L).

3.3.2 Meio para determinação de contaminantes

Em todos os ensaios realizados em biorreator, foi realizado o controle de contaminantes, com placas inoculadas com 1 mL do meio de cultivo. O meio utilizado para o controle de contaminantes foi composto por 2 g de ágar, 1 g de glicose, 0,1 g de peptona, 0,1 g de extrato de levedura e 10 mL de solução de sais, sendo o volume completado para 100 mL. Este meio foi autoclavado. No início e durante o processo de cultivo, foram observadas ao microscópio lâminas produzidas com o meio inoculado, com a finalidade de verificar a presença de possíveis contaminantes.

3.3.3 Meio líquido para produção de celulasas e xilanases

Para a produção de celulasas e xilanases em biorreator, para cada cultivo, foi usado um meio de cultivo padrão, com as seguintes proporções fixas:

- 1,4g/L de KNO₃ comercial;
- 2g/L de farelo de soja;
- 1g/L (v/v) de *Tween 80*[®];
- 5% (v/v) de solução de sais (sem sulfato de amônio e com KH₂PO₄ cinco vezes concentrado);
- 0,01% (v/v) de solução de sulfato de gentamicina 44g/L (utilizado somente no pré-inóculo).

As concentrações de celulose *CeluFlok*[®] micropulverizada e de sorbitol variaram de acordo com cada ensaio, de 0 a 1% (m/v) para sorbitol e de 0 a 3% (m/v) para celulose. Para o primeiro ensaio com celulose e sorbitol, utilizou-se 0,1% (m/v) de farelo de trigo no meio de cultivo.

3.4 Procedimentos para determinação da biomassa, atividade enzimática e consumo de sorbitol

3.4.1 Determinação da biomassa expressa em ácido nucléico

A determinação da biomassa expressa por ácido nucléico foi medida utilizando ácido perclórico. Uma suspensão micelial de 3 mL foi adicionada a igual volume de ácido perclórico 1 M e a mistura foi aquecida a 100°C por 20 minutos. Após, a mistura foi centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante lido em absorbância de 260 nm. Uma curva de concentração de micélio seco produzido em meio solúvel foi usada como padrão (Lin *et al.*, 2000).

3.4.2 Dosagens enzimáticas para determinação de FPA

Para a dosagem de celulasas, foi utilizada a análise de atividade enzimática sobre papel filtro, conforme Ghose (1987). Em um tubo de ensaio, foi adicionado 0,5 mL da amostra ou de diluições apropriadas e volume de tampão citrato 0,05 M pH 4,8 para completar 1,5 mL de volume reacional. Adicionou-se a cada tubo, 50 mg de papel filtro (*Whatman* nº1) em tiras de 1 cm x 6 cm, mantendo-os por 60 minutos em banho a 50°C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 3 mL da solução do reagente DNS e os tubos colocados em banho-maria a 100°C por 5 minutos. Após resfriamento em temperatura ambiente, adicionou-se 8 mL de água destilada e a absorbância das soluções foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. As concentrações de açúcares presentes nas amostras foram determinadas por regressão linear, utilizando uma curva de calibração construída com soluções de glicose de 0; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5 e 2 mg/mL, com o programa Microcal Origin.

3.4.3 Determinação de endoglicosidases

A determinação da atividade de endoglicosidases foi realizada conforme Ghose (1987), empregando-se 0,5 mL de solução de carboximetilcelulose 20g/L em um tubo de ensaio, ao qual foi acrescentado volume correspondente à diluição apropriada da solução enzimática. Os tubos contendo essas soluções foram colocados em banho a 50°C por 30 minutos. Após, a reação foi interrompida com a adição de 3 mL da solução do reagente DNS. Os tubos com a solução reagente foram fervidos a 100°C por 5 minutos. Após, as amostras foram diluídas com a adição de 8 mL de água destilada. A absorvância foi determinada a 545 nm, utilizando uma curva padrão de glicose.

3.4.4 Determinação de β -glicosidases

A determinação da atividade de β -glicosidases foi realizada empregando-se a metodologia descrita por Chahal (1985). Foram adicionados 0,5 mL de solução de salicina 1% (m/v) em um tubo de ensaio, ao qual foram acrescentados 0,25 mL de caldo enzimático e 0,25 mL de tampão citrato. Os tubos contendo essas soluções foram colocados em banho a 50°C por 30 minutos. Após, a reação foi interrompida com a adição de 3 mL da solução do reagente DNS e os tubos colocados em banho a 100°C por 5 minutos. Após, as amostras foram resfriadas, diluídas com 8 mL de água destilada e mensuradas a 545 nm. Os açúcares redutores liberados foram dosados com o uso do reagente DNS e posterior determinação da atividade enzimática, segundo Ghose (1987).

3.4.5 Determinação de xilanases

A determinação da atividade de xilanases ocorreu com a adição de 100 mL de solução enzimática em tubos de ensaio e 900 mL de solução de xilana 20g/L. Os tubos de ensaio ficaram em banho a 50°C por 30 minutos. Após, adicionaram-se 3 mL de solução de DNS, interrompendo a

reação. A mistura foi colocada em banho-maria a 100°C por 5 minutos, resfriada, diluída com 8 mL de água destilada e medida a absorvância a 545 nm, utilizando uma curva padrão de xilana.

3.4.6 Determinação de sorbitol

A reação colorimétrica (Sánchez, 1998) ocorreu pela reação do manitol (isômero do sorbitol) com o periodato de potássio, em meio ácido, resultando em formaldeído e ácido tartárico. O formaldeído reagiu com a acetilacetona na presença de amônia e formou um composto derivado da piridina, de coloração amarela. O excesso de periodato de potássio foi consumido pelo tiosulfato de sódio (Figura 3).

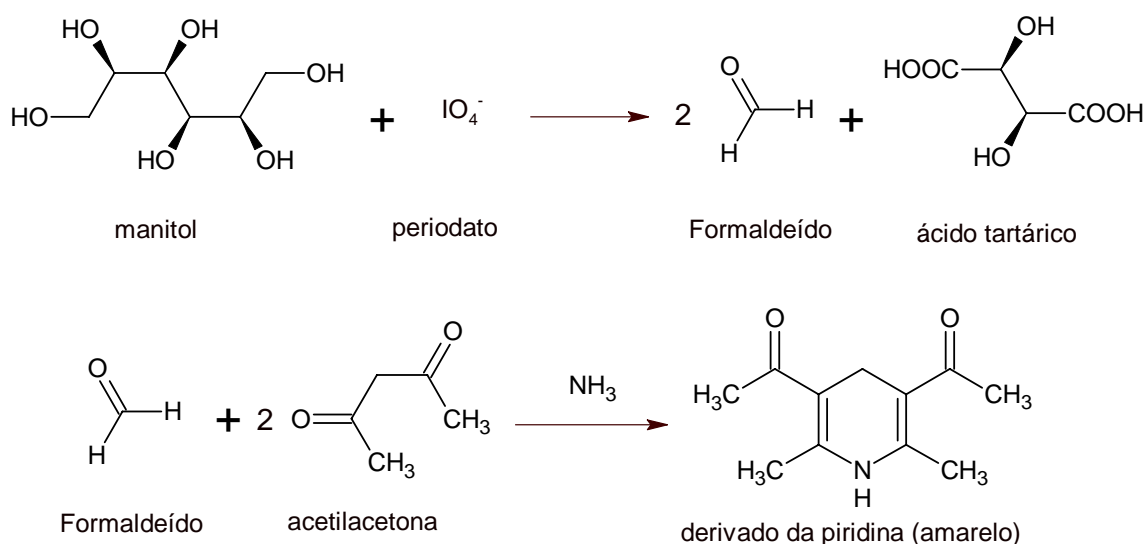


Figura 3. Etapas da reação do manitol para obtenção de composto corado.

Às amostras adequadamente diluídas, foram adicionados 1 mL de formato de potássio 0,7 M, 2 mL de periodato de potássio 3,5 mM e, após 1 minuto de reação, 1,5 mL do reagente I. Em seguida, em banho-maria, a solução reacional foi fervida a 100°C por 2 minutos e resfriada em banho com água, em temperatura ambiente (Venzon, 2008). A solução reacional foi diluída e a absorvância lida a 412 nm.

3.5 Cultivos submersos para produção de celulases em frascos sob agitação

Frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio foram inoculados com suspensão de 1×10^5 conídios, mantidos a 28°C e agitados a 180 rpm por 6 dias. Foram colhidas amostras para dosagem enzimática no 2º, 3º, 4º, 5º e 6º dias de cultivo, com complementação do volume de água evaporado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O meio foi constituído de 5 mL de solução de sais; 0,2 g de farelo de soja; 1% (m/v) de celulose *Celuflok*[®]; 100 µL de *Tween* 80[®]; 0,14% (m/v) de KNO₃ comercial e água destilada suficiente para preparar 100 mL de meio. A composição do meio variou em função do objetivo específico de cada ensaio.

Também foram utilizados cultivos submersos em frascos sob agitação com alimentação para investigar o mais adequado tempo de adição do indutor. Neste caso, o cultivo iniciou com concentrações de sorbitol variando de 0 a 1% (m/v) e, após 12, 24, 36 e 48 horas, foram adicionadas concentrações de celulose que variaram de 0 a 1% (m/v). Este ensaio foi realizado utilizando-se um planejamento experimental.

A concentração otimizada de sorbitol e de celulose e o seu tempo de adição foram determinados com o emprego de um planejamento experimental DCCR (delineamento composto central rotacional), de acordo com Rodrigues & Iemma (2005). Planejou-se um fatorial completo 2^3 , incluindo seis pontos axiais e seis repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios, realizados em triplicata, sendo a atividade enzimática descrita em função das variáveis independentes, como no modelo com variáveis codificadas pela equação $Y = b_0 + \sum b_{ii} \cdot x_i + \sum b_{ii} \cdot x_i^2 + \sum b_{ij} \cdot x_i x_j$, onde Y é a resposta da atividade enzimática (estimada) e x_i e x_j são os níveis de variáveis.

Para investigar a influência da adição de parte do meio integral de cultivo, iniciou-se o ensaio com 90% do volume inoculado. Após o 2º, 3º e 4º dias, adicionaram-se os restantes 10% do meio. As coletas ocorreram do 2º ao 6º dias.

3.6 Cultivos em biorreator com agitação mecânica

O biorreator utilizado opera com volume de 6 litros, sendo o volume de trabalho 5 litros. Possui 40 cm de altura e 27 cm de diâmetro externo. A agitação é realizada com duas turbinas de fluxo radial *Rushton*, cujas linhas de fluxo tendem a ser perpendiculares ao eixo do agitador, impulsionando a massa líquida contra as paredes do tanque. Contêm quatro chicanas metálicas, dispostas na parte interna do biorreator. Apresenta estrutura em vidro e tampa em aço inox. Possui controle da frequência do agitador, vazão de ar e sensores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH.

Os meios de cultivo dos testes realizados em biorreator foram autoclavados por 20 minutos em meio contendo sorbitol e por 30 minutos em meio na ausência de sorbitol. A frequência do agitador variou de 200 a 900 rpm e a aeração de 0,26 a 1,3 vvm, visando manter os níveis de oxigênio dissolvido num mínimo de 30% da saturação.

O inóculo do biorreator foi realizado após calibração dos eletrodos de pH e oxigênio dissolvido, com meio pré-inoculado com esporos em cultivo por 48 horas. Amostragens foram realizadas em intervalos de tempo que variaram de 3 a 12 horas, dependendo da fase do cultivo.

3.7 Cultivos em biorreator *airlift*

O cultivo em biorreator *airlift* de circulação interna foi realizado em biorreator de 56 cm de altura e 11,4 cm de diâmetro externo, tendo o *riser*, 34 cm de altura. O recipiente externo

(*downcomer*) é de vidro refratário e o *riser* é de policloreto de vinila (PVC). A tampa do biorreator é de aço inox e esterilizada a cada ensaio. A entrada de ar é realizada na parte inferior do *riser*, através de dois dispensadores de ar de diâmetros diferentes, feitos de silicone.

Os ensaios foram realizados com o controle de aeração, oxigênio dissolvido e pH. A temperatura foi mantida em 28°C através da utilização de um banho termostático de circulação interna através de um tubo na forma de U. O volume nominal do reator é de 4 litros, mas o reacional foi de 3,5 litros, sendo 10% (v/v) de pré-inóculo.

O inóculo do biorreator é realizado utilizando a mesma metodologia do biorreator com agitação mecânica e as coletas de amostras foram realizadas em intervalos de tempo que variaram entre 3 e 12 horas.

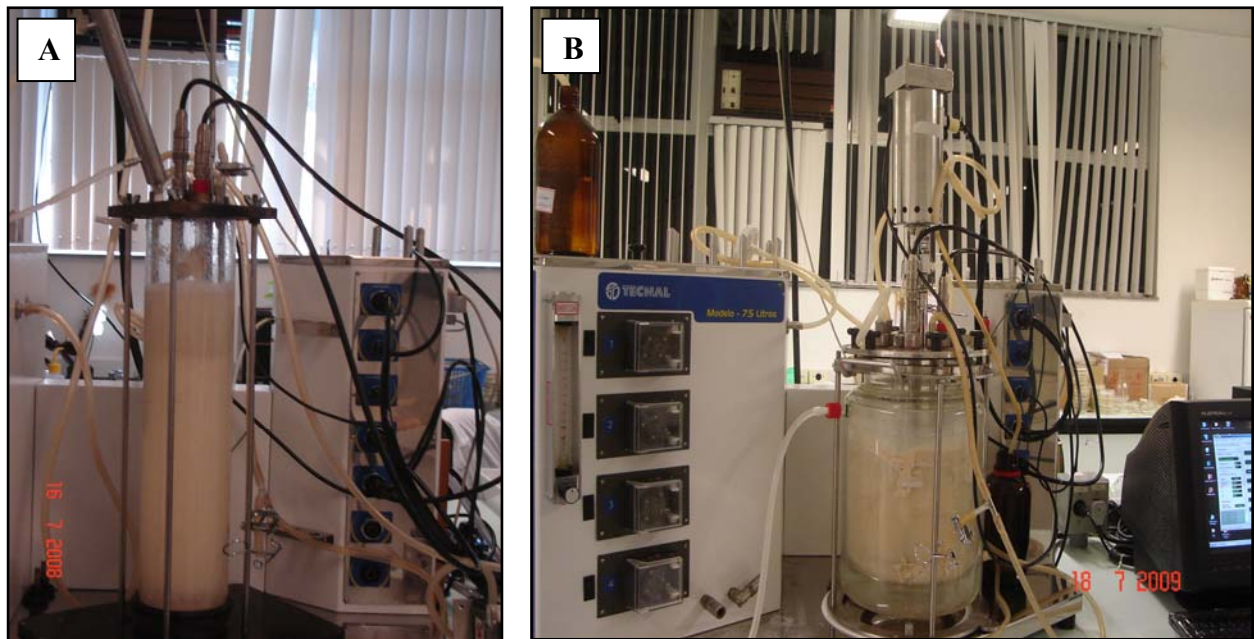


Figura 4. Biorreatores *airlift* de circulação interna (A) e com agitação mecânica (B) utilizados nos ensaios.

3.8 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

Para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, $K_L a$, em meio isento de células, foi realizada a calibração do eletrodo utilizando nitrogênio como o ponto 0% e ar como a saturação, segundo Sobotka *et al.* (1982). Posteriormente, injetou-se N_2 para aproximar a 10% de oxigênio dissolvido e cronometrou-se a variação de oxigênio até 90% de saturação. A equação que define a transferência de oxigênio para o meio é a seguinte:

$$dC/dt = K_L a (C_s - C) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde :

dC/dt = variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo;

C_s = concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio;

C = concentração de oxigênio dissolvido.

Integrando a Equação 1, com limites de C entre αC_s e βC_s e o tempo de zero a t , tem-se:

$$\ln[(1-\beta)/(1-\alpha)] = -K_L a \cdot t \quad (\text{Equação 2}),$$

Onde α e β são valores percentuais da concentração de oxigênio na saturação, registradas no reator. O gráfico resultante da Equação 2 apresenta um perfil linear, cujo coeficiente angular representa o $K_L a$.

3.9 Velocidade de circulação do meio

A velocidade de circulação do meio em biorreator *airlift* de circulação interna foi calculada a partir do acionamento da aeração, que promovia a circulação de *pellets* com densidade igual ao do meio circulante. Para cada vazão de ar utilizada, foi realizada uma tomada de tempo, em triplicata,

para que os *pellets* percorressem um dado comprimento no *downcomer* (x_i) (29 cm). Para efeito de cálculo, o diâmetro interno do *downcomer* foi de 103 mm e do *riser* de 73 mm.

A partir da Equação 3, foi obtida a velocidade média de circulação no *downcomer* (U_{Ld}) e através da teoria do critério da continuidade, representada pela Equação 4, foi obtida a velocidade de circulação do meio no *riser* (U_{Lr}) (Rossi, 2006).

$$U_{Ld} = X_i / t_m \quad (\text{Equação 3})$$

$$U_{Lr} A_r = U_{Ld} A_d \quad (\text{Equação 4})$$

Onde A_r e A_d correspondem à área da seção transversal do *riser* e do *downcomer*, respectivamente.

3.10 Determinação da viscosidade

Para a determinação da viscosidade do meio, utilizou-se viscosímetro Brookfield, modelo DVII, com *spindle* adequado para o torque maior que 10%.

3.11 Estimativa da demanda de oxigênio pelo método dinâmico

A partir do balanço de oxigênio num processo fermentativo aeróbio, defini-se a seguinte expressão (Wang, 1985):

$$\frac{dC}{dt} = K_{La}(C_s - C) - Q_{O_2} \cdot X \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

dC/dt = variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo;

K_{La} = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio;

C_s = concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio;

C = concentração de oxigênio dissolvido;

Q_{O_2} = velocidade específica de respiração;

X = concentração celular.

A partir da Equação 5, o termo $K_L a (C_s - C)$ corresponde à transferência de oxigênio e $Q_{O_2} \cdot X$ à demanda pelo cultivo. No cálculo de $Q_{O_2} \cdot X$ pelo método dinâmico, num dado instante, em que a concentração de oxigênio dissolvido se encontra em valor elevado, é feita a supressão de oxigênio através do fechamento da entrada de ar e a redução na frequência do agitador a um nível apenas suficiente para manter a suspensão celular. Desta forma, o termo de transferência da equação do balanço - $K_L a (C_s - C)$ torna-se nulo e, portanto, tem-se:

$$dC/dt = -Q_{O_2} \cdot X \text{ (Equação 6)}$$

Integrando a Equação 6, nos limites de $\beta \cdot C_s$ a $\alpha \cdot C_s$, onde β e α são as frações de C_s no momento da interrupção da transferência ($t=0s$) e num instante de tempo qualquer, respectivamente, obtém-se a seguinte expressão:

$$(\beta - \alpha) \cdot C_s = Q_{O_2} \cdot X \cdot t \text{ (Equação 7)}$$

Num gráfico correlacionando as frações de C_s com o tempo, durante a execução do método dinâmico, observa-se um comportamento linear que permite que se calcule facilmente o valor de $Q_{O_2} \cdot X$ pela Equação 7.

Neste trabalho, devido ao desconhecimento do valor da concentração de oxigênio na saturação (C_s) dos meios utilizados, os valores calculados para $Q_{O_2} \cdot X$ são expressos em termos de variação da fração da saturação em oxigênio do meio por minuto ($p_{O_2}/100/\text{min}$)

3.12 Determinação da produtividade volumétrica enzimática

Para a determinação da produtividade volumétrica, calculou-se a diferença entre a máxima atividade enzimática e a inicial e, posteriormente, dividiu-se pelo tempo (horas), cuja atividade foi máxima, sendo expressa em UI/L/h.

3.13 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram submetidos à análise de variância (*One-Way ANOVA*) e pós-teste de Tukey para um nível de probabilidade inferior a 5% ($p < 0,05$), utilizando-se o programa computacional Prism GraphPad.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados de cultivos submersos com *Penicillium echinulatum* 9A02S1, realizados em frascos sob agitação, em biorreator com agitação mecânica e em biorreator *airlift* de circulação interna. O item 4.1 se refere ao cultivo submerso em frascos sob agitação com pesquisa sobre o tempo de adição do indutor, celulose e sorbitol, bem como o efeito do suplemento de meio ao cultivo. Para os ensaios em biorreator com agitação mecânica, são apresentados os resultados com diferentes concentrações de celulose e sorbitol e ensaios com alimentação, descritos no item 4.2, que também apresenta resultados em *airlift*. No item 4.3, são descritos ensaios com diferentes concentrações de celulose e sorbitol (fontes de carbono) em regime descontínuo, bem como em regime descontínuo alimentado.

4.1 Cultivo submerso em frascos sob agitação

A primeira etapa deste trabalho deteve-se nos estudos de atividade de celulasas e xilanasas em cultivos em frascos sob agitação recíproca em meios contendo celulose cristalina e sorbitol como fontes de carbono. Também, pesquisou-se a influência de diferentes concentrações de celulose e sorbitol e o tempo de adição da celulose, bem como o efeito da lactose. No final deste item, apresentam-se dados sobre a suplementação de 10% de meio de cultivo ao meio inicial em diferentes etapas do processo.

4.1.1 Produção de celulases e xilanases em cultivo submerso em frascos sob agitação contendo sorbitol como fonte de carbono solúvel

Em estudos com *Trichoderma reesei*, Ilmén *et al.* (1997) mostraram que os polióis glicerol e sorbitol permitem o crescimento do fungo sem causar repressão catabólica; entretanto, estes substratos não foram estudados até o presente com a finalidade de produção de celulases.

Dentre os micro-organismos com potencial para a produção de celulases, incluem-se mutantes de *P. echinulatum* com alta capacidade de gerar atividade enzimática (Dillon *et al.*, 1992; Dillon *et al.*, 2006), que apresentam um complexo celulolítico balanceado no que se refere à relação entre FPA e β -glicosidases (Martins *et al.*, 2008). No presente trabalho, estudos com a linhagem 9AS201 de *P. echinulatum* foram realizados com a finalidade de associar duas fontes de carbono solúveis à celulose para a produção de celulases. Foi utilizada a lactose, que induz, apenas, atividade de β -glicosidases (Sehnm *et al.*, 2006), ao contrário do observado com *T. reesei* (Ilmén *et al.*, 1997). A outra fonte de carbono solúvel estudada foi o sorbitol e, tal como observado para *T. reesei* (Ilmén *et al.*, 1997), não mostrou causar repressão catabólica em *P. echinulatum* (Bittencourt *et al.*, 2002; Sehnm *et al.*, 2006).

A Figura 5A apresenta dados de FPA em cultivos onde o sorbitol foi adicionado à celulose. Pode-se verificar que, isoladamente, 1% (m/v) de sorbitol induziu pequena atividade de FPA se comparado a 1% (m/v) de celulose. Por sua vez, o cultivo com 1% (m/v) de celulose não diferiu do cultivo contendo 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol, no 4º dia. No 5º dia, a atividade dos meios cuja celulose foi substituída pelo sorbitol, em 0,25% ($0,861 \pm 0,081$ UI/mL) e 0,5% ($0,72 \pm 0,2$ UI/mL), foi igual ou superior à do meio contendo 1% (m/v) de celulose ($0,743 \pm 0,093$ UI/mL). Essa possível inativação evidenciada no 5º dia de cultivo se deve a lise celular causada pelo consumo total de substrato. Assim, para FPA, a substituição parcial da celulose por sorbitol não alterou significativamente as atividades enzimáticas em papel de filtro.

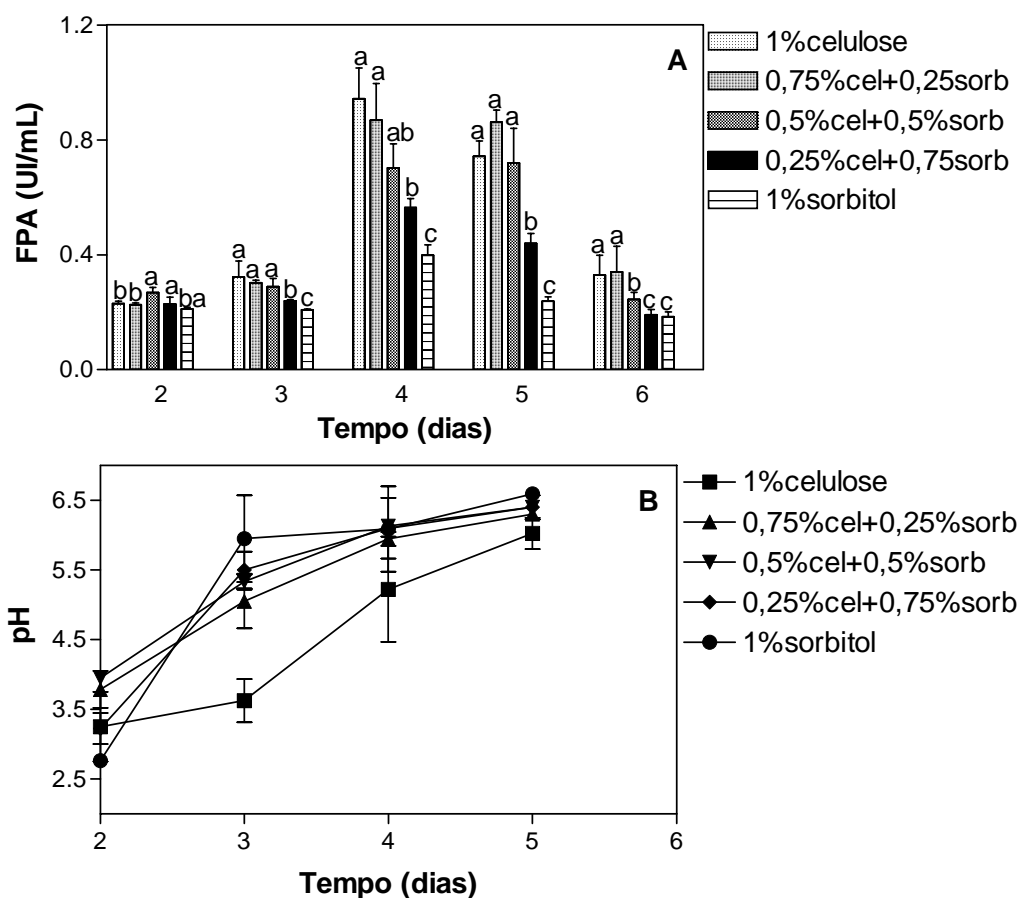


Figura 5. Produção de FPA (A) e variação do pH (B) em meios contendo celulose e sorbitol em frascos sob agitação recíproca. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem ao nível de $p < 0,05$.

Em relação ao pH (Figura 5B), observa-se que, nos tratamentos com adição de sorbitol, ocorreu uma elevação mais rápida nos valores em relação ao cultivo com celulose pura, o que pode ser consequência de mais rápido metabolismo, devido à presença do sorbitol, comparativamente ao meio contendo apenas celulose.

Os dados de endoglicanase (Figura 6) mostram que a adição de sorbitol também foi favorável para esta enzima, tal como para FPA. Nos primeiros dias de cultivo, o meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol mostrou atividade igual ao meio contendo somente celulose. O pico de atividade ocorreu no 4º dia, sendo de $3,08 \pm 0,36$ UI/mL para o de 1% (m/v) de celulose e $3,54 \pm 0,42$ UI/mL para o meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 0,75% (m/v) de celulose. A presença de

atividade de endoglinase no meio contendo apenas sorbitol no segundo dia de cultivo, tal como para FPA, pode ter sido devido ao farelo de trigo presente no meio.

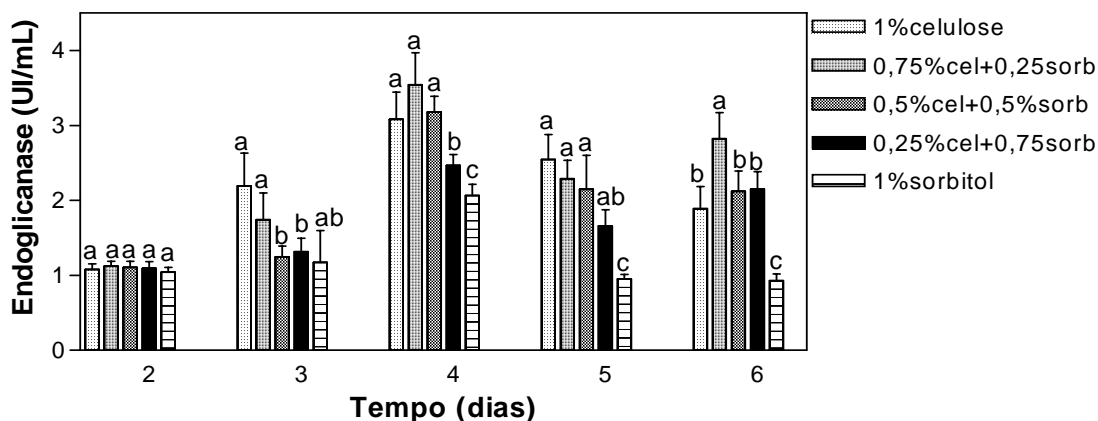


Figura 6. Produção de endoglicanase em meios contendo celulose e sorbitol em frascos sob agitação recíproca. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem ao nível de $p < 0,05$.

Os dados da Figura 7A, de atividade de β -glicosidase, mostram que a substituição de celulose por sorbitol favoreceu a atividade desta enzima, sendo seu título triplicado, como ocorreu no 6º dia de cultivo em relação ao meio contendo celulose. O pico desta enzima para o meio padrão, com 1% (m/v) de celulose, foi de $0,133 \pm 0,051$ UI/mL no 6º dia, enquanto que, para os meios com 0,75% e 0,50% (m/v) de sorbitol, as atividade alcançaram $0,451 \pm 0,046$ UI/mL e $0,42 \pm 0,032$ UI/mL, respectivamente. Estes picos relacionam-se com os picos de máximo pH em cada cultivo. No caso do meio contendo 1% (m/v) de sorbitol, a presença de farelo de trigo também deve ter contribuído para a produção desta enzima.

Também em relação à Figura 7 A, pode-se afirmar que no 5º dia de cultivo, o crescimento cessa, evidenciado pelo pH elevado. Provavelmente, ocorre a lise celular, aumentando a concentração de β -glicosidase no meio externo.

Para xilanase (Figura 7B), verifica-se que, no 2º dia, o cultivo contendo apenas 0,25% (m/v) de celulose e 0,75% (m/v) de sorbitol atingiu a mesma atividade enzimática que o cultivo contendo 1% de celulose (11 UI/mL). Afirma-se, também, que mesmo na ausência de xilana, seu indutor

preferencial, há atividade de xilanase (Figura 7B). Knopp *et al.* (2009) verificaram que a atividade de xilanase atingiu pico de 2,5 UI/mL em meio de Mandels formulado com e sem sulfato de amônio e com fosfato ácido de potássio.

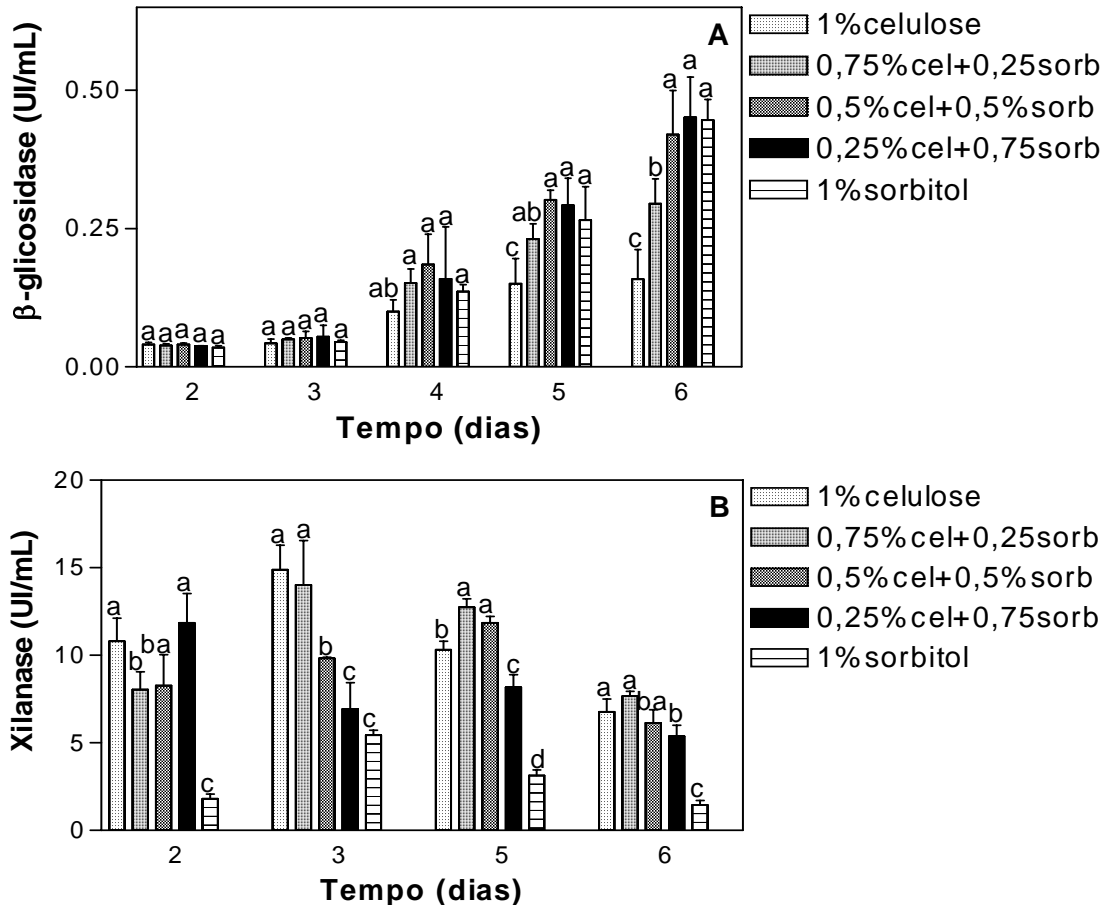


Figura 7. Produção de β -glicosidase (A) e xilanase (B) em meios contendo celulose e sorbitol em frascos sob agitação recíproca. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem ao nível de $p < 0,05$.

Assim, a partir destes resultados, verificou-se que a substituição de celulose por sorbitol pode ocorrer na fração de 0,25% a 0,75% (m/v).

4.1.2 Utilização de celulose concomitantemente com sorbitol e lactose

Os dados das Figuras 8, 9 e 10 referem-se a estudos onde sorbitol e lactose, como fontes de carbono solúveis, foram associadas à celulose para a produção de celulases em *P. echinulatum*.

Como se observa na Figura 8, no 3º e 4º dias de cultivo, a atividade FPA no meio contendo 0,75% de fonte solúvel (0,25% de sorbitol e 0,5% de lactose) e apenas 0,25% (m/v) de celulose foi semelhante à do meio contendo 1% (m/v) de celulose. Entretanto, na fração solúvel superior a 0,75% (m/v) da fonte de carbono houve diminuição nesta atividade enzimática. Após o 4º dia, verifica-se que as atividades enzimáticas são similares nos meios 0,5+0,25+0,25 e 0,25+0,5+0,25. Constata-se, também, atividade de FPA, embora pequena, nos meios contendo apenas sorbitol e lactose, na ausência de celulose.

