

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS
E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS E TECNOLOGIAS

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA AUTOMÁTICO DE
ALIMENTAÇÃO CONTROLADO PELO pH DO MEIO PARA
PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Penicillium echinulatum* S1M29 EM
REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO

Milena Pellin Morsoletto

Caxias do Sul, 2018

Milena Pellin Morsoletto

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA AUTOMÁTICO DE ALIMENTAÇÃO
CONTROLADO PELO pH DO MEIO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES POR
Penicillium echinulatum S1M29 EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, orientado por Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon e coorientado por Prof. Dra. Marli Camassola.

Caxias do Sul, 2018

Milena Pellin Morsoletto

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

M886d Morsolotto, Milena Pellin

Desenvolvimento de um sistema automático de alimentação controlado pelo pH do meio para produção de celulasas por *Penicillium echinulatum*S1M29 em regime descontínuo alimentado / Milena Pellin Morsolotto. – 2018.

63 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2018.

Orientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

Coorientação: Marli Camassola.

1. Celulose. 2. *Penicillium*. 3. pH (Química). 4. Etanol. I. Dillon, Aldo José Pinheiro, orient. II. Camassola, Marli, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 661.728.7

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Paula Fernanda Fedatto Leal - CRB 10/2291

“Desenvolvimento de um sistema automático de alimentação controlado pelo pH do meio para produção de celulasas por *Penicillium echinulatum* S1M29 em regime descontínuo alimentado.”

Milena Pellin Morsoletto

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais

Caxias do Sul, 20 de dezembro de 2018

Orientadores:

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Orientador

Universidade de Caxias do Sul

Profa. Dra. Marli Camassola

Coorientadora

Universidade de Caxias do Sul

Banca examinadora:

Prof. Dr. Adriano Brandelli

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna

Universidade de Caxias do Sul

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon e à Prof. Dra. Marli Camassola, pela orientação, paciência e ensinamentos;

À Roselei Claudete Fontana, técnica do Laboratório de Enzimas e Biomassas pelo excelente suporte técnico, essencial para a concretização desse trabalho;

A todos os colegas de laboratório, em especial a Rafael Galiotto Thains e Laísa dos Reis pelas contribuições e auxílios ao presente trabalho;

Ao Sidney G. O. Sobrinho, da Trendtech, pelo desenvolvimento da parte eletrônica do projeto;

Aos professores e colegas do PGEPROTEC por todo o aprendizado e aos funcionários pelo ótimo atendimento prestado;

Ao apoio estrutural da UCS e financeiro da Capes;

Finalmente, aos meus pais, Isabel e Flávio, ao meu namorado Marcelo e aos meus amigos pelo apoio incondicional durante essa jornada.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E O COMPLEXO ENZIMÁTICO DAS CELULASES E HEMICELULASES	13
3.2. PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES	16
3.2.1. Escolha do substrato indutor	16
3.2.2. Efeito do pH	17
3.2.3. Produção de celulases em regime descontínuo alimentado	18
3.2.4. Sistemas de alimentação condicionados ao pH	19
4. METODOLOGIA	20
4.1. LINHAGEM FÚNGICA	20
4.2. MEIOS DE CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS	20
4.3. CULTIVO EM FRASCOS SOB AGITAÇÃO RECÍPROCA PARA OBTENÇÃO DE INÓCULOS	20
4.4. CULTIVO EM BIORREATOR	21
4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÕES DE CELULOSE E ENZIMAS.....	23
4.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTADOR AUTOMÁTICO REGULADO PELO pH	25
5.2. CULTIVO EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE CELULOSE NA FAIXA DE pH 6,0-4,0 (CULTIVO 1)	27
5.2.1. Perfil de pH e concentração de celulose (Cultivo 1)	27
5.2.2. Atividades enzimáticas (Cultivo 1)	30
5.3. CULTIVO EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE CELULOSE NA FAIXA DE pH 6,0-5,0 (CULTIVO 2)	34
5.3.1. Perfil de pH e concentração de celulose (Cultivo 2)	34
5.3.2. Atividades enzimáticas (Cultivo 2)	36
5.4. CULTIVO EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE CELULOSE COM VALOR DE CONTROLE EM pH 6,0 (CULTIVO 3)	41
5.4.1. Perfil de pH e concentração de celulose (Cultivo 3)	41
5.4.2. Atividades enzimáticas (Cultivo 3)	43

5.5. CULTIVO EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE CELULOSE COM VALOR DE CONTROLE EM pH 6,0 E pH CONTROLADO POR 48 H (CULTIVO 4)	48
5.5.1. Perfil de pH e concentração de celulose (Cultivo 4).....	48
5.5.2. Atividades enzimáticas (Cultivo 4)	49
5.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS CULTIVOS 1, 2, 3 E 4.....	53
5.6.1. Perfil de pH e concentração de celulose	53
5.6.2. Atividades enzimáticas	55
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	56
7. REFERÊNCIAS	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 1)	30
Tabela 2. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 2)	37
Tabela 3. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 3)	43
Tabela 4. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 4)	50
Tabela 5. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivos 1, 2, 3 e 4)	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação do complexo enzimático de celulases (DILLON e CAMASSOLA, 2014).	14
Figura 2. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. D-Glucose (1), D-Galactose (2), L-Arabinose (3), D-Xilose (4), D-Manose (5), 4-O-Metil-D-Glucurônico (6) e L-Ramnose (7) (SJÖSTRÖM e WESTERNARK, 1999).	15
Figura 3. Esquema do alimentador, mostrando (1) o eixo de mistura, (2) a rosca transportadora, (3) a conexão do alimentador no biorreator, onde é colocada a resistência elétrica, e (4) local em que são conectados os motores elétricos, regulados pelo temporizador. (REIS, 2017).	21
Figura 4. Sistema de alimentação controlado pelo pH, contendo (1) o biorreator, (2) o alimentador, (3) a sonda de pH, (4) o controlador de pH Rovitec DosaMini 100, (5) o controlador universal de processos Novus N1100 e (6) o temporizador do alimentador.....	25
Figura 5. Perfil de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> em resposta à adição de celulose (Cultivo 1).....	28
Figura 6. Concentração de celulose e valores de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 1).....	29
Figura 7. Atividade FPA em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 1).	30
Figura 8. Atividade de endoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 1).....	31
Figura 9. Atividade de exoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 1).	32
Figura 10. Atividade de β -glicosidades em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 1).....	33
Figura 11. Atividade de xilanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 1).	34
Figura 12. Perfil de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> em resposta à adição de celulose (Cultivo 2).	35
Figura 13. Concentração de celulose e valores de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 2).....	36
Figura 14. Atividade FPA em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 2).	37
Figura 15. Atividade de endoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 2).....	38
Figura 16. Atividade de exoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 2).....	39
Figura 17. Atividade de β -glicosidades em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 2).....	40
Figura 18. Atividade de xilanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 2).	41

Figura 19. Perfil de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> em resposta à adição de celulose (Cultivo 3).	42
Figura 20. Concentração de celulose e valores de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 3).	43
Figura 21. Atividade FPA em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 3).	44
Figura 22. Atividade de endoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 3).	45
Figura 23. Atividade de exoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 3).	46
Figura 24. Atividade de β -glicosidades em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 3).	46
Figura 25. Atividade de xilanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 3)	47
Figura 26. Perfil de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> em resposta à adição de celulose (Cultivo 4).	48
Figura 27. Concentração de celulose e valores de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 4).	49
Figura 28. Atividade FPA em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 4).	50
Figura 29. Atividade de endoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 4).	51
Figura 30. Atividade de exoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 4).	52
Figura 31. Atividade de β -glicosidades em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 4).	52
Figura 32. Atividade de xilanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i> (Cultivo 4).	53

RESUMO

A produção de celulases é de grande interesse para aumentar a viabilidade econômica do etanol de segunda geração. Esse complexo contém três enzimas principais: endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases. Fungos filamentosos podem ser produtores eficientes de celulases, sendo um desses microrganismos *Penicillium echinulatum*. Celulases são produzidas geralmente em cultivos submersos e diferentes estratégias podem ser adotadas para aumentar a produtividade. Estudos anteriores mostram que a adição de um substrato indutor em regime descontínuo alimentado pode aumentar as atividades das celulases, assim como o pH ótimo. Foi reportado para outros fungos que quando não há controle de pH, o meio se acidifica enquanto a celulose é consumida e o pH aumenta quando há falta de substrato. Dessa forma, o pH do meio pode ser utilizado para controlar a adição de celulose. Nesse projeto, um sistema automático de alimentação controlado pelo pH do meio foi desenvolvido para adicionar celulose em cultivos de *Penicillium echinulatum* S1M29 em regime descontínuo alimentado. O sistema foi desenvolvido utilizando um controlador universal de processos Novus N1100 conectado a um sistema de controle de pH Rovitec DosaMini 100 e um temporizador conectado a um alimentador cilíndrico contendo celulose. Os resultados do presente trabalho demonstram que o sistema de alimentação automático funcionou adequadamente e quatro condições puderam ser testadas, obtendo atividades máximas de 1,4 U.mL⁻¹ (FPA), 11,5 U.mL⁻¹ (endoglicanase), 5,1 U.mL⁻¹ (exoglicanase), 5,1 U.mL⁻¹ (β -glicosidase) e 25,8 U.mL⁻¹ (xilanase). Uma relação inversa entre a concentração de celulose e o pH do meio foi observada, indicando que o pH pode estar relacionado ao metabolismo do fungo. As condições testadas não permitiram que alimentações múltiplas ocorressem, e baixos valores de pH e concentração de celulose interferiram negativamente nas atividades enzimáticas. Novas condições precisam ser testadas para aumentar a quantidade e a frequência de adição de celulose. O controle da queda do pH também deveria ser feito para melhorar as atividades enzimáticas.

Palavras-chave: *Penicillium echinulatum*, regime descontínuo alimentado, celulase, pH

ABSTRACT

The production of cellulases is of major interest in order to increase economic viability of second generation ethanol. This complex contains three major enzymes: endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. Filamentous fungi can be efficient cellulase producers, one of these microorganisms being *Penicillium echinulatum*. Cellulases are usually produced in submerged fermentation and different strategies can be adopted in order to increase productivity. Previous studies show that the addition of an inducer substrate in fed-batch can improve cellulase activities, so can the optimal pH. It has been reported for other fungi that when there is no pH control, the medium acidifies while cellulose is being consumed and the pH raises when there is lack of substrate, therefore, the pH of the medium can be used to control cellulose addition. In this project, an automatic feeding system controlled by the pH of the medium was developed to add cellulose in fed-batch submerged fermentation of *Penicillium echinulatum* S1M29. The system was developed using a universal controller Novus N1100 with a pH controlling system Rovitec DosaMini 100 and a timer connected to a cellulose cylindrical container. The results presented by this work demonstrate that the automatic feeding system controlled by the pH of the medium functioned properly and four different conditions could be tested, obtaining maximum enzymatic activities of 1.4 U.mL⁻¹ (FPase), 11.5 U.mL⁻¹ (endoglucanase), 5.1 U.mL⁻¹ (exoglucanase), 5.1 U.mL⁻¹ (β -glucosidase) and 25.8 U.mL⁻¹ (xylanases). An inverse relation between cellulose concentration and medium pH was observed, indicating that the pH can be related to the fungus metabolism. The tested conditions did not allow multiple feedings to happen, and low pH values and cellulose concentration interfered negatively in enzymatic activities. New conditions need to be tested in order to increase the amount and frequency of cellulose addition. Controlling pH decrease should also be performed to improve enzymatic activities.

Keywords: *Penicillium echinulatum*, fed-batch, cellulase, pH

1. INTRODUÇÃO

O complexo enzimático das celulasas consiste em um conjunto de enzimas encontradas de forma individualizada ou associada em fungos e bactérias. Além de permitir que esses seres vivos façam o aproveitamento da celulose como fonte de energia, as celulasas apresentam interesse biotecnológico com várias aplicações industriais como na indústria de alimentos, têxtil e papel e celulose.

Atualmente, o maior interesse do uso dessas enzimas é sua aplicação na produção de etanol lignocelulósico. De acordo com *The International Energy Association* (IEA, 2017), o investimento em energias renováveis deve crescer 150% ao ano, de 2015 a 2050, para atingir a meta do Acordo de Paris de assegurar um aumento médio de temperatura global abaixo de 2 °C até 2050, o que assegura que os investimentos em etanol de segunda geração devem aumentar nos próximos anos.

Para a viabilidade prática e econômica da produção de etanol lignocelulósico são importantes o custo da matéria-prima, a eficiência do processo de pré-tratamento da biomassa e a produção e a atividade das enzimas. Até 2014, o custo das enzimas em escala industrial para produção de etanol lignocelulósico foi estimado como sendo de sete a dez vezes maior que o dispendido na produção de etanol a partir da hidrólise do amido de milho. O decréscimo desse valor é esperado com melhorias contínuas na produção e na atividade das enzimas pelos fabricantes (SOUZA *et al*, 2015).

Os produtos comerciais, disponibilizados por Danisco A/S, DSM™, Novozymes® e Verenium™, principais empresas produtoras de celulasas, tratam-se de coquetéis enzimáticos concentrados contendo celulasas, β -glicosidases, hemicelulasas, pectinases e outras proteínas acessórias, sendo as celulasas obtidas principalmente de *Trichoderma reesei*. Embora os preparados comerciais apresentem elevada capacidade hidrolítica, novas melhorias na produtividade e no rendimento são determinantes para a redução dos custos de fabricação.

Em todas as empresas mencionadas, o processo de produção das enzimas utilizado é o cultivo submerso em biorreatores agitados. Para a produção das celulasas, o substrato indutor é de grande importância. A própria celulose, uma substância insolúvel, é o substrato indutor natural das celulasas. Outras fontes de carbono, principalmente dissacarídeos como: lactose, celobiose, sofrose, gentibiose e sacarose também têm sido avaliadas. No processo de produção das enzimas, aumentos de produtividade podem ser obtidos com emprego de maiores concentrações de indutor. Porém, concentrações elevadas do substrato indutor podem

influenciar negativamente a reologia do meio ou aumentar a liberação de glicose, causando repressão catabólica.

Para diminuir o impacto de altas concentrações do substrato indutor, estudos mostram que a adição intermitente ou fracionada de celulose em regime descontínuo alimentado é capaz de aumentar a produtividade enzimática. O controle da adição da celulose pode ocorrer manualmente ou por adição automática.

Cultivos com *T. reesei* mostraram que sem controle externo de pH o meio se acidifica, chegando a 2,4 (STERNBERG, 1976). Ao controlar o pH com adição de NH_4OH , observou-se que o consumo de NH_4^+ foi proporcional à quantidade de celulose adicionada. Ao final dos cultivos, houve aumento na concentração de NH_4^+ , resultante do catabolismo de proteínas internas, sinalizando carência de substrato (STERNBERG e DORVAL, 1979). Esse comportamento do pH, com queda durante o consumo de substrato e posterior estabilização, seguida de alta ao ocorrer esgotamento da fonte de carbono também foi observado por Bailey e Tahtiharju (2003) e utilizado como critério para alimentação de substrato em regime contínuo, com *T. reesei*. Estudos como este indicam que a adição de fonte de carbono indutora em regime descontínuo alimentado pode ser dependente do pH do meio, pois o mesmo pode ser um dos indicadores do estado metabólico do microrganismo.

Alguns gêneros de fungos filamentosos estão descritos como produtores das enzimas do complexo celulolítico como *Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Myceliophthora*, sendo *Trichoderma* o mais explorado comercialmente nos últimos 30 anos. (VAISHNAV *et al.*, 2018). Verifica-se que além de *Trichoderma*, linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium* estão presentes em 52% das publicações em revistas científicas sobre o tema, com um total de 62212 resultados, sendo 3276 publicados apenas em 2017 (PASSOS *et al.*, 2018).

Linhagens mutantes de *Penicillium echinulatum* vêm sendo estudadas, demonstrando uma característica catalítica vantajosa em relação a *T. reesei*, que consiste em apresentar maior proporção de β -glicosidases em relação à atividade FPA (MARTINS *et al.*, 2008). Já foram avaliadas as produtividades de celulases por *P. echinulatum* em meios sólido e líquido e em regimes descontínuo e descontínuo alimentado.

Uma vez que os benefícios da utilização do regime descontínuo alimentado (RDA) já são amplamente conhecidos, já existindo inclusive resultados com melhora na produtividade das celulases em linhagens de *P. echinulatum* utilizando RDA, no presente trabalho é apresentado um novo aporte ao processo de produção de celulases por esse fungo. A nova estratégia consiste na alimentação do substrato indutor ser controlada pelo pH do meio,

permitindo adições de acordo com as necessidades metabólicas do fungo, visando aumentar a produção enzimática.

Embora esta ideia não seja original, não há relatos da utilização do pH para controle de adição automática de celulose sólida e insolúvel na produção de celulases em regime descontínuo alimentado.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protótipo de um sistema de alimentação automático condicionado ao pH para produzir celulases de *Penicillium echinulatum* em biorreator de agitação mecânica operado em regime descontínuo alimentado.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver um sistema de controle que permita que o mecanismo de alimentação de celulose ao biorreator seja controlado pelo valor do pH do meio.
2. Realizar estudos de caso, produzindo celulases por *Penicillium echinulatum* em biorreator em regime descontínuo alimentado com adição de celulose controlada pelo pH.
3. A partir dos estudos de caso, determinar valores de pH para o controle da adição de celulose ao meio.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E O COMPLEXO ENZIMÁTICO DAS CELULASES E HEMICELULASES

A composição dos materiais lignocelulósicos é variada, mas inclui principalmente três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose e a hemicelulose, na parede da célula vegetal, estão incorporadas juntamente com a lignina constituindo matriz complexa que torna esta biomassa altamente recalcitrante (CHUNDAWAT *et al*, 2011; SHOWALTER, 1993).

A celulose é um polímero linear de alto peso molecular, formada por unidades de D-glicopirranose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas. Devido às suas unidades glicosil, a

macromolécula celulose apresenta ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, produzindo arranjos altamente cristalinos (PARK *et al.*, 2010; O'SULLIVAN, 1997).

As celulases são enzimas hidrolíticas relacionadas à degradação da celulose, sendo constituídas de celobiohidrolases (EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176), endoglicanases (EC 3.2.1.4) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21). As endoglicanases clivam a celulose aleatoriamente, gerando oligossacarídeos. As exoglicanases, ou celobiohidrolases, agem nesses oligossacarídeos liberando glicose ou celobiose, um dímero de glicose, podendo também agir em celulose microcristalina. As β -glicosidases hidrolisam a celobiose, liberando glicose. Esse sistema enzimático não é apenas um conjunto das três enzimas, mas possui uma capacidade de agir de maneira coordenada e eficiente para hidrolisar essa matéria-prima (LYND *et al.*, 2002). O mecanismo de ação do complexo enzimático das celulases é mostrado na Figura 1.

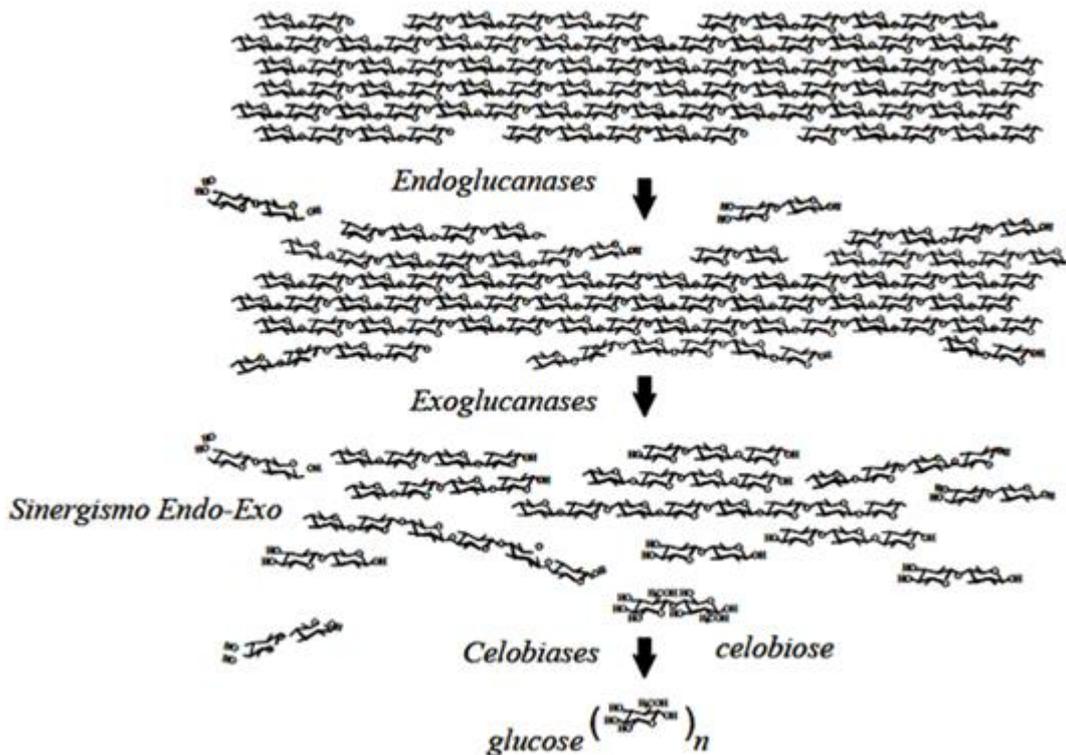


Figura 1. Mecanismo de ação do complexo enzimático de celulases (DILLON e CAMASSOLA, 2014).

A hemicelulose (Figura 2) trata-se de um polímero heterogêneo caracteristicamente rico em pentoses do tipo β -D-xilose e α -L-arabinose e hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose), além de ácidos urônicos (α -D-glicorônico, α -D-4-O-metilgalacturônico e α -D-ácido galacturônico). Na cadeia principal, os açúcares estão ligados por ligações β -1,4, mas podem ser encontradas ligações do tipo β -1,3-glicosídicas (SÁNCHEZ, 2009; JEFFRIES, 1994).

As enzimas que contribuem para a despolimerização da hemicelulose são principalmente as endoxilanases, β -xilosidases e as arabinofuranos. Estas enzimas, além da produção de etanol de segunda geração, também apresentam potencial biotecnológico para biobranqueamento da polpa de celulose, ao remover as hemiceluloses e para indústria de alimentos, na produção de xilitol (KUMAR e SHUKLA, 2016).

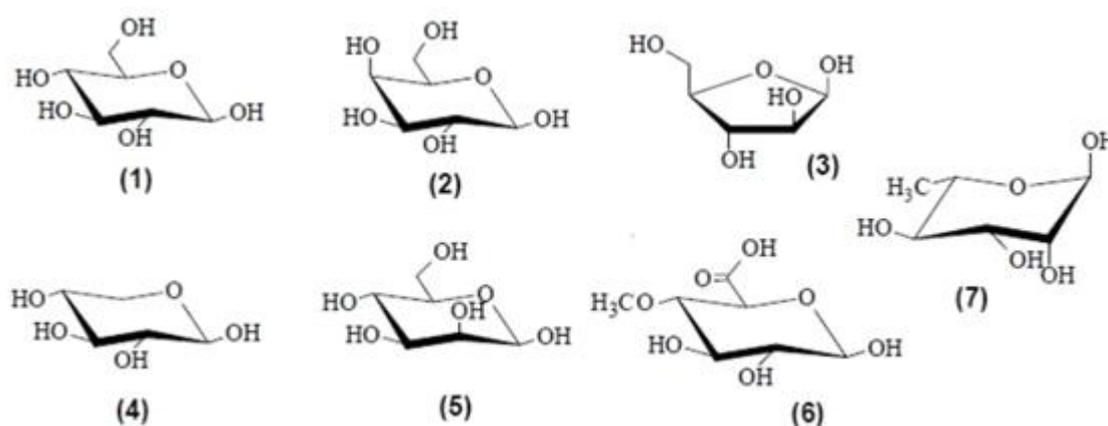


Figura 2. Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. D-Glucose (1), D-Galactose (2), L-Arabinose (3), D-Xilose (4), D-Manose (5), 4-O-Metil-D-Glucurônico (6) e L-Ramnose (7) (SJÖSTRÖM e WESTERNARK, 1999).

As endoxilanases (XYN - EC 3.2.1.8) estão envolvidas na hidrólise da xilana por clivagem de ligações glicosídicas β -1,4, liberando xilooligossacarídeos (XOs) (COLLINS *et al.*, 2005; KUMAR e SHUKLA, 2016). As β -xilosidases (XYL) atacam as extremidades não redutoras dos XOs para liberar xilose ou outros oligossacarídeos. As XYLs não somente degradam as XOs, mas também desempenham um papel importante na degradação da xilana, removendo a xilobiose (POLIZELI *et al.*, 2005). As XYLs também são capazes de mediar reações de transxilosilação (DILOKPI MOL *et al.*, 2011; BENASSI *et al.*, 2013; NIETO-DOMÍNGUEZ *et al.*, 2015; PAN *et al.*, 2001; XIA *et al.*, 2015).

As α -L-arabinofuranosidas (ABFs - EC 3.2.1.55) clivam as ligações α -L-arabinofuranosídicas entre os resíduos de arabinofuranose e xilose da cadeia central da xilana, de forma sinérgica para a completa hidrólise da fração de hemicelulose (NUMAN e BHOSLE, 2006).

O outro componente dos materiais lignocelulósicos é a lignina, um heteropolímero amorfo, insolúvel, composto por unidades de fenil-propano unidos por diferentes tipos de ligação. O principal objetivo da lignina é oferecer à planta suporte, impermeabilidade e proteção contra agentes externos (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). A presença da lignina

forma uma matriz hidrofóbica que dificulta o acesso de água e de enzimas aos demais polissacarídeos constituintes da biomassa vegetal (IIYAMA *et al.*, 1994).

3.2. PRODUÇÃO DE CELULASES E HEMICELULASES

As celulasas são enzimas produzidas por diversos organismos, sendo as de origem microbiana, produzidas por bactérias e fungos, intensamente estudadas. As celulasas microbianas são obtidas industrialmente pela indução da secreção da enzima por microrganismos. Porém, elevadas concentrações de indutores podem causar repressão catabólica. Dessa forma, para aumentar a produtividade dessas enzimas e, conseqüentemente torná-las viáveis economicamente, diversos parâmetros devem ser avaliados. Dentre essas variáveis, incluem-se as modificações genéticas dos organismos, o desenvolvimento do processo, os diferentes regimes, substratos e formulações de meio e os parâmetros de controle como pH, temperatura e oxigênio dissolvido. (DILLON e CAMASSOLA, 2014).

3.2.1. Escolha do substrato indutor

As celulasas são um complexo enzimático induzível. A celulose é reconhecida por ser o melhor indutor do complexo enzimático como um todo, mas diversas fontes de carbono já foram testadas e reportadas na literatura a fim de encontrar diferentes indutores (RYU e MANDELS, 1980)

Mandels *et al.* (1962) verificaram a capacidade indutora da soforose para *Trichoderma viride*, e essa fonte de carbono mostrou ser 2500 vezes mais ativa que a celobiose. Rho *et al.* (1982) avaliaram 21 carboidratos como indutores para a produção de celulasas e hemicelulasas por *Schizophyllum commune*. Desses 21, tiocelobiose, carboxi-metil-celulose, celobiose e xilana induziram as três enzimas testadas (carboxi-metil-celulasas, β -glicosidades e xilanases), sendo a tiocelobiose o indutor que apresentou melhores resultados. Já a gentibiose e a tiogentibiose foram avaliadas como indutoras em *Penicillium purpurogenum* (KURASAWA *et al.*, 1992), e a gentibiose fez o papel tanto de indutor quanto de fonte de carbono, enquanto a tiogentibiose apenas apresentou função indutora, não sendo consumida pelo microrganismo.

A produção de celulasas por *Penicillium echinulatum* já foi avaliada utilizando lactose como substrato em cultivo submerso (SEHNEN *et al.*, 2006). A lactose, por ser solúvel, não interferiu na reologia do meio e não causou repressão catabólica, porém a atividade FPA só

atingiu valores de $0,1 \text{ U.mL}^{-1}$, enquanto combinações de celulose e lactose chegaram à atividade de $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$. Camassola e Dillon (2007) produziram celulasas e xilanasas em cultivo em estado sólido, tendo bagaço de cana e farelo de trigo como substrato, obtendo atividades FPA de $32,89 \text{ U.g}^{-1}$. Reis (2017) analisou diferentes materiais lignocelulósicos para substituir 50% da celulose empregada em cultivos. Foram testados o bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e capim elefante em frascos, e o bagaço de laranja e o capim elefante se destacaram como potenciais substitutos.

3.2.2. Efeito do pH

Sternberg (1976) verificou que 12 horas após a inoculação de *T. reesei*, em biorreatores com meios contendo 2% (m/v) de celulose, o meio se acidifica, podendo chegar a pH 2,5 se não ocorrer controle. Adicionalmente, verificou que o controle do pH permitiu aumentar os títulos enzimáticos. Entretanto, o pH ideal para maior atividade FPA não foi o mesmo para maior atividade de β -glicosidases.

Sternberg e Dorval (1979) realizaram cultivos em *T. reesei* utilizando concentrações de até 8% (m/v) de celulose, com pH controlado pela adição de NH_4OH . A dosagem de NH_3 no meio mostrou que quanto maior a concentração de celulose, maior a sua depleção no meio. Ao final dos cultivos, houve liberação de NH_4^+ pelo fungo, resultante do catabolismo de proteínas internas, sinal de falta de substrato, ocasionando aumento do pH do meio.

O efeito do pH foi estudado por Tangnu et al. (1981) em relação à produção de celulasas pela linhagem *T. reesei* RUT C30 em biorreator com pH controlado. Foi observado que numa faixa de pH de 4,0 a 6,0 não ocorreu efeito significativo na taxa de produção, mas houve alteração na atividade de β -glicosidases. Com valores de pH de 4,0 e 5,0, a atividade de β -glicosidases aumentou gradualmente até o oitavo dia de cultivo.