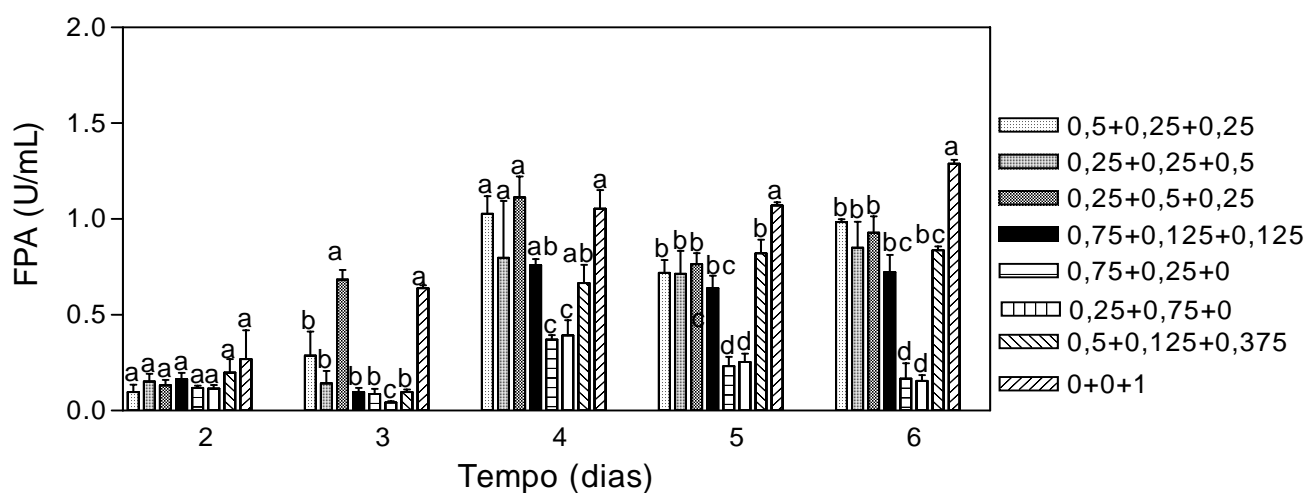


Figura 8. Produção enzimática de FPA em cultivo submerso em frascos sob agitação recíproca em meios contendo sorbitol, lactose e celulose. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem em nível de $p < 0,05$. Os valores da legenda referem-se, da esquerda para a direita, à concentração de sorbitol (% m/v), de lactose (% m/v) e de celulose (% m/v), respectivamente.

Verifica-se, na Figura 9, que o meio com celulose mostrou mais precocemente atividade de xilanases. Tal como observado para FPA, ocorreu atividade xilanásica quando o meio de cultivo continha apenas fonte de carbono solúvel (lactose e o sorbitol); entretanto, quando a celulose está presente no meio, a atividade enzimática é aumentada. Tal como observado, a lactose e o sorbitol não afetaram negativamente a atividade de xilanases.

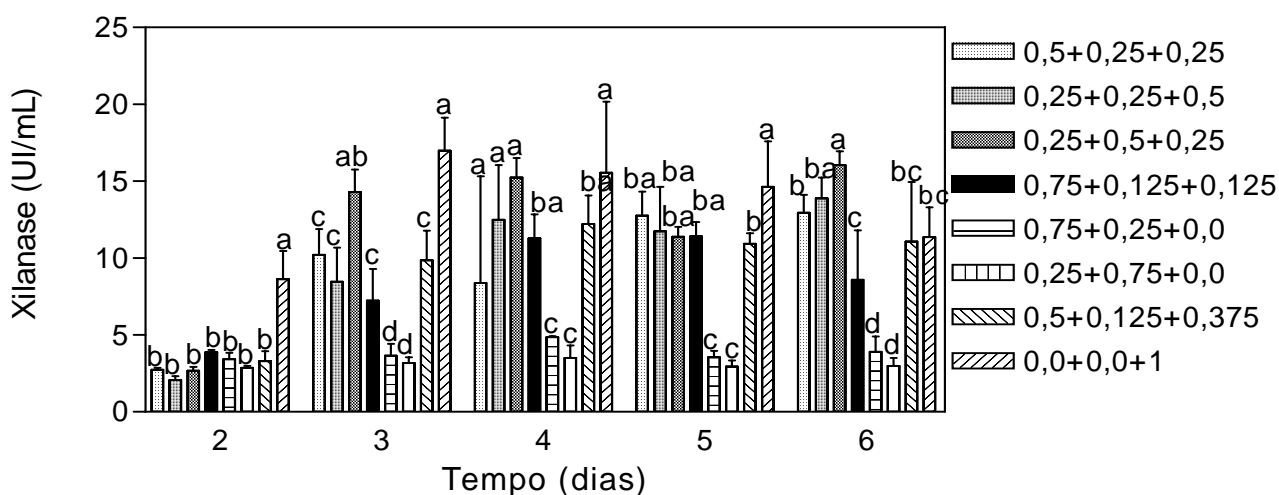


Figura 9. Produção enzimática de xilanase em cultivo submerso em frascos sob agitação recíproca em meios contendo sorbitol, lactose e celulose. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem em nível de $p < 0,05$. Os valores da legenda referem-se, da esquerda para a direita, à concentração de sorbitol (% m/v), de lactose (% m/v) e de celulose (% m/v), respectivamente.

Os dados da Figura 10 mostram que sorbitol e lactose, utilizados como fontes de carbono em cultivo submerso, possibilitam a produção de β -glicosidase e com valores superiores aos encontrados no meio contendo 1% (m/v) de celulose. Entretanto, aparentemente, a indução da atividade de β -glicosidase parece ser devida à lactose, desde que o tratamento contendo 0,75% (m/v) de lactose e 0,25% (m/v) de sorbitol apresentou títulos mais elevados comparativamente ao tratamento contendo 0,75% (m/v) de sorbitol e 0,25% (m/v) de lactose. Estes resultados corroboram com os de Sehnem *et al.* (2006), que mostraram que a linhagem 9A02S1 de *P. echinulatum* apresenta atividade de β -glicosidase quando cresce na presença de lactose.

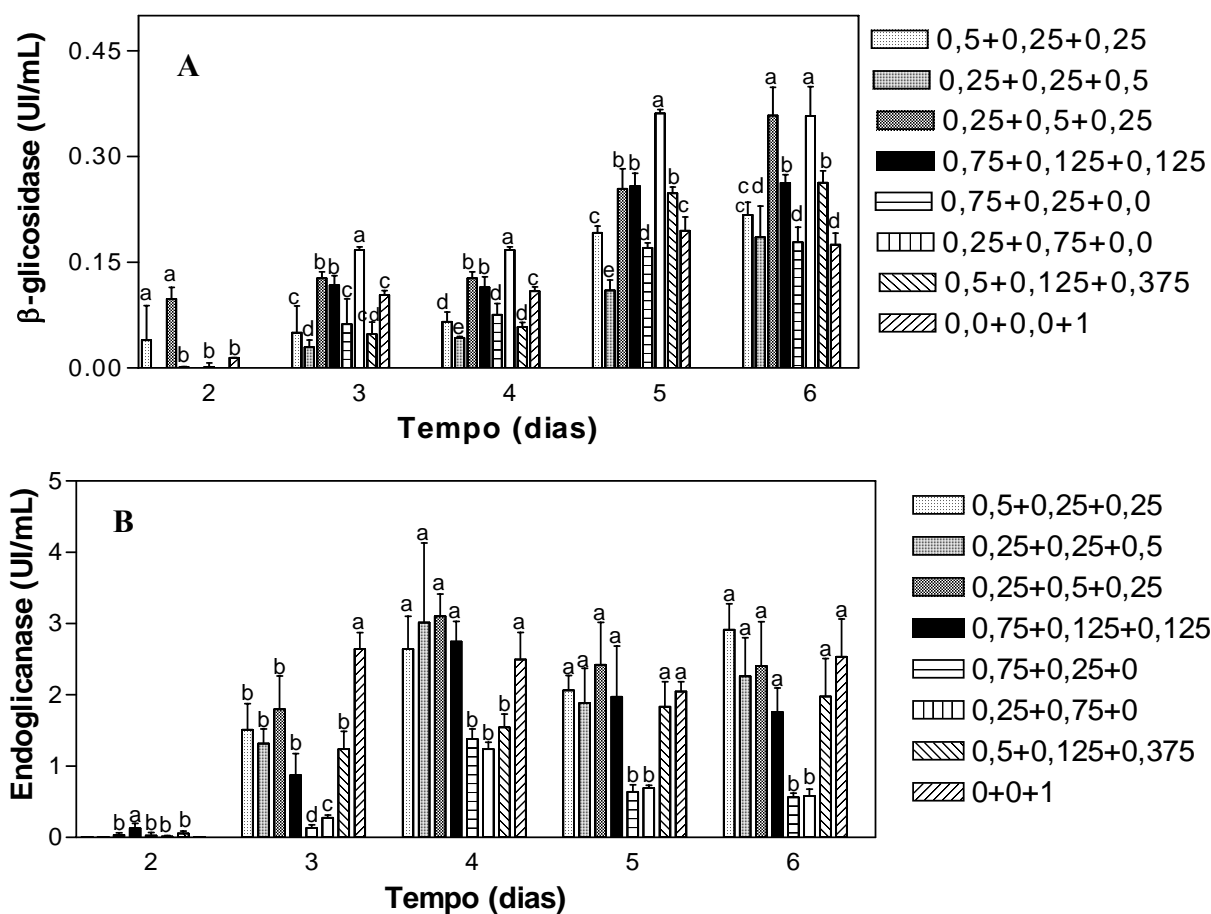


Figura 10. Produção enzimática β -glicosidase (A) e endoglicanase (B) em cultivo submerso em frascos sob agitação recíproca em meios contendo sorbitol, lactose e celulose. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem em nível de $p < 0,05$. Os valores da legenda referem-se da esquerda para a direita a concentração de sorbitol (% m/v), lactose (% m/v) e celulose (% m/v), respectivamente.

Cabe salientar que o meio contendo a menor concentração de celulose (0,75% de sorbitol, 0,125% de lactose e 0,125% de celulose) apresentou resultados superiores a 1% (m/v) de celulose a partir do 3º dia de cultivo, indicando que o sorbitol associado à lactose favorece a produção enzimática de β -glicosidase (Figura 10A).

Quando se comparam os cultivos com diferentes fontes de carbono solúveis e insolúveis e a atividade de endoglicanase (Figura 10B), verifica-se que o meio contendo 1% (m/v) de celulose é favorável para o aumento da produtividade, uma vez que, no 3º dia, ocorre o pico de $2,64 \pm 0,23$ UI/mL. Também, observa-se que há dois grupos distintos em relação à atividade enzima, um grupo

que contém fonte de carbono insolúvel e que apresenta os melhores resultados, apesar de não se diferenciarem estatisticamente e, outro, somente constituído de fonte de carbono solúvel.

4.1.3 Produção de celulasas e xilanasas em função da concentração de celulose e sorbitol e pesquisa do tempo de adição da celulose

Em cultivos de *P. echinulatum* 9A02S1, foi avaliado o efeito da concentração de sorbitol presente no meio no momento da inoculação, em combinação com a concentração de celulose e ao tempo em que esta foi adicionada ao meio sobre atividades de FPA (Figuras 11 e 12), endoglucanases (Figura 14), xilanasas (Figuras 15 e 16) e β -glicosidasas (Figura 17).

Como mostra a Figura 11A, a concentração de celulose resultou em variações da atividade enzimática sobre papel filtro. Observa-se, também, que os picos de atividade ocorreram no mesmo tempo, independentemente do tempo de adição do indutor.

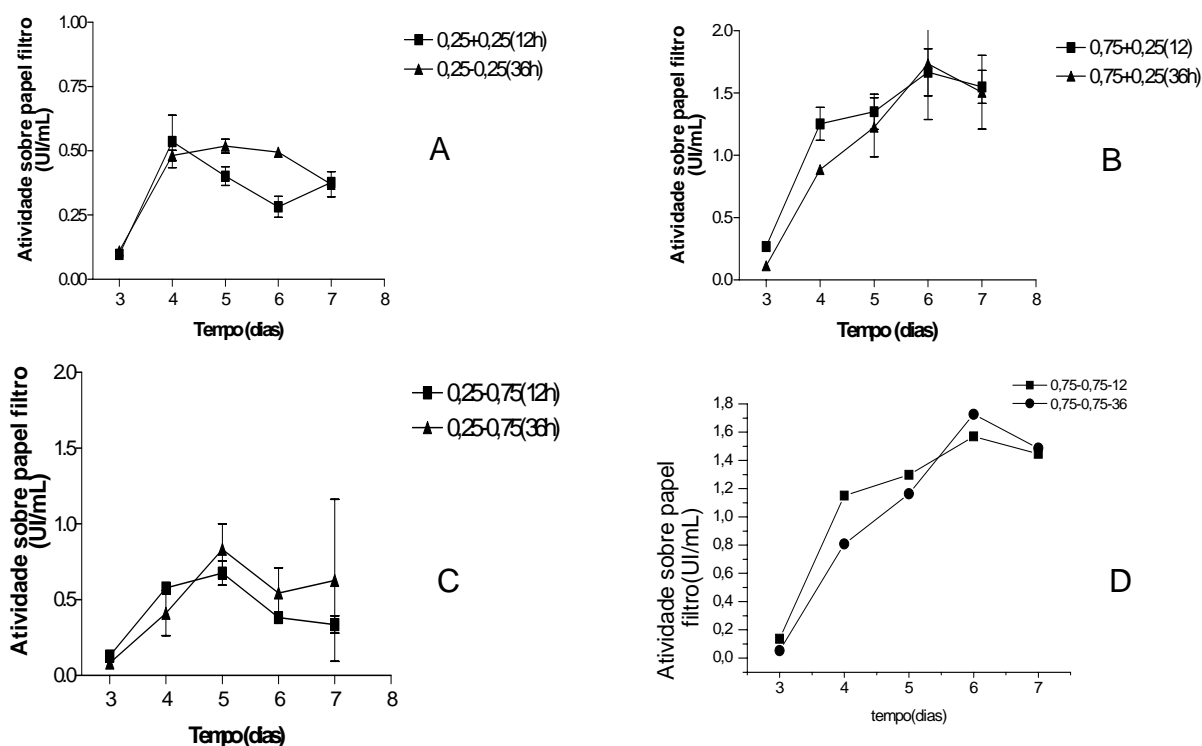


Figura 11. Atividade enzimática sobre papel filtro em cultivo submerso de *Penicillium echinulatum* em meios contendo sorbitol e com a adição de celulose em 12 e 36 horas de processo. Nas legendas, o primeiro, o segundo e o terceiro valores referem-se às concentrações (% m/v) de celulose e de sorbitol e ao tempo da adição da celulose (horas), respectivamente.

Na Figura 12, verifica-se que, no meio contendo 0,5% (m/v) de celulose (tratamento 0,5-0-0), a atividade obtida foi de 1,35 UI/mL, sendo a celulose disponibilizada logo ao início do cultivo como única fonte de carbono. Quando o meio foi formulado com 0,5 % (m/v) de celulose e 0,5% (m/v) de sorbitol (tratamento 0,5-0,5-0), um valor de FPA de 1,76 UI/mL foi obtido. Entretanto, quando a celulose foi adicionada após 24 horas do início do cultivo (tratamento 0,5-0,5-24), observou-se um valor de FPA ainda maior (1,96 UI/mL), sugerindo que o sorbitol favoreceu o crescimento fúngico nas primeiras horas e, posteriormente, com a celulose presente no meio, maior título enzimático foi alcançado. Por outro lado, na concentração de sorbitol 1% (m/v), atividade enzimática mais baixa foi obtida em comparação às demais condições. No último caso, é possível que o excesso de um substrato de mais fácil metabolização tenha reduzido a necessidade do fungo produzir celulases para a degradação e consumo da celulose, o que pode ser entendido como repressão catabólica.

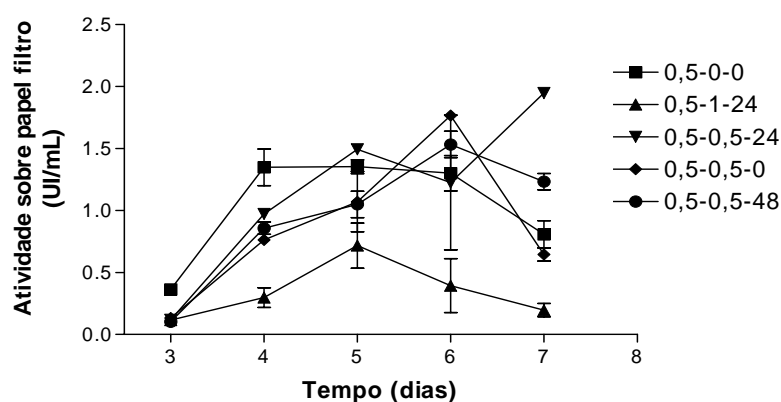


Figura 12. Atividade enzimática sobre papel filtro em cultivo submerso de *Penicillium echinulatum* em meios com e sem sorbitol e com a adição de celulose em 0, 24 e 48 horas de processo. Nas legendas, o primeiro, o segundo e o terceiro valores referem-se às concentrações (% m/v) de celulose e de sorbitol e ao tempo da adição da celulose (horas), respectivamente.

A análise do perfil de pH com o tempo (Figura 13) em diferentes ensaios realizados em meio contendo sorbitol mostra, em comum, o aumento deste parâmetro a valores acima de 6, na segunda metade dos cultivos, sendo que nos meios com menor concentração de celulose, os valores

de pH no 7º dia foram os mais elevados. Este comportamento foi anteriormente descrito por Sternberg & Dorval (1979), que relacionaram o fato com a liberação de amônia em razão da lise de células, sinalizando o término do crescimento.

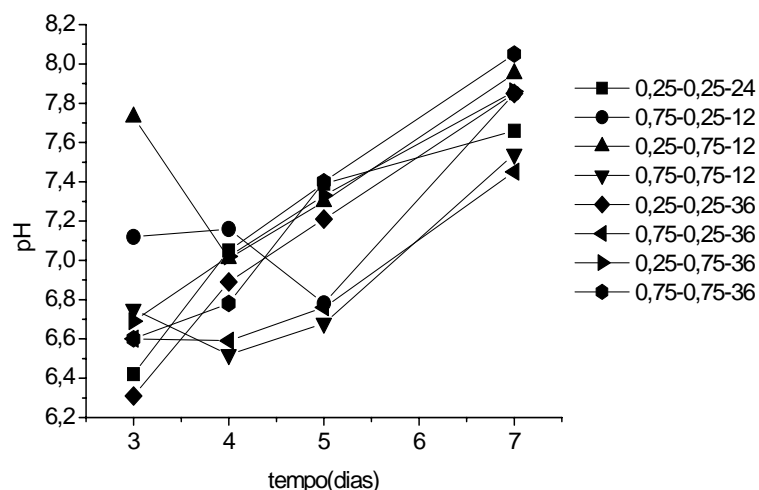


Figura 13. Variação do pH em cultivo submerso de *Penicillium echinulatum* em meio contendo sorbitol e com a adição de celulose em 12, 24 e 36 horas de processo. Nas legendas, o primeiro, o segundo e o terceiro valores referem-se às concentrações (% m/v) de celulose e de sorbitol e ao tempo da adição da celulose (horas), respectivamente.

A Figura 14 mostra que, entre as duas concentrações de celulose testadas, a atividade de endoglicanase foi maior no tratamento com 0,75% (m/v). Porém, a adição mais tardia da celulose, em 36 horas de processo (Figura 11B), ao mesmo tempo em que aumenta o tempo necessário para que seja atingido o pico de atividade enzimática, em comparação a adição de celulose às 12 horas de cultivo, mostrou-se desfavorável à atividade de endoglicanases, como mostra a comparação dos perfis dos tratamentos 0,75-0,25 e 0,75-0,75 (Figura 11B).

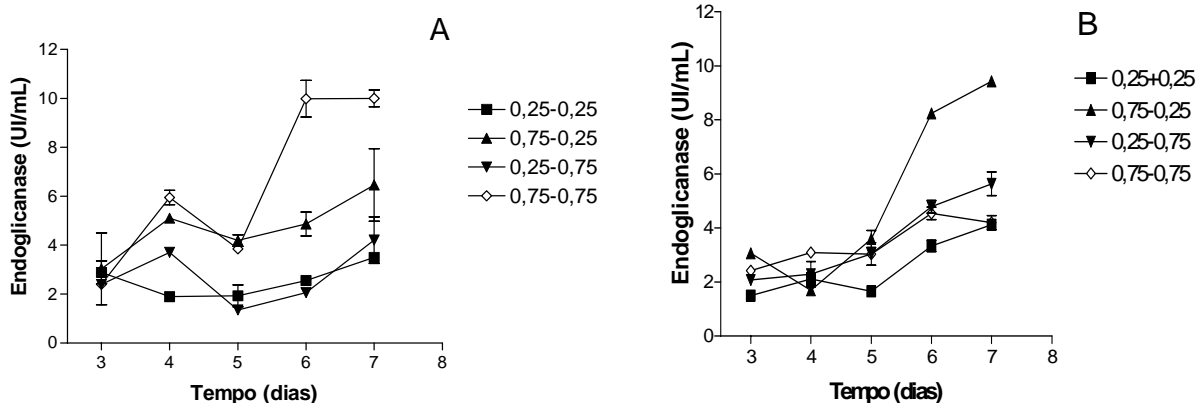


Figura 14. Produção enzimática de endoglicanase em cultivo submerso de *Penicillium echinulatum* em meios contendo sorbitol e com a adição de celulose em 12 (A) e 36 horas (B) de processo. Nas legendas, o primeiro e o segundo valores referem-se às concentrações (% m/v) de celulose e de sorbitol, respectivamente.

Com respeito à atividade de xilanase (Figura 15), pode ser verificado que esta foi maior com o aumento da concentração da celulose, visto que as atividades dos tratamentos 0,75-0,25 foram maiores que as obtidas nos tratamentos 0,25-0,25, com qualquer tempo de adição de celulose. Diferentemente do observado para a atividade de endoglicanase, o tempo de adição da celulose apresentou pouca influência sobre a formação de xilanase nos tratamentos 0,75-0,25.

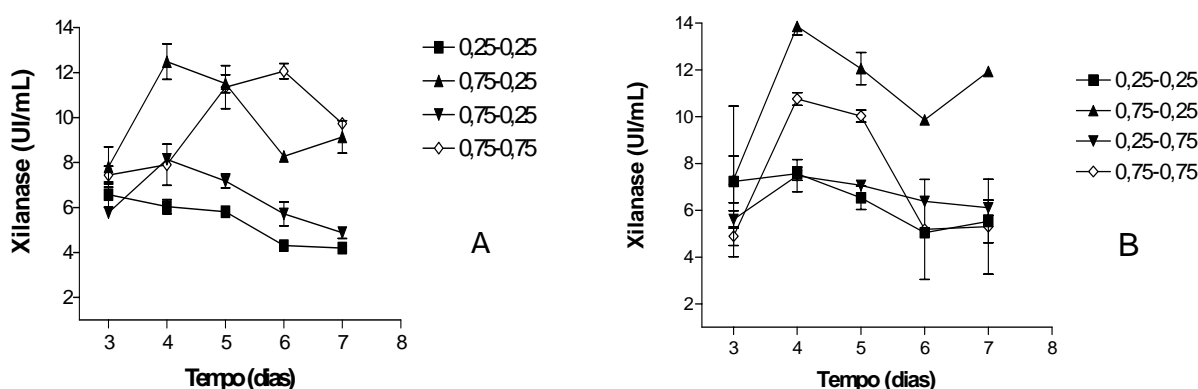


Figura 15. Produção enzimática de xilanase em cultivo submerso de *Penicillium echinulatum* em meios contendo sorbitol e com a adição de celulose em 12 (A) e 36 horas (B) de processo. Nas legendas, o primeiro e o segundo valores referem-se às concentrações (% m/v) de celulose e de sorbitol, respectivamente.

Na Figura 16, observa-se o perfil de atividade enzimática no tratamento 0-0,5-24 (meio sem celulose e com adição de 0,5% (m/v) de sorbitol após 24 horas), onde se evidencia que o sorbitol não é indutor de xilanases, enquanto o perfil do tratamento 0,5-0-24 mostra que a celulose induziu a formação desta enzima.

O cultivo de *P. echinulatum* iniciado com meio contendo 0,5% (m/v) de celulose e 0,5% (m/v) de sorbitol (0,5-0,5-0) produziu atividade de xilanase 23,6% menor que aquele em que a adição de celulose foi realizada após 24 horas (0,5-0,5-24). Entretanto, um aumento, ainda, no tempo de adição da celulose para 48 horas, acarretou decréscimo da atividade.

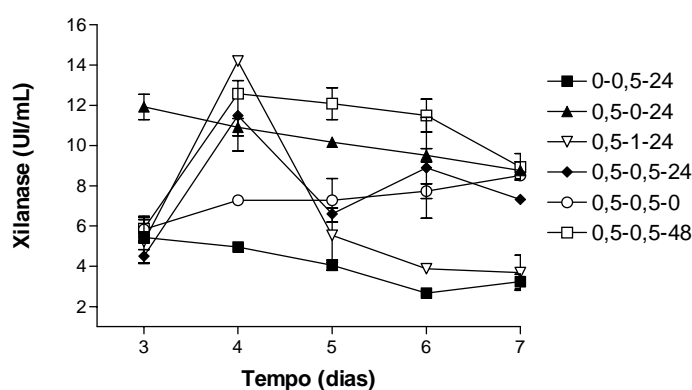


Figura 16. Produção enzimática de xilanase em cultivo submerso de *Penicillium echinulatum* em meios com e sem sorbitol e com a adição de celulose em 0, 24 e 48 horas de processo e em meio com sorbitol como única fonte de carbono. Nas legendas, o primeiro e o segundo valores referem-se às concentrações (% m/v) de celulose e de sorbitol, respectivamente.

Na Figura 17, pode-se verificar o comportamento da atividade de β -glicosidase no cultivo. Constata-se que a o meio contendo 0,75% (m/v) de celulose, adicionada após 12 horas de cultivo, iniciado com 0,75% (m/v) de sorbitol, apresentou significativa diferença em relação aos demais. Porém, cabe salientar que, para os demais ensaios, com tempo de adição em 24, 36 e 48 horas, os títulos enzimáticos para esta enzima não foram os esperados, apresentando-se menores do que os já publicados para este micro-organismo em diferentes meios (Dillon, 2006).

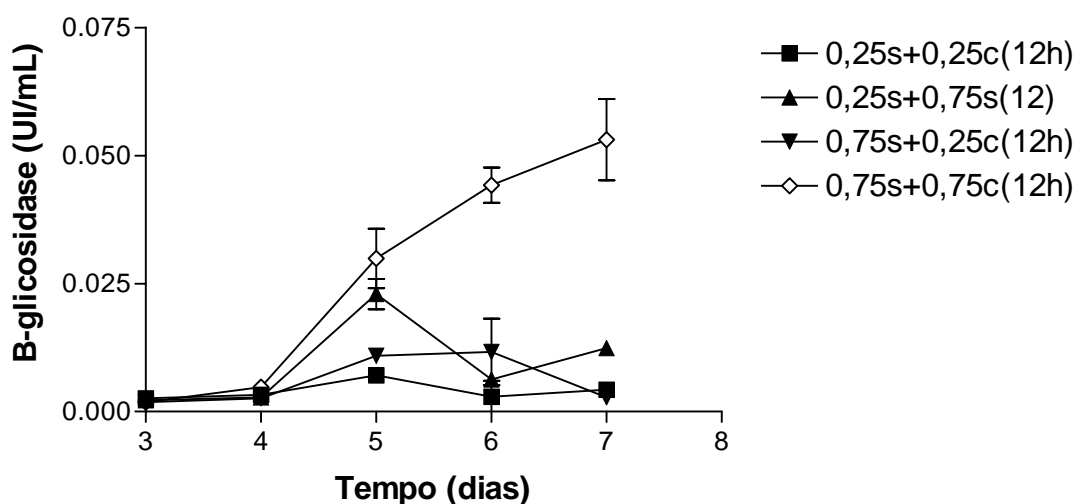


Figura 17. Produção enzimática de β -glicosidase em cultivo submerso de *Penicillium echinulatum* em meios com e sem sorbitol e com a adição de celulose em 0, 24 e 48 horas de processo e em meio contendo sorbitol como única fonte de carbono. Nas legendas, o primeiro e o segundo valores referem-se às concentrações (% m/v) de celulose e de sorbitol, respectivamente.

Desta forma, os dados mostram a conveniência do emprego de sorbitol para formulações de meios visando à produção de celulases e xilanases por *P. echinulatum*. Devido à solubilidade do sorbitol, pode ocorrer facilitação da transferência de oxigênio e, em decorrência, possibilidade de melhora no crescimento celular e na produção de celulases. Entretanto, verifica-se que o tempo em que o indutor (celulose) é adicionado pode produzir diferenças nas atividades enzimáticas.

4.1.4 Otimização para a produção de celulases e xilanases em função da concentração de celulose, de sorbitol e do tempo de adição da celulose

A partir dos dados apresentados no item anterior, houve a necessidade de realizar um planejamento experimental visando otimizar o meio de cultivo para a produção de celulases e xilanases em relação à concentração dos substratos e ao tempo de adição da celulose.

A análise da Tabela 2 indica que parte da celulose pode ser substituída por sorbitol em cultivo submerso para a produção de celulases. Também, observou-se que a concentração de

sorbitol favorece a atividade sobre papel filtro no quinto dia de cultivo, como visto na Figura 18, o que pode ser representado pela Equação 8:

$$Y_1 \text{ (UI/mL)} = 1,426 + 0,303x_1 + 0,12x_2 - 0,18x_1^2 - 0,11x_2^2 - 0,11x_3^2 - 0,09x_1.x_2 - 0,07x_1.x_3 \text{ (Equação 8)}$$

Onde:

Y_1 = Atividade em papel de filtro (UI/mL)

X_1 = concentração de celulose (% m/v)

X_2 = concentração de sorbitol (% m/v)

X_3 = tempo de adição da celulose ao meio contendo sorbitol (horas)

Todos os parâmetros foram significativos ($p < 0,05$) e, perfeitamente, ajustados à equação polinomial de segunda ordem com as variáveis codificadas e com 93,5% da variação explicada (Tabela 3). Como mostra a Figura 12, existe uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

Tabela 2. Atividade sobre papel filtro no quinto dia de cultivo submerso, em ensaios com variação na concentração de celulose e sorbitol e tempo de adição da celulose ao meio.

Ensaio	Códigos			Valores dos parâmetros			FPA (UI/mL)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ Concentração de celulose (g/L)	X ₂ Concentração de sorbitol (g/L)	X ₃ Tempo de adição do indutor (h)	Resposta (Y)	Estimado (Y)
1	-1	-1	-1	0,25	0,25	12	0,402	0,4508
2	1	-1	-1	0,75	0,25	12	1,350	1,3667
3	-1	1	-1	0,25	0,75	12	0,680	0,8650
4	1	1	-1	0,75	0,75	12	1,290	1,4203
5	-1	-1	1	0,25	0,25	36	0,520	0,5700
6	1	-1	1	0,75	0,25	36	1,230	1,2253
7	-1	1	1	0,25	0,75	36	0,833	0,9966
8	1	1	1	0,75	0,75	36	1,160	1,2915
9	-2	0	0	0	0,5	24	0,226	0,0924
10	2	0	0	1	0,5	24	1,350	1,3031
11	0	-2	0	0,5	0	24	0,720	0,7546
12	0	2	0	0,5	1	24	1,450	1,2349
13	0	0	-2	0,5	0,5	0	1,080	0,9796
14	0	0	2	0,5	0,5	48	1,050	0,9699
15	0	0	0	0,5	0,5	24	1,530	1,4259
16	0	0	0	0,5	0,5	24	1,440	1,4259
17	0	0	0	0,5	0,5	24	1,400	1,4259
18	0	0	0	0,5	0,5	24	1,420	1,4259
19	0	0	0	0,5	0,5	24	1,520	1,4259
20	0	0	0	0,5	0,5	24	1,440	1,0868

X₁ = concentração de celulose em % (m/v); X₂ = concentração de sorbitol em % (m/v) e X₃ = tempo de adição de celulose (horas).

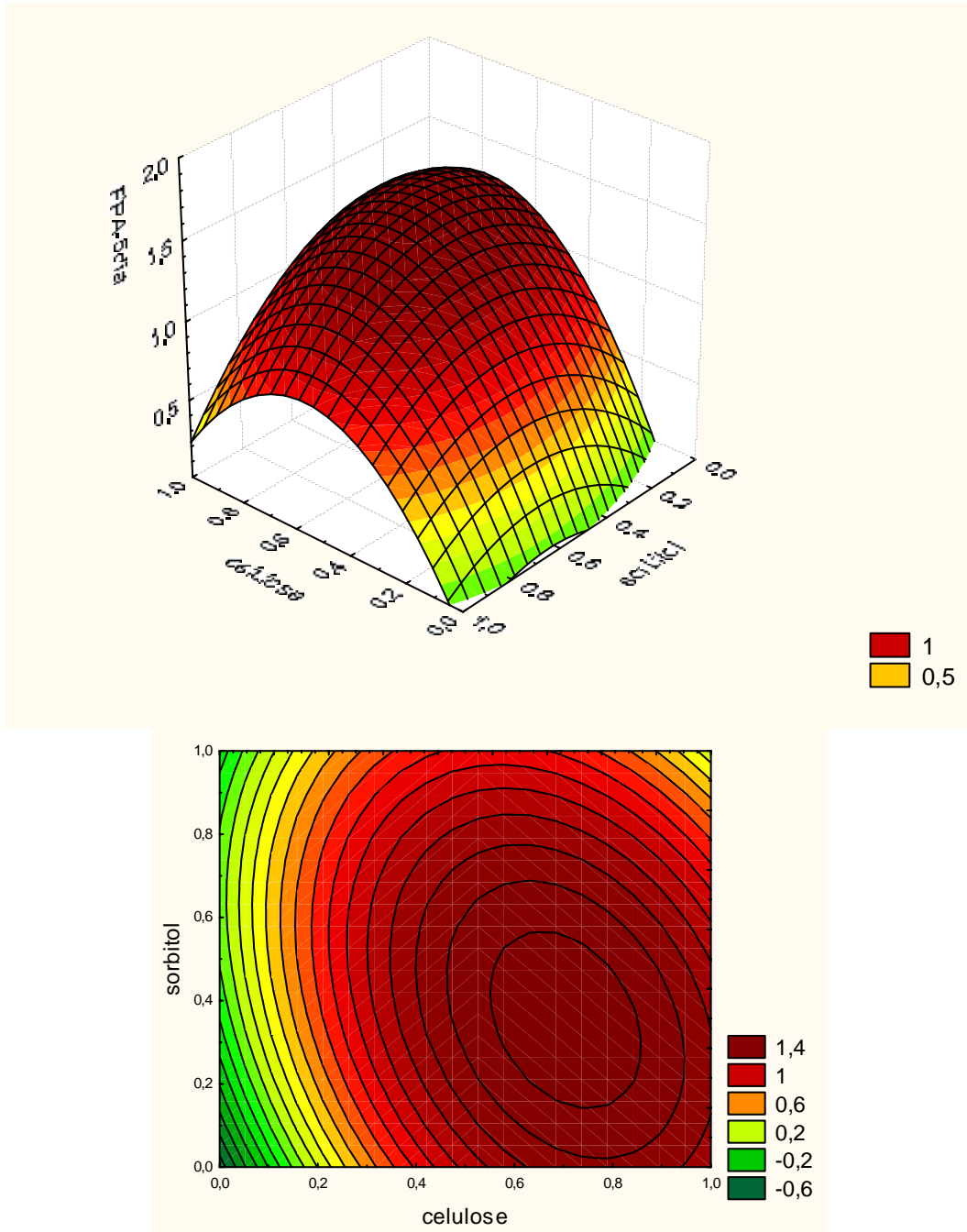


Figura 18. Superfície de resposta da atividade sobre papel filtro em função da concentração de sorbitol e celulose em cultivo submerso de cinco dias em frasco sob agitação por *Penicillium echinulatum*.