Estudos da variação da expressão de celulasas e xilanasas em *P. echinulatum* S1M29 em função do pH foram relatados por Reis et al. (2014) em frascos e em biorreator. Os dados obtidos nos dois casos foram compatíveis, apresentando maior atividade de FPA, endoglicanasas e xilanasas em pH entre 5,5 e 7,0, e para β -glicosidases, em pH entre 4,0 e 6,0. Porém, esse estudo apenas avaliou o pH ótimo de produção das enzimas, não demonstrando a relação entre o pH do meio e a quantidade de substrato disponível. Para *P. echinulatum* 9A02S1, foram avaliados o uso de tampões citrato e acetato e foi determinado que o pH ótimo para obtenção de maiores atividades FPA foi de 4,8 e de β -glicosidases entre 4,0 e 4,5 (CAMASSOLA et al., 2004).

3.2.3. Produção de celulasas em regime descontínuo alimentado

A adição fracionada de substrato em biorreator, que caracteriza o regime descontínuo alimentado, é uma estratégia para o aumento da produtividade de enzimas, uma vez que diminui as inibições por substrato e produto, bem como problemas de agitação e aeração, se comparado ao regime descontínuo. (ESTERBAUER *et al.*, 1991)

Hendy *et al.* (1982) utilizaram esse regime para diminuir o efeito da alta concentração de celulose na transferência de massa. Essa limitação permitia que a atividade enzimática aumentasse proporcionalmente em relação à concentração de celulose apenas até uma concentração de 50 a 60 g.L⁻¹, como reportado por Sternberg e Dorval (1979). Nos experimentos, os cultivos submersos, nas primeiras 48 horas, foram feitos em regime descontínuo com uma concentração inicial de 20 g.L⁻¹ de celulose (Solka Floc). Após 48 horas, foi adicionada Solka Floc para atingir concentrações maiores que 20 g.L⁻¹, com adições se repetindo a intervalos de 10 a 20 horas. Nesta sistemática, adições totalizando 150 g.L⁻¹ de Solka Floc foram feitas, resultando em valores de FPA próximos de 30 U.mL⁻¹, após 12 dias de cultivo.

Watson *et. al* (1984) aperfeiçoaram o regime descontínuo alimentado desenvolvido por Hendy *et. al.* (1982). Uma etapa inicial em regime descontínuo também foi empregada, por 42 horas com 20 g.L⁻¹ de celulose. Três vazões de alimentação foram desenvolvidas, com oxigenação sempre acima de 20% da saturação e controle do pH acima de 4,0 pela adição de NH₄OH 4 mol.L⁻¹. As alimentações foram feitas adicionando pequeno volume do meio do cultivo na celulose em pó e adição da mistura ao fermentador assepticamente. Ocorreram adições duas vezes ao dia em intervalos de 8 e 16 h, para as vazões de 0,25 e 0,50 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, e para a vazão de 1 g.L⁻¹.h⁻¹ as adições ocorreram a cada 8 h. Nesse trabalho as atividades máximas alcançadas superaram as obtidas por Hendy *et. al.* (1982), chegando a valores de 57. U.mL⁻¹

Reis *et al.* (2013) realizaram estudo comparativo entre regime descontínuo e regime descontínuo alimentado com 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de celulose em cultivos com *P. echinulatum*. Os resultados indicaram claramente que o processo de regime descontínuo alimentado provocou aumento nos títulos enzimáticos de FPA, que chegaram a 8,3 U.mL⁻¹ para o cultivo que totalizou 40 g.L⁻¹ de celulose. Em regime descontínuo, para a mesma concentração de celulose, a atividade foi de apenas 4,0 U.mL⁻¹. No mesmo estudo, os autores observaram que a atividade de β-glicosidases não apresentou diferença nos regimes descontínuo ou descontínuo alimentado para a mesma concentração de celulose. Tal observação também foi

feita por Kim *et al.* (1997), uma vez que o regime descontínuo alimentado não aumentou a atividade de β -glicosidases para *A. niger*.

No estudo de Reis *et al.* (2013), a alimentação foi realizada de forma manual. Dessa forma, Reis (2017) desenvolveu um sistema de alimentação automático, conectando o alimentador a um temporizador, que realizava adições de celulose periodicamente. As atividades máximas obtidas para FPA, endoglicanases, exoglicanases, β -glicosidases e xilanases foram, respectivamente, de 14 U.mL⁻¹, 116 U.mL⁻¹, 10,8 U.mL⁻¹, 4,7 U.mL⁻¹ e 1032 U.mL⁻¹ para cultivos em pH controlado em 6,0 e um total de 60 g.L⁻¹ de celulose adicionados.

3.2.4. Sistemas de alimentação condicionados ao pH

Observações feitas em cultivos em regime descontínuo para produção de celulases mostraram que a produção mais eficiente de enzimas por *T. reesei* ocorreu durante a diminuição da concentração de substrato e, ao mesmo tempo, a tendência de acidificação do meio diminuía, passando a haver um aumento no pH do meio nesse momento. Bailey & Tahtiharju (2003) basearam-se nessas observações para automatizar a adição de meio rico em lactose em cultivo em regime contínuo. Para isso, foi criado um diagrama de controle que calculava a variação da quantidade de base adicionada a cada 5 minutos. Quando esse valor estava abaixo de um valor de controle, mais meio com lactose era adicionado. Ao aumentar a variação, a adição do meio era interrompida. A estratégia resultou em produção contínua até 150 h, sendo a eficiência do processo comprometida após esse período devido à constante oscilação do metabolismo do fungo entre as fases de crescimento e esgotamento de substrato.

Além do trabalho com celulases, essa estratégia de alimentação foi observada por outros autores. Suzuki *et al.* (1990) avaliaram o crescimento de *Protomonas extorquens* sp. K adicionando metanol como substrato quando o pH do meio ultrapassasse o valor de 7,0, notando que a estratégia de alimentação funcionava, porém, maiores valores de crescimento só eram obtidos quando a quantidade de metanol alimentada era de 5 g por pulso. A produção de 2,3-butanodiol em regime descontínuo alimentado com adição de sacarose controlada pelo pH foi avaliada por Silveira *et al.* (1998), a fim de evitar inibição pelo substrato em *Klebsiella pneumoniae*, atingindo maiores concentrações de produto, produtividade e conversão. Kim *et al.* (2004) combinaram a alimentação exponencial com a alimentação controlada pelo pH, adicionando glicose a cultivos de *E. coli*, resultando em elevada concentração de células. Todavia, nesse estudo, a adição controlada pelo pH precisou ser combinada com a alimentação exponencial, uma vez que apenas a adição pelo pH causava elevada produção de acetato, que inibia o crescimento.

Considerando os resultados obtidos pelos autores na literatura analisada, verifica-se que a alimentação em regime descontínuo alimentado condicionada ao pH pode ser uma estratégia válida. Entretanto, não foram encontradas informações sobre desenvolvimento de um sistema automático de alimentação de celulose sólida controlada pelo pH do meio, que foi a proposta desenvolvida no presente trabalho.

4. METODOLOGIA

4.1. LINHAGEM FÚNGICA

Para a produção de celulasas e xilanases foi utilizada a linhagem S1M29 (DILLON *et al.*, 2011) de *Penicillium echinulatum* obtida a partir da linhagem 9A02S1, depositada no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (DSM 18942).

4.2. MEIOS DE CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DE LINHAGENS

Para a manutenção da linhagem foi utilizado o meio ágar-celulose (C-agar), 40 mL de celulose intumescida, 10 mL de solução salina; 0,1g proteose peptona (Oxoid L85); 2 g ágar e 50 mL de água destilada.

O meio líquido para a produção de inóculo foi constituído de 5 g.L⁻¹ de celulose *Celuflok*; 1 g.L⁻¹ de sacarose; 1,4 g.L⁻¹ sulfato de amônio; 2 g.L⁻¹ de farelo de soja; 5 g.L⁻¹ de farelo de trigo; 0,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura Prodex®; 1 mL.L⁻¹ de surfactante *Tween 80*; 50 mL.L⁻¹ da solução mineral de Mandels & Reese (1957) e água destilada para completar o volume de 100 mL. (REIS *et al.*, 2013).

Os frascos foram autoclavados a 120 °C e 1.10⁵ Pa por 20 minutos antes da inoculação.

4.3. CULTIVO EM FRASCOS SOB AGITAÇÃO RECÍPROCA PARA OBTENÇÃO DE INÓCULOS

Os inóculos foram crescidos por 48 horas em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL do meio líquido inoculados com 1 mL de 1 x10⁷ conídios.mL⁻¹, mantidos a 28°C, com agitação recíproca a 180 rpm (REIS *et al.*, 2013). Após as 48h, cinco frascos foram adicionados ao cultivo em biorreator, representando 10% do volume total do reator.

4.4. CULTIVO EM BIORREATOR

O biorreator utilizado nos cultivos foi desenvolvido em parceria entre a Universidade de Caxias do Sul e Senai/Mecatrônica. Ele apresenta cuba de vidro com volume operacional de 5L e 28 cm de altura e 20 cm de diâmetro. A agitação ocorre por meio de uma turbina feita de aço inoxidável, em forma de “U”, com 15,3 cm de altura e 12,6 cm de largura, e apresenta aletas em seu corpo. O biorreator possui três chicanas. Sua tampa, que permite a conexão do alimentador, eletrodos, turbina, antiespumante, bombas ácido e base e outras entradas e saídas, também é confeccionada em aço inoxidável.

O alimentador automático foi desenvolvido por Reis (2017), é composto de um cilindro de inox e apresenta uma rosca transportadora e um eixo de mistura, ambos ligados a um motor elétrico e acionados por um temporizador (Figura 3). Quando acionado, o temporizador movimenta tanto a rosca transportadora, que é responsável pela adição de celulose no cultivo, quanto o eixo de mistura, que impede que a celulose se acumule apenas em uma região do cilindro de inox. O temporizador é configurado definindo o tempo de alimentação e o tempo de intervalo entre as alimentações. No presente trabalho, o tempo de alimentação selecionado foi de 3 s e o intervalo entre as alimentações de 60 min. Na conexão do alimentador com o biorreator é colocada uma resistência com a finalidade de impedir que a celulose acumulada na saída do alimentador absorva umidade e cause entupimento do sistema.

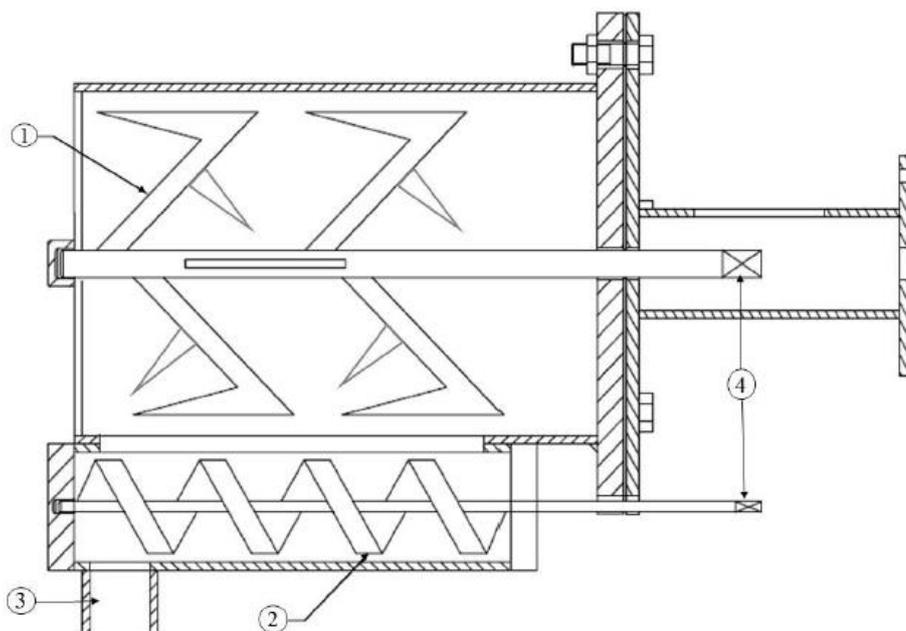


Figura 3. Esquema do alimentador, mostrando (1) o eixo de mistura, (2) a rosca transportadora, (3) a conexão do alimentador no biorreator, onde é colocada a resistência elétrica, e (4) local em que são conectados os motores elétricos, regulados pelo temporizador. (REIS, 2017).

Os ensaios no biorreator foram feitos em regime descontínuo alimentado. Os meios para os ensaios no biorreator tiveram a mesma composição que o meio para obtenção do inóculo, observadas as proporções para um volume final de 5 L. Apenas a concentração inicial de celulose variou entre cada cultivo, sendo de 5 g.L^{-1} nos cultivos 1 e 2, nenhuma celulose inicial adicionada no cultivo 3 e 10 g L^{-1} no cultivo 4. O reator e o alimentador contendo a celulose a ser adicionada foram autoclavados a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e 1.10^5 Pa por 1h.

O cultivo foi alimentado com quantidades variadas de celulose *Celuflok*, utilizando o alimentador em função do pH. O pH do meio foi acompanhado por pHmetro Rovitec DosaMini com eletrodo de vidro e foi o determinante para o acionamento ou desligamento do temporizador. A escolha da faixa de pH para alimentação, presença ou ausência de controle externo de pH e momento do início da alimentação foi baseada no próprio comportamento do pH em cada cultivo, visando melhorias na quantidade de alimentações e tempo de resposta. Dessa forma, os critérios estabelecidos foram:

- Cultivo 1: faixa de alimentação entre os pHs 6,0 e 4,0, sem controle externo de pH por bombas de ácido e base, com a alimentação iniciada no tempo 0.
- Cultivo 2: faixa de alimentação entre os pHs 6,0 e 5,0, sem controle externo de pH por bombas de ácido e base, com a alimentação iniciada somente quando o pH do meio atingiu o valor de 6,0.
- Cultivo 3: faixa de alimentação fixa no pH 6,0, sem controle externo de pH por bombas de ácido e base, com a alimentação iniciada somente quando o pH do meio atingiu o valor de 6,0.
- Cultivo 4: faixa de alimentação fixa no pH 6,0, pH fixo em 6,0 nas primeiras 48h por adições de ácido e base com bombas externas de pH, com o alimentador conectado somente em 48h e alimentação iniciada somente quando o pH do meio atingiu o valor de 6,0.

A frequência dos agitadores mecânicos do biorreator foi variada entre 150 e 250 rpm e a aeração entre 0,5 e 2,0 vvm a fim de manter uma concentração de oxigênio dissolvido entre 30% e 100% da saturação (REIS *et al.*, 2013). A temperatura foi estabelecida na faixa de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Aos cultivos foi adicionado antiespumante à base de silicone a fim de controlar a formação de espuma, sendo inicialmente adicionadas algumas gotas, antes do início do cultivo e, posteriormente durante o cultivo, adicionado conforme a necessidade.

Os cultivos no biorreator foram mantidos por um período de 7 dias, conforme experimentos prévios (REIS *et al.*, 2013), tendo sido observados seus padrões de variação de

pH e frequência de alimentação para determinar o encerramento. Sendo assim, o Cultivo 1 foi encerrado em 164 h, o Cultivo 2 em 160 h e os Cultivos 3 e 4 em 168 h. Foram feitas duas coletas de 12 mL diariamente, armazenadas em tubos de centrífuga com 1 μ L de azida sódica 20% (m/v) por mL de amostra para conservação sob congelamento.