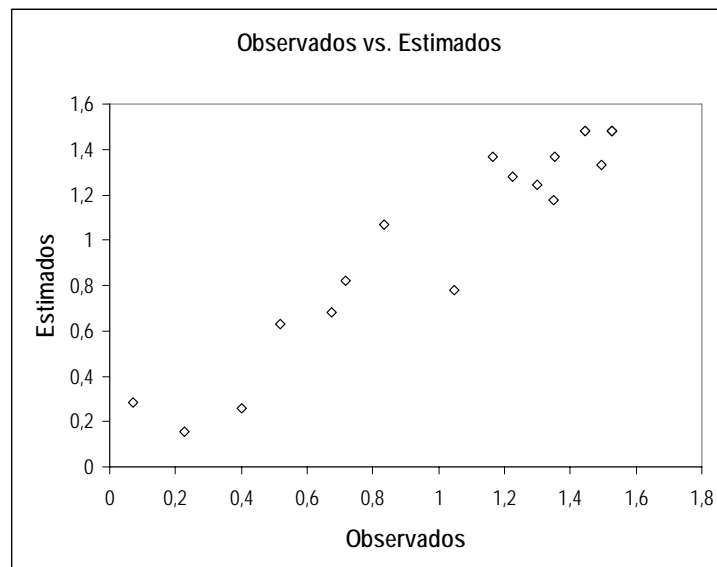
Em relação ao tempo de adição de celulose (Tabela 3 e Figura 20), verifica-se que esta variável, conjugada com as concentrações de sorbitol, apresentou efeito no processo. Constatou-se que a adição até as primeiras 24 horas do cultivo promoveu um incremento na FPA, ocorrendo, após, uma redução na atividade. Como pode ser observado quando a um meio contendo 0,5% (m/v) de sorbitol foi adicionado 0,5% (m/v) de celulose, observou-se que a FPA foi de 1,07; 1,52 e 1,05 UI/mL para 0, 24 e 48 horas de cultivo, respectivamente. Nas mesmas concentrações e com adição em 24 horas, a determinação de FPA no 6º dia foi máxima e atingiu 1,91 UI/mL.

Por outro lado, quando uma concentração de sorbitol 1% (m/v) foi utilizada, menor atividade enzimática foi obtida em comparação às demais condições. Assim, é possível que o excesso de um substrato de mais fácil metabolização tenha reduzido a necessidade do fungo produzir celulasas para a degradação e consumo da celulose.

A utilização de planejamento experimental pode proporcionar uma economia de tempo e de reagentes, uma vez que compila e ajusta os pontos essenciais dos parâmetros a serem analisados. Wen *et al.* (2005) otimizaram valores de pH, temperatura e concentração de resíduos de animais na produção de celulasas e β -glicosidase utilizando *T. reesei* e *Aspergillus phoenicis*, constatando influência positiva para os dois primeiros parâmetros. Os picos de atividade de FPU para *T. reesei*, nas condições otimizadas, foi de 1,7 UI/mL no 7º dia; para β -glicosidase foi de 0,08 UI/mL no 6º dia. Os baixos valores de β -glicosidase para algumas linhagens de *T. reesei* foram resolvidos com o cultivo realizado com os dois fungos e a atividade atingiu pico de 0,57 UI/mL no 9º dia.

Tabela 3. Coeficientes de regressão para resposta para atividade FPA.

Coeficientes	Erro	t (7)	P
b₀	1,426 ± 0,025806	55,26	2E-10
b₁	0,303 ± 0,014832	20,41	2E-07
b₂	0,12 ± 0,014832	8,095	8E-05
b₃	-0 ± 0,014832	0,164	0,874
b₁₁	-0,18 ± 0,012192	14,93	1E-06
b₂₂	-0,11 ± 0,012192	8,84	5E-05
b₃₃	-0,11 ± 0,012192	9,25	4E-05
b₁₂	-0,09 ± 0,020976	4,297	0,004
b₁₃	-0,07 ± 0,020976	3,105	0,017
b₂₃	0,003 ± 0,020976	0,149	0,886

**Figura 19. Valores observados X valores estimados de FPA no quinto dia de cultivo.**

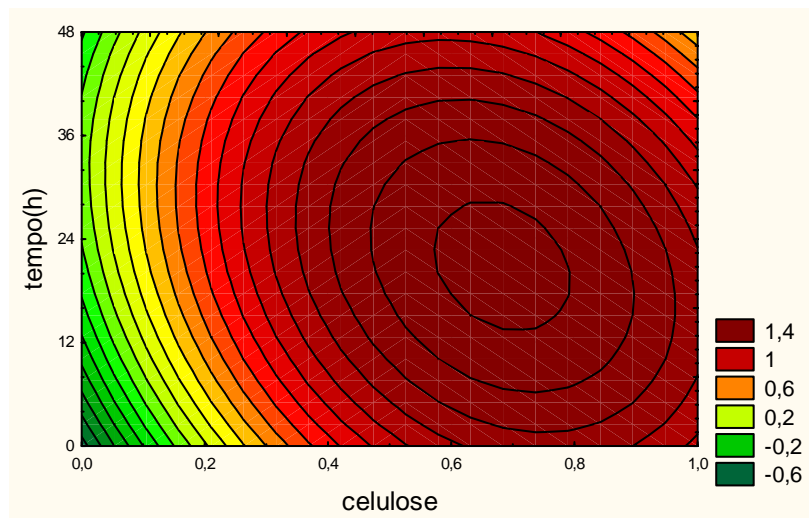
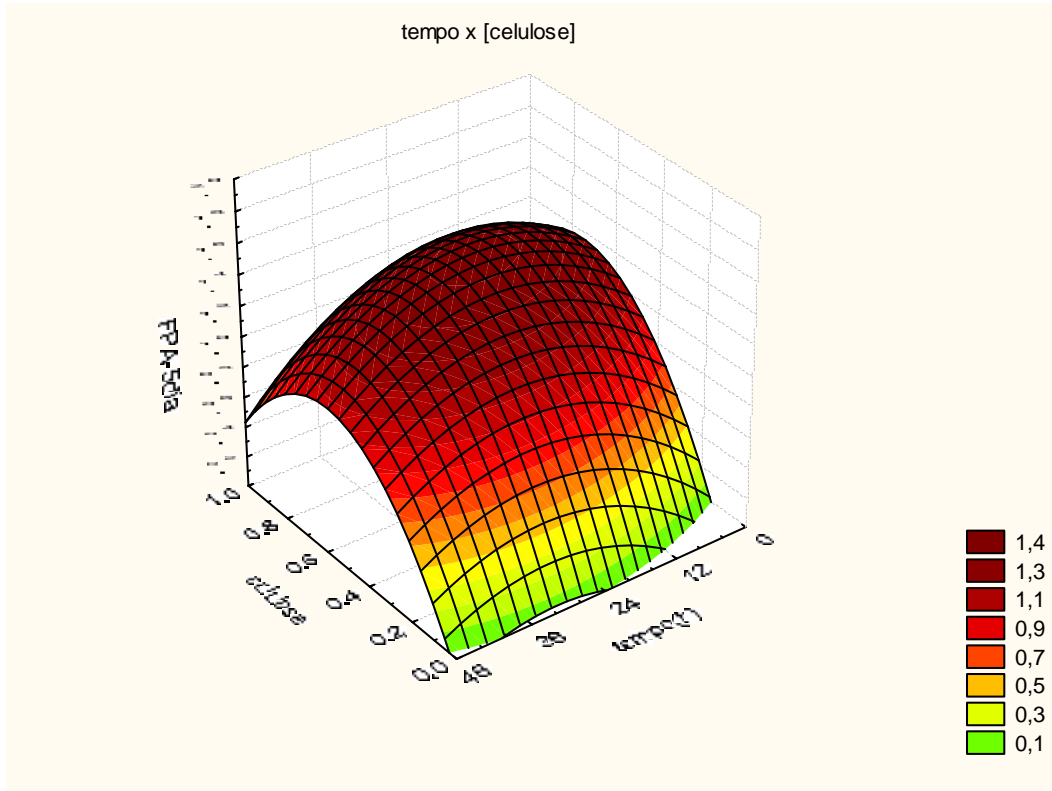


Figura 20. Superfície de resposta de FPA por *Penicillium echinulatum* em função da concentração de celulose e do tempo de adição em cultivo submerso em frascos sob agitação de cinco dias.

Para a atividade de xilanase, no 5º dia, observou-se que há variação explicada de 92% dos valores (Figura 21). O modelo de equação que define o comportamento, em variáveis codificadas, pode ser representado pela Equação 9:

$$Y_2 \text{ (UI/mL)} = 12,1 + 1,77 \cdot x_1 + 0,463x_3 - 1,26 \cdot x_1^2 - 1,52x_2^2 - 0,61x_3^2 - 0,76x_1 \cdot x_2 - 0,43x_1 \cdot x_3 - 0,6x_2 \cdot x_3$$

(Equação 9)

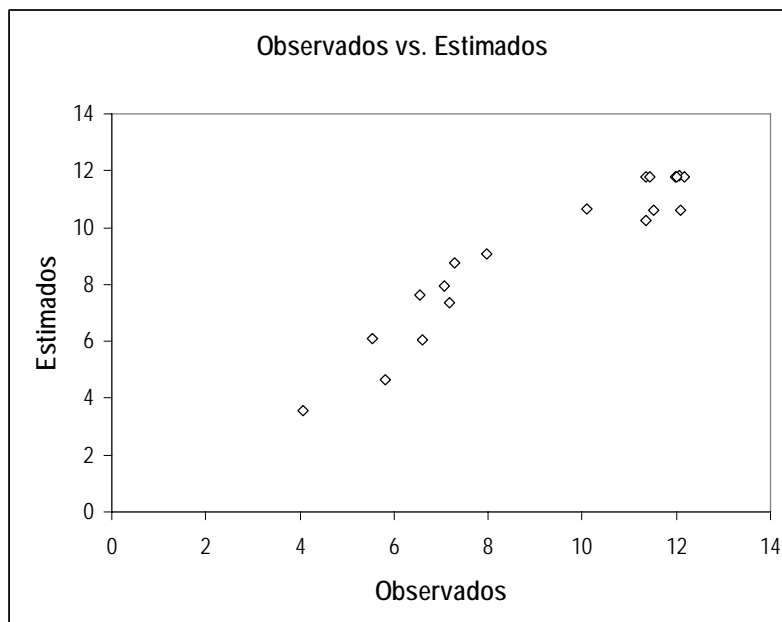


Figura 21. Valores observados X valores estimados de xilanase no quinto dia de cultivo, com variação explicada de 92%.

Constatou-se uma correlação entre o tempo de adição de celulose e a atividade de xilanase. Os maiores títulos ocorreram quando a adição foi realizada antes das 36 horas (Figura 20), ocorrendo, após este tempo, um decréscimo na atividade enzimática. O meio contendo 0,25% (m/v) celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol mostrou atividades de 5,81 e 6,56 UI/mL, quando a adição ocorreu em 12 e 36 horas, respectivamente. Quando, para a mesma situação, aumentando a concentração de celulose para 0,75% (m/v), têm-se atividades de 11,51 e 12,06 UI/mL, respectivamente. Assim, observa-se que a celulose é indutora preferencial para xilanase.

Desta forma, a concentração de sorbitol de até 0,3% (m/v) e de celulose acima de 0,7% (m/v) apresenta aumento na atividade de xilanase (Figura 22). Também, no meio contendo apenas sorbitol (0,5%), houve atividade enzimática com um máximo de 4,06 UI/mL, mostrando que o sistema xilanásico responde favoravelmente ao sorbitol, diferentemente do observado para celulasas.

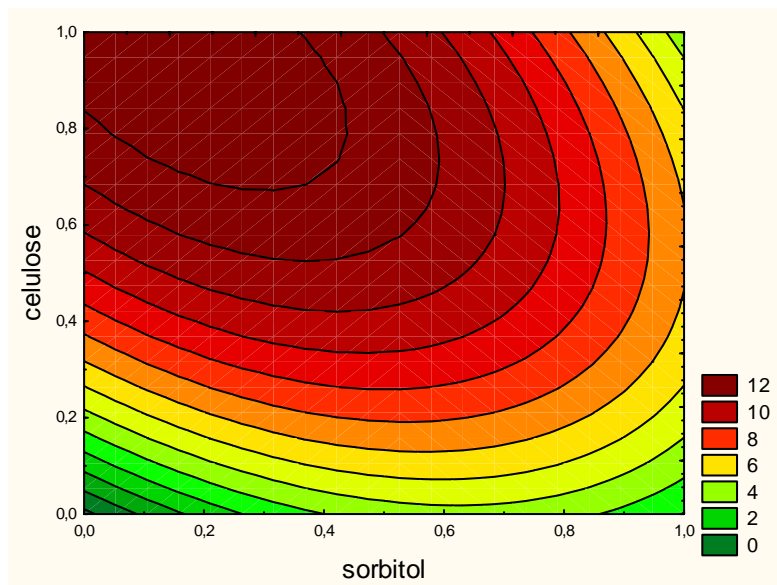
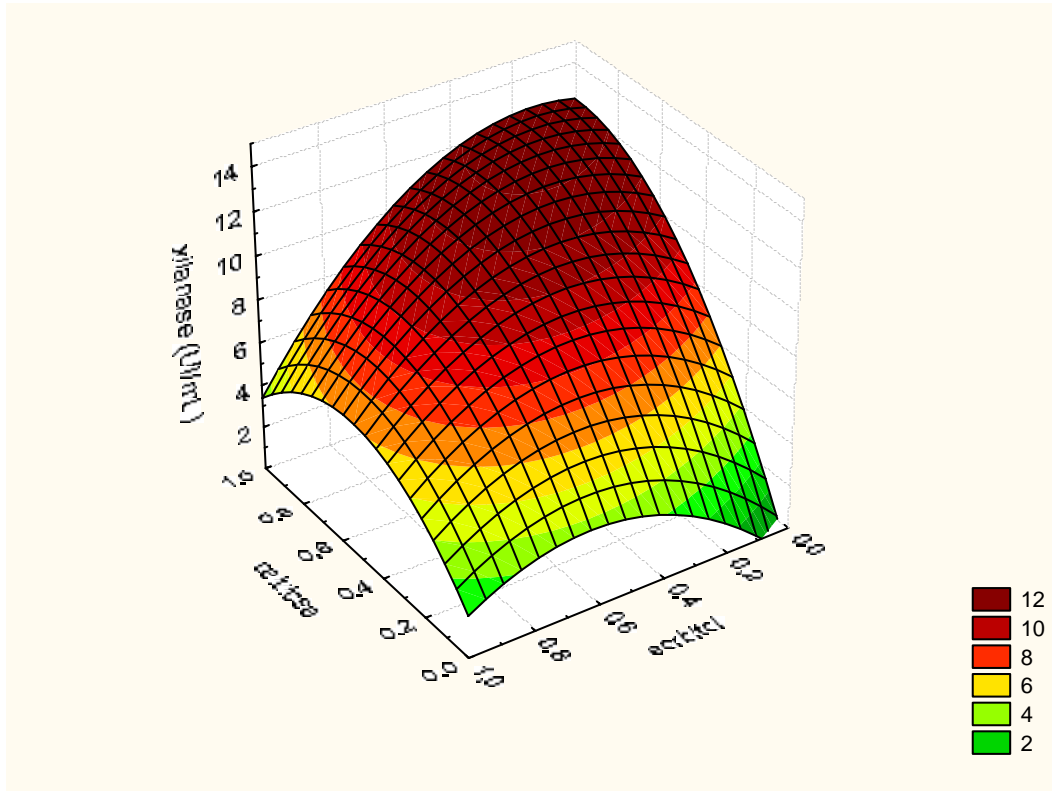


Figura 22. Superfície de resposta da atividade de xilanase no quinto dia de cultivo em frascos sob agitação por *Penicillium echinulatum* em função da concentração de celulose e de sorbitol.

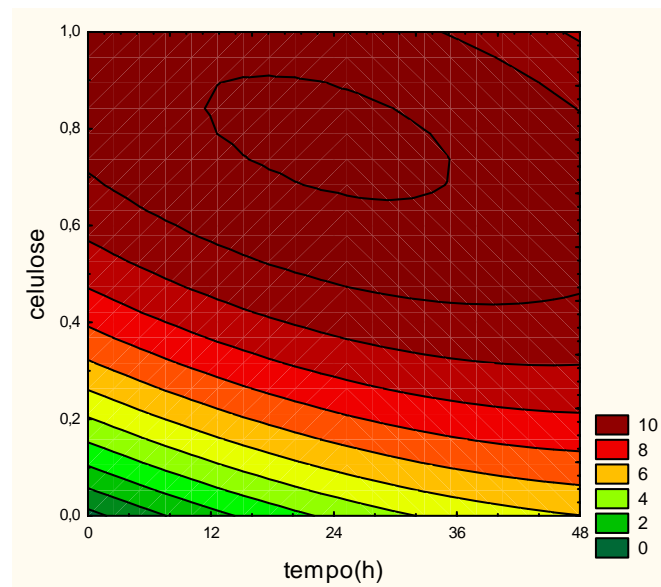
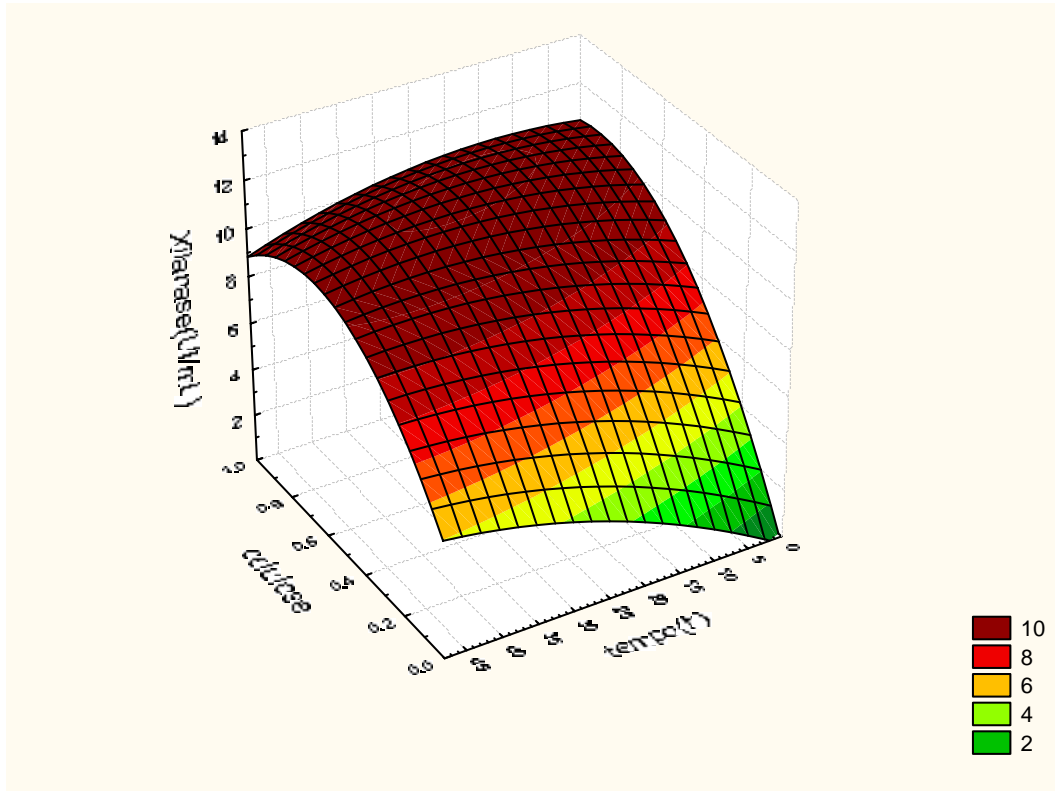


Figura 23. Superfície de resposta da atividade de xilanase em frasco sob agitação por *Penicillium echinulatum* em função da concentração de celulose e do tempo de adição no quinto dia de cultivo.

Como se observa na Figura 24, a atividade de endoglicanase pode ser favorecida com a substituição de parte da celulose por sorbitol, na faixa de 0,6% a 0,8% (m/v). Quando 0,75% (m/v)

de celulose foram adicionados ao cultivo contendo 0,25% (m/v) de sorbitol em 12 horas, a atividade de endoglicanase foi de 4,19 UI/mL e quando o cultivo continha com 0,75% (m/v) de sorbitol e 0,25% (m/v) de celulose, a atividade atingiu 6,85 UI/mL.

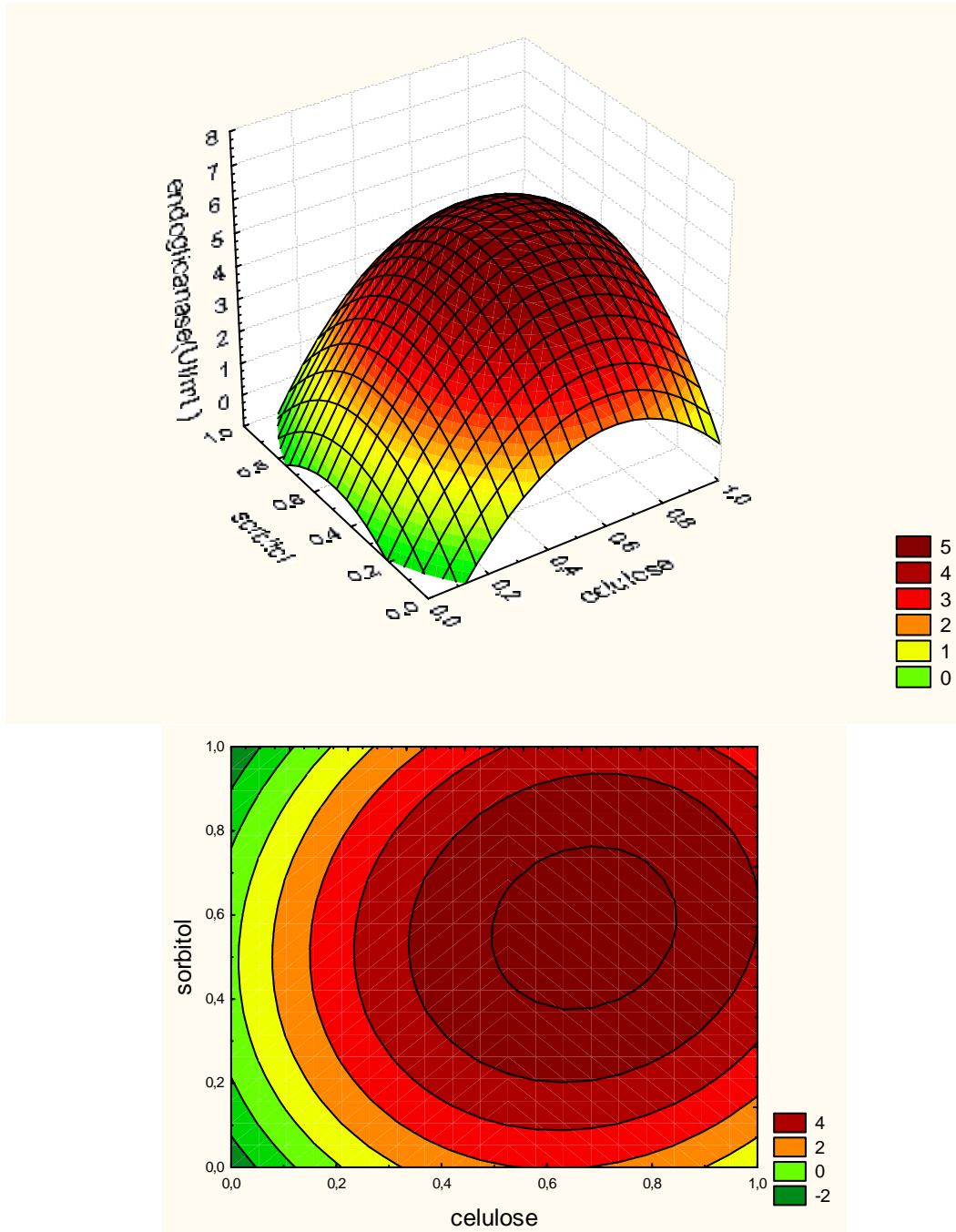


Figura 24. Superfície de resposta da atividade de endoglicanase no quinto dia de cultivo em frascos sob agitação por *Penicillium echinulatum* em função da concentração de celulose e de sorbitol.

Para a resposta da atividade de endoglicanase, todos os coeficientes de regressão foram significativos ($p < 0,05$) (Tabela 4) e a variação explicada de 92% indica uma boa concordância entre os valores experimentais e os previstos.

Constatou-se, também, que os modelos de equação polinomial para as atividades enzimáticas de FPA, xilanase e endoglicanase apresentam o mesmo perfil, demonstrando a contribuição positiva para aumento das concentrações de celulose e sorbitol e o tempo de adição e negativa para a associação entre as variáveis.

Tabela 4. Coeficientes de regressão para a resposta da atividade de endoglicanase em cultivo submerso (quinto dia).

	Coeficientes	Erro	t (7)	P
b₀	6,034 ± 0,057982	104,1	2E-12	
b₁	0,854 ± 0,033326	25,62	4E-08	
b₂	0,109 ± 0,033326	3,263	0,014	
b₃	0,104 ± 0,033326	3,113	0,017	
b₁₁	-1,18 ± 0,027394	43,24	9E-10	
b₂₂	-0,86 ± 0,027394	31,56	8E-09	
b₃₃	-0,6 ± 0,027394	21,75	1E-07	
b₁₂	0,16 ± 0,04713	3,395	0,012	
b₁₃	-0,73 ± 0,04713	15,44	1E-06	
b₂₃	-0,16 ± 0,04713	3,342	0,012	

Ao analisar a produção de endoglicanase, constata-se que a atividade foi superior quando a adição ocorreu até as 12 horas de cultivo, quando comparada a 36 horas, tendo sua máxima atividade de 9,98 UI/mL no meio contendo 0,75% (m/v) de celulose e 0,75% (m/v) de sorbitol (Figura 25).

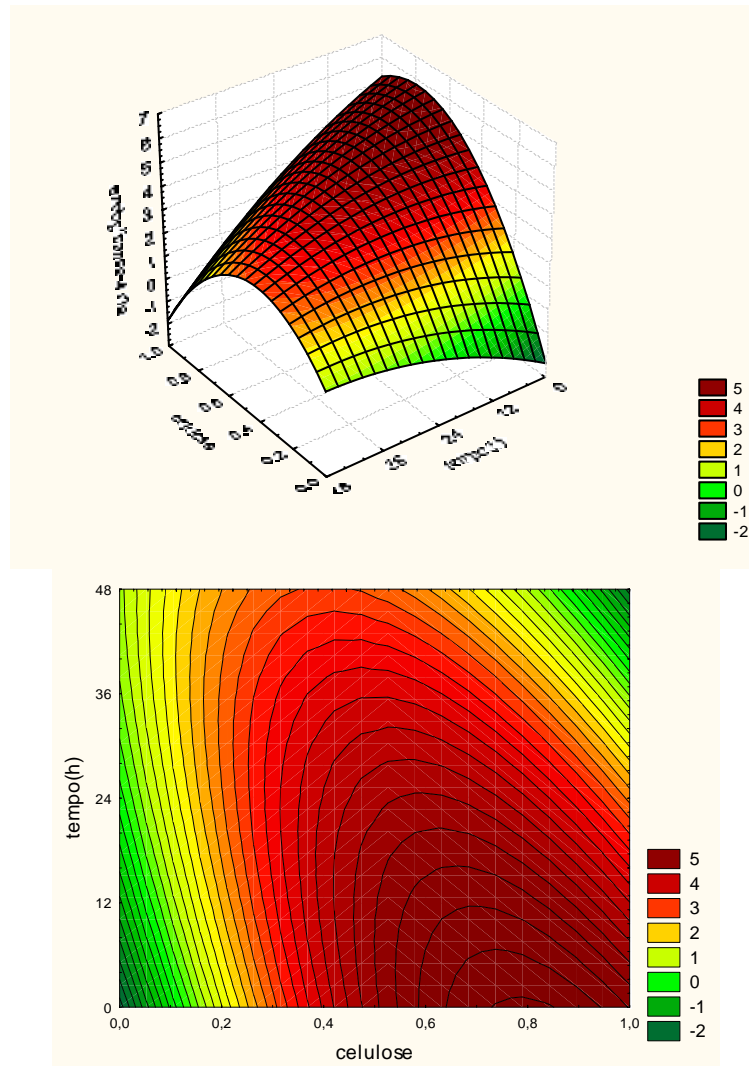


Figura 25. Superfície de resposta da produção de endoglicanase em cultivo submerso de quatro dias em frascos sob agitação com *Penicillium echinulatum* em função do tempo de adição e da concentração de celulose.

4.1.5 Suplementação de meio de cultivo em ensaios realizados em frascos sob agitação

Nas Figuras 26 a 29, são apresentados resultados de atividades enzimáticas de experimentos onde ocorreu alimentação com 10% (v/v) do mesmo meio de cultivo, visando minimizar a queda na atividade enzimática após o pico. Os dados da Figura 26, de FPA, mostram que ocorreu aumento nos títulos enzimáticos e na produtividade quando ocorreram alimentações, em tempos distintos.

Nos cultivos com 1% (m/v) de celulose, pode-se observar um aumento na atividade FPA quando ocorreram adições (2º, 3º ou 4º dia) em relação cultivo padrão (sem alimentação).

Enquanto no 6º dia o cultivo com 1% de celulose (padrão) ocorre uma atividade de FPA de 0,67 UI/mL, no cultivo com alimentação no 4º dia, a atividade foi de 1,35 UI/mL. Quando a alimentação foi realizada no 3º dia, a produtividade foi maior, como consequência do adiantamento do pico de atividade. Quando o suplemento de meio foi realizado no 3º dia, a atividade foi de $1,45 \pm 0,017$ UI/mL no 4º dia de cultivo, enquanto que o padrão apresentou $1,10 \pm 0,102$ UI/mL. No 5º dia, o melhor resultado foi o do meio suplementado no 2º dia, atingindo $1,41 \pm 0,11$ UI/mL.

Como se verifica na Figura 26B, relativa aos dados do meio constituído por 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol, a alimentação no 4º dia proporcionou atividade de FPA maior do que a observada para o meio com 1% (m/v) de celulose (Figura 23A). Entretanto, os dados mostram que as alimentações no 2º e 3º dias desfavoreceram a atividade de FPA. Aparentemente, comparando a curva do padrão com a obtida pela alimentação no 4º dia, não existiu interferência na atividade de FPA, possivelmente devido à alimentação realizada tardiamente. O aparente desfavorecimento das alimentações no 2º e 3º dias sugere um possível efeito repressor do sorbitol, mesmo que a alimentação tenha sido de 1/10 da quantidade de sorbitol foi utilizada no início do experimento. Entretanto, cabe salientar que, no 6º dia de cultivo, o meio suplementado no 3º dia apresenta atividade superior ao meio não suplementado, evidenciando que não houve a queda esperada.

Entretanto, para o meio contendo 50% (m/v) de celulose e 50% (m/v) de sorbitol (Figura 26C), verifica-se que as adições não favoreceram a atividade de FPA. Ainda, no meio suplementado no 2º dia, aparentemente, reduziu a atividade FPA em relação às outras condições, como visto nos dados do 3º dia, o que pode reforçar a possibilidade do sorbitol ter um efeito repressor, quando

adicionado no 2º dia de cultivo, embora nesta condição, valores de FPA tenham apresentado uma elevação no 4º e 5º dias.

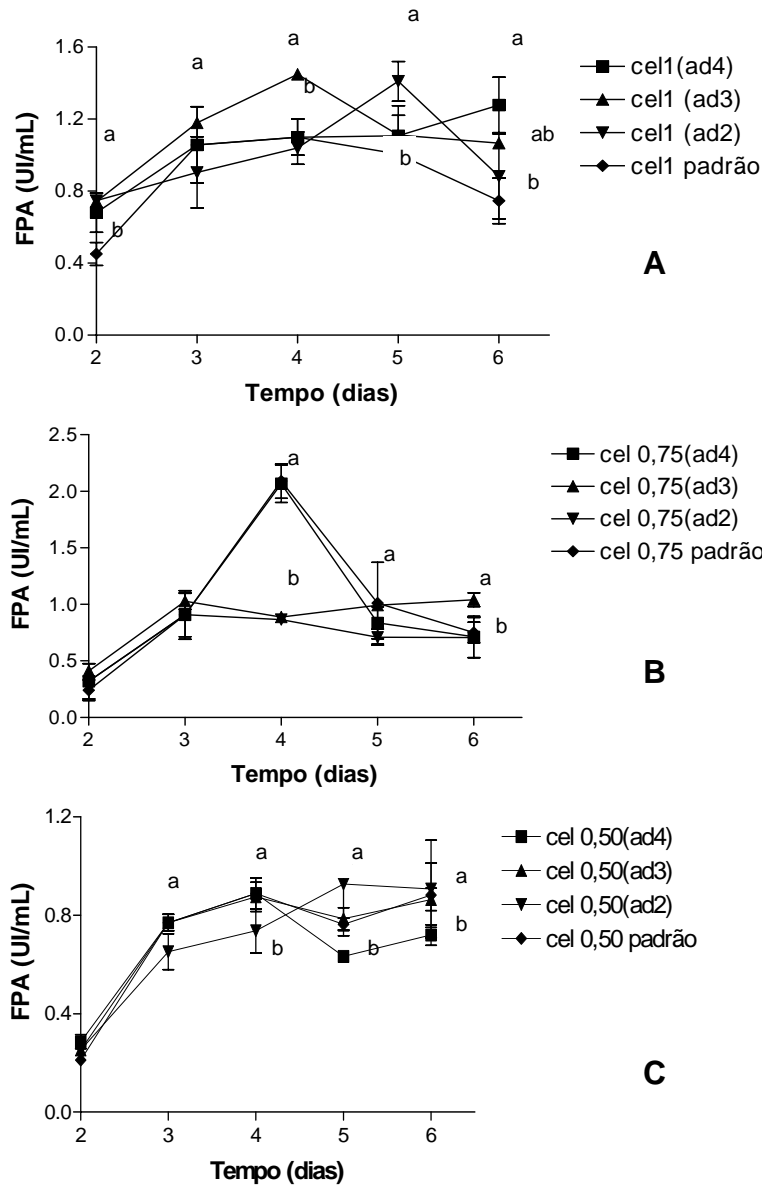


Figura 26. Cinética de produção de FPA em frascos sob agitação com alimentação no segundo, terceiro e quarto dias de cultivo. Meios contendo 1% (m/v) de celulose (A); 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol (B) e meio contendo 50% (m/v) de celulose e 50% (m/v) de sorbitol (C). Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem em nível de $p < 0,05$.