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÕES DE CELULOSE E ENZIMAS

A concentração de celulose nas amostras foi obtida pelo método de Updegraff (1969), porém em vez de quantificar a celulose por método espectrofotométrico, a quantificação foi feita por método gravimétrico, conforme modificado por Ahamed *et al.* (2008). Dessa forma, um volume de 10 mL de amostra foi centrifugado a 4000 rpm por 30 minutos e após remoção do sobrenadante, os pellets do precipitado foram suspensos em solução com ácido acético e ácido nítrico, permanecendo em banho por 30 min a 100 °C. Os pellets foram lavados com duas porções de 10 mL de água destilada, após resfriamento, em um papel filtro seco com massa previamente determinada. Para determinar a massa da celulose, o papel foi seco a 50 °C por 48 h e pesado novamente. Assim, desconta-se o valor inicial do papel e a quantidade em gramas é convertida em $g L^{-1}$.

Para determinação de FPA, foi utilizado o procedimento descrito por Ghose (1987) modificado conforme Camassola e Dillon (2012). Em placa de polipropileno com poços de capacidade de 1,5 mL cada, foram adicionados 10 μ L de solução enzimática e 140 μ L de tampão citrato de sódio 0,05 $mol.L^{-1}$ pH 4,8. Após banho em 50 °C por 10 minutos, foram adicionados a cada poço 5 mg de papel filtro, e a placa permaneceu em banho de 50 °C por mais 60 minutos. A reação foi interrompida com 300 μ L de DNS e colocada em banho de 100 °C por 5 minutos. A absorbância foi medida em 545 nm em placa de poliestireno com 96 poços de capacidade de 0,4 mL, após adição de 100 μ L da solução, foi completado o restante do volume com água. A determinação da atividade foi feita a partir de construção de curva de calibração de glicose com concentrações de 0 a 2,0 $mg.m.L^{-1}$.

Para a atividade de endoglicanases, também se utilizou a metodologia descrita por Ghose (1987), modificada por Camassola e Dillon (2012), de maneira semelhante à determinação por FPA, sendo a diferença, a adição de 50 μ L de solução de carboximetilcelulose 2% (m/v), previamente aquecida a 50°C, sendo as placas de polipropileno de 1,5 mL, mantidas por 30 minutos em banho a 50°C, com posterior dosagem dos açúcares redutores utilizando DNS.

A atividade das exoglicanases foi determinada utilizando-se a metodologia de Deshpande *et al.* (1984), empregando o ρ -nitrofenil- β -D-cellobiosídeo (ρ NPC) como substrato. Foram adicionadas em placas de poliestireno de 96 poços, com volume de 0,4 mL, 10 μ L da solução enzimática e 90 μ L de ρ NPC 1 mg.m.L⁻¹. As placas foram incubadas a 50°C por 30 minutos, com interrupção por adição de 200 μ L de Na₂CO₃ a 100 g. .L⁻¹. Posteriormente, foi feita a leitura da absorbância de ρ -nitrofenol, em 405 nm, para quantificação espectrofotométrica.

Para quantificar a atividade de β -glicosidases foi empregada a metodologia descrita por Chahal (1985), com modificações nos volumes. A mistura reacional consistiu de 10 μ L de solução enzimática, 40 μ L de tampão citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ pH 4,8 e 50 μ L da solução de salicina 1% (m/v) que foram adicionadas em poços de placa de poliestireno de 96 poços com volume de 0,4 mL. As placas contendo essas soluções foram colocadas em banho a 50°C, por 30 minutos. Posteriormente houve a adição de 300 μ L de solução do reagente DNS que interrompeu a reação, e a placa foi colocada em banho a 100°C, por 5 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, foi feita a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 545 nm. A determinação da atividade ocorreu como para FPA.

A determinação da atividade de xilanases foi realizada empregando 90 μ L de solução de xilana (*oat spelts*) 1% (m/v), a qual permaneceu sob agitação em banho a 50 °C em placa de polipropileno de 96 poços com capacidade de 1,5 mL cada. Ao poço foi acrescentado mais 10 μ L da solução enzimática para um tempo de reação de 5 minutos. Após, a reação foi interrompida com a adição de 300 μ L da solução do reagente DNS e os poços foram colocados em banho a 100°C, por 5 minutos. As amostras foram diluídas e medidas como para FPA. Os açúcares redutores liberados foram dosados com o uso do reagente DNS e a absorbância das preparações foi medida em espectrofotômetro a 545 nm. As concentrações de xilanases presentes nas amostras foram determinadas através de curva de calibração construída a partir de uma solução 0,01 M, conforme Bailey *et al.* (1992).

As unidades de FPA, endoglicanases, exoglicanases, β -glicosidases e xilanases foram definidas como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ M de açúcar redutor por minuto (MILLER, 1959).

4.6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os cálculos das atividades enzimáticas foram elaborados numa planilha do Excel, e os gráficos, utilizando-se o *software* PrismGraphPad. Não foi possível a análise de variância, pois os experimentos em biorreator não tiveram repetição.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESENVOLVIMENTO DE ALIMENTADOR AUTOMÁTICO REGULADO PELO pH

Baseando-se nos trabalhos de Sternberg e Dorval (1979) e Bailey & Tahtiharju (2003), utilizando o alimentador descrito por Reis (2017), foi desenvolvido um sistema de alimentação controlado pelo pH.

Dessa forma, foi necessária a introdução de um Controlador Universal de Processos N1100 da marca Novus, para relacionar o pH medido por um sistema de controle de pH Rovitec DosaMini 100 ao temporizador do alimentador. O pH era medido pelo pHmetro, enviando um sinal elétrico para o controlador que, dependendo da configuração escolhida, ativava ou desativava o temporizador do alimentador. O esquema do sistema é apresentado na Figura 4.

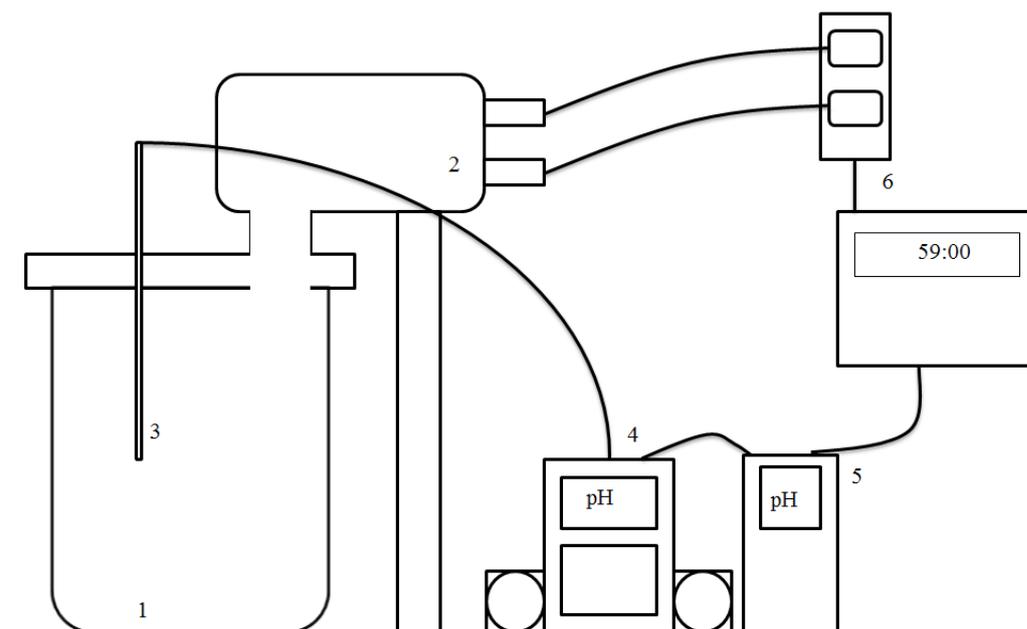


Figura 4. Sistema de alimentação controlada pelo pH, contendo (1) o biorreator, (2) o alimentador, (3) a sonda de pH, (4) o controlador de pH Rovitec DosaMini 100, (5) o controlador universal de processos Novus N1100 e (6) o temporizador do alimentador.

Para configurar o controlador, foi utilizado o *software* NConfig, em um computador. Utilizando o programa, foi possível estabelecer valores de pH em que o temporizador do alimentador funcionava ou não. Para isso, primeiramente foi escolhido um valor de pH para controle (*setpoint*), que é o valor mínimo de pH necessário para iniciar o acionamento do temporizador. Ao estabelecer-se um valor de controle, o funcionamento do sistema era simples: se o pH estivesse acima desse valor, o temporizador do alimentador funcionava normalmente; se estivesse abaixo, o temporizador era desativado, não ocorrendo alimentação.

Além do valor de controle, um limite inferior também poderia ser estabelecido. Dessa forma, a alimentação ocorria em uma faixa de pH, não apenas em um valor fixo. Se o pH do meio estivesse acima do valor de controle, ou em queda, entre o valor de controle e o limite inferior, o temporizador era ativado. Ao atingir o limite inferior, o temporizador era desativado e só voltava a ser acionado quando o pH do meio atingisse novamente o valor de controle.

Dentre as limitações do controlador do sistema, a primeira é que os valores medidos não são registrados. Dessa forma, algumas variações de pH ou mesmo algumas alimentações podem passar despercebidas, caso não sejam acompanhadas. Logo, o perfil de pH do cultivo, bem como as frequências de alimentação têm seu registro limitado aos horários de coletas de amostras.

O acoplamento do controlador impediu o funcionamento das bombas de ácido e base do sistema de controle de pH. Sendo assim, as alimentações ocorreram em pH livre. Reis *et al.* (2014) relataram a variação de pH em função do tempo para cultivos de *P. echinulatum* em frascos, e observaram que nas primeiras 48 h o pH tende a cair, atingindo valores abaixo de 3,0. Isso pode acarretar baixos valores de atividades enzimáticas, uma vez que no mesmo trabalho o pH ótimo para produção de enzimas do complexo das celulases em biorreator foi estabelecido como sendo entre 5,5 e 6,5.

Por fim, como a alimentação é dependente do pH e o meio se encontra em pH livre, não há como prever quando a alimentação irá ocorrer, podendo ocasionar longos períodos sem ativação do temporizador. No mesmo biorreator utilizado no presente trabalho, Reis (2017) observou entupimento no sistema quando ocorria um longo tempo de espera para a alimentação, uma vez que a celulose na saída do alimentador absorve umidade do meio. O entupimento ocorre mesmo com a resistência instalada em volta do bocal do alimentador, com o propósito de prevenir a absorção de umidade. Dessa forma, se o meio de um cultivo levar muitas horas para atingir o valor de controle, o controlador ativará o temporizador do

alimentador, mas pouca celulose poderá ser adicionada devido a essa limitação do equipamento.

Para testar o funcionamento do sistema, bem como sua aplicabilidade em cultivos longos e avaliar a resposta do *P. echinulatum* a cultivos em regime descontínuo alimentado em pH livre com alimentação dependente do pH, foram realizados quatro cultivos em biorreator. O valor de controle em todos os cultivos foi estabelecido em pH 6,0, pois é o pH ótimo de produção das enzimas. O limite inferior, a concentração inicial de celulose e as condições para início da alimentação foram variados de acordo com o perfil de pH apresentado, sendo os resultados desses cultivos discutidos nos próximos itens.

5.2. CULTIVO EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE CELULOSE NA FAIXA DE pH 6,0-4,0 (CULTIVO 1)

5.2.1. Perfil de pH e concentração de celulose (Cultivo 1)

Em um primeiro cultivo no biorreator, cujos dados de pH constam na Figura 5, a faixa de pH entre 4,0 e 6,0 foi escolhida para o acionamento da alimentação. A concentração inicial de celulose no biorreator foi de 5g.L^{-1} , não havendo controle externo do pH por adição de ácido e base. O alimentador foi conectado e acionado no tempo 0, permanecendo em funcionamento até o pH atingir um valor abaixo de 4,0, que ocorreu em 24h. Novas alimentações não voltaram a ocorrer até o encerramento em 164h. A quantidade total de celulose adicionada durante as alimentações foi de 112 g, dessa forma, o cultivo totalizou $27,4\text{g.L}^{-1}$ de celulose.

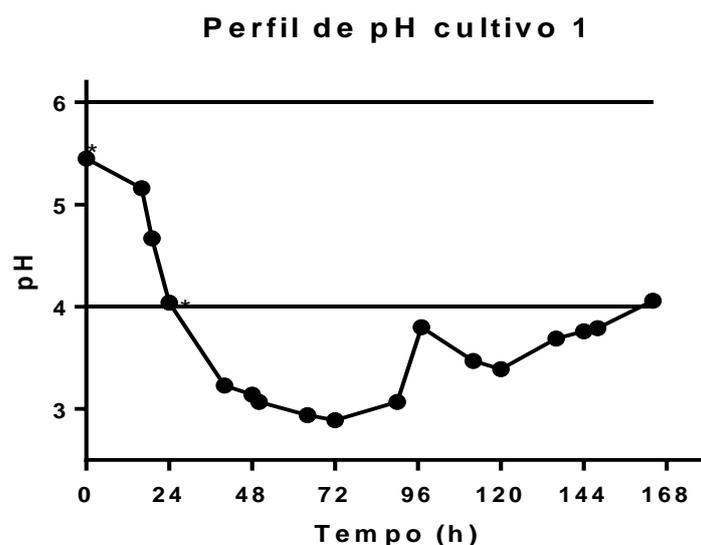


Figura 5. Perfil de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* em resposta à adição de celulose (Cultivo 1).

Verifica-se que houve queda do pH de seu valor inicial de 5,4 até o valor de 2,9, em 72h, mostrando que, conforme relatado para *T. reesei* (STERNBERG & DORVAL, 1979), o metabolismo da celulose por *P. echinulatum* acarreta queda do pH. Após a queda do pH, observou-se seu aumento até o valor 3,8, em 96h. Posteriormente uma nova queda até 3,4 em 120h e elevação até 4,1 em 160h, quando o cultivo foi encerrado. Como o pH do meio não voltou a atingir 6,0, não ocorreu nova alimentação.

As variações do pH observadas na Figura 5 são indicações da possibilidade de controlar a adição de celulose pelo pH durante cultivos em regime descontínuo alimentado com celulose para a produção de celulases por *P. echinulatum*.

Ao observar-se a concentração de celulose no cultivo 1 (Figura 6), a maior concentração ocorre em 24h, de 15 g L^{-1} . Esse resultado pode ser explicado, pois neste cultivo o sistema de alimentação já funcionou no tempo 0 indo até às 24h, quando o meio atingiu pH inferior a 4,0, interrompendo a alimentação. Logo, em 24h, além da celulose inicial (5 g.L^{-1}) presente no meio, também havia celulose adicionada pelo alimentador. Após o período de 24h iniciais de cultivo, não havendo mais adição de celulose, a concentração decresceu, devido ao consumo pelo fungo. O máximo de celulose em 24 h é justificado, tanto pelas adições de celulose, quanto pelo consumo paralelo de sacarose, não havendo um consumo proporcional à celulose adicionada. Conforme relatado por Reis *et al.* (2013), a sacarose, quando adicionada no meio de cultivo de *P. echinulatum* em biorreator em regime descontínuo e descontínuo alimentado, é consumida praticamente em sua totalidade nas primeiras 24 h de cultivo. Dessa

forma, somente após grande parte da sacarose ser consumida, o microrganismo passa a consumir a celulose em maior quantidade.