Para a atividade de endoglicanase (Figura 27), a alimentação em determinados tempos mostrou efeito positivo, não somente aumentando os títulos enzimáticos como também evitando a diminuição na atividade enzimática no decorrer do cultivo. Observa-se que, na condição padrão, sem suplementação (Figura 27A), o pico de atividade enzimática ocorreu no 3º dia, com queda no 4º e 5º e uma pequena elevação no 6º. Quando ocorreu suplementação no 3º dia, a atividade chegou a 4,67 UI/mL, comparado a 2,20 UI/mL observada na condição padrão. Um comportamento similar ocorreu quando a adição foi realizada no 4º dia, atingindo, no final do cultivo, 4,15 UI/mL, 43% maior que no meio sem suplementação, que apresentou 2,9 UI/mL. Por outro lado, a suplementação no 2º dia atrasou o pico de atividade para o 4º dia, quando comparado com a condição padrão, sugerindo um efeito repressor da celulose suplementada sobre a atividade enzimática.

A comparação dos dados entre as Figura 27B e 27A mostra que, no meio formulado com 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol, o pico de atividade enzimática foi adiantado para o segundo dia de cultivo. Apesar de apresentar menor título enzimático de endoglicanase, no meio contendo 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol, quando ocorreu alimentação no 4º dia, não houve uma queda abrupta na atividade enzimática. A queda que ocorreu após a alimentação, no 2º dia, deve-se, provavelmente, à adição de sorbitol (Figura 27B).

Pela análise da Figura 27C, referente ao cultivo com 50% (m/v) de celulose e 50% (m/v) de sorbitol, pode-se verificar que a alimentação de 10% de meio favoreceu a atividade de endoglicanase. Constata-se que quando ocorreu suplementação no 2º, 3º e 4º dia, as atividades enzimáticas foram superiores ao padrão. O pico, ocorrendo no 4º dia, de 4,26 UI/mL, foi aumentado para 4,42 UI/mL no 6º dia, quando a adição de meio ocorreu no 3º e 4º dia.

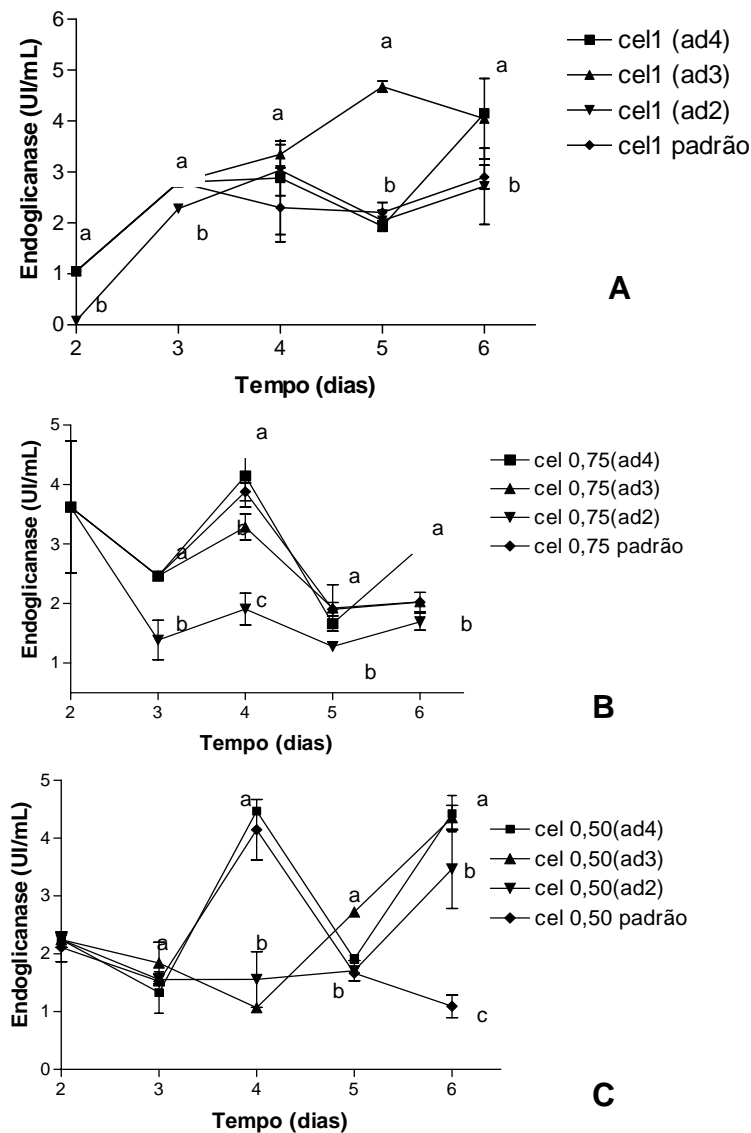


Figura 27. Cinética de produção de endoglucanase em frascos sob agitação com alimentação no segundo, terceiro e quarto dias de cultivo. Meios contendo 1% (m/v) de celulose (A); 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol (B) e meio contendo 50% (m/v) de celulose e 50% (m/v) de sorbitol (C). Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem em nível de $p < 0,05$.

Os dados de atividade de β -glicosidase (Figura 28) permitem sugerir mecanismos que podem estar influenciando a atividade destas enzimas. A comparação das Figuras 26, 27 e 28 corrobora constatações de que o acúmulo de atividade no meio externo de β -glicosidase foi mais tardio em relação às atividades de FPA, endoglucanases e xilanases. A comparação das atividades

de β -glicosidase no 4º dia sugere que as suplementações causaram diminuição na atividade desta enzima, exceto no meio que foi suplementado ao 3º dia (Figura 28A).

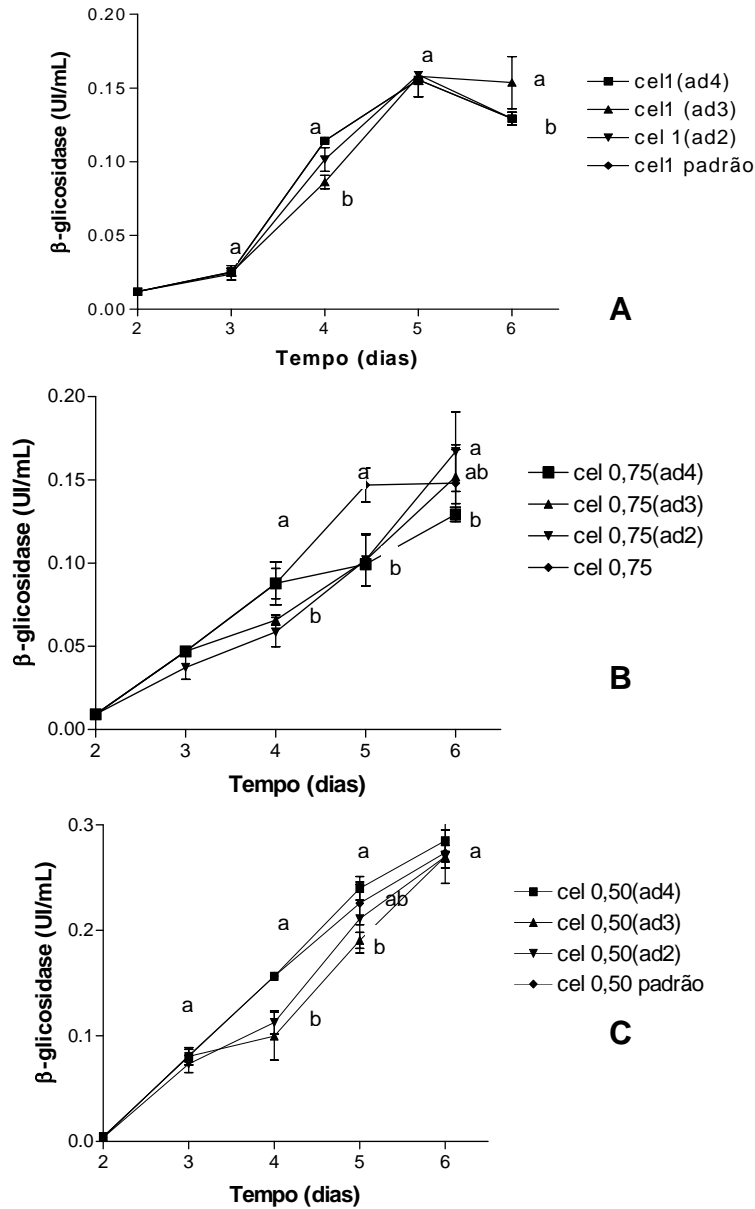


Figura 28. Cinética de produção de β -glicosidase em frascos sob agitação com alimentação no segundo, terceiro e quarto dias de cultivo. Meios contendo 1% (m/v) de celulose (A); 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol (B) e meio contendo 50% (m/v) de celulose e 50% (m/v) de sorbitol (C). Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem ao nível de $p < 0,05$.

Na Figura 28B observa-se que, no 5º dia, ocorre uma redução na atividade dos cultivos suplementados. Isto ocorreu, provavelmente, devido à presença de sorbitol no meio. No 6º dia, dia

do pico enzimático em todos os ensaios, a máxima atividade foi a do meio suplementado no segundo dia, com $0,167 \pm 0,016$ UI/mL, enquanto que o padrão, não suplementado, apresentou $0,148 \pm 0,016$ UI/mL. Constatou-se que a suplementação nos primeiros dias favorece a atividade de β -glicosidase e evita a queda desta enzima. Por outro lado, a suplementação de 10% de meio ao cultivo contendo 0,50% (m/v) de sorbitol e 0,50% (m/v) de celulose (Figura 28C) foi estatisticamente diferente no 4º dia, onde se observa que os meios suplementados no 2º e 3º dias apresentaram uma queda quando comparado com o meio padrão. Porém, no final do cultivo, no 6º dia, todos apresentaram resultados estatisticamente semelhantes.

Os dados para atividade de xilanases (Figura 29) mostram uma significativa diferença quando ocorreu alimentação. Verifica-se que a suplementação realizada no 2º dia não favoreceu a atividade de xilanases, pois a atividade enzimática ficou abaixo do padrão e dos demais tratamentos. Comparado com o padrão, a suplementação no 3º dia impediu a queda brusca da atividade, como ocorreu com o padrão no 4º, 5º e 6º dias. A suplementação com 10% de meio (Figura 29A), no 4º dia, mostrou uma atividade de 24,9 UI/mL no 6º dia, diferentemente das 13,2 UI/mL do meio padrão no final do cultivo.

Como ocorreu nas atividades de FPA, endoglicanase e β -glicosidase, a atividade de xilanase sofreu influência da suplementação no meio contendo 75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol (Figura 29B). O pico ocorreu no 3º dia para todos os ensaios. Observa-se, no entanto, que a suplementação no 3º e 4º dias mudou o comportamento em relação ao padrão, não ocorrendo a queda acentuada da atividade enzimática. Já para o meio contendo 0,50% (m/v) de sorbitol e 0,50% (m/v) de celulose (Figura 29C), verifica-se que a suplementação de meio nos 2º e 3º dias desfavoreceu a atividade de xilanase, uma vez que, no 4º dia de cultivo, as máximas atividades foram $12,67 \pm 0,12$ UI/mL e $16,5 \pm 1,6$ UI/mL, respectivamente, enquanto que o padrão atingiu $18,2 \pm 1,3$ UI/mL. Já para o 5º dia de cultivo, a menor atividade observada no cultivo suplementado

no 2º dia, com $11,48 \pm 1,2$ UI/mL de atividade. Assim, verifica-se que, ao final do ensaio, os meios suplementados apresentaram atividades inferiores ao padrão.

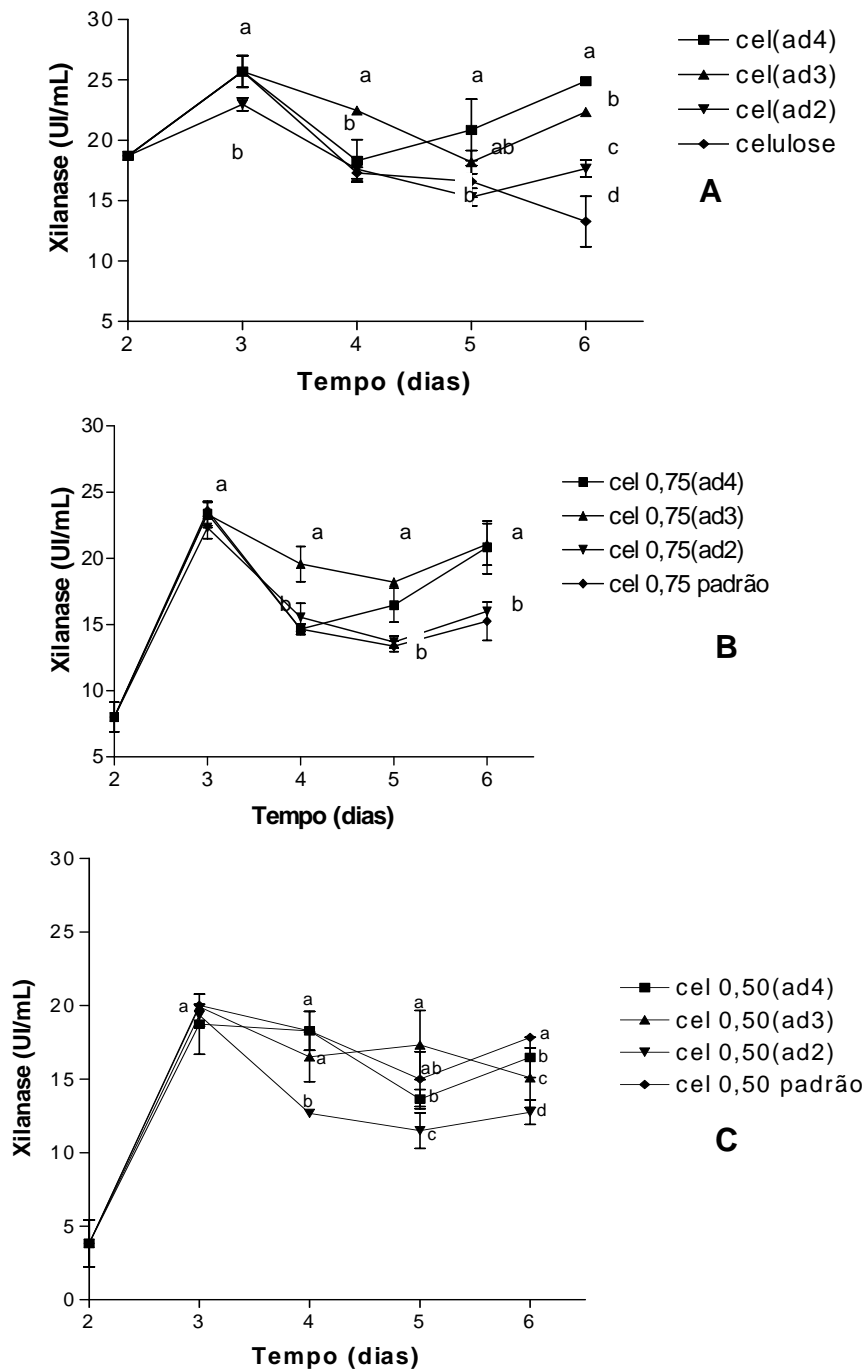


Figura 29. Cinética da produção de xilanase em frascos sob agitação com alimentação no segundo, terceiro e quarto dias de cultivo. Meios contendo 1% (m/v) de celulose (A); 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol (B) e 0,50% (m/v) de celulose e 0,50% (m/v) de sorbitol (C). Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem ao nível de $p < 0,05$.

4.2 Produção de celulasas e xilanases em biorreator com agitação mecânica

Utilizando-se as condições estudadas em nível de frascos sob agitação, foram realizados ensaios em biorreator com agitação mecânica e em biorreator *airlift* de circulação interna (apresentados no item 4.3). Para estas etapas, acrescentaram-se estudos sobre o crescimento microbiano, que foi estimado indiretamente pela dosagem do DNA (Lin, 2000) e a determinação colorimétrica do consumo de sorbitol (Venzon, 2008). A seguir, são apresentados os resultados dos ensaios em regime de batelada e batelada alimentada realizados em biorreator com agitação mecânica.

4.2.1 Ensaios em biorreator com agitação mecânica em regime de batelada

Os dados de uso de sorbitol na composição do meio para produção de celulasas com substituição parcial da celulose em frascos serviram de base para as pesquisas em biorreatores. Sendo assim, iniciou-se o estudo com o meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 0,75% (m/v) de celulose (cel0,75m), condição que, em frascos sob agitação, apresentou os melhores resultados quanto à produção enzimática. A agitação e a aeração oscilaram em função do percentual mínimo de saturação do oxigênio dissolvido, mantido em 20%.

Na Figura 30, são apresentados os dados do ensaio em batelada contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 0,75% (m/v) de celulose, inicialmente a 300 rpm (frequência de agitação das pás) e 0,7 vvm (fluxo de ar). Constatou-se a ausência de uma fase lag de crescimento (Figura 30 A), ocorrendo fase exponencial já nas primeiras horas de cultivo, com o crescimento celular atingindo o seu máximo de 3,31 g/L de massa seca em 42 horas. Neste ensaio, o perfil de atividade de FPA (B) mostrou-se associado ao crescimento. Para este cultivo, o pico de FPA foi de 0,71 UI/mL também em 42 horas.

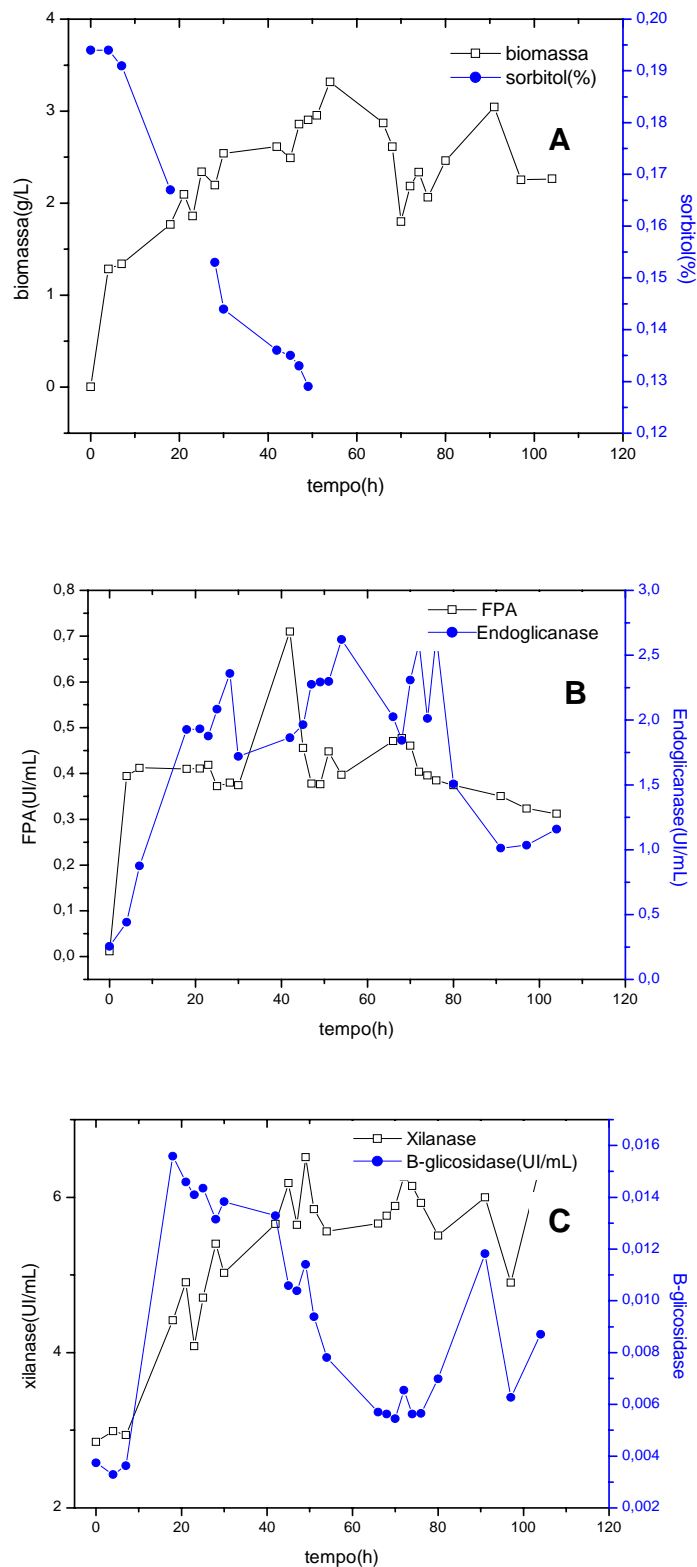


Figura 30. Consumo de sorbitol e crescimento de *Penicillium echinulatum*(A), atividade de FPA, endoglicanase(B), β -glicosidase, xilanase (C) e em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 0,75% (m/v) de celulose em biorreator com agitação mecânica.

Verifica-se para endoglicanase (Figura 30 B) que a substituição de 0,25% (m/v) da celulose por sorbitol, tal como para FPA, também reduziu o tempo para que iniciasse o aumento da atividade enzimática, quando compara-se com estudos apresentados anteriormente, condição que pode desencadear redução em termos de consumo de energia para o cultivo. O comportamento da atividade de xilanases (Figura 30C) e endoglicanases (Figura 30B) apresentaram perfis similares, com atividades máximas em torno de 40 horas de cultivo, tal como para FPA.

Verificou-se que neste meio, em biorreator, os resultados de atividade enzimática foram mais baixos do que os observados em frascos sob agitação. Assim, foram realizados novos ensaios em meio base contendo 1% (m/v) de celulose (cellm) e 1% (m/v) de sorbitol, para conhecimento da cinética de crescimento, consumo de sorbitol e produção enzimática, bem como do consumo de oxigênio, aeração e agitação necessárias. Estes ensaios serviram para o conhecimento dos perfis de crescimento e enzimáticos em biorreatores, em função dos ensaios de batelada alimentada.

A Tabela 5, apresenta os valores de K_{La} encontrados para o meio contendo 1% (m/v) de celulose e 1% (m/v) de sorbitol. Pode-se constatar uma proporcionalidade do coeficiente (K_{La}) em função da agitação e da aeração e, também, que a substituição da celulose por sorbitol favorece a transferência de oxigênio.

Tabela 5. Valores do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) em diferentes condições de agitação em meio não inoculado.

Agitação	K_{La} (h^{-1})					
	500 rpm			300 rpm		
	Aeração	0,7 vvm	1,04 vvm	1,25 vvm	0,25 vvm	0,34 vvm
1% (m/v) celulose	13,78	26,93	32,58	5,0	8,82	8,28
1% (m/v) sorbitol	27,5	35,3	36,8	-	-	-
0,75%cel e 0,25%sorb	23,04	29,09	34,2	-	-	8,71
1%cel e 1% sorb	23,04	33,5	43,6	5,65	9,94	11,16

Os ensaios foram realizados em condições iniciais de aeração de 0,7 vvm e atingiram 1,25 vvm e a frequência do agitador variou de 200 a 700 rpm, uma vez que no início do cultivo não há necessidade de manter o oxigênio dissolvido em seu percentual máximo. Posteriormente, com o decorrer dos cultivos, a agitação e a aeração foram variadas a fim de manter os níveis mínimos de 20% de O_2 no meio.

Na Figura 31, observa-se que, no meio contendo 1% (m/v) de celulose, aparentemente, ocorreu uma relação entre os dados de produção de FPA e de crescimento. Os picos de FPA (0,58 UI/mL) e de crescimento (4,02 g/L) ocorreram perto de 55 horas. Estes dados podem ser relacionados com os obtidos com *T. reesei*, por Ganesh *et al.* (2000), onde, em pH 4,8, ocorreu uma redução de 28,3% na atividade de FPA; quando o pH aumentou para 6,5, a redução foi de 12,2%. Para as enzimas endoglicanase e xilanase (Figura 31 B e C), o comportamento foi similar ao apresentado para FPA, ocorrendo no mesmo tempo, as máximas atividades, de 6,00 UI/ml e 11,06 UI/mL, respectivamente.

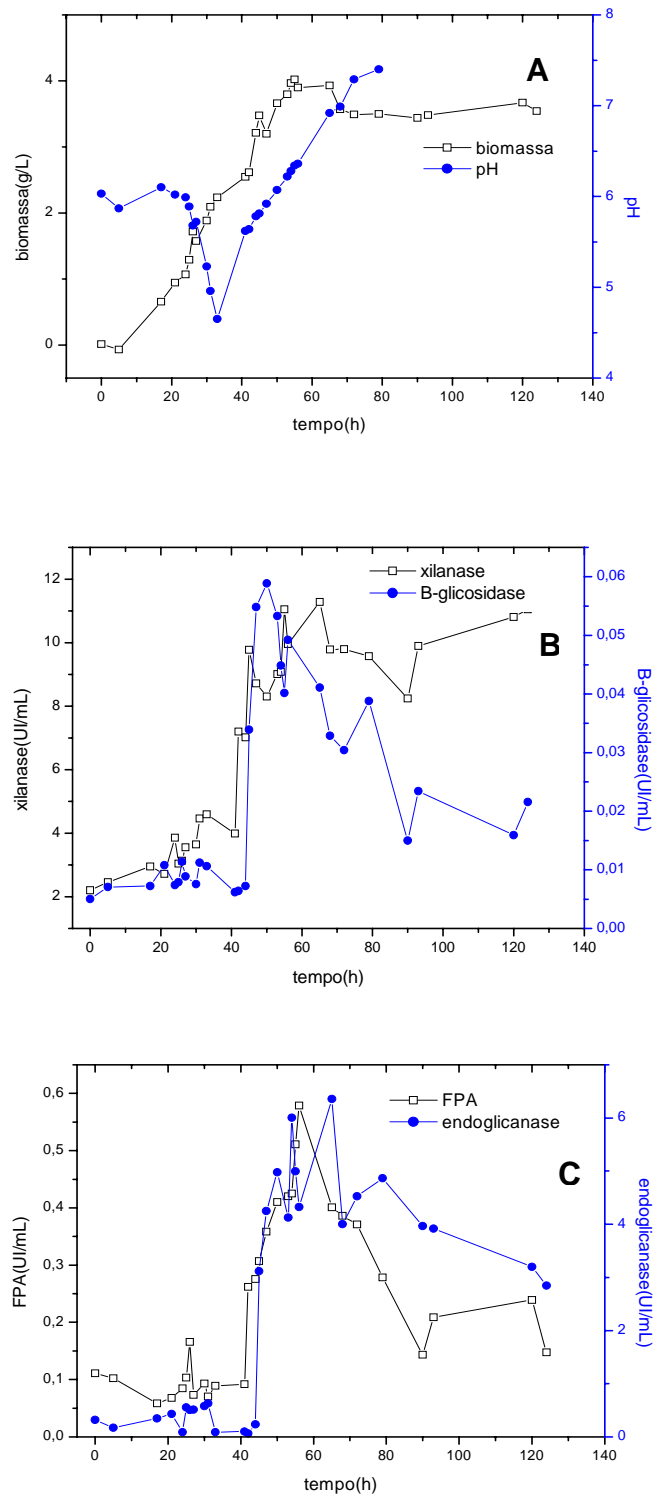


Figura 31. Crescimento de *Penicillium echinulatum* e pH (A), β -glicosidase e xilanase (B), FPA e e endoglicanase (C) e em meio contendo 1% (m/v) de celulose em biorreator com agitação mecânica.

A atividade de β -glicosidase (Figura 31B) foi baixa nas 50 horas de cultivo (0,058 UI/mL).

O cultivo contendo 1% (m/v) de sorbitol como fonte de carbono (Figura 32) foi iniciado com frequência do agitador de 300 rpm e vazão de ar de 1 vvm; ocorreu similaridade com relação ao meio contendo 1% (m/v) de celulose, constatando-se a fase estacionária a partir de 50 horas de cultivo. Verifica-se que o crescimento celular foi acompanhado por mudanças no pH e que atingiu a fase exponencial em 50 horas. O crescimento atingiu o máximo em 72 horas (4,22 g/L) e o consumo de sorbitol cessou em 53 horas, momento em que o micro-organismo estava na fase estacionária (Figura 32A).

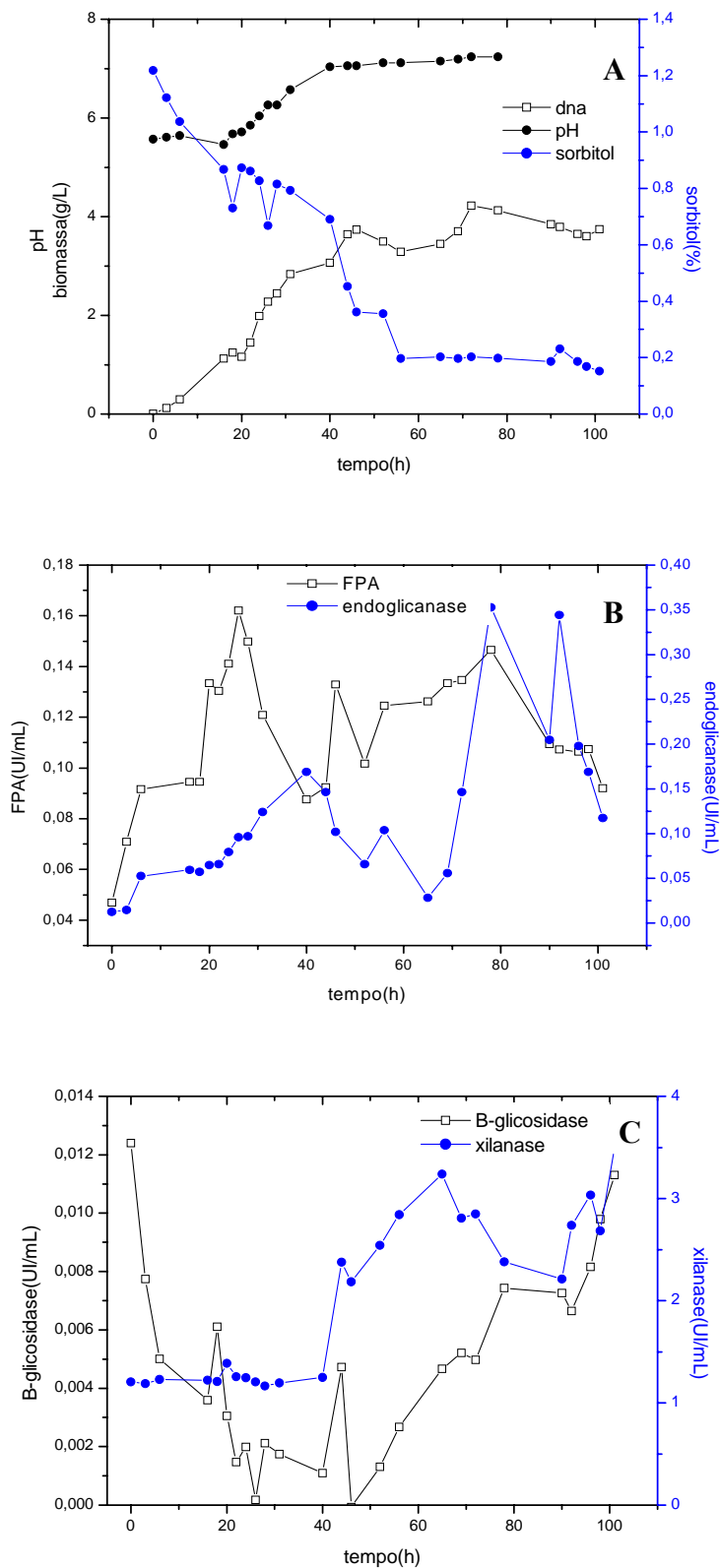


Figura 32 Atividade de FPA, β -glicosidase, xilanase e endoglucanase, consumo de sorbitol e crescimento de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol em biorreator com agitação mecânica.

Como se verifica na Figura 32, no cultivo contendo apenas sorbitol, ocorreu produção de celulasas, com uma atividade máxima de FPA de 0,165 UI/mL em 22 horas (C) e de xilanases de 3,23 UI/mL em 62 horas (B), que podem ser explicadas pela de farelo de soja (0,2% m/v) que contem celulose na sua constituição.

Quando se compara o crescimento do fungo em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol em diferentes condições operacionais (Figura 33), constata-se que, a 500 rpm e 0,25 vvm, houve uma concentração celular correspondente a 1,9 g/L em 45 horas de cultivo. Com 500 rpm e 1 vvm, a concentração máxima foi de 1,94 g/L em 40 horas de cultivo. O aumento na aeração do meio a 500 rpm não se mostrou positiva, pois apresentou a mesma produtividade volumétrica. Entretanto, quando a agitação foi aumentada para 700 rpm e a aeração foi de 0,25 vvm, o crescimento máximo foi de 1,6 g/L em 23 horas de cultivo (19% menor que as demais condições), mas a fase lag foi reduzida, aumentando a produtividade em relação ao crescimento, sugerindo que a disponibilidade de oxigênio ou a homogeneidade do meio possam ser limitantes.

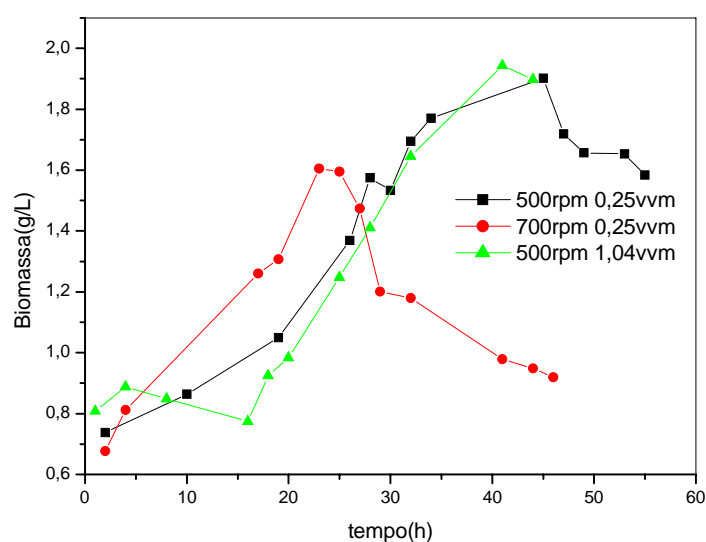


Figura 33. Crescimento de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol em diferentes condições operacionais de aeração e agitação.