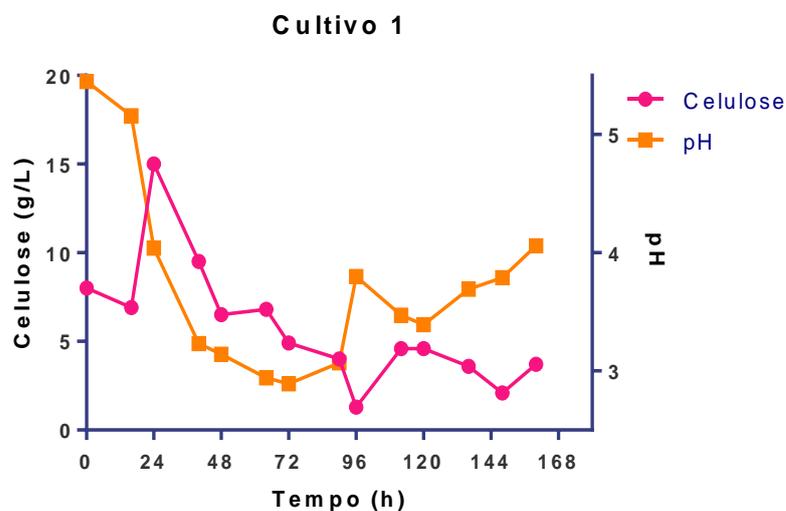


Figura 6. Concentração de celulose e valores de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 1).

Ao analisar-se o pH em conjunto com a concentração de celulose no Cultivo 1 (Figura 6), observa-se que há uma tendência inversa entre os dois parâmetros. No tempo de 24h, onde há o máximo da concentração de celulose, também há queda do pH do meio, de 5,2 em 16h para 4,1 em 24h.

Após 90 h a concentração de celulose permanece inferior a 5 g.L^{-1} , com pequenas oscilações. Enquanto essa concentração permaneceu num nível menor, o pH começou a subir. Esse perfil de variação sugere que em um cultivo de *P. echinulatum* sem controle de pH, a queda do pH está relacionada a um consumo de celulose, e que a elevação é consequência da carência de celulose.

Essa relação já foi descrita por Bailey & Tahtiharju (2003), em que os autores afirmam que fungos filamentosos, durante seu crescimento e consumo da fonte de carbono, apresentam queda de pH no meio e, após o esgotamento dessa fonte, o pH volta a subir. Esse mecanismo é exatamente o que pode viabilizar a alimentação condicionada pelo pH: o sistema só receberá mais celulose quando o pH subir a um determinado nível estipulado, como consequência do consumo da celulose.

O tempo de resposta do pH no presente cultivo foi elevado. Uma queda mais rápida do pH interromperia a alimentação, causando menor acúmulo de celulose no meio. Da mesma forma, um brusco aumento do pH exigiria alimentações antes das 160h.

5.2.2. Atividades enzimáticas (Cultivo 1)

As atividades enzimáticas máximas observadas no Cultivo 1 e seus respectivos tempos são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 1)

	FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	β-glicosidades (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
Valor Máximo	1,2	11,5	3,1	5,1	13,4
Tempo (h)	112	148	148	148	112

A variação da atividade FPA no Cultivo 1 é mostrada na Figura 7, verificando-se que as enzimas responsáveis pela atividade FPA tiveram aumento considerável na sua produção a partir de 24h. Após encerramento da alimentação, o crescimento permaneceu, com oscilações até o máximo de 1,2 U.mL⁻¹, momento em que o pH do meio estava em 3,5. A partir de 112h, a atividade tendeu a diminuir até 160h, com exceção de um pequeno aumento em 148h.

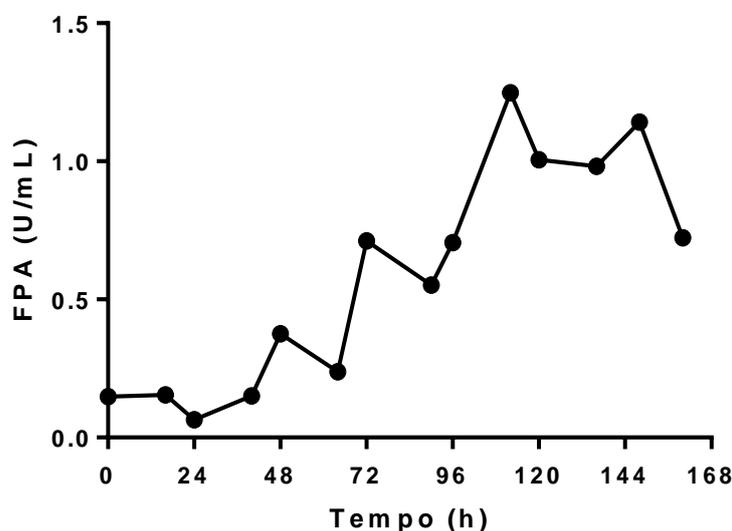


Figura 7. Atividade FPA em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 1).

Ao compararem-se as atividades FPA obtidas no presente trabalho com atividades já reportadas de *P. echinulatum* em RDA, Reis (2017) obteve 14 U.mL⁻¹, em 216 h, pH controlado em 6,0 e concentração de celulose totalizando 60 g.L⁻¹. Já Reis *et al.* (2014), ao variar o pH em cultivos em regime descontínuo com concentração de celulose chegando a 10

g.L^{-1} (1% m/v) obtiveram valores máximos de atividade FPA $1,81 \text{ U.mL}^{-1}$ com pH 6,0 em 96 h. Porém, ao observarem-se os resultados em pH 4,0, próximo ao pH da atividade máxima do Cultivo 1, a atividade máxima reportada foi de $0,43 \text{ U.mL}^{-1}$. Dessa forma, verifica-se que tanto o pH ótimo quanto maiores concentrações de celulose induzem maior atividade FPA. Porém, mesmo em pH desfavorável, o Cultivo 1 apresentou melhores atividades do que cultivos em RD na mesma faixa de pH.

Considerando as atividades de endoglicanases no cultivo (Figura 8), constata-se um aumento em 48h com posterior crescimento de forma gradual, com oscilações, apresentando seu máximo de $11,5 \text{ U.mL}^{-1}$, em 148h, com pH do meio em 3,8 e sendo a maior atividade de endoglicanases de todos os cultivos.

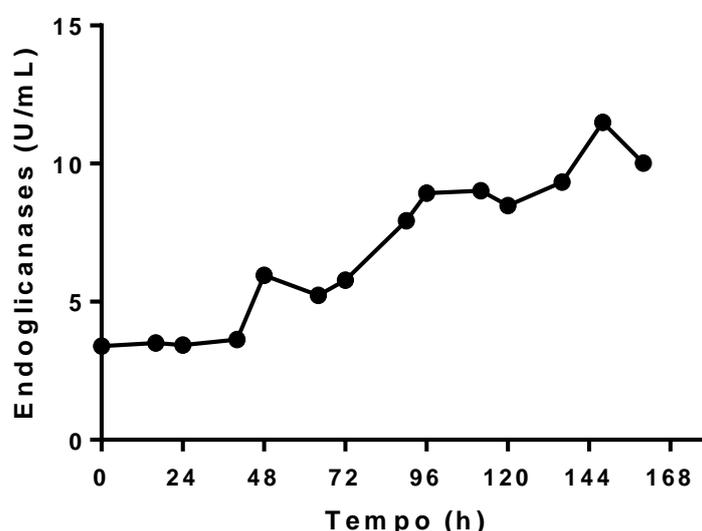


Figura 8. Atividade de endoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 1).

Considerando as atividades obtidas nos cultivos em RD em diferentes pHs e concentração de celulose em 10 g.L^{-1} realizados por Reis *et al.* (2014), o cultivo 1 superou os valores tanto no pH próximo de 4,0 ($5,4 \text{ U.mL}^{-1}$ em 92h), quanto no pH ótimo de 6,0 ($10,2 \text{ U.mL}^{-1}$ em 96h), sugerindo que o regime descontínuo alimentado causa maior indução dessa enzima, mesmo em pH desfavorável. Porém, a atividade máxima obtida por Reis (2017) em RDA com pH controlado em 6,0 e concentração total de celulose de 60 g.L^{-1} foi de 116 U.mL^{-1} , em 208 h, verificando a importância de uma adição contínua de substrato durante o regime descontínuo alimentado.

Para as exoglicanases (Figura 9), a atividade começa a crescer em 48h, atingindo seu máximo de $3,1 \text{ U.mL}^{-1}$ em 148h, com pH do meio em 3,8. Uma vez que a atividade das

exoglicanases é liberar celobiose a partir dos fragmentos de polímeros gerados pelas endoglicanases (LYND *et al.*, 2002), a baixa produção dessas enzimas nas primeiras 48h de cultivo é esperada, visto que a produção de endoglicanases nesse período também foi baixa. De uma maneira geral, ambas enzimas apresentaram perfis semelhantes de atividade, apresentando, inclusive, seus picos em 148h.

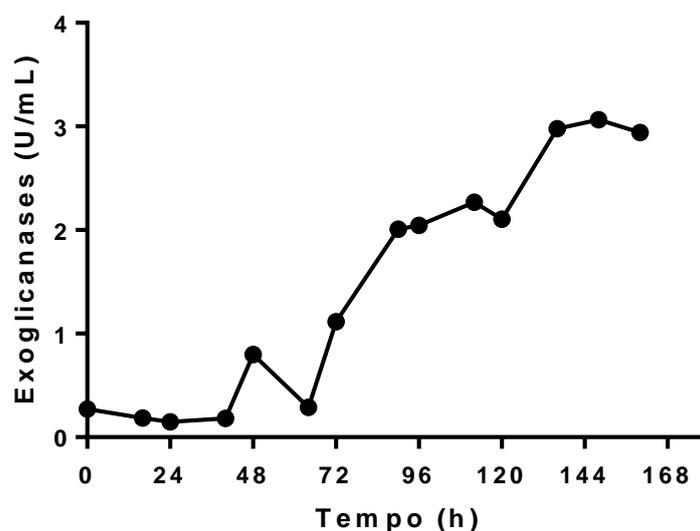


Figura 9. Atividade de exoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 1).

As exoglicanases não foram avaliadas em regime descontínuo em diferentes pHs por Reis *et al.* (2014), não sendo possível fazer comparações com as atividades em diferentes faixas de pH. Porém, em RDA chegando a 60 g.L^{-1} de celulose e pH controlado em 6,0, a atividade de exoglicanases foi de $10,8 \text{ U.mL}^{-1}$ em 216h (REIS, 2017). A elevada concentração de celulose certamente foi de grande importância para a obtenção de maiores produtividades de exoglicanases, pois, uma vez que mais celulose foi adicionada, maiores produções de endoglicanases ocorreram, acarretando a liberação de substratos para a ação da exoglicanases.

Dessa forma, embora a atividade das exoglicanases não seja exercida diretamente sobre a celulose não hidrolisada, a adição de celulose provoca indução de produção de endoglicanases, que liberam o substrato necessário para a atividade das exoglicanases, tornando a atividade desse grupo de enzimas dependente, de forma indireta, da adição de celulose.

A atividade de β -glicosidades (Figura 10) mostrou-se pequena nas primeiras 48h. Após as 48h, a atividade das β -glicosidases começou a aumentar, justamente quando as endoglicanases já estão com atividades elevadas (Figura 9) e já existindo atividade de

exoglicanases (Figura 8). As β -glicosidades também atingiram seu máximo de $5,1 \text{ U.mL}^{-1}$ em 148h, com pH do meio em 3,5.

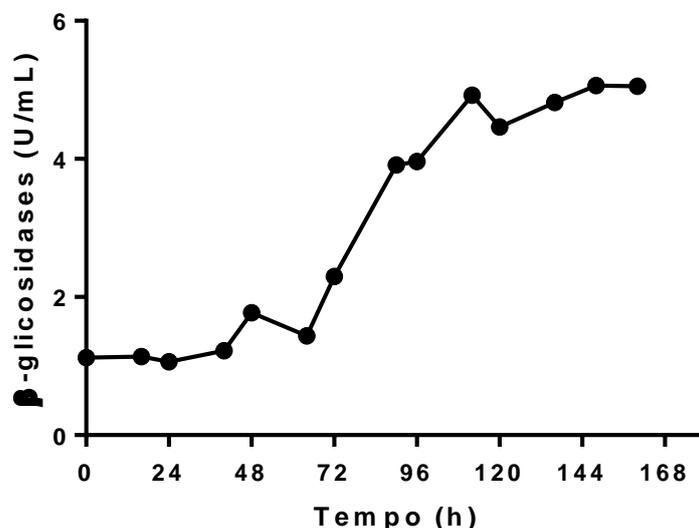


Figura 10. Atividade de β -glicosidases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 1).

Ao avaliarem a atividade de β -glicosidases em diferentes pHs, Reis *et al.* (2014) obtiveram atividade máxima de $0,67 \text{ U.mL}^{-1}$ em pH 5,5 em 96h e 10 g.L^{-1} de celulose. Ao variarem a concentração de celulose, Reis *et al.* (2013) alcançaram atividades de $5,8 \text{ U.mL}^{-1}$ com concentrações de celulose em 60 g.L^{-1} , tanto em RD quanto em RDA, em 168h. Já nos cultivos em RDA de Reis (2017), em que as demais enzimas apresentaram atividades muito maiores do que as do presente trabalho, a atividade máxima de β -glicosidases foi de $4,7 \text{ U.mL}^{-1}$ em 216h com total de 60 g.L^{-1} de celulose.

A condução dos cultivos com controle da adição de celulose pelo pH pode trazer vantagens nos processos de produção de β -glicosidases, uma vez que os valores obtidos no presente trabalho ($5,1 \text{ U.mL}^{-1}$) ocorreram com menor dispêndio de celulose e sem controle externo de pH. Além disso, o máximo de atividade de β -glicosidases foi anterior, pois ocorreu em 148h, em comparação com 168h observados em Reis *et al.* (2013) e 216h em Reis (2017). Em tempo similar de 135h, Li *et al.* (2013) obtiveram atividade de $4,5 \text{ U.mL}^{-1}$ com *T. reesei*, porém a quantidade de celulose alimentada totalizou 80 g.L^{-1} .

Quanto às xilanases (Figura 11), há início de produção em 24h, apresentando uma queda em 48 e 64h e voltando a crescer em 72h até seu máximo de $13,4 \text{ U.mL}^{-1}$ em 112h, momento em que o pH do meio estava em 3,5, com oscilações, mas tendência de queda até o final do cultivo.