Na sequência dos ensaios, investigou-se a produção enzimática e o crescimento em função do incremento na concentração de celulose. Assim, realizaram-se ensaios em biorreator com

2%(cel2) e 3%(cel3) de celulose, com variação da agitação (frequências de agitação de pás de 300 a 800 rpm) e aeração de 0,25 (inicial) a 1,25 vvm (fase exponencial de crescimento). Os parâmetros operacionais utilizados foram manipulados a fim de manter, no mínimo, em 20% o oxigênio dissolvido.

O aumento na concentração de celulose para 2% (Figura 34) proporcionou um aumento na FPA, quando comparado com os dados de 1% (m/v) de celulose; entretanto, foi significativa a redução de atividade quando a concentração foi de 3% (m/v) de celulose. Em cultivo com 2% (m/v) de celulose observa-se, em 56 horas, tempo similar ao do cultivo com 1% (m/v) de celulose, um pico de atividade de FPA de 0,66 UI/ml.

O crescimento atingiu a fase estacionária em 62 horas com 5,6 g/L (medida indireta da concentração da massa celular (Figura 34). Enquanto que, no cultivo contendo 3% (m/v) de celulose, o pico de crescimento ocorreu em 52 horas e a máxima concentração encontrada foi de 5,2 g/L, indicando que o aumento na concentração da celulose não provocou aumento na biomassa.

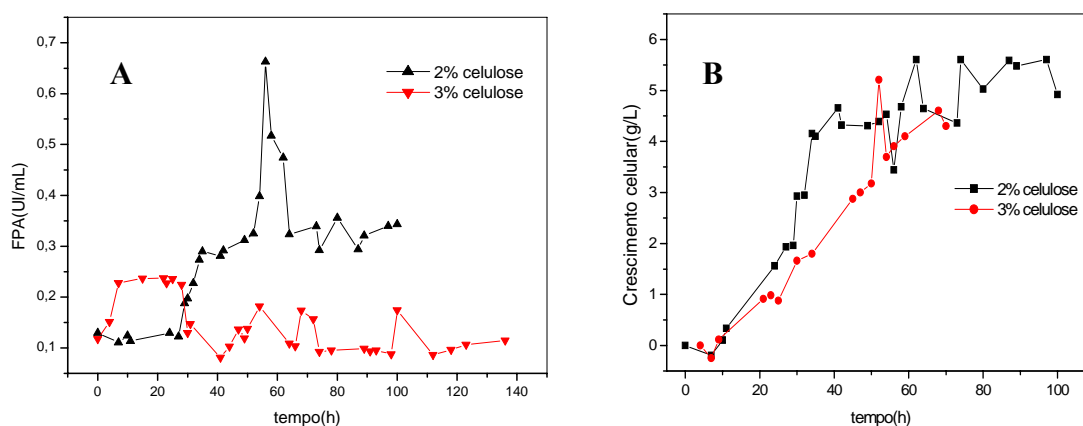


Figura 34. FPA (A) e crescimento (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 2% (m/v) e 3% (m/v) de celulose.

Em relação às atividades de endoglicanases e β -glicosidases, verifica-se que, no meio contendo 2% (m/v) de celulose, as atividades foram mais elevadas do que em 3% (m/v). Para

endoglicanase, a produtividade volumétrica foi de 0,0673 UI/mL/h, enquanto que, para o cultivo com 3% (m/v) de celulose foi de 0,0508 UI/mL/h. Quando se comparam os cultivos em relação à β -glicosidase, o meio contendo 2% (m/v) de celulose apresenta pico mais alto de atividade em 42 horas, de 0,26 UI/mL (Figura 35).

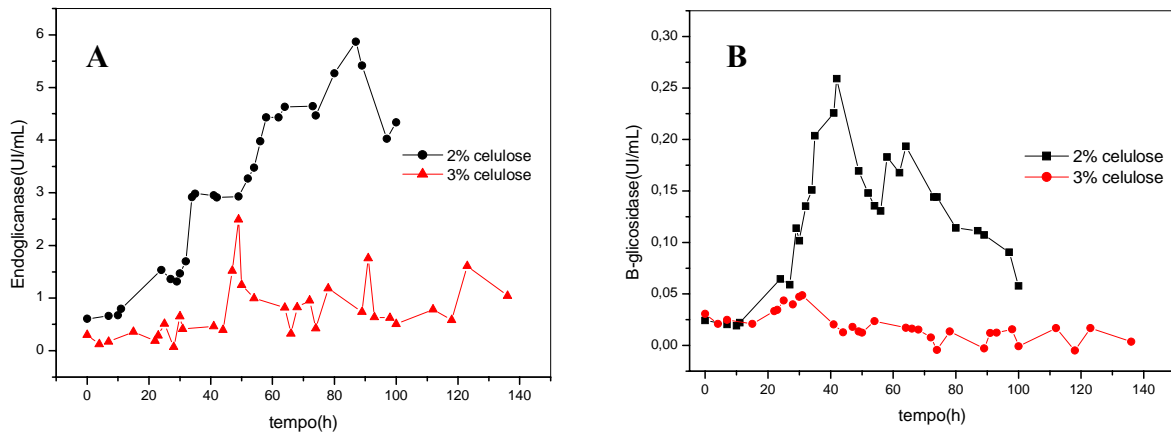


Figura 35. Perfil de atividade de endoglicanase (A) e β -glicosidase (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 2% (m/v) e 3% (m/v) de celulose.

Para a atividade de xilanase (Figura 36), embora o comportamento das curvas com 2% (m/v) e 3% (m/v) de celulose tenha sido semelhante, houve significativa diferença nos títulos enzimáticos, uma vez que a máxima atividade foi atingida em tempos similares. Enquanto as atividades de endoglicanases e β -glicosidases diminuíram quando ocorreu um aumento de 2% (m/v) para 3% (m/v) de celulose, não houve alteração na atividade de xilanases (Figuras 35 e 36).

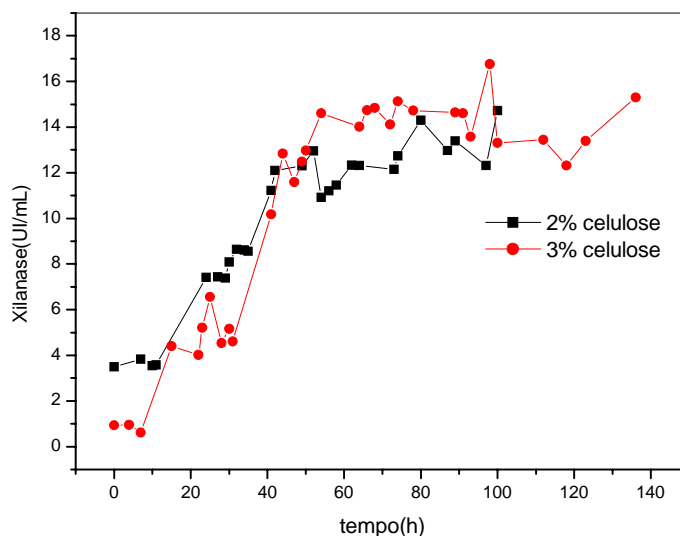


Figura 36. Atividade de xilanases em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 2% (m/v) e 3% (m/v) de celulose.

Uma vez que o sorbitol e o aumento na concentração de celulose favoreceram as atividades enzimáticas e a associação de ambos favoreceu a transferência de oxigênio (Tabela 5), investigou-se este efeito em um meio contendo 1% (m/v) de sorbitol e 1% (m/v) de celulose (cel1sorb1). Na Figura 40, são apresentados os dados de atividade de FPA, xilanase, endoglicanase e β -glicosidase do meio. Para FPA, ocorrem dois picos de atividade, um às 60 horas de cultivo (0,85 UI/mL) e outro em 100 horas (0,93 UI/mL). Estas atividades são superiores ao cultivo contendo 2% (m/v) de celulose, que apresentou a máxima atividade de 0,66 UI/mL. A substituição de parte da celulose por sorbitol, neste caso, aumentou a atividade de FPA em 28% em relação ao primeiro pico e 41% em relação ao segundo.

As Figuras 37 e 38 mostram que a atividade enzimática ocorreu simultaneamente ao crescimento e ao consumo de sorbitol. O primeiro pico de atividade ocorreu quando o pH foi máximo; entretanto, o segundo ocorreu em pH mínimo, situação já identificada anteriormente por (Chahal *et al.*, 1992), que foi explicada pela geração de regiões de celulose amorfa (de fácil hidrólise enzimática) por ação de celulasas, liberando açúcares solúveis que permitiram o crescimento, que foi acompanhado da queda do pH.

Como se observa, ainda na Figura 37A, a produção de endoglicosidase iniciou somente após 70 horas. Comportamento semelhante ao da endoglicanase foi observado para a atividade de β -glicosidase, que aumentou somente a partir de 70 horas de cultivo, atingindo o pico em 145 horas (0,23 UI/mL), período em que o sorbitol foi quase totalmente consumido. Em meio contendo 1% (m/v) de celulose, isento de sorbitol, observa-se que este período foi de apenas 40 horas, mostrando que a presença desta fonte solúvel de carbono retarda a produção desta enzima (Figura 31B e C). Para xilanase, as primeiras 40 horas de cultivo mostraram um comportamento constante em relação à atividade enzimática, sem representativo aumento e o pico de 16,87 UI/mL ocorre em 112 horas.

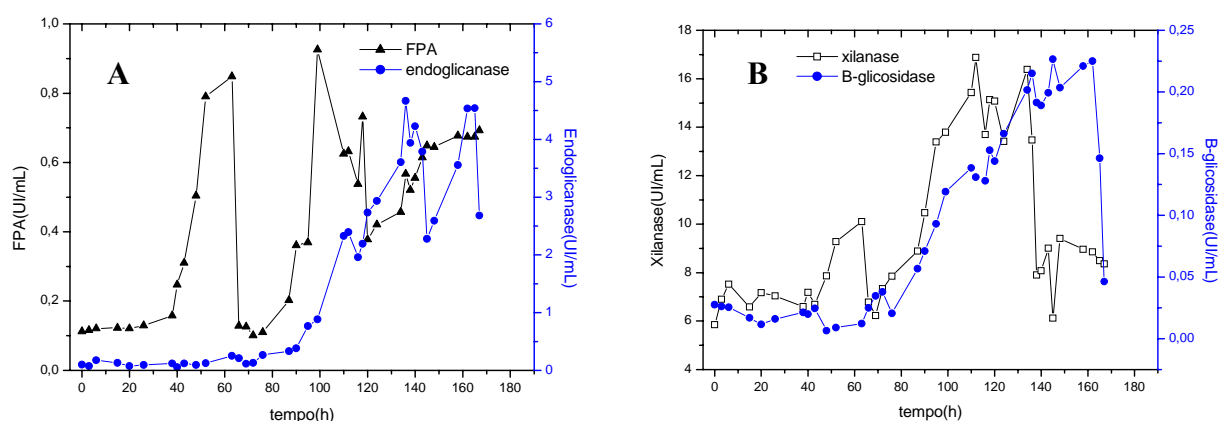


Figura 37. Perfil de atividade enzimática de FPA e endoglicanase (A), xilanase e β -glicosidase (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* em meios contendo 1% (m/v) de sorbitol e 1% (m/v) de celulose em biorreator com agitação mecânica.

Verifica-se a possibilidade de relação entre a atividade de FPA detectada e o pH. Observa-se, nas Figuras 37 e 38, que os picos de atividade ocorrem quando o pH aumenta. Ocorre uma redução na atividade de FPA com o aumento do pH após 100h de cultivo. As reduções de atividade enzimática podem estar relacionadas a diminuições bruscas no pH que podem interferir na desnaturação de proteínas e, conseqüentemente, afetar a atividade enzimática, além de influenciar na fisiologia do micro-organismo (Camassola & Dillon, 2007). A atividade de β -glicosidase

apresentou um incremento significativo entre 80 e 120 horas de cultivo, tempo que coincidiu com o menor valor de pH (inferior a 4,7).

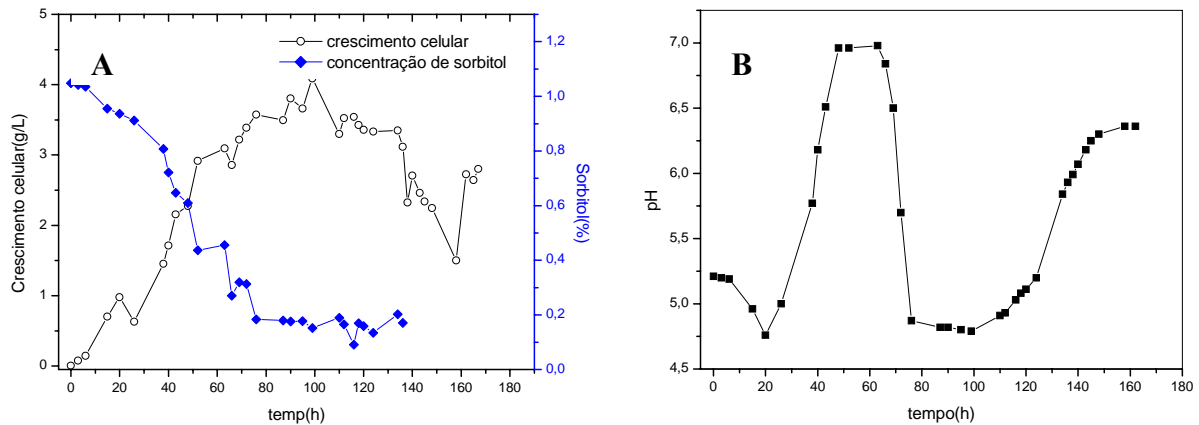


Figura 38. Crescimento celular, consumo de sorbitol (A) e variação do pH (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol e 1% (m/v) de celulose em biorreator com agitação mecânica.

Comparando-se as Figuras 32 e 38, referentes aos dados de crescimento, consumo de sorbitol e pH, verifica-se um pico de pH 7,2 em ambas as condições de meio, após 40 horas. Entretanto, na condição de maior concentração de fonte de carbono ocorreram 2 picos de pH. O pico de crescimento celular, em torno de 4,09 g/L, foi mais adiantado no meio com menor quantidade de substrato no meio (entre 40 e 50 horas) em relação ao apresentado na Figura 38 (entre 90 e 100 horas). O consumo de sorbitol cessou em torno de 40 a 50 horas (Figura 32A) e somente após 80 horas quando esta fonte de carbono solúvel está associada a celulose. (Figura 38).

Outro fator de grande importância no cultivo submerso é a transferência de oxigênio e o consumo de oxigênio durante o processo. Assim, observando o consumo de oxigênio, determinando pelo método dinâmico, após o inóculo do reator, constata-se que é mais acentuado no cultivo cel0,75m, o que, em parte, justifica a reduzida fase lag de crescimento neste ensaio. A massa fúngica é suficiente para que sejam necessários apenas 20 minutos para que o oxigênio dissolvido no meio atinja 30% da saturação (Figura 39 e Tabela 6).

Por outro lado, o cultivo cel1m mostrou consumo mais lento, sendo necessários mais de 40 minutos para uma redução de 40% no teor de oxigênio dissolvido. Perfis de consumos semelhantes apresentaram os ensaios contendo 1% (m/v) de sorbitol e 3% (m/v) de celulose. Estes dados podem ser relacionados com os dados obtidos para o coeficiente de transferência de oxigênio, onde foi observado que o sorbitol apresenta um fator positivo para o aumento do K_{La} . Desta maneira quanto maior o K_{La} , maior o crescimento e maior o consumo de oxigênio.

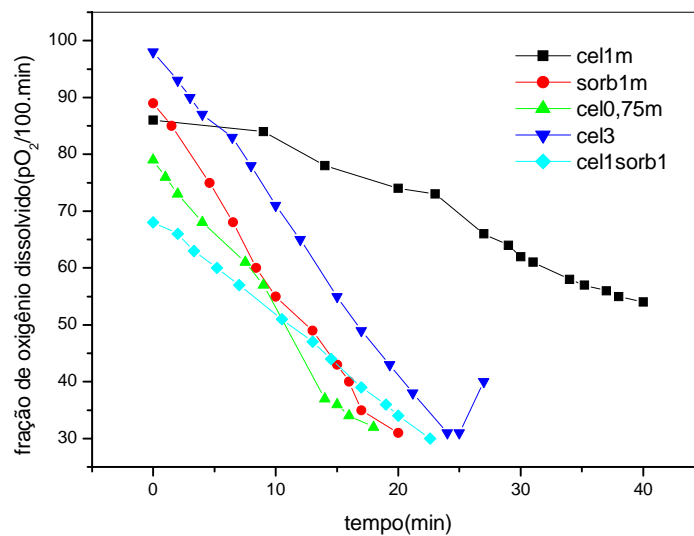


Figura 39. Variação do consumo de oxigênio dissolvido (%) em meios inoculados cel1m, sorb1m, cel0,75m, cel3, cel1sorb1 em função do tempo.

A partir da Tabela 6, verifica-se que o micro-organismo apresentou melhor adaptação ao meio cel3, uma vez que sua máxima velocidade de crescimento ($\mu_{X_{max}}$) foi superior à dos demais.

Com relação aos meios contendo sorbitol, o meio sorb1m mostrou melhores condições para o crescimento do fungo em biorreator com agitação mecânica. Cabe salientar que o meio contendo celulose e sorbitol (cel0,75m) mostrou a metade da velocidade específica de crescimento quando comparado ao meio sorb1m.

Tabela 6. Máxima velocidade específica de crescimento em biorreator com agitação mecânica em regime em batelada.

Meios de cultivo	Cel1m	Cel3	Sorb1m	Cel0,75m	Cel 1sorb1
$\mu_{X_{max}} (h^{-1})$	0,152	0,255	0,123	0,065	0,035

Cel1m: cultivo contendo 1% de celulose em biorreator com agitação mecânica.

Sorb1m: cultivo contendo 1% de sorbitol em biorreator com agitação mecânica.

Cel0,75m cultivo contendo 0,75% de celulose e 0,25% de sorbitol em biorreator com agitação mecânica.

Como observado na Tabela 6, o meio cel3 apresenta o maior valor de máxima velocidade específica de crescimento, quando comparado com os demais ensaios. Esta velocidade foi duas vezes superior ao meio sorb1m (meio contendo 1% de sorbitol em cultivo em biorreator com agitação mecânica) e quatro vezes superior ao meio cel0,75m. Estes resultados possivelmente estão relacionados ao consumo preferencial de celulose em relação ao sorbitol.

4.2.2 Ensaios em biorreator com agitação mecânica em regime de batelada alimentada

Uma vez verificado que o sorbitol apresentou influência na atividade enzimática e no crescimento celular e que o melhor resultado obtido foi quando 1% (m/v) de celulose e 1% (m/v) de sorbitol com atividades de 0,92 UI/mL de FPA, investigou-se o efeito do sorbitol adicionado desde o início do cultivo na concentração de 1% (m/v) e, após, com alimentação de celulose nas concentrações de 0,75; 1 e 1,7% (m/v).

Nos primeiros dois ensaios, os cultivos foram iniciados com 1% (m/v) de sorbitol e, posteriormente, houve adição de celulose durante a fase exponencial de crescimento do micro-organismo. A adição no biorreator ocorreu após 26 horas para um dos ensaios (início da fase exponencial de crescimento) e 48 horas para o outro ensaio (final da fase exponencial), sendo adicionado 1% (m/v) de celulose. O tempo de 48 horas para a alimentação também foi em função do consumo de sorbitol cessar em 53 horas (Figura 32A).

Na Figura 40 A e B, observa-se que os perfis de atividade FPA e crescimento são similares aos verificados quando a celulose e o sorbitol foram adicionados no início do cultivo. A fase exponencial de crescimento prolongou-se até 80 horas de cultivo, comportamento semelhante ao do cultivo iniciado com a mesma concentração de substrato. Entretanto, só ocorreu incremento de atividade de FPA a partir de 70 horas, diferindo do cultivo iniciado com celulose, onde esta atividade aumenta já a partir de 40 horas. A maior atividade de FPA (0,84 UI/mL) ocorreu em 135 horas.

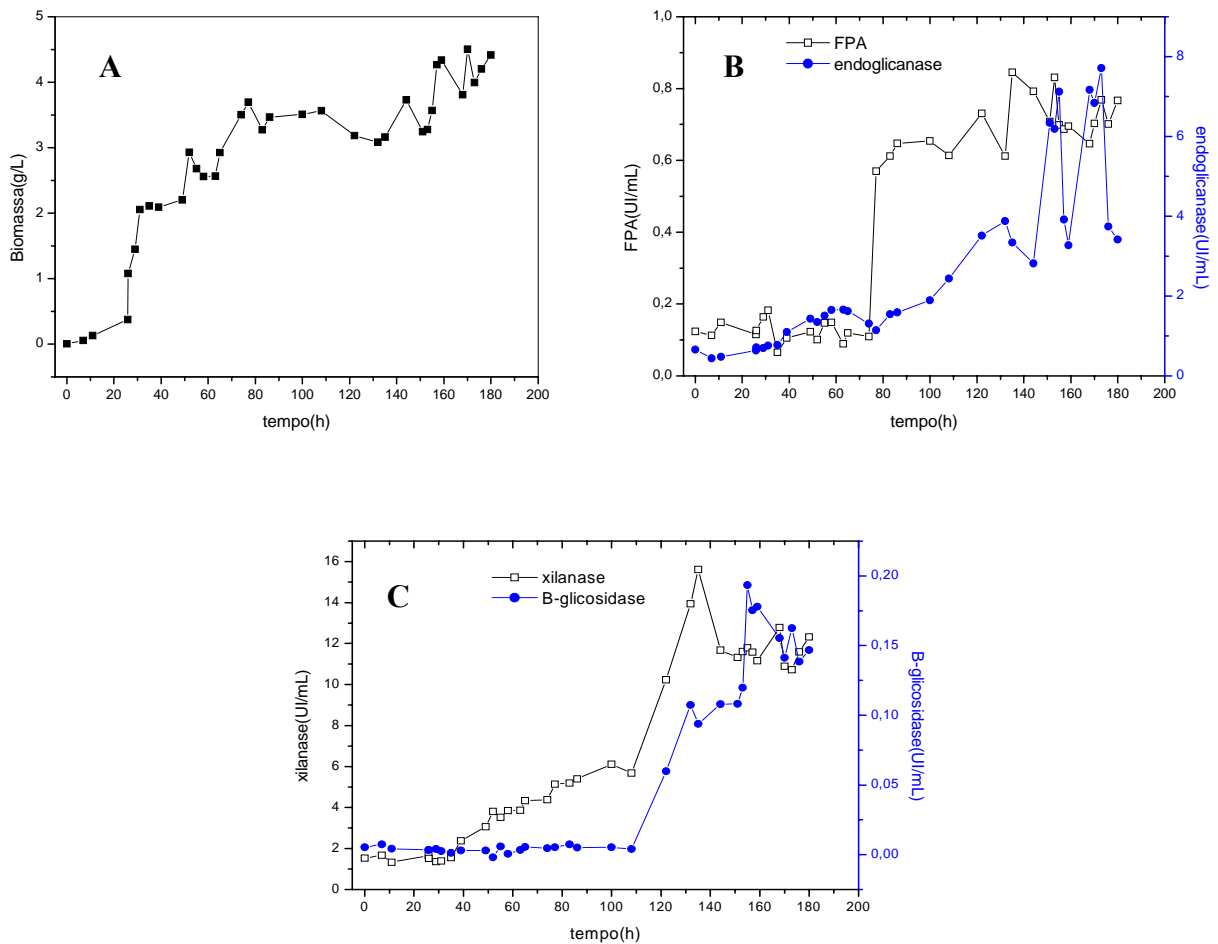


Figura 40. Atividade enzimática de FPA, β -glicosidase, xilanase e endoglucanase e crescimento de *Penicillium echinulatum* em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol e alimentado com 1% (m/v) de celulose em 26 horas em biorreator com agitação mecânica.

Em relação às atividades de β -glicosidase e endoglicanase (Figura 40 B e C), os picos ocorreram em 155 horas de cultivo, correspondendo a 0,19 UI/mL e 7,12 UI/mL, respectivamente; para ambas as enzimas, o incremento na atividade iniciou-se em torno de 100 horas de cultivo. Neste cultivo foi representativo o aumento destas duas atividades em relação ao meio iniciado com celulose e sorbitol conjuntamente. Para xilanase, o pico ocorreu em 135 horas, correspondendo a 15,61 UI/mL (Figura 44)

Quando se compara a Figura 40, com os dados do meio contendo apenas 1% (m/v) de celulose, verifica-se que a atividade de FPA, para o meio alimentado, teve um aumento correspondente a 44%, e a atividade de endoglicanase de 18%. Para a atividade de β -glicosidase, o aumento foi ainda mais significativo, de 3,8 vezes maior (Figura 40C).

Assim, para comprovar, em análise paralela, estudou-se o comportamento inibitório do sorbitol sob a enzima β -glicosidase. Para isso, o volume de enzima utilizado foi de 250 μ L e o de salicina de 500 μ L; entretanto, os volumes de tampão e da solução de sorbitol 1% variaram, não ultrapassando 250 μ L. Manteve-se o volume reacional de 1 mL (Tabela 7). É possível verificar que a atividade enzimática de β -glicosidase foi semelhante nos ensaios contendo 250 μ L de sorbitol e na ausência deste, mostrando que o sorbitol não tem influência pelo menos sobre a β -glicosidase.

Tabela 7. Atividade de β -glicosidase em mistura reacional**contendo diferentes concentrações de sorbitol.**

Volume de sorbitol 1% (m/v) (μL)	0	50	80	100	150	200	250
Volume de tampão citrato (μL)	250	200	170	150	100	50	0
Atividade de β-glicosidase (UI/mL)	0,116 \pm 0,0053	0,126 \pm 0,0038	0,108 \pm 0,0059	0,111 \pm 0,0089	0,117 \pm 0,0021	0,122 \pm 0,0063	0,124 \pm 0,0036

Ainda sobre a Figura 40, observa-se um aumento de 48% na atividade de xilanase quando o cultivo foi iniciado com 1% (m/v) de sorbitol e alimentado com 1% (m/v) de celulose em 26 horas, quando comparado ao meio contendo 1% de celulose. Os dados mostraram que a alimentação com celulose promoveu incremento na atividade enzimática em meios iniciados com sorbitol. Assim, investigou-se a adição, após 48 horas, de 1% de celulose em cultivo iniciado com 1% (m/v) de sorbitol, cujos dados são apresentados na Figura 41. Pode-se observar que a atividade de FPA apresentou um pico em 122 horas (0,71 UI/mL), com uma produtividade volumétrica inferior a apresentada no cultivo com a mesma composição de meio, mas com a alimentação de celulose em 26 horas de cultivo (Figura 40B). Observa-se que o crescimento celular atingiu o seu máximo em 98 horas e apresentou uma fase lag reduzida, diferentemente do cultivo com a mesma concentração de celulose e sorbitol alimentado em 26 horas, que apresentou fase lag de aproximadamente 25 horas.

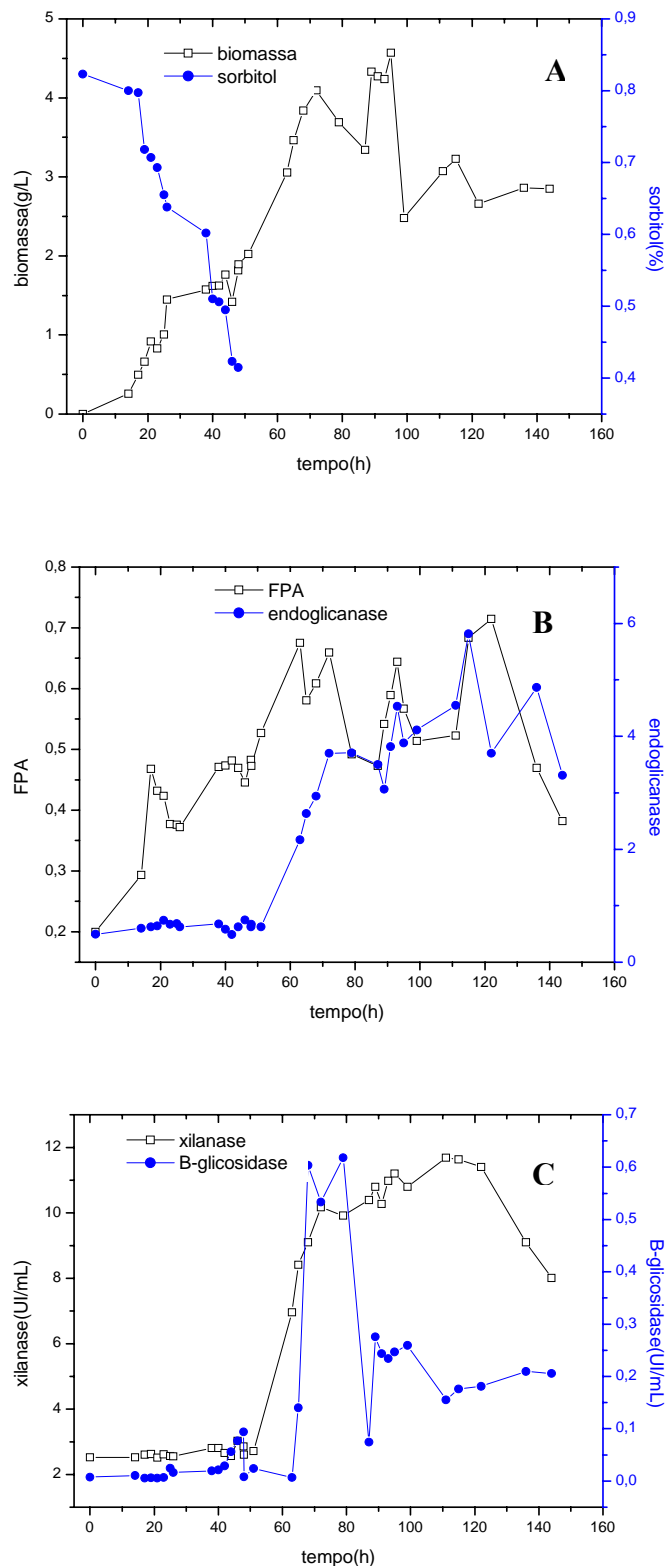


Figura 41. Perfil de crescimento celular, consumo de sorbitol, atividade de FPA, β -glicosidase, xilanase e endoglicanase de cultivo com *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol, alimentado com 1% (m/v) de celulose após 48 horas de cultivo.

A fase lag reduzida para a atividade enzimática pode ser observada principalmente para β -glicosidase, cujo incremento na atividade iniciou-se em 80 horas, tempo menor do que no ensaio com alimentação em 26 horas, com favorecimento da produtividade volumétrica.

Quando se comparam os cultivos com tempo de adição da celulose de 26 e 48 horas, constata-se que a adição em 48 horas diminui também o tempo necessário para que endoglicanase e β -glicosidase apresentem um aumento na atividade, ocorrendo a partir de 50 horas, após a adição da celulose. Quando a adição foi em 26 horas, este tempo foi de aproximadamente 100 horas. A produção de xilanase iniciou imediatamente após a adição de celulose, indicando a capacidade indutora da celulose, atingindo um pico de 11,6 UI/mL em 122 horas (Figura 41B). O comportamento foi similar ao cultivo apresentado na Figura 32, onde a atividade de xilanase inicia seu incremento após as 40 horas de cultivo. A redução do tempo para a produção de enzimas ativas foi representativa, apesar de a atividade enzimática ser menor em cultivo alimentado em 48 horas.

Em um novo ensaio, realizou-se a adição de 1,7% (m/v) de celulose em 48 horas, durante a fase exponencial de crescimento (Figura 47). Constatou-se que o pH apresenta um aumento até as 20 horas de cultivo e, posteriormente, mantém-se constante até próximo de 48 horas, quando ocorre uma pequena queda. Com a adição de celulose ao meio, existiu um aumento até as 70 horas e uma queda entre 70 e 92 horas. Há um novo aumento no pH após 92 horas, tempo no qual o sorbitol já não é mais consumido. Também, salienta-se que, neste ensaio, o consumo de sorbitol se estendeu até 83 horas, até atingir concentrações mínimas, enquanto que, no cultivo contendo apenas sorbitol (1%) este consumo cessou em 53 horas (Figura 34).

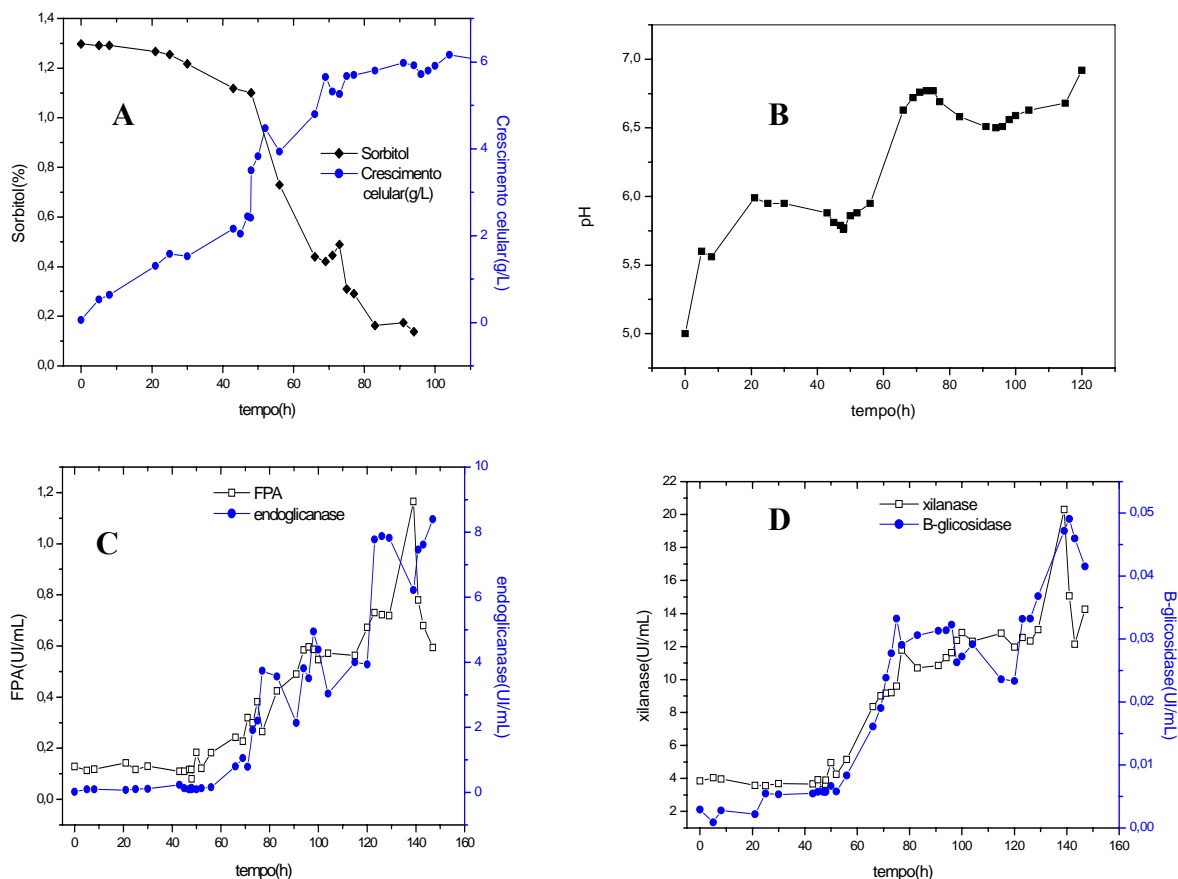


Figura 42. Concentração celular, consumo de sorbitol (A) e variação do pH (B) e atividade enzimática no cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol, alimentado com 1,7% (m/v) de celulose após 48 horas.

O aumento na concentração de celulose não só promoveu o aumento na biomassa fúngica, mas também na atividade de FPA, que atingiu 1,16 UI/mL em 139 horas, valor de atividade que resultou em aumento da produtividade do cultivo - 0,0083 UI/mL/h (Figura 42C). Cabe salientar que todas as atividades enzimáticas analisadas apresentaram incremento partir de 48 horas, momento da adição da celulose. A atividade de xilanase (Figura 42D) atingiu pico máximo de 20,3 UI/mL em 139 horas e de 8,40 UI/mL para endoglicanase em 98 horas. Entretanto, a atividade de β -glicosidase (Figura 42D) foi muito baixa. Segundo Zhang *et al.* (2007), esta enzima representa menos de 1% do total de proteínas secretadas por *T. reesei*, atingiu um pico de 0,01 UI/mL em cultivo contendo 5 g/L de glicose e 5 g/L de celulose.

Apesar de constatado que o meio iniciado com sorbitol favorece a atividade enzimática e o crescimento, um longo tempo sem aumento na atividade das enzimas pode refletir-se negativamente na produtividade volumétrica da enzima. Desta forma, verificou-se a possibilidade de promover o crescimento celular com atividade enzimática em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol, apenas.

A Figura 43 mostra dados de um cultivo iniciado com 0,25% (m/v) de sorbitol e, após 12 horas, alimentado com 1% (m/v) de celulose. Pode-se observar um crescimento exponencial até 12 horas de cultivo, tempo em que ocorreu adição da celulose, apresentando elevações e quedas até atingir um pico de 3,05 g/L em 75 horas.

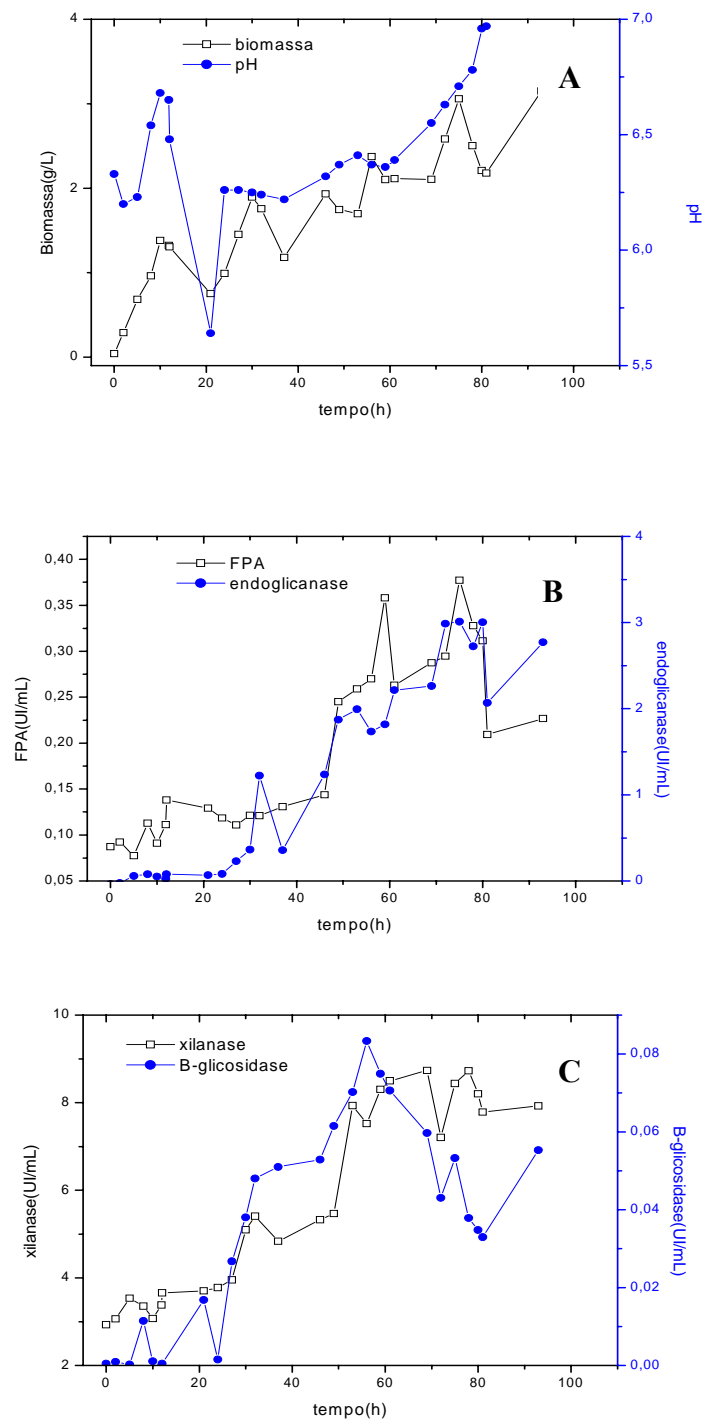


Figura 43. Perfil de concentração celular, atividade enzimática e pH de cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 1% (m/v) de celulose em 12 horas de cultivo.

Os dados das Figuras 43B e C mostram uma redução no tempo dos incrementos nas atividades enzimáticas. Para endoglicanase e xilanase, este tempo passou para, aproximadamente, 20 horas. Os picos de atividade para estas enzimas foram de 3,0 UI/mL e 8,73 UI/mL, respectivamente. O pico de atividade de FPA (0,38 UI/mL) ocorreu em 60 horas (Figura 43B) e de β -glicosidase foi de 0,083 UI/mL em 56 horas, sendo consideradas atividades baixas em relação às obtidas anteriormente.

Uma nova investigação foi desenvolvida com a adição de celulose em 36 horas de cultivo, tempo em que a fase exponencial de crescimento aproxima-se do final. Da análise da Figura 44, constata-se que o crescimento foi máximo (2,29 g/L) em 80 horas de cultivo, com a fase exponencial iniciando-se às 36 horas, tempo em que ocorreu alimentação da celulose. Este comportamento foi similar ao cultivo cuja adição foi às 12 horas, que atingiu 3,04 g/L.

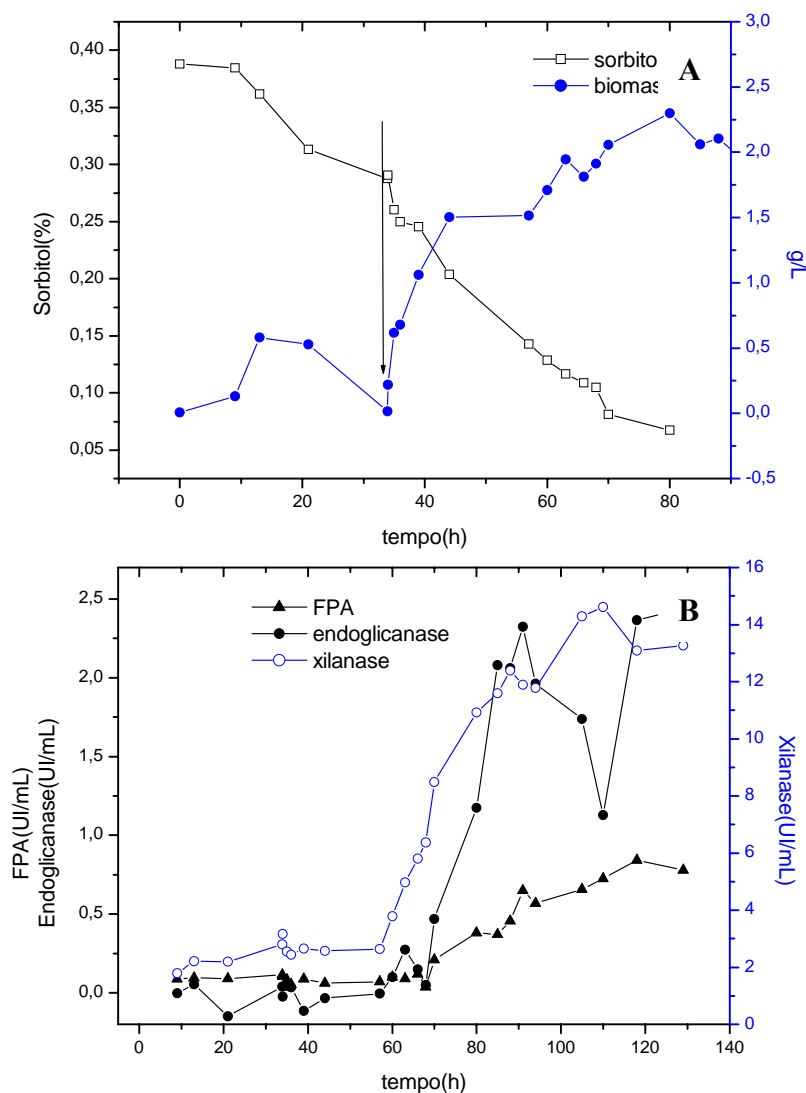


Figura 44. Perfil de concentração celular, consumo de sorbitol e atividade enzimática de cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 0,75% (m/v) de celulose após 36 horas de cultivo.

Em relação ao tempo de adição da celulose ao meio contendo sorbitol, concluiu-se que, quando esta foi adicionada em 36 horas de cultivo, ocorreram melhores resultados de FPA em comparação com a adição que ocorreu em 12 horas, embora tenha havido mais uma variável, que foi a própria concentração de celulose. O pico desta atividade foi em 118 horas e atingiu 0,84 UI/mL, valor semelhante ao cultivo com 1% (m/v) de sorbitol acrescido de 1% (m/v) de celulose em 26 horas. Ainda, o cultivo com adição em 36 horas mostrou maior produtividade volumétrica de

FPA. Concluiu-se, desta forma, que concentrações menores de sorbitol e celulose, promovem melhores resultados de atividade de FPA.

Houve um incremento na atividade de xilanase (Figura 44B) superior a 62% quando comparado ao experimento com adição de celulose em 12 horas. Entretanto, evidenciou-se um tempo de aproximadamente 60 horas para que as atividades de FPA, endoglicanase e xilanase aumentassem. Este fato influenciou negativamente a produtividade volumétrica do cultivo.

Para o meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 0,75% (m/v) de celulose, observaram-se perfis diferentes em relação à FPA e ao tempo de adição do indutor. Quando as fontes de carbono foram adicionadas concomitantemente no biorreator, a máxima atividade foi de 0,71 UI/mL, com uma produtividade volumétrica de 0,0169 UI/mL/h. Entretanto, quando a adição da fonte insolúvel foi realizada após 36 horas em cultivo com 0,25% (m/v) de sorbitol, a atividade atingiu 0,84 UI/mL, reduzindo a produtividade para 0,0071 UI/mL/h. Constatando que o cultivo contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 0,75% (m/v) de celulose em 36 horas apresentou um bom resultado quando comparado às demais formulações, verificou-se o comportamento enzimático e da biomassa ao aumentar a concentração de celulose alimentada neste tempo.

Assim, o ensaio que segue foi realizado com 0,25% (m/v) de sorbitol inicial e, após 36 horas de cultivo, adicionou-se 1,7% (m/v) de celulose ao meio. Na Figura 45A, são mostrados o comportamento do pH e a concentração de biomassa. Verificam-se semelhanças com outros cultivos, em que a fase exponencial de crescimento ocorreu quando o pH aumentou. Diferentemente do que ocorreu nos demais, o pH final atingiu valor mais elevado (8,08).

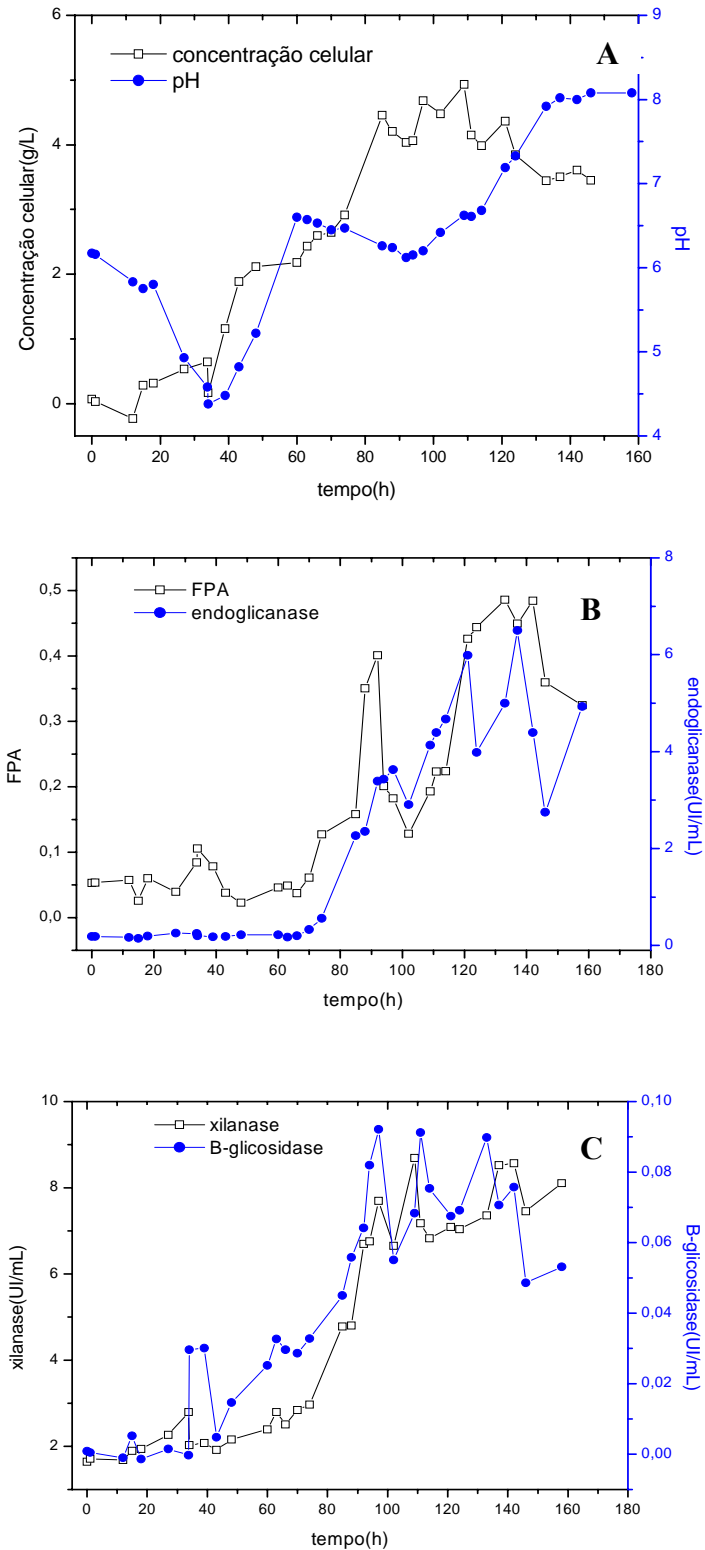


Figura 45. Perfil de concentração celular, variação do pH e atividade enzimática em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 1,7% (m/v) de celulose após 36 horas de cultivo.

Verifica-se que a FPA (Figura 45B) atingiu 0,67 UI/mL em 142 horas. Devido ao longo tempo para o pico enzimático, a produtividade volumétrica (0,00415 UI/mL/h) foi muito baixa. Entretanto, para a atividade de endoglicanase, o título enzimático de 6,49 UI/mL em 137 horas de cultivo foi o maior dos ensaios, que utilizaram 0,25% (m/v) de sorbitol. Na comparação deste ensaio foi com o de adição de 0,75% (m/v) de celulose no mesmo tempo, constatou-se um aumento de 167% na atividade de endoglicanase. Também, verifica-se que o tempo de incremento de atividade para endoglicanase nos cultivos em biorreator com agitação mecânica apresentados até o momento foi de 60 ± 20 horas. Esse tempo, segundo Nidetzky *et al.* (1994), trata-se do tempo médio para que ocorresse entre 70% e 90% de adsorção em papel filtro, respectivamente, para EGI e EGIII, em sistema agitado a 1350 rpm. Os autores também verificaram que a adsorção foi menor em meio estático e que a afinidade de EGIII foi maior que EGI quando utilizado papel filtro como substrato.

Entretanto, este comportamento não ocorreu para xilanases (Figura 45C). O aumento na concentração de celulose de 0,75% (m/v) para 1,7% (m/v), adicionada em 36 horas em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol, não foi convertido em atividade enzimática. O pico de xilanase com a maior concentração de celulose foi de 8,56 UI/mL em 142 horas de cultivo. A atividade de β -glicosidase foi máxima em 109 horas, com pico de 0,092 UI/mL (Figura 45C), mostrando que o aumento na concentração da celulose aumentou a atividade desta enzima no caldo fermentativo em cerca de duas vezes, quando comparada com a adição de 0,75% (m/v) de celulose no mesmo tempo, embora os estes valores sejam muito baixos para atividade de β -glicosidase.

Constatou-se, também, que o tempo necessário para a ocorrência do pico de atividade enzimática em cultivo iniciado com 0,25% (m/v) de sorbitol, cuja adição de celulose ocorreu em 36 horas, não sofreu influência da concentração do indutor. Nestes dois casos, com adição em 36

horas, este tempo foi de 58 horas. Por outro lado, o cultivo iniciado com 0,25% (m/v) de sorbitol e acrescido de 1% (m/v) de celulose em 12 horas apresentou redução neste tempo, para 22 horas.

4.2.3 Ensaios de cultivo em biorreator de agitação mecânica em regime de batelada alimentada com volume variável

Dois cultivos em regime de batelada alimentada foram realizados em que variou-se o volume. Ambos totalizaram 2% (m/v) de fonte de carbono, no primeiro ensaio, inicialmente, foi utilizado 0,5% (m/v_i) de celulose, num volume inoculado de 3,5 litros; posteriormente, em 48, 72 e 96 horas de cultivo, foram adicionados 0,5% (m/v) de celulose, além da concentração proporcional de farelo de soja e solução de sais. O segundo ensaio iniciou com 0,5% (m/v) de sorbitol, adicionando-se 1,5% (m/v) de celulose e o correspondente volumétrico de farelo de soja e solução de sais, nos mesmos tempos citados.

No primeiro ensaio (cel:48-72-96), iniciado com 0,5% (m/v) de celulose, totalizando 3,5 litros de meio inoculado, o biorreator foi alimentado com 0,5% (m/v) de celulose em diferentes tempos de cultivo: 48, 72 e 96 horas, completando, assim, os 5,5 litros de volume operante e concentração final de 2% (m/v) de celulose. Neste ensaio de batelada alimentada, visou-se a comparação com os dados obtidos anteriormente em batelada, na concentração final de 2% (m/v) de celulose. Em cada alimentação, a amostragem foi realizada antes e depois da adição da celulose.

A Figura 45B apresenta a atividade de FPA no meio contendo 2% (m/v) de celulose em regime de batelada alimentada. Pode-se constatar que as alimentações foram favoráveis ao aumento da atividade, não ocorrendo queda de atividade enzimática durante o processo. Cabe salientar, que as reduções nas atividades apresentadas na Figura 46 podem ter sido devidas à diluição da enzima em função do aumento no volume do meio de cultivo. Em termos comparativos com relação à

produção enzimática, observou-se que a FPA em cultivo em batelada com 2% (m/v) de celulose (cel2) teve seu pico de 0,66 UI/mL em 56 horas, ocorrendo uma queda de atividade posterior.

Entretanto, quando se compara este ensaio com o cel2 constata-se que, em 42 horas de cultivo, a atividade enzimática foi de 455 UI e 1540 UI para os meios cel2:48-72-96 e cel2, respectivamente. Também em 56 horas (pico do meio cel2), a atividade foi de 546 e 3630 UI, para os meios cel2:48-72-96 e cel2, respectivamente. Desta forma, pode-se verificar que a alimentação em etapas não trouxe vantagens em relação à FPA.

Em batelada alimentada, com resíduos da produção de etanol, no 3º, 6º e 9º dias de cultivo com *T. reesei*, Ximenes *et al.* (2007) constataram que a alimentação produziu pico de FPA de 1,9 UI/mL no 11º dia e o incremento de xilanase foi 3 vezes superior ao cultivo em frascos.

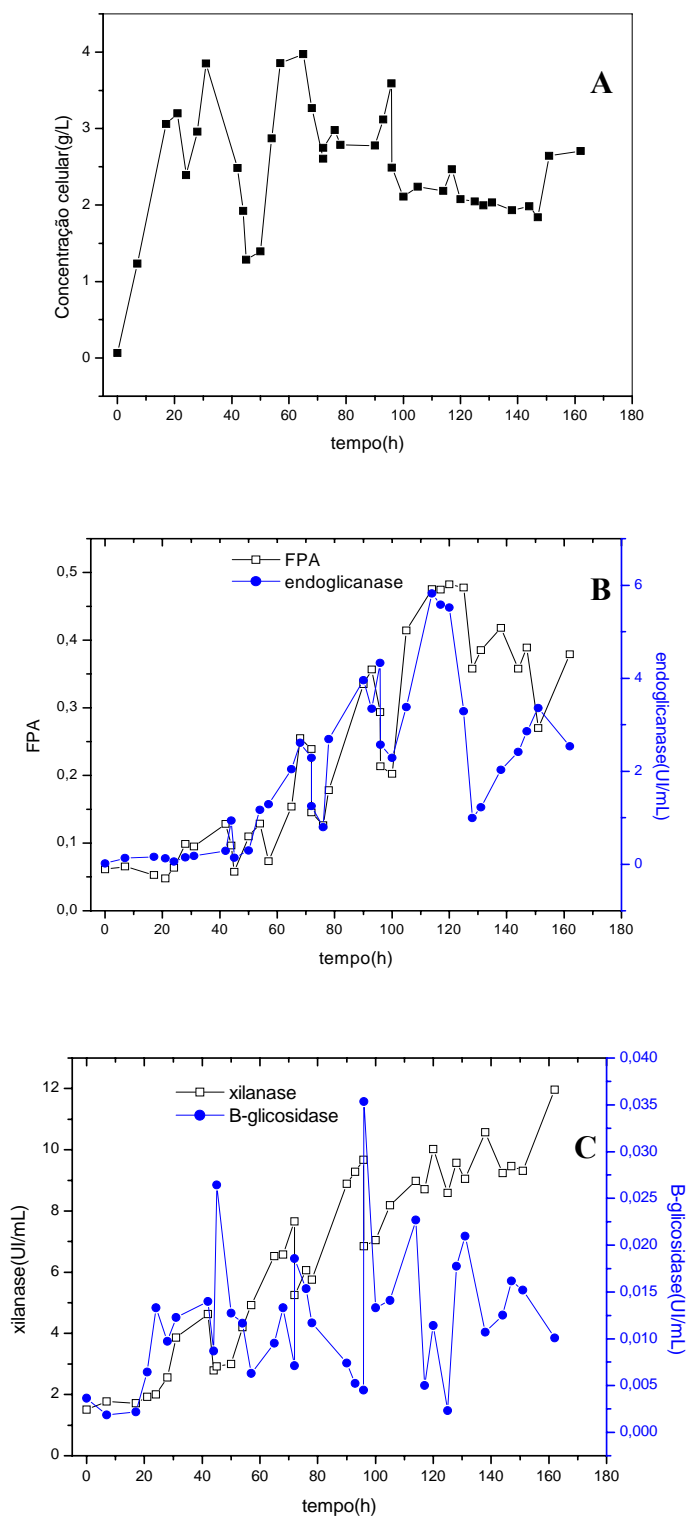


Figura 46. Perfil de produção enzimática e crescimento celular em cultivo de *Penicillium echinulatum* em biorreator com agitação mecânica alimentado com 0,5% (m/v) de celulose em 48, 72 e 96 horas de cultivo, totalizando 2% (m/v) de celulose.

A linearidade na atividade de FPA pode estar relacionada ao crescimento, visto que a biomassa formada neste ensaio apresentou três picos de crescimento elevados. Em 31, 65 e 95 horas de cultivo ocorreram as maiores concentrações de biomassa, de 3,85 g/L, 3,97 g/L e 3,59 g/L, respectivamente (Figura 45A). As quedas apresentadas durante estes intervalos de tempo podem ter sido consequência da diluição do meio em função da alimentação realizada. Também, cabe assinalar que este procedimento de alimentação produz maior quantidade de espuma, sendo necessária a adição de antiespumante em volume superior ao normalmente utilizado e que parte do micélio adere-se à parede do biorreator e/ou às chicanas, impossibilitando sua remoção. Essa biomassa presa no biorreator aumenta no decorrer do cultivo. A presença de espuma, segundo Zhang *et al.* (2007), é consequência do aumento da concentração de sólidos e de células, sendo um indicativo da produção de proteínas extracelulares. Os autores também observaram células e enzimas na espuma, o que, em parte, justifica a baixa atividade enzimática observada neste ensaio.

Assim como para FPA, ocorreram picos de atividade de xilanase e endoglicanase como mostra a Figura 46 B e C. Pode-se constatar que estes picos são menores que os apresentados em cultivos em batelada com 2% (m/v) de celulose. Entretanto, em regime de batelada alimentada, observou-se manutenção da atividade até o final do cultivo, o que não ocorre no cultivo em batelada.

A partir dos dados apresentados na Figura 46, constatou-se que não houve queda na atividade enzimática em regime de batelada alimentada; a seguir outro teste foi realizado, visando substituir parte da celulose por sorbitol. Desta forma, este segundo ensaio, de alimentação com volume variável, iniciou com 0,25% (m/v) de sorbitol e, posteriormente, alimentou-se com 1,75% (m/v) de celulose, divididos entre 48, 72 e 96 horas. A alimentação inicial, em 48 horas, foi escolhida em função de buscar comparação com dados anteriores, em cujos cultivos utilizou-se este mesmo tempo para alimentação de celulose.

A Figura 47 apresenta os resultados deste cultivo em relação às enzimas FPA, xilanase, endoglicanase e β -glicosidase, além de crescimento celular e pH do processo. Observa-se que o crescimento máximo foi de 4,85 g/L em 126 horas de cultivo e os picos enzimáticos de FPA e xilanase foram de 0,36 UI/mL e 10,25 UI/mL em 196 horas de cultivo, respectivamente. Cabe salientar que a atividade de β -glicosidase foi máxima (0,16 UI/mL) em 83 horas, antecipando-se em relação à endoglicanase, cujo pico foi de 2,5 UI/mL em 196 horas.

Neste ensaio verificou-se uma reduzida produtividade enzimática volumétrica, talvez por consequência da alta agitação empregada no cultivo (930 rpm), a fim de manter a homogeneidade do meio. Znidarsic & Pavko (2001) também relataram que a produção de enzimas celulolíticas extracelulares de *T. reesei* é fortemente afetada pela agitação, resultando em diferentes características de *pellets*.

Novamente, observou-se a fixação do micélio nas paredes do biorreator e nas chicanas, fato que acarretou consumo elevado de antiespumante, o que pode ter influenciado também no crescimento e na biossíntese de celulasas e xilanases.

Sendo assim, os ensaios posteriores realizaram-se em biorreator *airlift*, a fim de investigar a redução na taxa de cisalhamento e a ausência de agitação mecânica, bem como comparar com os melhores resultados obtidos em biorreator com agitação mecânica.

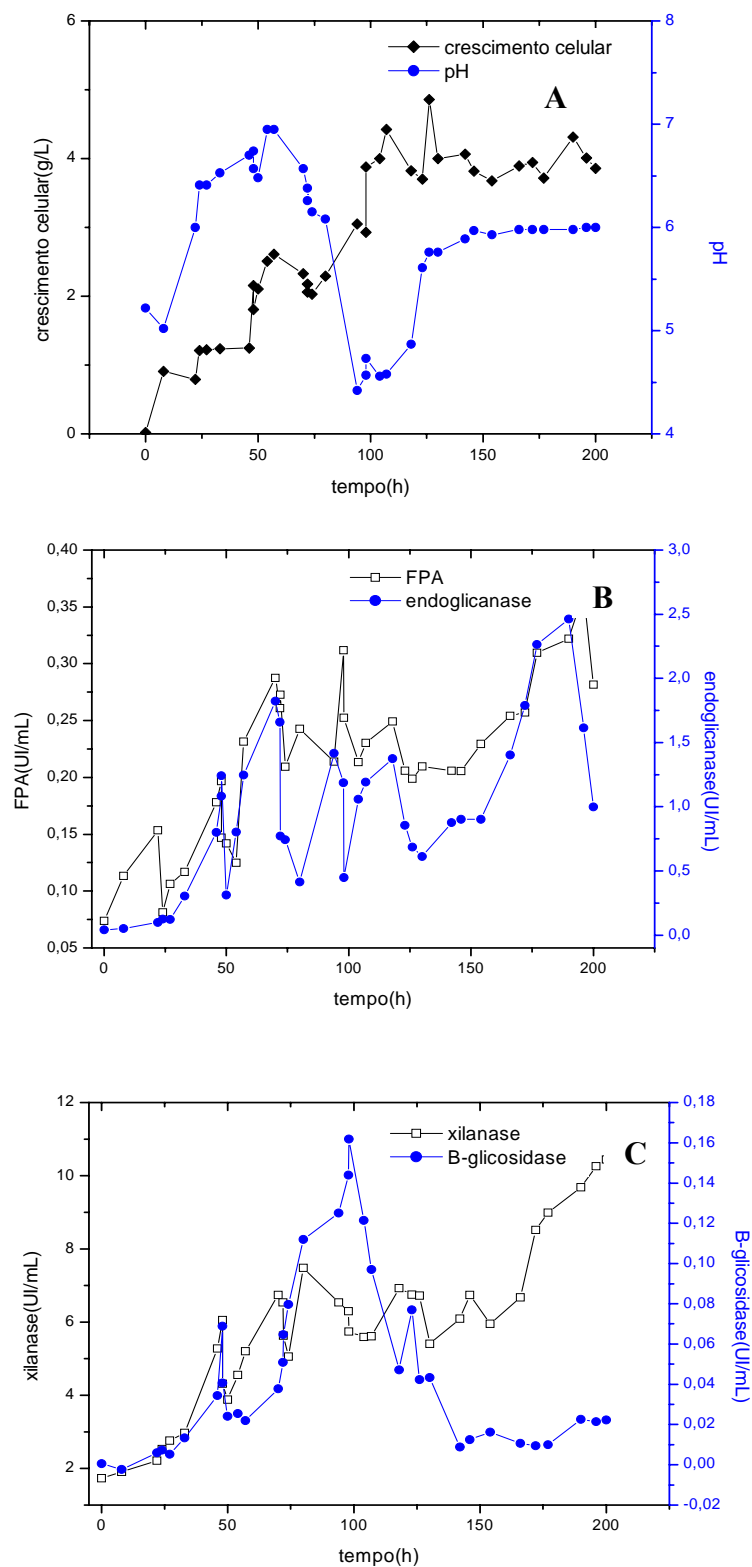


Figura 47. Perfil de concentração celular, variação do pH e perfil de atividade enzimática em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator com agitação mecânica em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 1,75% (m/v) de celulose em 48, 72 e 96 horas em volume variável do biorreator.

4.3 Produção de celulases e xilanases em biorreator *airlift* de circulação interna

Uma alternativa para a redução do cisalhamento micelial provocado pelos biorreatores com agitação mecânica é o emprego de biorreatores *airlift*. Neste sistema, a homogeneização é promovida pelo fluxo de ar, a dissipação de energia é homogênea e a transferência de oxigênio é comparável aos biorreatores com agitação mecânica.

Mesmo que na literatura já conste uma relevante quantidade de informações sobre o potencial de atividade de celulases e xilanases de *P. echinulatum* em frascos sob agitação, no presente trabalho buscaram-se realizar os primeiros estudos de crescimento e produção de celulases e xilanases por este organismo em biorreator *airlift* de circulação interna. Nestes estudos, visou-se determinar a velocidade de circulação do meio, bem como o fluxo de ar e a composição do meio de cultivo, a fim de obter maior atividade enzimática de celulases e xilanases.

Inicialmente, foram realizados os testes com meios contendo 1% (m/v) de celulose (cel1), 1% (m/v) de sorbitol (sorb1); 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol (cel0,75); 0,5% (m/v) de celulose e 0,5% (m/v) de sorbitol e, para finalizar esta etapa, realizou-se um teste substituindo 0,75% (m/v) da celulose por sorbitol, ou seja, um meio com 0,25% (m/v) de celulose e 0,75% (m/v) de sorbitol. Como fonte inorgânica de nitrogênio, em todos os meios, foi utilizado 0,14% (m/v) de nitrato de potássio comercial, além de 0,1% (m/v) de farelo de soja e 0,01% (v/v) de *Tween 80*[®].

4.3.1 Influência do crescimento celular na velocidade de circulação do meio

Constata-se que um dos fatores que influencia a velocidade de circulação do meio e, conseqüentemente, a transferência de oxigênio à célula é a viscosidade, função direta do

crescimento celular. Na Figura 59A, como esperado, a velocidade no *downcomer* (VND), no início, é proporcional à vazão de ar, mas diminui consideravelmente com o tempo de cultivo, em função, possivelmente, da reologia do meio, devido ao aumento da densidade. Na Figura 47B, apresentam-se dados da relação entre a velocidade no *downcomer* e a biomassa, em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol. Verifica-se que o final da fase exponencial, que ocorre em 50 horas de cultivo, coincide com a menor velocidade no *downcomer* (2,23 cm/s) e a máxima concentração celular (3,38 g/L). Esta concentração de biomassa foi menor quando comparada ao cultivo em biorreator com agitação mecânica, que mostrou 4 g/L como concentração celular máxima, em 55 horas de cultivo.

A velocidade no *downcomer* com 1% (m/v) de celulose (0,83 cm/s), em 47 horas, foi menor, comparativamente, com 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol, que apresentou uma VND foi de 1,76cm/s em 73 horas (Figura 48C). Como observado, portanto, a substituição de 25% (m/v) de celulose por sorbitol interfere favoravelmente na reologia do meio para aumento da VND.