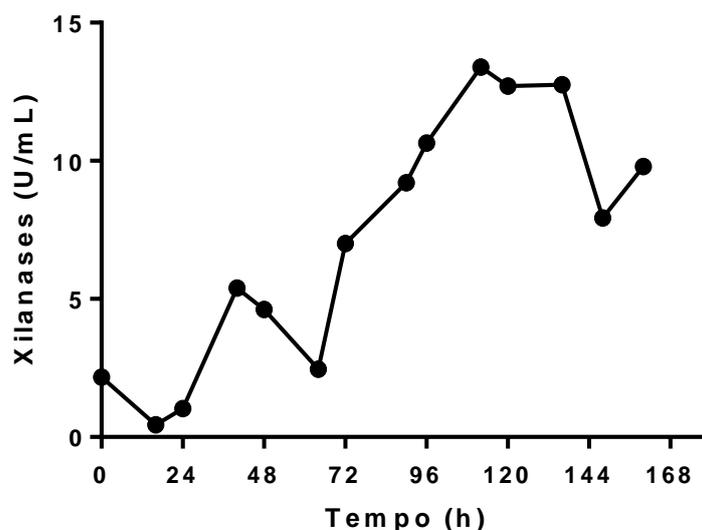


Figura 11. Atividade de xilanases em regime descontínuo alimentado da linhagem SIM29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 1).

Comparando os resultados do Cultivo 1 com cultivos em RD em diferentes pHs (Reis *et al.*, 2014), observa-se que no pH ótimo de 6,0 a atividade máxima foi de $33,5 \text{ U.mL}^{-1}$ em 96h, e no pH próximo (4,0) de $13,1$ em 68h, ambos com concentração de celulose de 10 g.L^{-1} . Já em RDA, Reis (2017) obteve atividades de 1032 U mL^{-1} em 216h e 60 g.L^{-1} de celulose. Assim como para atividade FPA, também se observa que para as xilanases tanto o pH ótimo quanto maiores concentrações de celulose no meio beneficiam sua produção, sendo esses dois fatores potenciais justificativas para produções enzimáticas inferiores às já reportadas para *P. echinulatum* em cultivo submerso em biorreator.

5.3. CULTIVO EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE CELULOSE NA FAIXA DE pH 6,0-5,0 (CULTIVO 2)

5.3.1. Perfil de pH e concentração de celulose (Cultivo 2)

Em um segundo experimento, cujos dados de pH são apresentados na Figura 12, a faixa de pH 6,0-5,0 foi escolhida para alimentação, para que houvesse interrupção da adição de celulose já em pH 5,0, visando diminuir a quantidade de substrato alimentada, provocando uma resposta mais rápida do sistema, em relação ao experimento anterior.

A nova alimentação foi programada para ocorrer somente quando o pH atingisse 6,0, na tentativa de iniciar a alimentação com maior consumo da celulose já adicionada ao meio. Neste segundo cultivo, a concentração inicial de celulose foi 5 g.L^{-1} e não houve controle de pH por sistemas de bombas para alimentação de ácido e base. A quantidade total de celulose

adicionada durante as alimentações foi de 38 g, dessa forma, o cultivo totalizou 12,6 g.L⁻¹ de celulose.

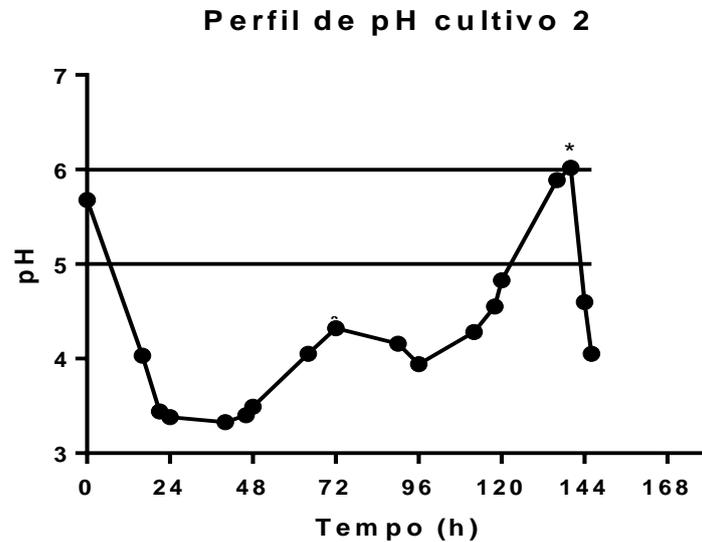


Figura 12. Perfil de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* em resposta à adição de celulose (Cultivo 2).

A análise da Figura 12 também mostra a existência de uma queda do pH até o valor 3,3 em 40h, que reforça a tese de que o consumo de celulose do meio leva à queda do pH. Verificou-se uma elevação no pH a partir de 50h, apresentando pH 4,3 em 72h, ocorrendo uma nova medida apenas em 90h, quando então o pH estava no valor 4,2. A queda do pH entre 72 e 90h pode ser explicada pelo consumo da celulose cristalina após o uso da celulose amorfa. Esse comportamento ocorre, pois primeiramente o microrganismo consome a celulose amorfa, por estar mais disponível no meio, e somente após o esgotamento dessa forma de celulose, passa a consumir a celulose cristalina.

A partir de 90h verificou-se uma elevação no pH e em 140 h o pH voltou a atingir o valor de controle, acionando o temporizador e o alimentador. Em 144h, o pH já estava abaixo do limite inferior de 5,0 (4,6) e, portanto, com alimentação já interrompida. Neste experimento o cultivo foi encerrado em 160 h.

A ocorrência de queda no pH nas primeiras 40h no Cultivo 2 (Figura 13) foi acompanhada pela diminuição geral da concentração de celulose, embora graficamente haja eventuais oscilações. A partir de 48h, a concentração de celulose permaneceu baixa, mas o pH começou a subir, mais uma confirmação de que a variação do pH pode ser relacionada com o consumo ou a ausência de substrato no meio.

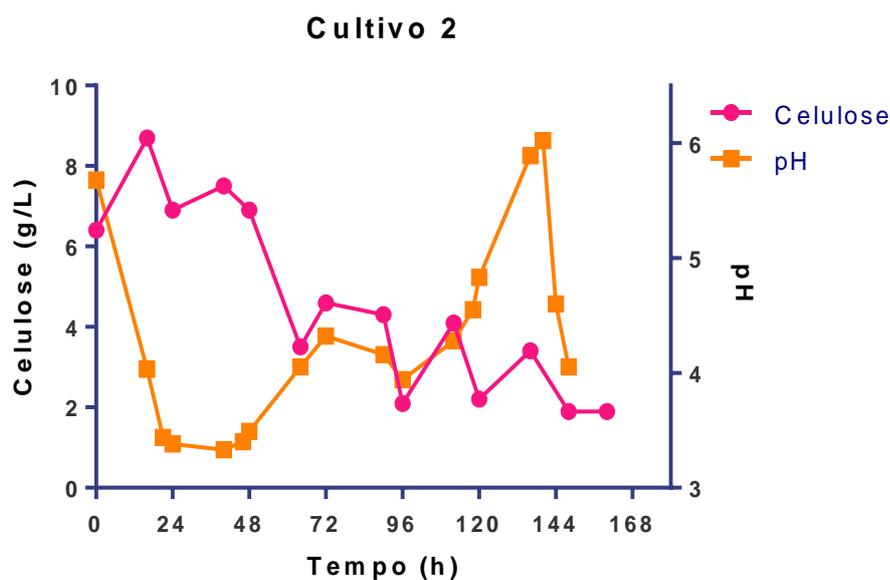


Figura 13. Concentração de celulose e valores de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 2).

Já em 140h, momento em que foi observada a chegada do pH ao valor de controle, não foi coletada amostra. As coletas foram realizadas em 136 h ($3,4 \text{ g.L}^{-1}$) e 148 h ($1,9 \text{ g.L}^{-1}$). As explicações para não se observar esse aumento seriam, o entupimento do sistema, conforme relatado nas limitações do sistema de alimentação, ou o consumo do substrato adicionado, que teria ocorrido antes da próxima amostragem.

Ao fim desse cultivo, observou-se que uma menor concentração de celulose foi adicionada e o comportamento cíclico do pH foi demonstrado. Porém, mesmo ao estabelecer a adição de celulose somente ao atingir o valor de controle e reduzir o limite inferior, não foi possível obter uma resposta mais rápida do sistema. Esses dados indicam que a concentração inicial de celulose demora muito para ser consumida pela pequena concentração microbiana presente nas primeiras horas do cultivo.

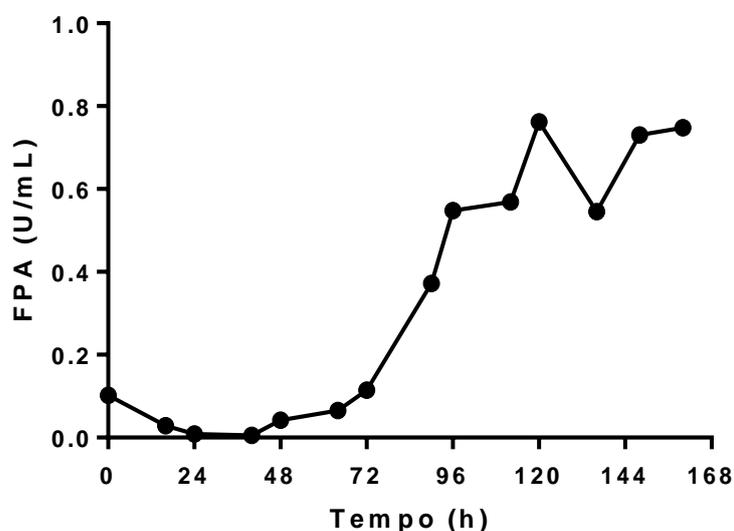
5.3.2. Atividades enzimáticas (Cultivo 2)

As atividades enzimáticas máximas observadas no Cultivo 2 e seus respectivos tempos são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 2)

	FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	β-glicosidades (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
Valor					
Máximo	0,8	10,3	3,1	4	18,9
Tempo (h)	120	148	160	136	160

A atividade FPA (Figura 14) foi quase inexistente até 48 horas. Como observado anteriormente, esse cultivo apresentou queda mais acentuada de pH nas primeiras 48 horas. A baixa atividade de FPA está de acordo com as observações de Li *et al.* (2013), que verificaram para *T. reesei* um pH favorável de 4,5 para as enzimas responsáveis pela atividade FPA, ou seja, valores inferiores a 4,5 poderiam ser desfavoráveis. Dessa forma, a atividade enzimática só começou a aumentar após as 48h, paralelamente à elevação do pH, atingindo seu valor máximo de 0,8 U.mL⁻¹ em 120h, quando o pH do meio estava em 4,8.

**Figura 14.** Atividade FPA em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 2).

No Cultivo 2, a atividade FPA reportada foi semelhante à obtida por Reis *et al.* (2014), com 10 g.L⁻¹ de celulose em RD em pH 5,0, que foi 0,7 U.mL⁻¹ em 112 h. Ao comparar-se a atividade FPA no pH ótimo de 6,0 (1,81 U.mL⁻¹ em 96h) relatada no mesmo trabalho, ou a obtida em RDA (REIS, 2017) com pH controlado em 6,0 e 60 g.L⁻¹ de celulose

(14 U.mL⁻¹, em 216h), novamente observa-se a importância do pH ótimo, bem como de maiores concentrações de celulose para a atividade FPA.

Para as endoglicanases (Figura 15) o cultivo apresentou um crescimento linear na atividade até 112h, com queda em 120 e 136h e novo aumento em 148h e esse aumento ocorreu justamente após a alimentação, entre 136 e 144h. O máximo é atingido em 148h, com atividade de 10,3 U.mL⁻¹ e pH no meio de 4,0

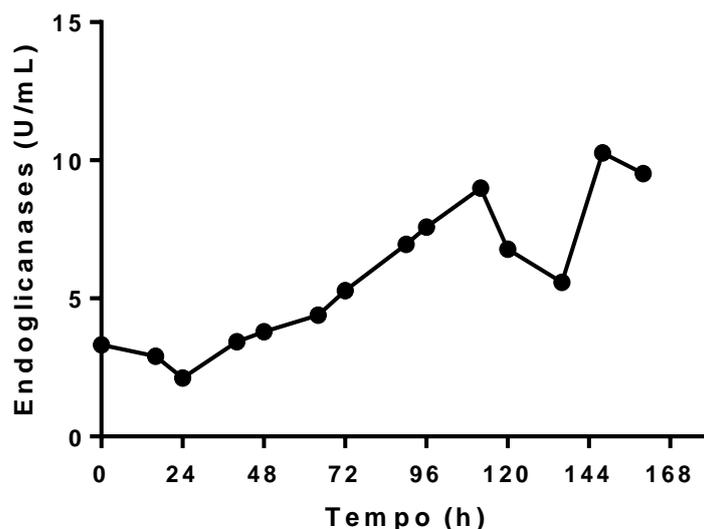


Figura 15. Atividade de endoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 2).

Da mesma forma que observado no Cultivo 1, a atividade máxima obtida superou tanto a atividade no pH próximo de 5,0 (7,9 U.mL⁻¹ em 116h), quanto no pH ótimo de 6,0 (10,2 U.mL⁻¹ em 96h) reportados por Reis *et al.* (2014) em RD com 10 g.L⁻¹ de celulose. Novamente, o resultado foi menor que em RDA com 60 g.L⁻¹ de celulose (REIS, 2017), que atingiu 116 U.mL⁻¹ em 208h.

Já para as exoglicanases (Figura 16) o Cultivo 2 apresentou um padrão de crescimento gradual de atividade, havendo um aumento mais evidente após a alimentação em 140h até atingir seu valor máximo de 3,1 U.mL⁻¹ em 160h com pH do meio em 4,0.

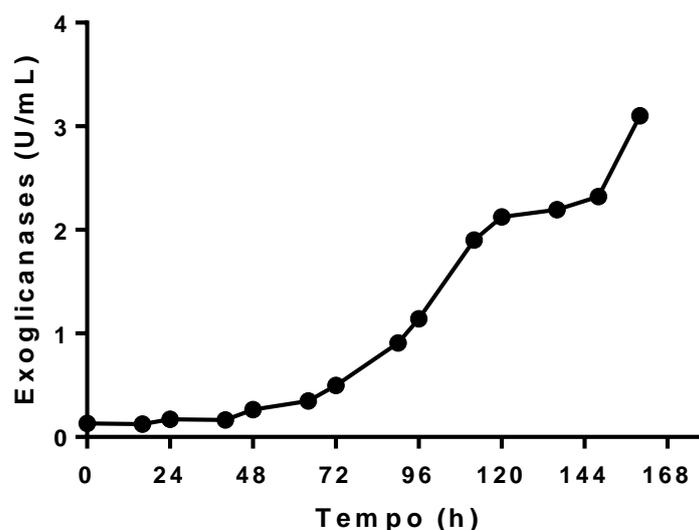


Figura 16. Atividade de exoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 2).

As atividades novamente iniciaram somente após certa atividade de endoglicanases já ser observada, como ocorreu no Cultivo 1, retrato do mecanismo de ação das enzimas do complexo das celulases. Mais uma vez, ao comparar-se a atividade obtida de $10,8 \text{ U.mL}^{-1}$ em 216h com RDA em pH 6,0 controlado e 60 g.L^{-1} de celulose (REIS, 2017), verifica-se a dependência da concentração de celulose para produção de exoglicanases.

A atividade de β -glicosidases (Figura 17) foi baixa nas primeiras 48h, começando a crescer até 96h, tendo um aumento mais pronunciado até seu máximo em 136h de $4,0 \text{ U.mL}^{-1}$ com pH do meio em 5,9. Não foi observado um aumento de atividade de β -glicosidases relacionado com as alimentações. Tal resultado para *P. echinulatum* havia sido observado por Reis *et al.* (2013), uma vez que os valores máximos de atividade de β -glicosidases foram os mesmos para a mesma concentração de celulose, independentemente de ser RD ou RDA. Para Kim *et al.* (1997) o regime descontínuo alimentado também não provocou aumentos de rendimentos de β -glicosidases com *A. niger*.

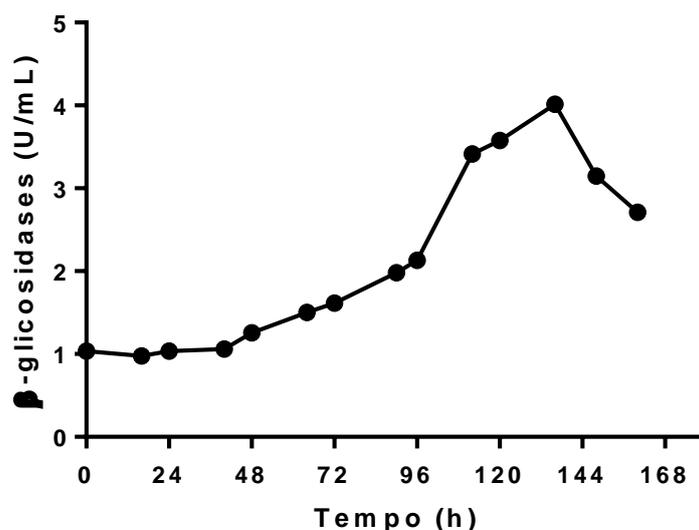


Figura 17. Atividade de β -glicosidases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 2).

Nesse cultivo, a atividade máxima das β -glicosidases também superou a atividade máxima de $0,67 \text{ U mL}^{-1}$ em pH 5,5 e 96h, obtida por Reis *et al.* (2014), em RD com 10 g.L^{-1} de celulose. Porém, não alcançou a atividade de $5,8 \text{ U.mL}^{-1}$ reportada por Reis *et al.* (2013), com concentrações de celulose em 60 g.L^{-1} , tanto em RD quanto em RDA, nem os $4,7 \text{ U.mL}^{-1}$ em RDA obtidos por Reis (2017), com total de 60 g.L^{-1} de celulose em RDA.

Por fim, para as xilanases (Figura 18), o cultivo só iniciou a produção após 72h, mantendo a atividade de xilanases em crescimento até o fim do cultivo, quando atingiu seu valor máximo de $18,9 \text{ U.mL}^{-1}$ (160 h), com pH do meio em 4,0. Não foi observado, após a alimentação, um destaque no crescimento da atividade das xilanases.

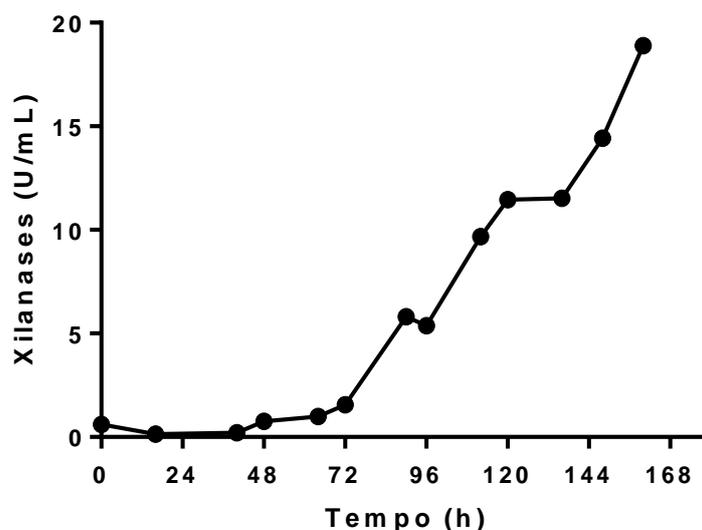


Figura 18. Atividade de xilanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 2).

Assim como no Cultivo 1, o Cultivo 2 apresentou maior atividade que a obtida em pH 4,0 em RD com 10 g.L^{-1} de celulose reportada por Reis *et al.* (2014) ($13,1 \text{ U.mL}^{-1}$ em 68h), mas não superou a atividade máxima obtida no pH 6,0 ($33,5 \text{ U.mL}^{-1}$ em 92h), muito menos a atividade de 1032 U mL^{-1} em 216h e 60 g.L^{-1} de celulose em RDA (REIS, 2017).

5.4. CULTIVO EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE CELULOSE COM VALOR DE CONTROLE EM pH 6,0 (CULTIVO 3)

5.4.1. Perfil de pH e concentração de celulose (Cultivo 3)

No Cultivo 3, cujos dados de pH são apresentados na Figura 19, não foi estabelecido um limite inferior de pH, apenas utilizou-se o valor de controle 6,0 para adição de celulose, novamente na tentativa de que um menor tempo de alimentação diminuísse o tempo de resposta do pH do meio. Outra tentativa de obter um tempo de resposta mais rápido foi não adicionar celulose ao meio no tempo inicial. Dessa forma, as concentrações de celulose iniciais são apenas provenientes do inóculo e dos farelos de soja e trigo adicionados ao meio. No Cultivo 3 também não houve controle de pH por sistemas de bombas para adição de ácido e base.

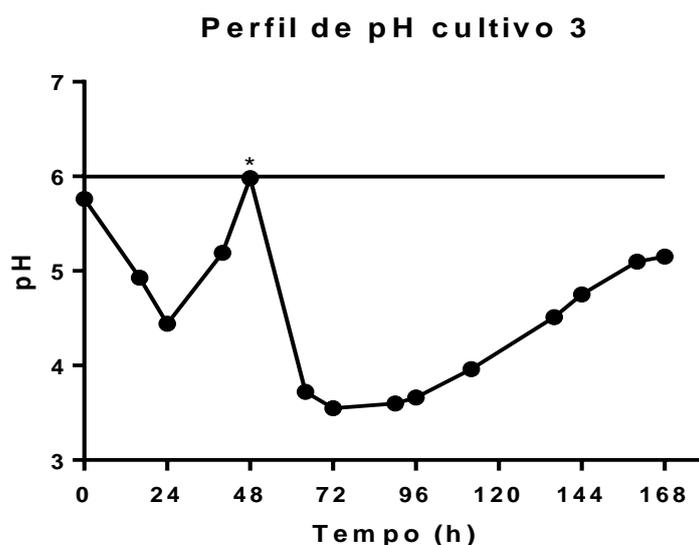


Figura 19. Perfil de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* em resposta à adição de celulose (Cultivo 3).

Observando-se a Figura 19, nota-se que a queda do pH foi menos brusca do que a observada nos Cultivos 1 e 2, o que é explicado pela baixa concentração de celulose no meio no início do cultivo. O pH atingiu o valor de 4,4 em 24h e voltou a subir, sendo registrado o valor de 6,0 em 48h, momento em que ocorreu alimentação. Esse comportamento inicial demonstra que utilizar menores concentrações de celulose no início do cultivo pode ser uma estratégia para reduzir o tempo de resposta do pH do meio. Porém, após a alimentação em 48h, o pH volta a cair, atingindo seu mínimo de 3,6 em 72h. A estabilização do pH ocorreu entre 72 e 96h e após, em 112h, um novo aumento foi observado. Essa tendência permaneceu até o fim do cultivo, em 168h, porém, o pH não chegou a atingir o valor de controle novamente a ponto de ocorrer nova alimentação.

Observando a relação entre o pH e a concentração de celulose (Figura 20), é possível perceber que nas primeiras 48h a concentração de celulose foi baixa e constante. Após a alimentação em 48h, a concentração passou de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ para $4,3 \text{ g.L}^{-1}$, em 64h, que coincide com a queda mais brusca do pH.

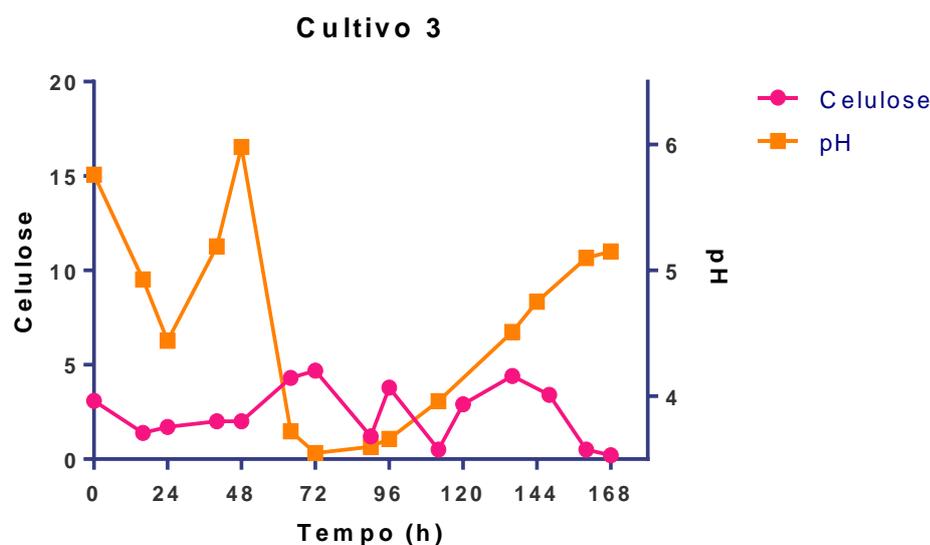


Figura 20. Concentração de celulose e valores de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 3).

Na Figura 20, também é válido observar que no Cultivo 3, após a alimentação em 48h até o consumo da maior parte da celulose (90h), o pH permanece estável e baixo, mostrando, mais uma vez, que durante o consumo da celulose há uma tendência de acidificação do meio. Finalmente, percebeu-se que apesar da estratégia inicial de não adicionar celulose ao meio ter sido eficiente para reduzir o tempo de resposta do pH do meio, após a adição de celulose pelo alimentador, o tempo de resposta voltou a se elevar, não sendo possível observar mais de uma alimentação durante as 168h do cultivo.

5.4.2. Atividades enzimáticas (Cultivo 3)

A Tabela 3 mostra as atividades enzimáticas máximas e seus respectivos tempos, observados no Cultivo 3.

Tabela 3. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 3)

	FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	β-glicosidades (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
Valor Máximo	1,4	10,3	3,0	4,4	16,5
Tempo (h)	112	96	168	136	160

A atividade FPA (Figura 21) só começou a ser significativa após a alimentação em 48h, apresentando um crescimento gradual, com oscilação em 96h, até seu valor máximo de

1,4 U.mL⁻¹ em 112h, quando o pH do meio estava em 4,0. Posteriormente, foi observado um decréscimo, seguido de novo aumento em 160h, voltando a cair ao final do cultivo, em 168h.

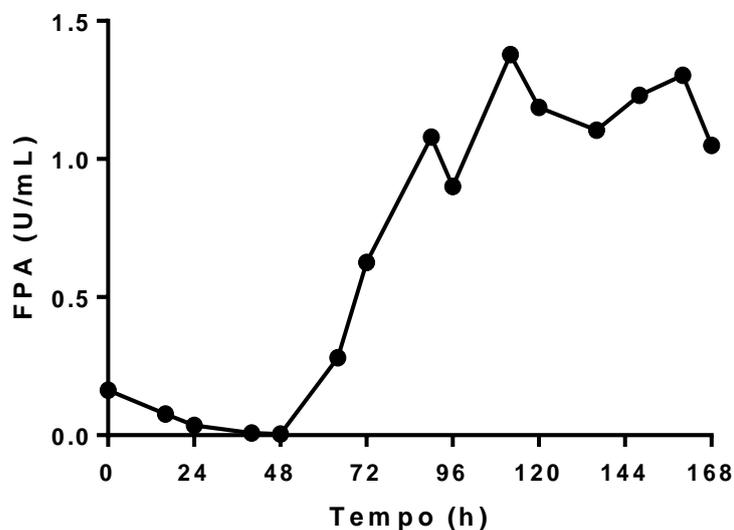


Figura 21. Atividade FPA em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 3).

Neste cultivo, a atividade FPA superou a reportada por Reis *et al.* (2014), com 10 g.L⁻¹ de celulose em RD em pH 4,0, que foi 0,43 U.mL⁻¹ em 96h. Entretanto, assim como observado nos Cultivos 1 e 2, a atividade FPA do Cultivo 3 não atinge nem os valores em pH ótimo de 6,0 reportado por Reis *et al.* (2014) (1,81 U.mL⁻¹) nem em RDA com pH controlado em 6,0 e 60 g.L⁻¹ de celulose, reportada por Reis (2017) (14 U.mL⁻¹).

Para as endoglicanases (Figura 22), há um aumento da atividade a partir de 24h, sendo observado um importante incremento após a alimentação em 48h. O cultivo apresenta seu máximo de 10,3 U.mL⁻¹ em 96h, com pH do meio em 3,7.

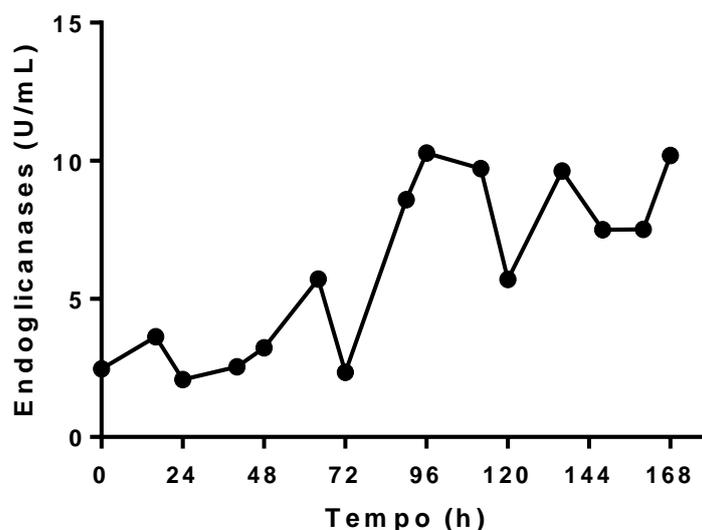


Figura 22. Atividade de endoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 3).

No que diz respeito às endoglicanases, o Cultivo 3 apresentou resultados semelhantes aos reportados por Reis *et al.* (2014) no pH ótimo de 6,0, em que a atividade de endoglicanases foi de $10,2 \text{ U.mL}^{-1}$ em 96h, em RD empregando 10 g.L^{-1} de celulose. De forma semelhante aos cultivos anteriores, a atividade de 116 U.mL^{-1} em 208h obtida em RDA com 60 g.L^{-1} de celulose (REIS, 2017) não foi superada.