Ao comparar o crescimento celular nos meios cell1 nos biorreatores de agitação mecânica e *airlift*, verifica-se que, neste último, o crescimento foi menor. Isto também foi verificado por Fontana *et al.* (2009) em cultivo com *Aspergillus oryzae*, que obtiveram menor biomassa em *airlift*. Porém, ao comparar o meio cel0,75, a produção de biomassa foi similar para ambos os biorreatores.

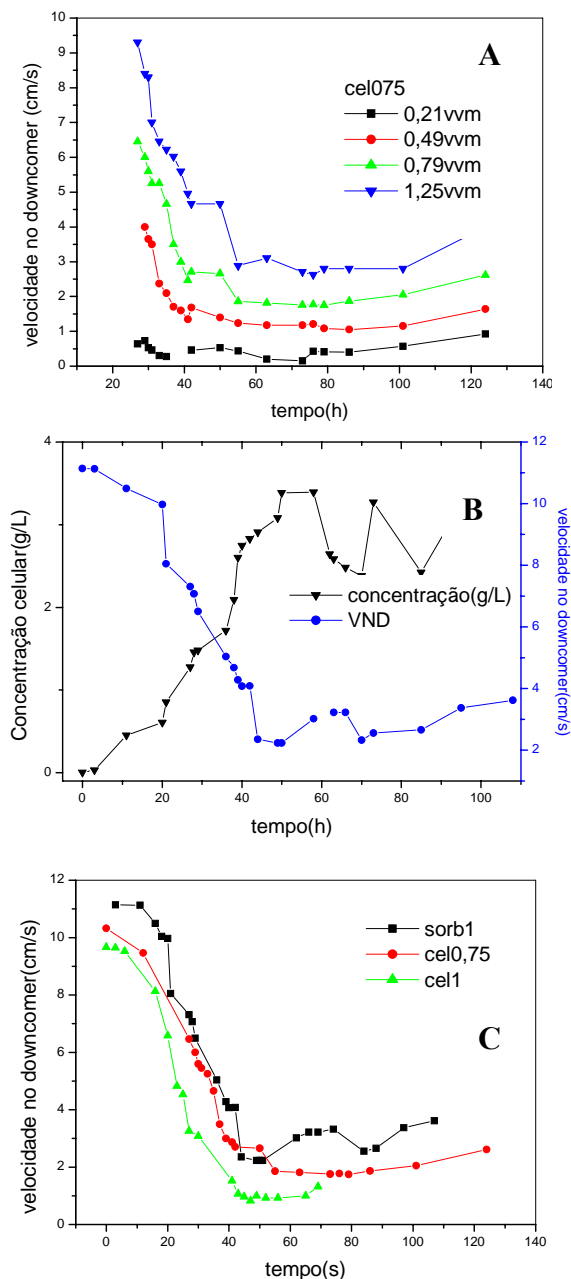


Figura 48. Velocidade de circulação do meio no *downcomer* e biomassa fúngica em função do tempo em biorreator *airlift* de circulação interna (A). Meio contendo 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol a 0,79 vvm. Concentração celular e velocidade do meio contendo 1% (m/v) de sorbitol (B) e velocidade de circulação do meio contendo 1% (m/v) de celulose, 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol e somente 1% (m/v) de sorbitol (C).

O efeito da presença de sólidos em suspensão também foi verificado por Merchuk *et al.* (1998). Em estudo com água pura e água do mar em *airlift*, constataram que a presença de NaCl

inibe a coalescência de bolhas, mas aumenta a transição do fluxo de bolhas para fluxos heterogêneos; este efeito está fortemente ligado a concentração de sal.

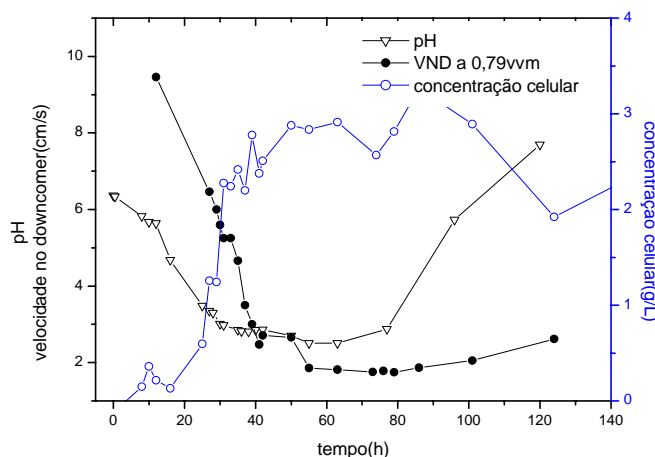


Figura 49. Velocidade no *downcomer*, variação do pH e concentração celular com vazão de ar de 0,79 vvm em biorreator *airlift* de circulação interna em função do tempo em meio de cultivo contendo 0,75% (m/v) de celulose e 0,25% (m/v) de sorbitol.

A Tabela 8 apresenta os dados da velocidade de circulação do meio em vazões de ar de 0,49; 0,79 e 1,25 vvm no biorreator. Constata-se que, quando 0,25% (m/v) da celulose foi substituída por sorbitol (cel0,75) no meio, em uma vazão de 0,79 vvm, permitiu um pequeno aumento na velocidade de circulação, possivelmente favorecendo a transferência de oxigênio. Observou-se, também, que para este meio e para o meio sorb1, o aumento na aeração não proporcionou significativa diferença na velocidade no *downcomer* e no *riser*. Adicionalmente, verificou-se que vazões de 0,79 e 1,25 vvm nos meios sorb1 (1% de sorbitol) e cel0,75 não proporcionaram diferença significativa na velocidade de circulação do meio no *downcomer* e no *riser*, possivelmente devido ao retorno de bolhas de ar no *downcomer*, que coalescem com outras bolhas. Sendo assim, uma vazão de ar de 0,79 vvm pode ser indicada para este tipo de ensaio, levando-se em consideração, também, o custo energético.

Tabela 8. Velocidade de circulação do meio (U_L) em vazões de ar de 0,49; 0,79 e 1,25 vvm no início do cultivo.

	Cell			Sorb1			Cel0,75		
Vazão de ar (vvm)	0,49	0,79	1,25	0,49	0,79	1,25	0,49	0,79	1,25
U_{Ld} (cm/s)	7,52	9,67	12,11	10,28	11,14	11,5	7,5	10,32	10,40
U_{Lr} (cm/s)	14,96	19,24	24,10	20,46	22,17	22,88	14,93	20,54	20,69

Os dados de K_{La} e U_{Lr} (velocidade de circulação do meio no *riser*) do biorreator *airlift* utilizado no presente trabalho podem ser comparados com os observados com Gouveia *et al.* (2003) que, em um biorreator *airlift* de circulação interna de 6 litros contendo, na fase aquosa, uma solução de sulfito, obtiveram K_{La} igual a 72 h^{-1} e U_{Lr} de $0,032 \text{ m/s}$. Rossi (2006), em biorreator *airlift* de circulação externa contendo solução salina a $0,15 \text{ M}$ obteve o mesmo valor de K_{La} , com U_{Lr} de $0,076 \text{ m/s}$. Ainda, corroborando com a sugestão de que a concentração de sólidos influencia na VND, Pedrini *et al.* (1996), com *airlift* de circulação externa de 6,5 litros contendo água da torneira, obtiveram K_{La} igual 33 h^{-1} e VND de $0,015 \text{ m/s}$.

A análise da Figura 50 permite verificar um comportamento semelhante entre a viscosidade e o crescimento celular, em meio contendo $0,5\%$ (m/v) de celulose e $0,5\%$ (m/v) de sorbitol. Também, pode-se constatar que o consumo de oxigênio foi proporcional ao crescimento, ocorrendo o seu máximo em 38 horas de cultivo.

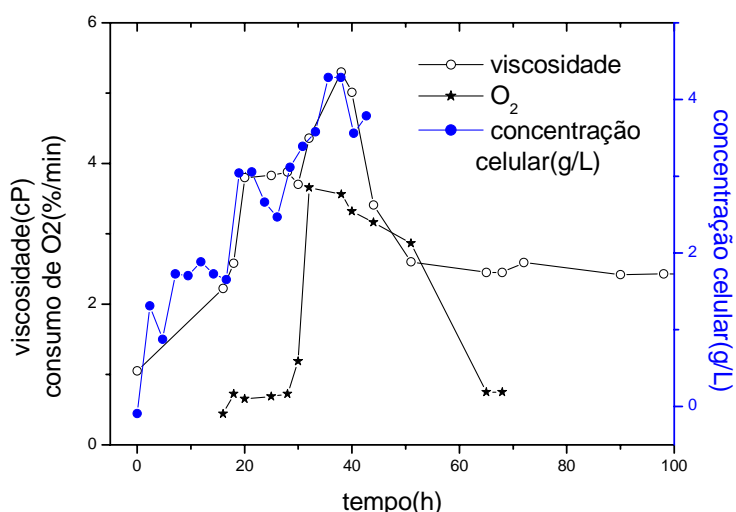


Figura 50. Concentração celular, viscosidade e consumo de oxigênio dissolvido em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator airlift em meio contendo 0,5% (m/v) de celulose e 0,5% (m/v) de sorbitol.

Em relação à reologia do meio, Verma *et al.* (2006) constataram, em estudos com *Trichoderma viride* utilizando biorreator *airlift* contendo águas residuárias, que a viscosidade pode ser um importante fator no acompanhamento do processo. Entretanto, com o decorrer do processo, ela passa a ser menos eficaz como controle. Os autores verificaram, também, que a viscosidade aumentou nas primeiras 36 horas de cultivo, decrescendo no final do processo, em 96 horas. A máxima viscosidade, medida indireta do crescimento fúngico, foi atingida quando o cultivo ocorreu com 30% de saturação de oxigênio dissolvido, sendo superior aos cultivos com 40% e 80%; assim, caracterizaram-se os cultivos em pseudoplásticos e tixotópicos.

4.3.2 Produção enzimática de celulasas e xilanases em reator *airlift* com diferentes composições de fonte de carbono

As atividades enzimáticas em biorreator *airlift* de circulação interna podem ser verificadas para as cinco composições de fonte de carbono envolvendo celulose e sorbitol nas Figuras 51A (FPA), Figura 52 (xilanases) e Figura 53 (β -glicosidase). Observa-se que, no cultivo contendo apenas sorbitol como fonte de carbono, não existiu indução de FPA, endoglicanase, xilanase e β -

glicosidases. Estes resultados mostram, mais uma vez, que sorbitol não induz a produção destas enzimas em *P. echinulatum*, tal como observado para *T. reesei*. Entretanto, quando a celulose esteve presente, observaram-se atividades enzimáticas de FPA, endoglicanase e xilanases, inclusive com incrementos, quando se comparam as atividades enzimáticas dos meios cel0,25 (0,25% de celulose e 0,75% de sorbitol), cel0,5 (0,5% de celulose e 0,5% de sorbitol) e cel1(1% de celulose).

O comportamento das curvas na Figura 51A (FPA) e 50B (endoglicanase) mostram a conveniência de substituir 0,25% (m/v) de celulose por sorbitol (cel0,75) para obter significativos aumentos na atividade de FPA, como pode ser visto, também, na Tabela 9, onde verifica-se que, embora o pico de FPA na condição cel0,75 tenha sido atrasado, ocorreu maior produtividade volumétrica em relação à condição cel1.

Ao comparar os dados dos dois biorreatores utilizados neste trabalho para o meio cel0,75, verifica-se que, em *airlift*, a atividade máxima de FPA foi 2,5 vezes maior do que a obtida em biorreator com agitação mecânica em regime de batelada. Estes dados foram similares aos de diferentes biorreatores obtidos por Kim *et al.* (1996), que observaram melhores resultados na produção de celulasas e xilanases em biorreatores de coluna de bolhas e *airlift* quando comparados com os de agitação mecânica. Entretanto, para FPA, os resultados em biorreator com agitação mecânica foram 10% mais elevados.

O atraso no tempo para o pico de endoglicanase na condição cel0,75 diminuiu a produtividade volumétrica para esta enzima (Tabela 9), mas foi superior 2,47 vezes ao meio cel0,75m. Em relação à atividade xilanosídica (Figura 52) verifica-se que, nos tratamentos com substituição de parte da celulose por sorbitol, as atividades enzimáticas foram menores em relação à cel1 e, aproximadamente, 1,8 vezes inferiores ao mesmo meio produzido em biorreator com agitação mecânica (cel1m).

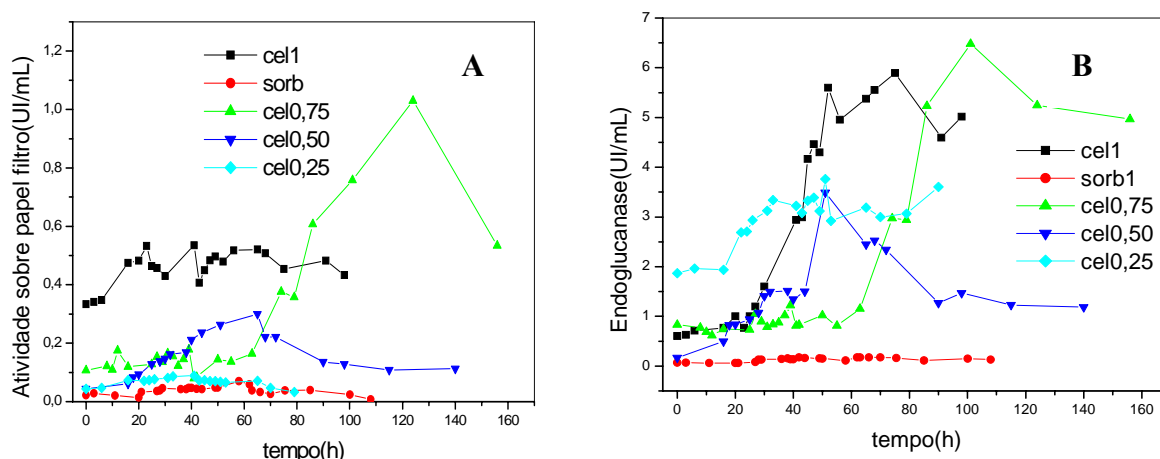


Figura 51. Perfil de atividade de FPA (A) e endoglucanase (B) no cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meios constituídos de celulose e sorbitol como fontes de carbono.

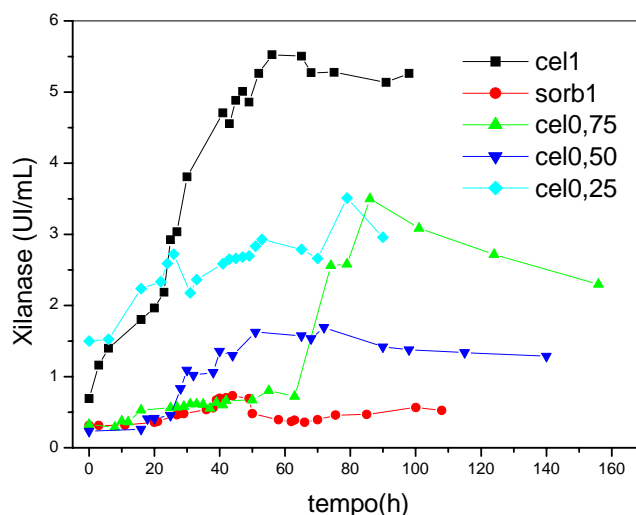


Figura 52. Perfil de atividade xilanosídica no cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meios constituídos de celulose e sorbitol como fontes de carbono.

Para a atividade de β -glicosidase (Figura 53), verifica-se que o meio cel075 favoreceu a atividade desta enzima em comparação com outros tratamentos. Cabe salientar que, comparando a atividade dessa enzima no meio cel0,75 com o meio cel0,75m, o incremento foi de sete vezes, demonstrando que o cultivo em *airlift* favoreceu a produção enzimática.

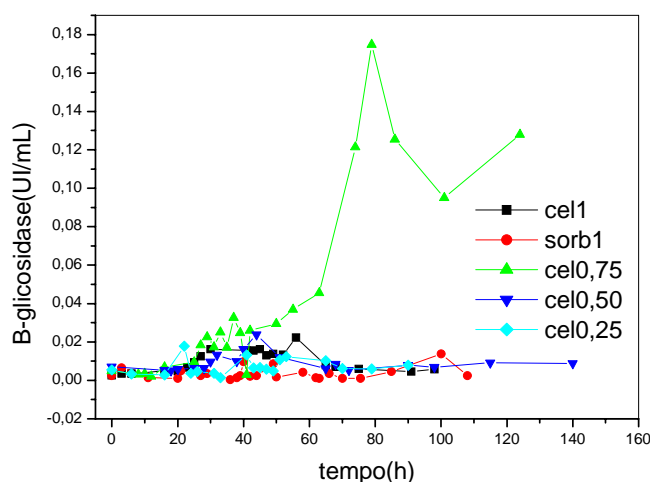


Figura 53. Perfil de atividade de β -glicosidase no cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meios constituídos de celulose e sorbitol como fontes de carbono.

Como se verificou com o meio cel0,75, o cultivo em *airlift* apresentou melhores resultados em relação ao biorreator com agitação mecânica. Estes dados podem estar relacionados ao K_{La} do meio, visto que a condição de início deste cultivo (0,29 vvm) mostrou K_{La} de $5,29 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 9), o que se aproxima da condição de 0,7 vvm e 300 rpm no biorreator com agitação mecânica (K_{La} $8,71 \text{ h}^{-1}$). Já para o meio cel1, o K_{La} assemelha-se ao cultivo cel1m, cujo K_{La} foi de $13,78 \text{ h}^{-1}$ a 0,7 vvm e 500 rpm. Estes dados corroboram os resultados de Fontana *et al.* (2009), que verificaram que o K_{La} de operação em meio não inoculado em *airlift* a 0,7 vvm foi igual ao do biorreator com agitação mecânica a 200 rpm. Já quando a aeração superou 1,5 vvm e atingiu 2 vvm, a comparação foi com a velocidade de 300 rpm. Em relação às atividades de xilanases e endoglicanases, a produção aumentou à medida que a concentração de celulose diminuiu; para β -glicosidase e FPA, ocorreu o contrário. Segundo Ahamed & Vermette (2009), a produtividade volumétrica enzimática de FPA aumenta em função da massa de micélio e do número de ápices de hifas em *T. reesei*. Estes autores também constataram que, controlando a morfologia do fungo, a produtividade aumenta. Deste modo, o meio cel0,25 propiciou a maior concentração micelial (5,16 g/L) dentre os cultivos em *airlift*, juntamente com a segunda maior produtividade de FPA (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação de diferentes parâmetros em ensaios realizados com *Penicillium echinulatum* em biorreator airlift de circulação interna.

Parâmetro avaliado	Cel1	Cel0,75	Cel0,5	Cel0,25	Sorb1
Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio a 0,49vvm (K_{La})(h⁻¹)	18,79	8,47	12,76	8,48	19,34
Máxima velocidade específica de crescimento (μ_{xm}) (h⁻¹)	0,136	0,194	0,475	0,326	0,0667
Produtividade volumétrica de endoglicanase (UI/mL/h)	0,07	0,056	0,065	0,032	0,016
Produtividade volumétrica de xilanase (UI/mL/h)	0,074	0,037	0,021	0,025	0,0095
Produtividade volumétrica de β-glicosidade (UI/mL/h).10⁻⁴	2,9	1,5	3,6	1,9	1,1
Produtividade volumétrica de atividade sobre papel filtro (UI/mL/h).10⁻³	0,86	4,9	3,9	3,9	1,1

Comparando a velocidade específica para a atividade de xilanase, endoglicanase e FPA com a de biomassa (μ_x) do meio sorb1 e cel0,75, estas diferiram quanto ao tempo em que foram determinadas (Figura 54). Na presença de sorbitol (Figura 54B), μ_{xm} ocorreu em 24 horas, enquanto que os picos de atividades enzimáticas ocorreram em torno de 70 horas. Para o meio cell1, observou-se que a máxima velocidade de crescimento celular ocorreu no início do cultivo; entretanto, para FPA, a velocidade foi máxima em 45 horas (Figura 54C). Os resultados obtidos corroboram com os de Papagianni (2004), em que o crescimento de fungos filamentosos, como *Aspergillus* e *Penicillium*, apresenta velocidade específica de crescimento na ordem de 0,1 a 0,3 h⁻¹.

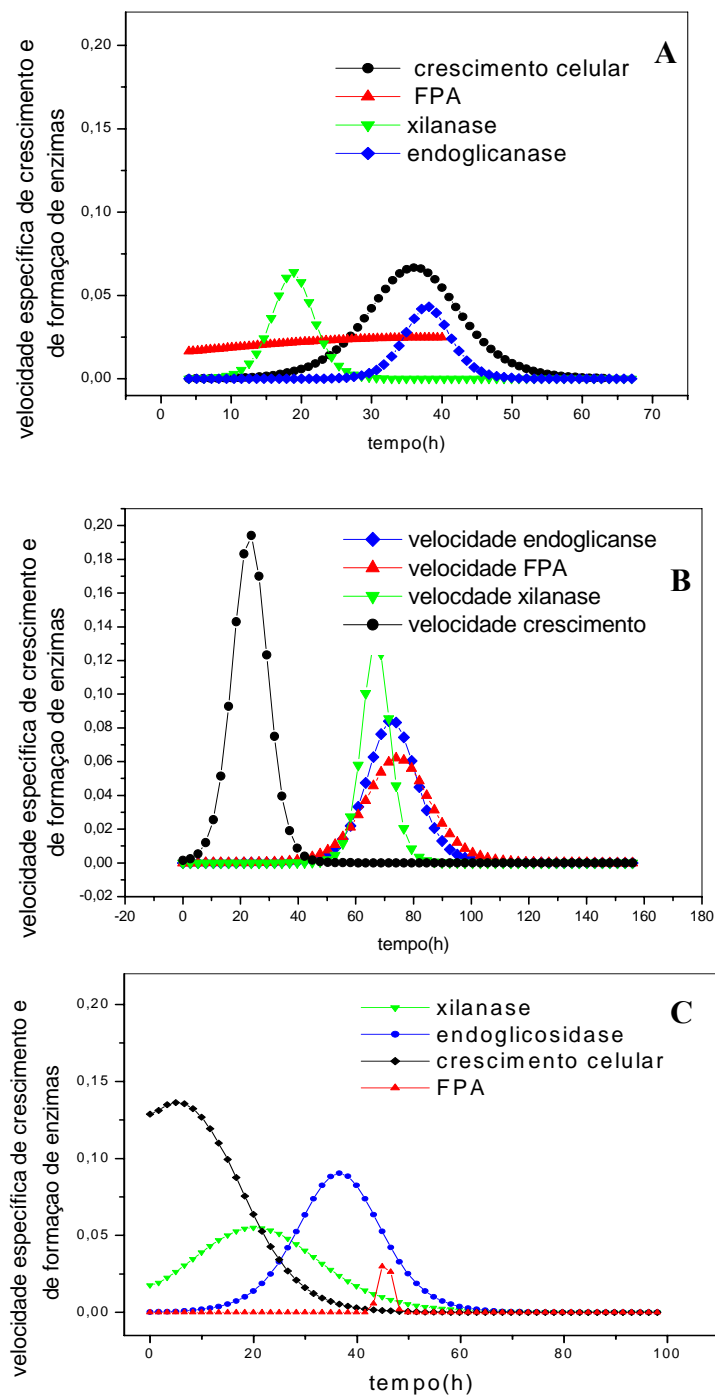


Figura 54. Velocidade máxima de produção enzimática em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol (A), cel0,75 (B) e cel1 (C) em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna.

Uma vez verificado que cultivos com maiores concentrações de celulose promovem maior atividade enzimática, realizou-se um ensaio cujo meio continha 0,25% (m/v) de sorbitol e 1,75%

(m/v) de celulose em *airlift*, cuja aeração do meio variou de 0,49 vvm a 1,2 vvm e a temperatura manteve-se em $28\pm 1^\circ\text{C}$.

Os dados de biomassa e de atividade enzimática (Figura 55) mostram que a fase exponencial de crescimento celular cessou em 70 horas de cultivo, atingindo um pico de 4,02 g/L; neste tempo, também ocorreu a menor velocidade de circulação do meio (0,95 m/s a 1 vvm), sendo necessário aumentar a aeração. Cabe salientar, neste cultivo, a ocorrência de uma reduzida fase lag de crescimento; além disso, a concentração celular só foi superada pelo cultivo cel0,5

Adicionalmente constata-se que o aumento na atividade enzimática de xilanase e β -glicosidase iniciou após 20 horas de cultivo. Para a atividade de xilanase, o pico ocorreu em 98 horas (10,9 UI/mL), tempo que coincide com os picos de β -glicosidase e FPA (0,23 e 0,39 UI/mL, respectivamente). A atividade de β -glicosidase foi semelhante ao meio cel0,75, mostrando que o aumento na concentração de celulose não provocou aumento proporcional na atividade enzimática. A mesma situação ocorreu para endoglicanase, cujo pico de atividade foi menor do que o cultivo contendo 1% (m/v) de celulose.

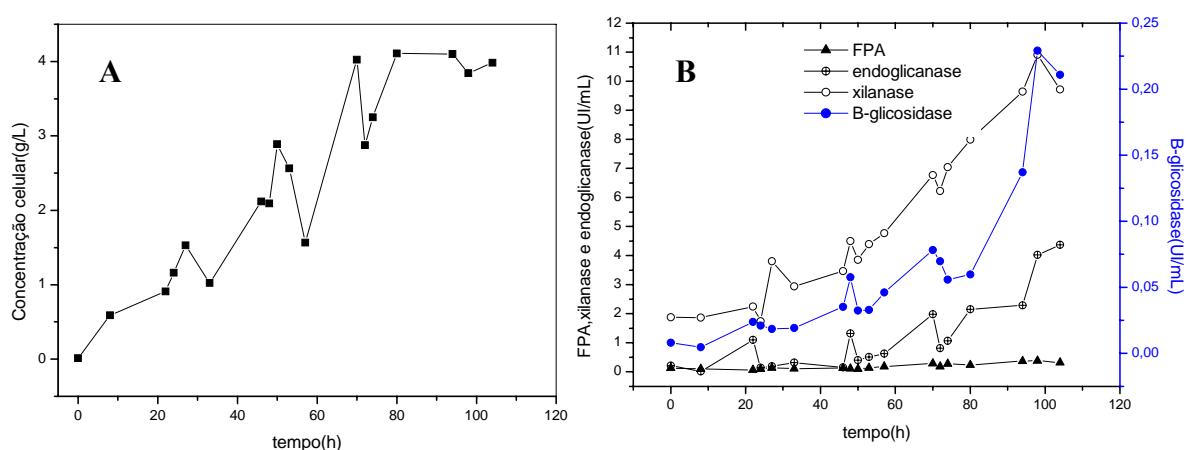


Figura 55. Perfil de concentração celular (A) e atividades enzimáticas (B) obtidas em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 1,75% (m/v) de celulose.

4.3.3. Influência do tempo de adição de celulose em biorreator *airlift*

Constatado que, em biorreator com agitação mecânica e em frascos sob agitação, a adição às 36 horas de 0,75% (m/v) de celulose em cultivo iniciado com 0,25% (m/v) de sorbitol apresentou melhores resultados em relação ao meio apenas com celulose, repetiu-se esta condição em biorreator *airlift* de circulação interna. Este cultivo realizou-se com fluxo de ar de 0,79 vvm, pois conforme a Tabela 8 ocorre maior velocidade no *downcomer*, sem que ocorra retorno de bolhas de ar e, também, o consumo de energia para aeração é menor que para a aeração de 1,25 vvm.

Como se verifica na Figura 56A, os dados de crescimento celular apontam para o início da fase estacionária em torno de 40 horas, com uma queda na concentração e, posteriormente, um novo pico de biomassa, que atingiu 2,42 g/L em 80 horas. Estes resultados de rápido crescimento podem estar relacionados a condições favoráveis proporcionadas pelo sistema *airlift*. Na Figura 56B, também se observou que, em 30 horas, ocorre um pico de atividade de FPA de 0,65 UI/mL e outro pico em 80 horas de 0,43 UI/mL. Esta atividade foi menor em relação ao meio onde as fontes de carbono foram adicionadas concomitantemente, que atingiram atividade de 1,03 UI/mL em 124 horas de cultivo. O pico de atividade de FPA já em 30 horas, de 0,65 UI/mL, deve-se, provavelmente, também ao consumo do farelo de soja como fonte de carbono, ocorrendo, posteriormente, um acentuado crescimento celular, que se estendeu até 50 horas de cultivo, o que corresponde ao final da fase exponencial de crescimento. Entretanto, o pico de apenas 30 horas para FPA é de grande importância, visto o aumento da produtividade que, possivelmente, está relacionado a uma precoce fase de lise celular, que pode ser corroborada pelo decréscimo da concentração celular entre 30 e 65 horas. A queda na atividade de FPA entre 30 e 40 horas pode ser, inclusive, explicada pela lise celular, com liberação de proteases no meio de crescimento.

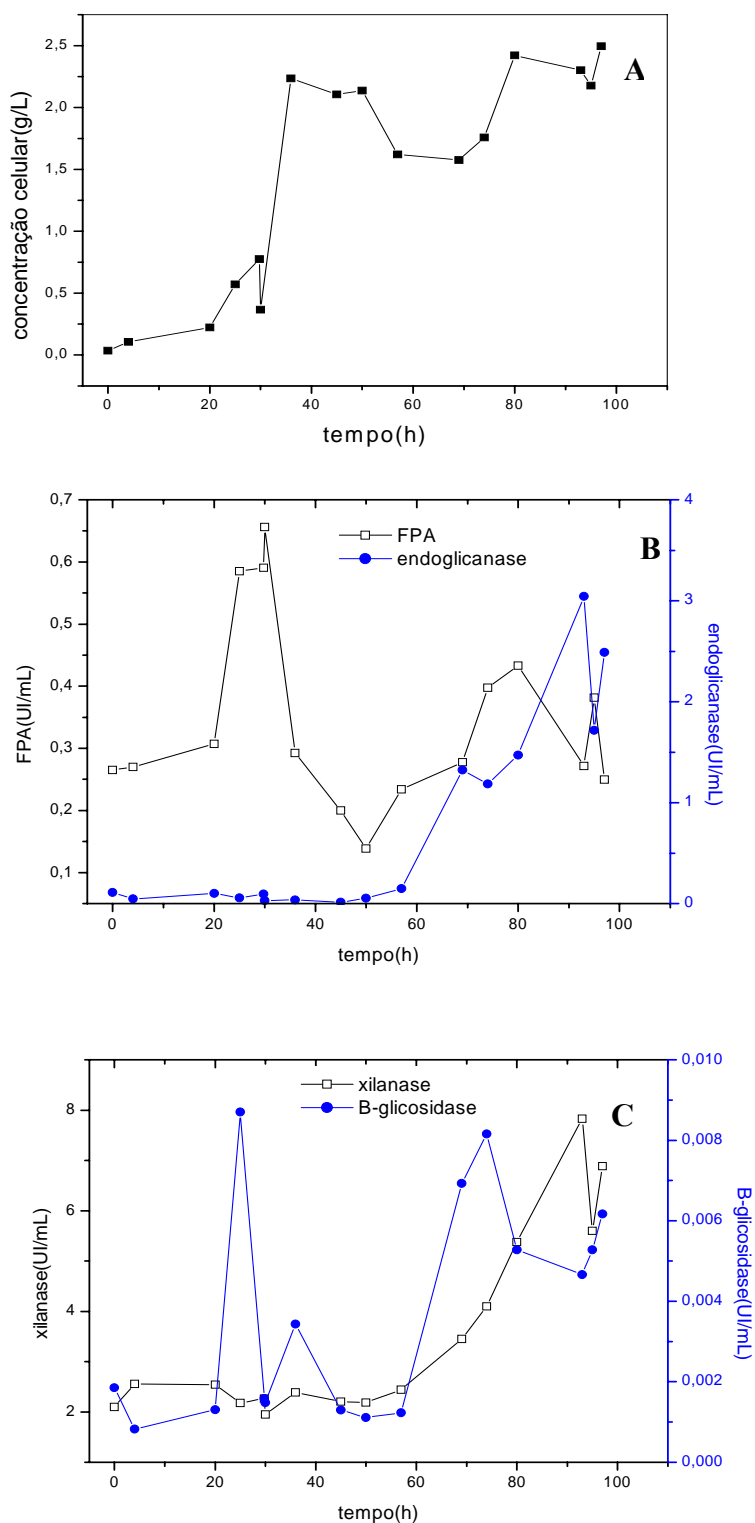


Figura 56. Concentração celular (A) e atividade de FPA (B) em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado após 30 horas com 0,75% (m/v) de celulose.

Para as atividades de endoglicanases e xilanases (Figura 56B e C), pode ser verificado um comportamento muito semelhante entre suas atividades enzimáticas, com picos que ocorreram em 93 horas de cultivo, de 3,04 UI/mL e 7,8 UI/mL, respectivamente. Para a atividade de xilanase, a adição da celulose após 30 horas apresentou um aumento em torno de duas vezes, quando comparada ao cultivo contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 0,75% (m/v) de celulose. Este comportamento, representando um favorecimento na adição posterior de celulose, não se repetiu para a atividade de endoglicanase. Esta enzima apresentou um decréscimo na atividade, que correspondeu a 50%, quando comparada ao meio cel0,75.

A Figura 56C apresenta o comportamento cinético da produção de β -glicosidase, cujos picos enzimáticos ocorrem em 25 e 74 horas, de 0,008 UI/mL. Esta atividade foi muito inferior quando comparada ao meio cel0,75, que atingiu 0,17 UI/mL. Constatou-se que o cultivo iniciado com sorbitol não foi favorável à produção desta enzima, uma vez que se verificaram os menores títulos dos ensaios em biorreator *airlift*.

Uma vez constatado que a adição tardia de celulose promove melhores atividades enzimáticas em biorreator com agitação mecânica, procedeu-se um ensaio em *airlift* onde 0,75% (m/v) de celulose foi adicionada após 48 horas de cultivo, iniciado com 0,25% (m/v) de sorbitol e meio base, com o intuito de reduzir a concentração de sorbitol, aumentando a biomassa, e correlacionar estas variáveis. O ensaio foi mantido a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, com a aeração variando entre 0,5 e 1,2 vvm, necessária para promover a circulação do meio.

As Figuras 57 A e B mostram a relação entre o crescimento fúngico e a atividade de FPA. A biomassa foi proporcional à VND, que atingiu 2,4 cm/s em 22 horas de cultivo e 0,93 cm/s em 70 horas, demonstrando, assim, a necessidade de maior fluxo de ar para promover o crescimento e a agitação do meio. Observa-se que, neste ensaio, ocorreu crescimento celular e, posteriormente, na fase estacionária, o pico enzimático, atingiu 0,50 UI/mL em 138 horas. Desta forma, quando se

compara os resultados do cultivo com a mesma concentração de celulose e sorbitol alimentado em 30 horas, cujo pico foi de 0,43 UI/mL, pode-se afirmar que a adição em 48 horas promoveu um aumento na atividade enzimática. Quando se comparam as duas situações, a produtividade volumétrica no cultivo alimentado em 30 horas foi maior do que em 48 horas.

Cabe salientar que, neste cultivo, houve crescimento fúngico com a formação de massa presa às paredes do biorreator, provavelmente onde o fluxo de ar foi menor. Este crescimento se acentuou a partir das 120 horas, o que justifica a queda que ocorreu entre 120 e 145 horas de cultivo. Para evitar este fenômeno antes das 120 horas, utilizou-se maior quantidade de antiespumante, uma vez que o volume útil do biorreator só se completou em 96 horas, favorecendo a formação de espuma.

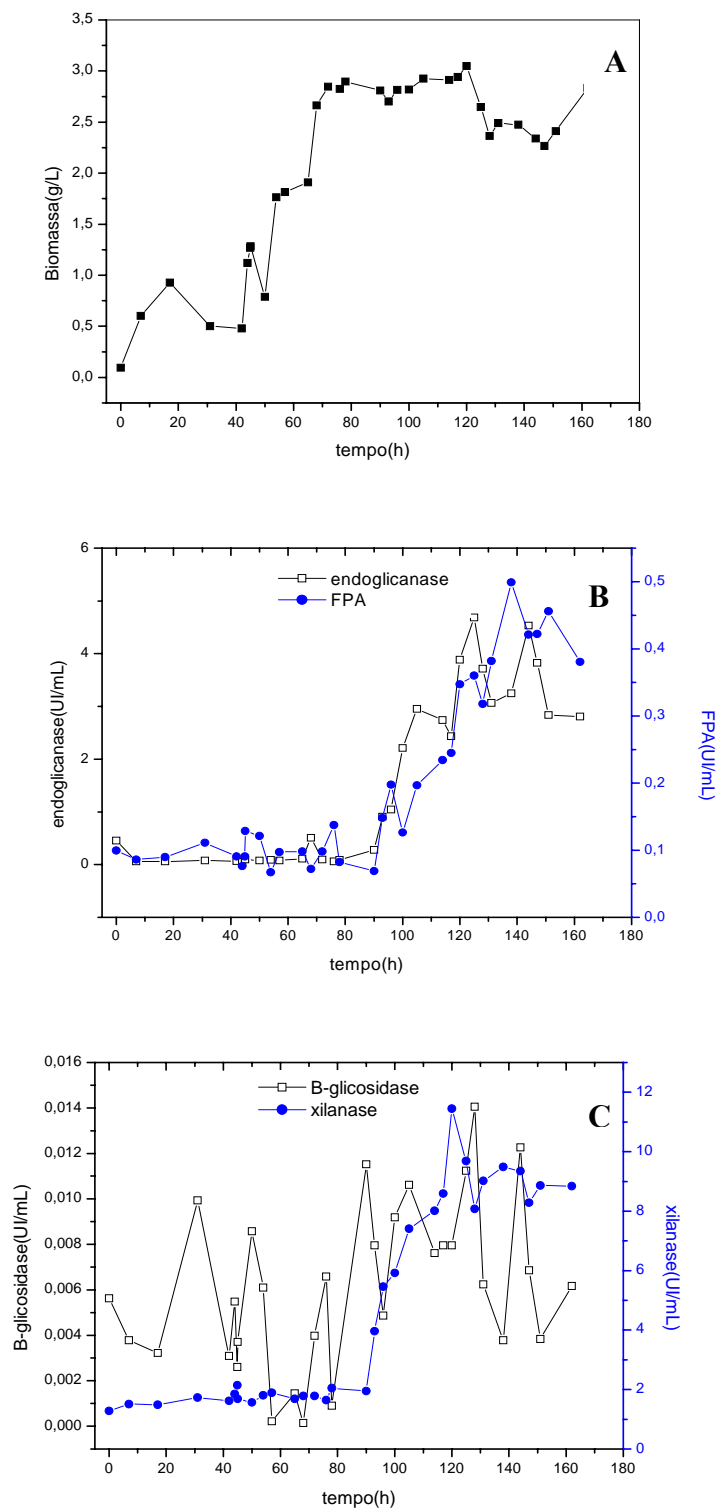


Figura 57. Perfil de crescimento celular e atividade enzimática em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em biorreator *airlift* de circulação interna em meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e alimentado com 0,75% (m/v) de celulose em 48 horas.

De maneira similar, as atividades de endoglicanase e xilanase (Figuras 57 B e C) apresentam um tempo de 80 horas, aproximadamente, sem alterações significativas em seus títulos, o que acarreta diminuição da produtividade volumétrica. Este tempo de 80 horas foi maior do que o tempo do ensaio cuja alimentação ocorreu em 30 horas, que foi de 50 horas, aproximadamente. Após, ocorreu acentuado incremento, atingindo picos de 4,68 e 9,49 UI/mL para endoglicanase e xilanase, respectivamente.

Cabe salientar que ambas as atividades, de xilanase e endoglicanase, foram favorecidas com a adição em 48 horas, sendo a de xilanase 35,5% superior ao cultivo alimentado em 30 horas com a mesma concentração de celulose, e a de endoglicanase, 54,6% maior, como mostram as Figuras 57 B e C.

Assim, verificou-se que os cultivos em *airlift* apresentaram resultados superiores quando comparados aos realizados em biorreatores com agitação mecânica em termos de atividade enzimática e de biomassa. O meio cel0,75, em *airlift*, apresentou os melhores resultados em relação à atividade de FPA, endoglicanase e β -glicosidase. Em relação ao complexo xilanase, o meio que apresentou melhores resultados foi o cel0,5. Observou-se, também, que o tempo de adição da celulose deve ser retardado (48 horas de cultivo em meio contendo 0,25% de sorbitol). Desta forma, os estudos em *airlift* para produção de celulasas e xilanasas de *P. echinulatum* foram considerados promissores.

4.4 Cultivos em frascos sob agitação utilizando bagaço de cana de açúcar e sorbitol

Uma vez que a reologia do meio é afetada por altas concentrações de celulose, dificultando a transferência de oxigênio e a homogeneidade do meio, a alternativa de substituição completa ou parcial da celulose por uma fonte de carbono solúvel foi promissora. Entretanto, embora não calculado, o gasto energético para manutenção da aeração e da agitação provavelmente é alto, devido à elevada frequência utilizada, à longa fase lag de crescimento e ao início da produção enzimática, refletindo na redução da produtividade volumétrica.

Adicionalmente, o custo da celulose cristalina, que é utilizada tradicionalmente para a produção de celulases, também é elevado. Desta forma, o bagaço de cana-de-açúcar, resíduo da indústria do açúcar e do álcool, poderia ser uma alternativa de fonte de carbono. Neste item, são apresentados dados de cultivos envolvendo celulose e bagaço de cana-de-açúcar, isolados ou associados às fontes de carbono solúvel, sorbitol e lactose. Nestes cultivos, houve adição de 0,1% (m/v) de farelo de trigo.

Na Figura 58, verifica-se que a atividade de FPA foi distinta quando celulose e bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados como fonte de carbono e, também, quando estas fontes foram associadas às fontes solúveis sorbitol ou lactose. A FPA foi maior em meio contendo celulose cristalina quando comparada aos meios com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Em concentrações de sorbitol e lactose de 0,25% (m/v) e 0,75% (m/v), no quinto dia de cultivo, observa-se significativa diferença na atividade enzimática, isto é, o aumento na concentração de sorbitol de 0,25% (m/v) para 0,75% (m/v) promoveu aumento na atividade enzimática, enquanto que este mesmo aumento, para lactose, promoveu diminuição na atividade de FPA. Em relação ao substrato preferencial, o meio com celulose, além de ser mais precoce em relação à FPA, apresenta os maiores títulos quando comparado ao meio com bagaço no 3º, 4º e 5º dias de cultivo.

Estas diferenças de atividade de FPA nos meios podem ser devidas, também, à concentração de celulose, que é menor no bagaço de cana-de-açúcar em relação à presente na fonte de celulose utilizada. Cabe salientar, que não existiu diferença, para FPA, nos meios com bagaço de cana-de-açúcar isoladamente e o meio com 0,25% (m/v) de sorbitol + 0,50% (m/v) de lactose + 0,25% (m/v) de bagaço no 4º dia, indicando a possibilidade de substituição de parte da fonte de carbono insolúvel por uma fonte solúvel.

Costa *et al.* (2009), em estudos com *T. reesei* em meio contendo 5 g/L de lactose, verificaram que o pico da atividade de endoglicanase foi de 0,43 UI/mL e que a atividade de FPA foi de 0,03 UI/mL. Porém, em cultivo contendo bagaço de cana tratado por explosão a vapor, o pH caiu durante todo processo, variando de 6 para 3,71 em 72 horas de cultivo e o pico de concentração de endoglicanase e FPA foi de 2,67 UI/mL e 0,15 UI/mL, respectivamente.

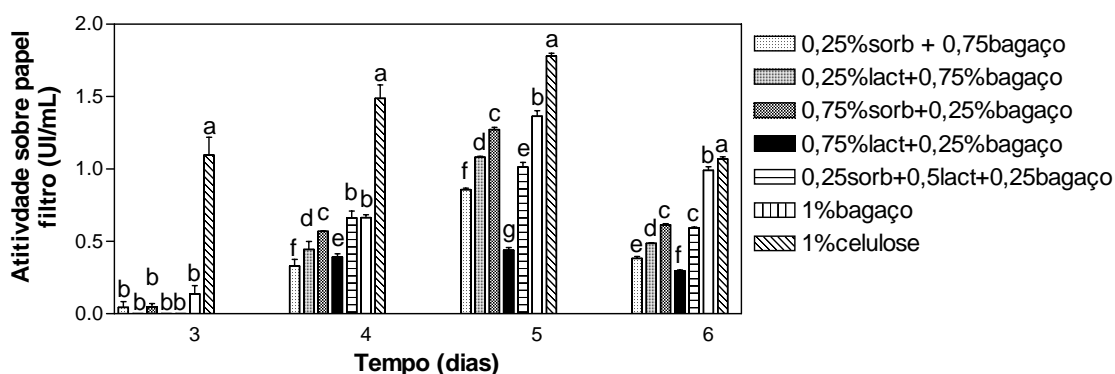


Figura 58. Produção enzimática de FPA em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em frascos sob agitação recíproca. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem em nível de $p < 0,05$.

Na Figura 59, tal como visto para FPA, verifica-se que, em relação à atividade xilanásica, o meio contendo celulose (1%) mostrou maior precocidade, mas atividade semelhante no 4º dia. Também no 4º dia, verifica-se que a atividade do meio contendo 1% (m/v) de celulose e 1% (m/v) de bagaço de cana foi estatisticamente semelhante. Este dado é importante, visto que os resíduos

lignocelulósicos apresentam de 20 a 50% de celulose, 20 a 35% de hemicelulose e 10 a 35% de lignina (Kumar *et al.*, 2009). Desta forma, a vantagem de substituição fica evidente.

As adições de lactose ou sorbitol ao bagaço de cana-de-açúcar foram favoráveis para a atividade de xilanases. No 6º dia de cultivo verifica-se que, no meio com bagaço de cana, as atividades de xilanase foram mais estáveis em relação ao meio contendo celulose.

A utilização de resíduos agrícolas para a obtenção de enzimas e a produção de álcool etílico é muito pesquisada em função do baixo custo da matéria-prima e de sua disponibilidade. Assim, o aproveitamento de resíduos de cevada, promoveu um aumento na atividade de xilanase em função da concentração quando Xiros & Christakopoulos (2009) utilizaram 1% (m/v) deste resíduo, obtendo 14 UI/mL, enquanto que, com o dobro da concentração, a atividade foi de 36 UI/mL.

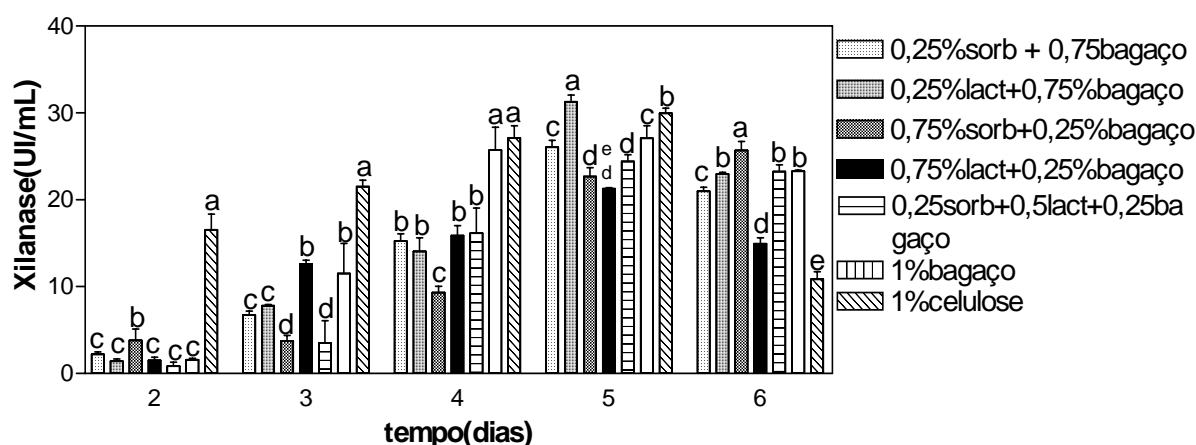


Figura 59. Atividade de xilanases em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em frascos sob agitação recíproca. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem em nível de $p < 0,05$.

Tal como para FPA e xilanases, o meio com celulose mostrou atividade endoglicanásica mais precoce que em relação ao meio com bagaço de cana-de-açúcar (Figura 60), sendo que o meio com celulose mostrou as mais elevadas atividades. As adições de sorbitol e lactose em substituição

a parte do bagaço de cana não promoveram aumentos na atividade desta enzimática. Porém, Xiros & Christakopoulos (2009), em pesquisa com *Fusarium oxysporum*, verificaram aumento na atividade de endoglicanase em meio contendo bagaço de cevada e sabugo de milho (3:1 m/m) duas vezes maior que o meio contendo apenas resíduo de cevada. Também observaram que, quando a proporção é de 1:1, a atividade triplica, sendo que os títulos de β -glicosidase também foram maiores.

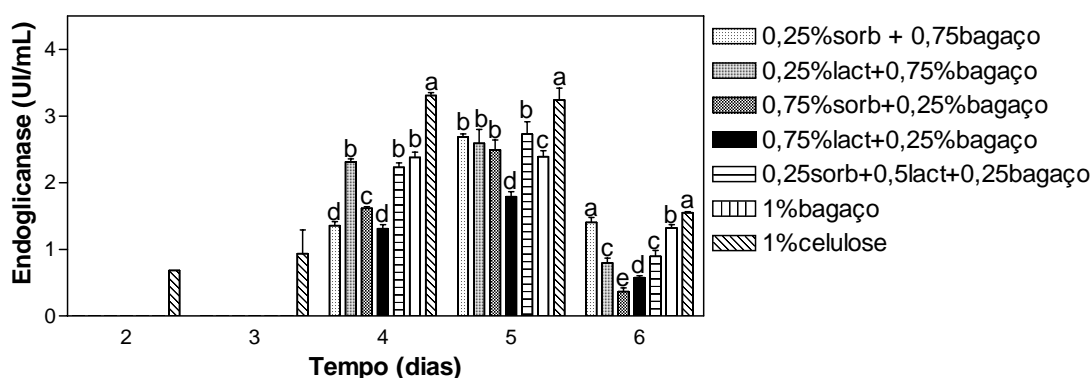


Figura 60. Atividade de endoglicanases em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em frascos sob agitação recíproca. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem em nível de $p < 0,05$.

Já para atividade de β -glicosidases (0,26 UI/mL) verificou-se que, no conjunto dos tratamentos, a atividade ficou abaixo de 0,5 U/mL, atividade já atingida por este fungo filamentoso. A adição de substratos solúveis ao bagaço de cana-de-açúcar mostrou ser favorável à atividade de β -glicosidases, sendo o meio com a associação sorbitol-lactose-bagaço de cana-de-açúcar o de maior precocidade; entretanto, o contendo 0,75% (m/v) de sorbitol e 25% (m/v) de bagaço mostrou o maior pico de atividade (Figura 61).

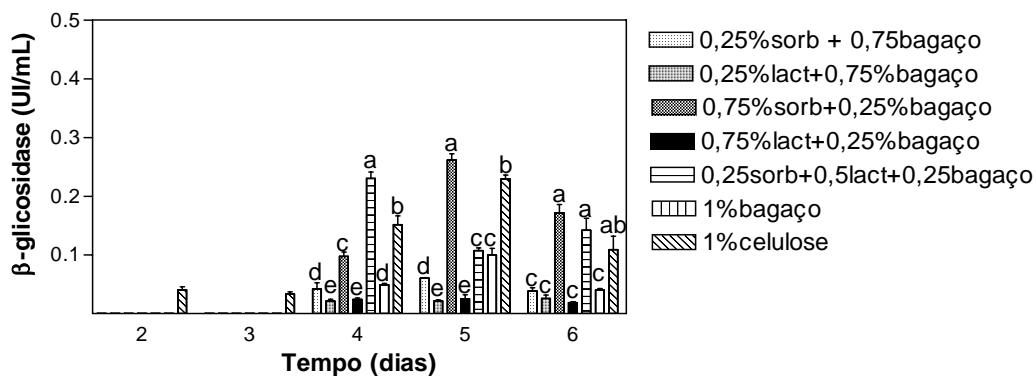


Figura 61. Atividade de β -glucosidases em cultivo de *Penicillium echinulatum* realizado em frascos sob agitação recíproca. Meios com atividades enzimáticas com letras semelhantes, em um mesmo dia, não diferem em nível de $p < 0,05$.

Cabe salientar que a utilização de bagaço de cana em substituição à celulose e a substituição dessas fontes de carbono insolúveis por fontes solúveis foi viável, apresentando vantagem em relação à produção enzimática e à utilização de fontes renováveis de matéria-prima.

5 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do presente trabalho, realizado com a linhagem 9A02S1 de *Penicillium echinulatum*, permite concluir que:

- parte da celulose utilizada na formulação do meio de produção de celulases pode ser substituída por fontes de carbono solúveis (sorbitol ou lactose) e insolúveis, como o bagaço de cana-de-açúcar. Entretanto, a produtividade volumétrica apresenta diminuição em função do consumo do sorbitol;
- o meio contendo 0,25% (m/v) de sorbitol e 0,75% (m/v) de celulose apresenta melhores resultados em termos de atividade de FPA em ensaios em frascos sob agitação e em biorreator *airlift*;
- o método DCCR (delineamento composto central rotacional) é eficaz para a determinação do melhor tempo de adição de celulose em cultivos iniciados com sorbitol;
- a adição, após o início do cultivo, de 10% de meio, é eficaz no aumento de atividade enzimática para cultivos em frascos sob agitação, em relação às enzimas FPA, endoglicanase e β -glicosidase;
- em cultivos realizados em biorreator com agitação mecânica, o meio contendo 1% (m/v) de celulose e 1% (m/v) de sorbitol apresenta os melhores resultados em termos de atividade de FPA, xilanase e β -glicosidase. A alimentação, em 48 horas, de 1,7% (m/v) de celulose em meio contendo 1% (m/v) de sorbitol é favorável à produção enzimática de FPA, endoglicanase e xilanase, em relação aos demais regimes de alimentação;
- quando a alimentação de 0,75% (m/v) de celulose ocorre após 36 horas de cultivo iniciado com 0,25% (m/v) de celulose, o pico de FPA é superior ao do meio contendo 2% (m/v) de celulose e igual ao do meio alimentado com 1% (m/v) de celulose em 26 horas, no cultivo iniciado com 1% (m/v) de sorbitol;
- há produção enzimática e de biomassa micelilal de *Penicillium echinulatum* em biorreator *airlift*;
- o regime descontínuo alimentado, com volume de meio variável, é eficiente para evitar a queda brusca da atividade enzimática; porém, influencia negativamente os títulos enzimáticos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahamed, A.; Vermette, P. (2008). Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* Rut C-30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochem. Eng.** 42: 41-46.
- Ahamed, A.; Vermette, P. (2009). Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. **Bioresour. Technol.** 100: 5979-5987.
- Alkasrawi, M.; Eriksson, T.; Wingren, A. (2003). The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 71-78.
- Al-Zuhair, S. (2008). The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. **Bioresour. Technol.** 99: 4078-4085.
- Bakker, W.A.M.; Van Can, H.J.L.; Tramper, J.; Gooijer, C.D. (1993). Hydrodynamics and mixing in a multiple airlift loop reactor. **Biotech. Bioeng.** 42: 994-1001.
- Bansal, P.; Hall, M.; Realff, M.J.; Lee, J.H.; Bommarius, A.S. (2009). Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnol. Adv.** 27: 833-848.
- Bello, R.A.; Robinson, C.W.; Moo-Young, M. (1985). Gas-holdup and overall volumetric oxygen transfer coefficient in airlift contactors. **Biotechnol. Bioeng.** 27: 369-381.
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.** 18: 355-383.
- Bittencourt, L.R.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2002). Aumento de produtividade na formação de celulases por *Penicillium echinulatum* em meio formulado com sorbitol. In: VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas. **Anais.** Maringá, 2002.
- Bommarius, A.; Katona, A.; Cheben, S.; Patel, A.; Ragausas, A.; Knudson, K.; Pu, Y. (2008). Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metab. Eng.** 10: 370-381.
- Brown, D.E.; Halsted, D.J. (1975). The effect of acid pH on the grown kinetics of *Trichoderma viride*. **Biotechnol. Bioeng.** 17: 1199-1210.
- Camassola, M.; Bittencourt, L.; Sehnem, N.; Andreus, J.; Dillon, A.J.P. (2004). Characterization of the cellulases complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatal. Biotransform.** 22: 391-396.

- Camassola, M.; Dillon, A.J.P. (2007). Effect of methylxanthines on production of cellulases by *Penicillium echinulatum*. **J. Appl. Microb.** 102: 478-485.
- Cerri, M.O.; Teodoro, J.C.; Ortiz, S.C.A.; Baptista-Neto, A.; Cruz-Hernandez, I.L.; Baldino Jr., A.C. (2005). Comparação entre biorreatores convencional e biorreator *airlift* de circulação interna para cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de ácido clavulânico. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais**. Recife, 2005.
- Chaabouni, E.S.; Belguith, H.; Hassairi, I.; Rad, K.M.; Ellouz, R. (1995). Optimization of cellulase production by *Penicillium occitanis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43: 267-269.
- Chahal, D.S. (1985). Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. **Appl. Environ. Microbiol.** 49: 205-210.
- Chahal, P.D.; Chahal, D.S.; Andre, G. (1992). Cellulase production profile of *Trichoderma reesei* on different cellulosic substrates at various pH levels. **J. Ferment. Bioeng.** 74: 126-128.
- Chipeta, Z.A.; Preez, J.; Christopher, L. (2008). Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 587-594.
- Chisti, M.Y.; Moo-Young, M. (1987). Airlift reactors: Characteristics, applications and design considerations. **Chem. Eng. Commun.** 60: 195-242.
- Chisti, Y. (1989). **Airlift bioreactors**. London: Elsevier Science Publishers. 355p.
- Costa, L.B.; Santos, S.F.M.; Souto-Maior, A.M. (2009). Avaliação do crescimento e produção de celulasas por *Trichoderma reesei* Rut C-30 em diferentes fontes de carbono. In: XVII Simpósio Brasileiro de Bioprocessos. **Anais**. Natal, 2009.
- Dillon, A.J.P. (2004). **Celulases**. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa. pp 243-269.
- Dillon, A.J.P.; Camassola, M.; Sehnem, N.; Bittencourt, L.R. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 163-167.
- Dillon, A.J.P.; Toresan, S.O.P.; Barp, L.P. (1992). Isolation of cellulase producing mutants from a *Penicillium* sp strain denominated 3MUV24. **Rev. Bras. Gen.** 15: 491-498.

- Domingues, F.C.; Queiroz, J.M.S.; Fonseca, L.P. (1999). The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulose production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 394-401.
- Druzhinina, I.S.; Schomoll, M.; Seiboth, B.; Kubicek, C. (2006). Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. **Appl. Environ. Microbiol.** 72: 2126-2133.
- Duan, X.Y.; Liu, S.Y.; Zhang, Q.X.; Gao, P.J. (2004). Volumetric productivity improvement for endoglycanase of *Trichoderma pseudokoingii* S-38. **J. Appl. Microbiol.** 96: 772-776.
- Fang, X.; Yano, S.; Inoue, H.; Sawayama, S. (2008). Lactose enhances cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. **J. Biosc. Bioeng.** 106: 115-120.
- Fazolo, A. (2001). Estimativa dos parâmetros cinéticos e de transferência de massa em um reator aeróbio de leito fixo utilizado no pós-tratamento de efluente anaeróbio. **Tese de doutoramento.** Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.
- Fontana, R.C.; Polidoro, T.A.; Silveira, M.M. (2009). Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresour. Technol.** 100: 4493-4498.
- Friedl, M.; Kubicek, C.; Druzhinina, I. (2008). Carbon source dependence and photostimulation of conidiation in *Hypocrea atroviridis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 74: 245-250.
- Ganesh, K.; Joshi, J.B.; Sawant, S.B. (2000). Cellulases desactivation in stirred reactor. **Biochem. Eng. J.** 4: 137-141.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulose activities. **Pure Appl. Chem.** 59: 257-268.
- Gluzcs, P.; Michalski, H. (1994). Cultivation of *Aspergillus niger* in a pilot plant external-loop airlift bioreactor. **FEMS Microbiol. Rev.** 14: 83-88.
- Gouveia, E.R.; Hokka, C.O.; Balduino Jr., A.C. (2003). The effects of geometry and operational conditions on gás holdup, liquid circulation and mass transfer in airlift reactor. **Braz. J. Chem. Eng.** 20: 363-374.
- Gupta, V.K.; Gaur, R.; Yadava, S.K.; Darmwall, N.S. (2009). Optimization of xylanase production from *Fusarium solani* F7. **Am. J. Food Technol.** 4: 20-29.

- Helle, S.S.; Duff, S.J.B.; Cooper, D.G. (1993). Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** 42: 611-617.
- Hendy, N.A.; Wilke, C.R.; Blanch, H.W. (1984). Enhanced cellulase production in fed batch culture of *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 73-77.
- Ilmén, M.; Saloheimo, A.; Onnela, M.; Penttilä, M.E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1298-1306.
- Juhász, T.; Egyházi, A.; Réczey, K. (2005). β -glucosidase production by *Trichoderma reesei*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 121: 243-254.
- Kim, S.W.; Kang, S.W.; Lee, J.S. (1996). Cellulase and xylanases production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresour. Technol.** 50: 63-67.
- Knopp, F.M.; Gottschalk, L.M.; Bom, E.P.S. (2009). Otimização de meio de cultivo para a produção de celulasas, xilanases e β -glicosidase pelo fungo *Trichoderma reesei* Rut C-30. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. **Anais.** Natal, 2009.
- Kumar, S.; Singh, S.P.; Mishra, I.M.; Adhikari, D.K. (2009). Recent advances in production of bioethanol from lignocellulosic biomass. **Chem. Eng. Technol.** 32: 517-526.
- Latifian, M.; Hamidi-Esfahani, Z.; Barzegar, M. (2007). Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresour. Technol.** 98: 3634-3637.
- Liming, X.; Xueliang, S. (2003). High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn COB residue. **Bioresour. Technol.** 91: 259-262.
- Lin, J.Q.; Lee, S.M.; Koo, Y.M. (2000). Modeling of typical microbial cell growth in batch culture. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** 5: 382-385.
- Magnelli, P.; Forchiassin, F. (1999). Regulation of the cellulase complex production by *Saccobolus saccoboloides*: Induction and repression by carbohydrates. **Mycologia.** 91: 359-364.
- Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. (1976). Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 6: 21-33.
- Mandels, M.; Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. **J. Bacteriol.** 73: 269-278.

- Mandels, M.; Weber, J. (1969). The production of cellulases. **Adv. Chem.** 95: 391-414.
- Mansfield, S.D.; Mooney, C.; Saddler J.N. (1999). Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Prog.** 15: 804-816.
- Martins, L.F.; Kolling, D.; Camassola, M.; Dillon, A.J.P.; Ramos, L.P. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresour. Technol.** 99: 1417-1424.
- Merchuk, J.C.; Contreras, J.A.; Garcia, J.; Molina, E. (1998). Studies of mixing in a concentric tube airlift bioreactor with different spargers. **Chem. Eng. Sci.** 53: 709-719.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Morikawa, Y.; Ohashi, T.; Monatani, O; Okada, H. (1995). Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 44: 106-111.
- Nidetzky, B.; Steiner, W.; Claeyssens, M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: Adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. **Biochem. J.** 303:817-823.
- Nitschke, M.; Pastore, G.M. (2002). Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Quím. Nova.** 25: 772-776.
- Noyola, T.; Torre, M. (2001). Regulation of cellulases and xylanases from a derepressed mutant of *Cellulomonas flavigena* growing on sugar-cane bagasse in continuous culture. **Bioresour. Technol.** 78: 285-291.
- Oliveira, F.J. (2005). Tratamento microbiológico de ar contaminado com hexano em biorreator *airlift*. **Tese de doutoramento**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- Pail, M.; Peterbauerz, T.; Seiboh, B.; Hametnere, C.; Druzhinina, I.; Kubicek, C.P. (2004). The metabolic role and evolution of L-arabinitol 4-dehydrogenase of *Hypocrea jecorina*. **Eur. J. Biochem.** 271: 1864-1872.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnol. Adv.** 22: 189-259.
- Pardo, A.G.; Forchiassin, F. (1999). Factors influencing β -glucosidase production, activity and stability in *Nectria catalinensis*. **Folia Microbiol.** 31: 41-44.

- Pedrini, M.R.S.; Furigo, A.; Souza, J.R.; Ninow, J. (1996). Construção e estudos hidrodinâmicos de um fermentador *airlift* com circulação externa. In: V Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. **Anais**. Maringá, 1996.
- Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. (2005). **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia seqüencial de planejamento**. 1 ed. Campinas: Casa do Pão. 326p.
- Rossi, M.J. (2006). Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *airlift*. **Tese de doutoramento**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.
- Ryu, D.Y.; Mandels, M. (1980). Cellulases: Biosynthesis and applications. **Enzyme Microb. Technol.** 2: 91-102.
- Said, S.; Pietro, R. (2002). **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Ribeirão Preto: Eventos.
- Samain, E.; Debeire, P.; Touzel, J.P. (1997). High level production of a cellulose-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* strain. **J. Biotechnol.** 58: 71-78.
- Sánchez, J. (1998). Colorimetric assay of alditols in complex biological samples. **J. Agric. Food Chem.** 46: 157-160.
- Schell, D.; Farmer, J.; Hamilton, J.; Lyons, B.; McMillan, J.; Saéz, J.; Tholudur, A. (2001). Influence of operating conditions and vessel size on oxygen transfer during cellulose production. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 91-93: 627-642.
- Schmidell, W.; Facciotti, M.C.R. (2001). **Biorreatores e processos fermentativos**. In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (Coord.). **Biotechnologia industrial**. Vol. 2. São Paulo: Edgard Blücher. pp 179-192.
- Schugerl, K.; Luke, J.; Oels, U. (1977). Bubble column bioreactors. **Adv. Biochem. Eng.** 7: 1-84.
- Sehnm, N. (2003). Efeito da utilização de sorbitol e celulose e de diferentes fontes de nitrogênio na produção de celulasas em *Penicillium echinulatum*. **Monografia**. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Sehnm, N.; Bittencourt, L.R.; Camassola, M; Dillon, A.J.P. (2006). Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 72: 163-167.

- Shanmughapriya, S.; Kiran, G.S.; Selvin, J.; Thomas, T.A.; Rani, C. (2009). Optimization, purification, and characterization of extracellular mesophilic alkaline cellulase from sponge-associated *Marinobacter* sp. MSI032. **Appl. Biochem. Biotechnol.** DOI: 10.1007/s12010-009-8747-0.
- Siegel, M.H.; Merchuk, J.C.; Schugerl, K. (1986). Airlift reactor analysis: Interrelationships between riser, downcomer, and gas-liquid separator behaviour, including gas recirculation effects. **AIChE J.** 32: 1585-1596.
- Silveira, M.M.; Jonas, R. (2002). The biotechnological production of sorbitol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 400-408.
- Silveira, M.M.; Molina, M.A.B. (2002). **Fermentação: Forma de valorização de resíduos agrícolas e agroindustriais.** In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. (Org.). **Biocologia: avanços na agricultura e na agroindústria.** Caxias do Sul: EDUCS. pp 203-209.
- Sobotka, M.; Prokop, A.; Dunn, I.I.; Einsele, A. (1982). **Review of methods for the measurement of oxygen transfer in microbial systems.** In: Tsao, G.T. (Ed.). **Annual reports on fermentation process.** London: Academic Press. pp 127-210.
- Sternberg, D.; Dorval, S. (1979). Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 181-191.
- Sternberg, D.; Mandels, G. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. **J. Bacteriol.** 139: 761-769.
- Sukan, F.V. (1998). Foaming: consequences, prevention and destruction. **Biotechnol. Adv.** 16: 913-948.
- Sun, Y; Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, **Bioresour. Technol.** 83: 1-11.
- Techapun, C.; Poosaran, N.; Watanabe, M.; Sasaki, K. (2003). Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulose-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. **J. Biosc. Bioeng.** 95: 298-301.

- Venzon, L.T. (2008). Determinação de manitol e reparação injetável por reação colorimétrica. **Monografia**. Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Verma, M.; Brar, A.; Tyagi, R.D.; Surampali, R.Y.; Valero, J.R. (2006). Dissolved oxygen as principal parameter for conidia production of biocontrol fungi *Trichoderma viride* in non-Newtonian wastewater. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 33: 941-952.
- Wang, H.Y. (1985). **Analysis of fermentation gases**. In: Moo-Young, M. **Comprehensive biotechnology: The principles, application and regulation of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Pergamon Press. pp 423-431.
- Watson, T.G.; Nelligan, I.; Lessing, L. (1984). Cellulase production by *Trichoderma reesei* (Rut C-30) in fed-batch culture. **Biotechnol. Lett.** 16: 667-672.
- Wen, Z.; Liao, W.; Chen, S. (2005). Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. **Process Biochem.** 40: 3087-3094.
- Ximenes, E.A.; Dien, B.S.; Ladisch, M.R.; Mosier, N.; Cotta, M.A.; Li, X.L. (2007). Enzyme production by industrially relevant fungi cultured on coproduct from corn dry grind ethanol plants. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 136-140: 171-184.
- Xiong, H; Weymarn, N; Turunen, O; Leisola, M; Pastinem, O. (2005). Xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 grown on L-arabinose-rich plant hidrolysates. **Bioresour. Technol.** 96: 753-759.
- Xiros, C.; Christakopoulos, P. (2009). Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. **Biotechnol. Biofuels.** 2: 1-12.
- Zhang, Q.; Lo, C.; Ju, L. (2007). Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Bioresour. Technol.** 98: 753-760.
- Znidarsic, P.; Pavko, P. (2001). The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. **Food Technol. Biotechnol.** 39: 237-252.