Já a atividade de exoglicanases (Figura 23) também mostrou comportamento semelhante aos cultivos anteriores, tendo apenas um aumento expressivo após já haver certa atividade de endoglicanases, ocorrendo justamente após a alimentação em 48h. A atividade continuou aumentando até 96h, momento em que oscilações começaram a ocorrer, até atingir o máximo de $3,0 \text{ U.mL}^{-1}$ em 168h, com pH do meio em 5,2.

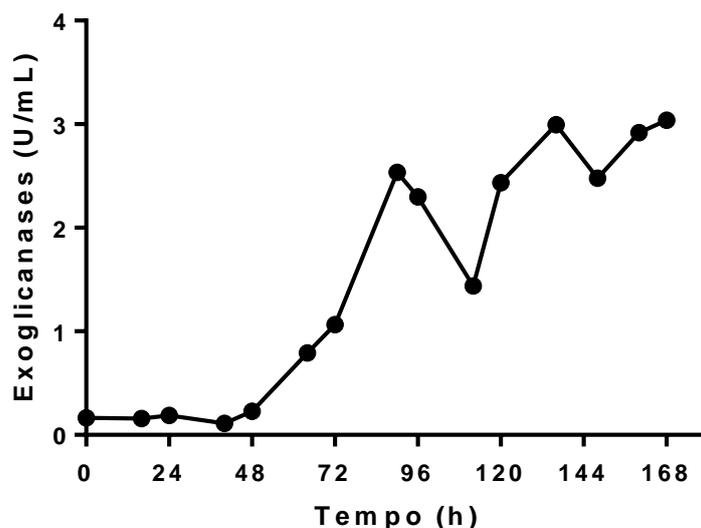


Figura 23. Atividade de exoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 3)

Outra vez, a atividade de $10,8 \text{ U.mL}^{-1}$ em 216h em RDA com pH controlado em 6,0 e 60 g.L^{-1} de celulose (REIS, 2017) superou a do Cultivo 3.

Quanto às β -glicosidases (Figura 24), a atividade apresentou um aumento gradual e sensível até 72h, com maiores valores a partir de 90h, até atingir seu máximo de $4,4 \text{ U.mL}^{-1}$ em 136h, com pH do meio em 4,5.

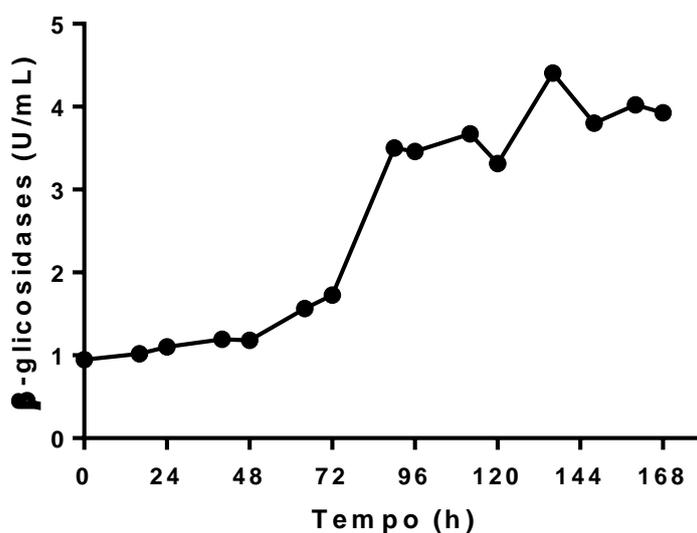


Figura 24. Atividade de β -glicosidases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 3)

Assim como no Cultivo 2, não foi observado um aumento na atividade em função da alimentação, conforme já discutido. A atividade máxima das β -glicosidases obtida por Reis *et al.* (2014), em RD com 10 g.L^{-1} de celulose, foi de $0,67 \text{ U mL}^{-1}$ em pH 5,5 e 96h, sendo superada pelo Cultivo 3. Já as atividades de $5,8 \text{ U.mL}^{-1}$ (REIS *et al.*, 2013), obtidas tanto em RD quanto em RDA, com concentrações de celulose em 60 g.L^{-1} e a de $4,7 \text{ U.mL}^{-1}$ (REIS, 2017) em RDA também com 60 g.L^{-1} de celulose, foram maiores que a obtida no presente trabalho, nessas condições.

Finalmente, para as xilanases (Figura 25), a atividade começou ser significativa após a alimentação em 48h. Após, apresentou um crescimento gradual, com leve oscilação em 148h, até atingir o máximo de $16,5 \text{ U.mL}^{-1}$ em 160h com pH do meio em 5,1.

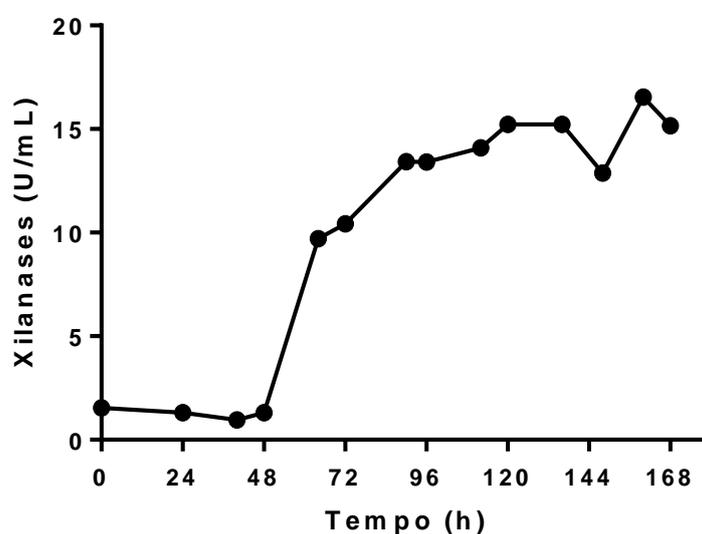


Figura 25. Atividade de xilanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 3)

Ao contrário dos Cultivos 1 e 2, o Cultivo 3 não apresentou maior atividade que a obtida por Reis *et al.* (2014) ($17,5 \text{ U.mL}^{-1}$ em 40 h) em pH 5,0 e RD com 10 g.L^{-1} de celulose. Adicionalmente, também apresentou atividades menores que a máxima obtida no mesmo trabalho em pH 6,0 ($33,5 \text{ U.mL}^{-1}$ em 92h), e que a de 1032 U mL^{-1} em 216h relatada por Reis (2017) em RDA e 60 g.L^{-1} de celulose.

5.5. CULTIVO EM REGIME DESCONTÍNUO ALIMENTADO COM ADIÇÃO DE CELULOSE COM VALOR DE CONTROLE EM pH 6,0 E pH CONTROLADO POR 48 H (CULTIVO 4)

5.5.1. Perfil de pH e concentração de celulose (Cultivo 4)

No quarto cultivo, foi adotada uma estratégia para o controle de adição de celulose em que o cultivo teve o pH controlado em 6,0 nas primeiras 48 h. A estratégia foi escolhida visando a uma velocidade de resposta mais rápida de alteração do pH, já que o aumento da quantidade de massa microbiana poderia proporcionar um consumo mais rápido da celulose adicionada. Dessa forma, as primeiras 48h do cultivo ocorreram em regime descontínuo, sendo o alimentador conectado apenas após 48h. O valor de controle foi novamente estabelecido como 6,0 sem limite inferior e a concentração inicial de celulose inicial foi de 10 g.L⁻¹. Os valores de pH do cultivo 4 são apresentados na Figura 26.

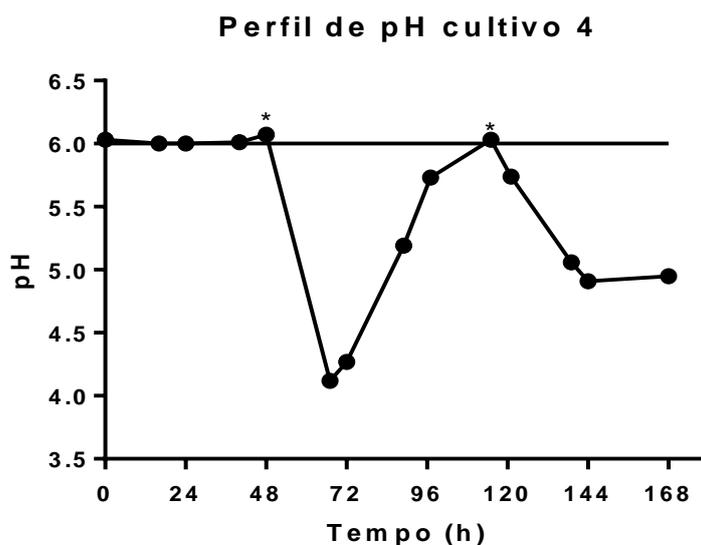


Figura 26. Perfil de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* em resposta à adição de celulose (Cultivo 4).

Observando os valores de pH (Figura 26), percebe-se que assim que o alimentador foi conectado em 48h, já ocorreu alimentação, uma vez que o pH do meio estava controlado em 6,0, coincidindo com o valor de controle. Já em 64h, houve uma queda para 4,1 voltando a subir a partir de 72h, até atingir novamente o valor de 6,0 em 112h, indicando a ocorrência de nova alimentação entre 96 e 112h. Posteriormente, o pH permaneceu em queda até 144h, apresentando um leve aumento em 168h, momento em que o cultivo foi encerrado.

Ao avaliar a concentração de celulose em paralelo com os valores de pH (Figura 27), é possível visualizar que nas primeiras 48h com pH fixo, a celulose foi consumida pelo fungo.

Após o desligamento do controle de pH, o mesmo começou a cair, paralelamente com a continuidade do consumo da celulose inicial, juntamente com a celulose alimentada em 48h. A partir de 72h, a concentração geral da celulose caiu ainda mais, fenômeno acompanhado pelo aumento do pH. Também foi observado um aumento da concentração de celulose em 112h, sendo esse aumento provocado pela alimentação. Nas horas finais do cultivo, a concentração de celulose não sofreu grandes variações e o pH mostrou novamente um comportamento de queda, estabilização e aumento.

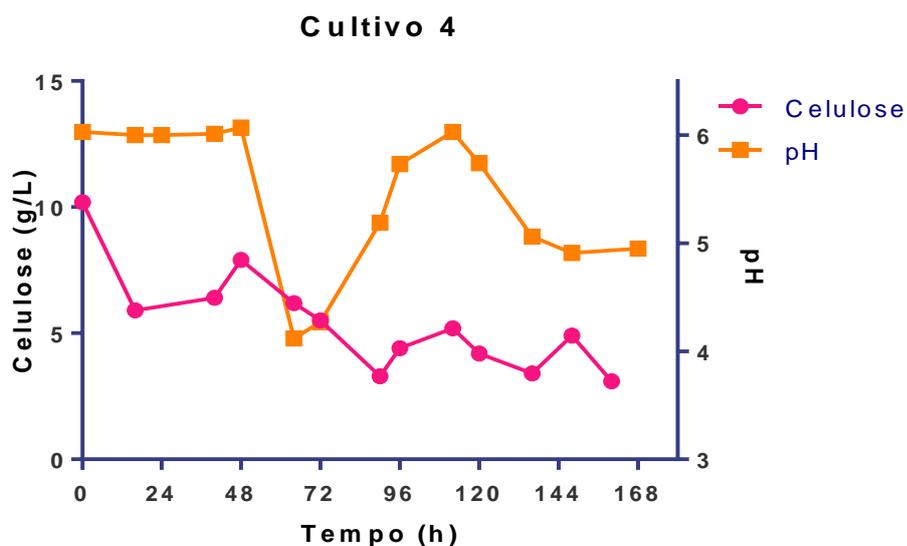


Figura 27. Concentração de celulose e valores de pH em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 4).

Analisando esses parâmetros, é possível constatar que a estratégia de manter o cultivo sob pH controlado, para aumentar a massa fúngica e diminuir o tempo de resposta, provocou um intervalo entre alimentações de 64h. Porém, esse tempo de resposta novamente não foi pequeno o suficiente para possibilitar um maior número de alimentações.

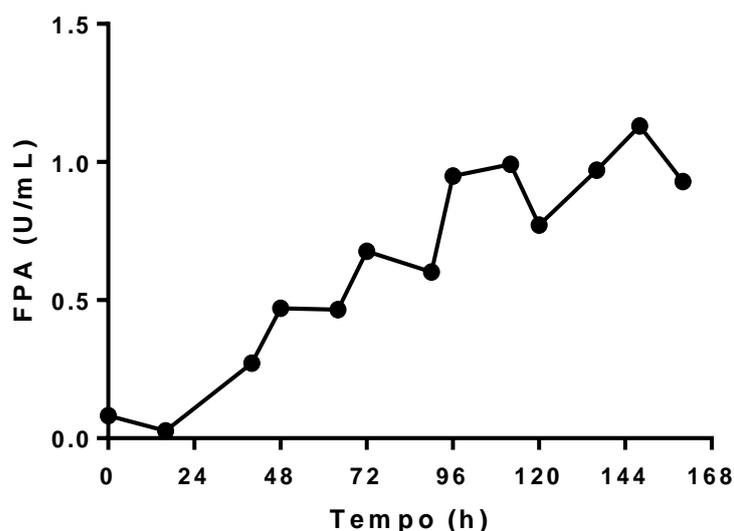
5.5.2. Atividades enzimáticas (Cultivo 4)

As atividades máximas das enzimas do complexo das celulases observadas no Cultivo 4 e seus respectivos tempos são reportadas na Tabela 4.

Tabela 4. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 4)

	FPA (U.mL ⁻¹)	Endoglicanases (U.mL ⁻¹)	Exoglicanases (U.mL ⁻¹)	β-glicosidades (U.mL ⁻¹)	Xilanases (U.mL ⁻¹)
Valor Máximo	1,1	10,0	5,1	5,1	25,8
Tempo (h)	148	148	136	136	148

A atividade FPA (Figura 28) iniciou seu crescimento após as 16h, apresentando um crescimento gradual, com algumas oscilações. Um aumento na atividade foi observado entre 96 e 112h, ao ter ocorrido alimentação. A atividade máxima obtida foi de 1,1 U.mL⁻¹ em 148h, momento em que o pH do meio era de 4,9.

**Figura 28.** Atividade FPA em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 4).

Da mesma forma que observado nos três cultivos anteriores, a atividade FPA máxima do Cultivo 4 supera a de 0,7 U.mL⁻¹ em 112h em RD e pH 5,0 com 10 g.L⁻¹ de celulose (REIS *et al.*, 2014), mas não alcançou a atividade de 1,8 U.mL⁻¹ obtida em pH 6,0 e 96h, nem a de 14 U.mL⁻¹ em 216h relatada por Reis (2017), em RDA com pH controlado em 6,0 e um total de 60 g.L⁻¹ de celulose adicionadas.

Para as endoglicanases (Figura 29), a atividade apresentou maior crescimento a partir de 24h. Assim como nos Cultivos 2 e 3, após a alimentação (entre 96 e 112h) é possível

observar um aumento de atividade dessas enzimas, em 120h. O máximo foi alcançado em 148h, com pH do meio em 4,9 e atividade de 10,0 U.mL⁻¹.

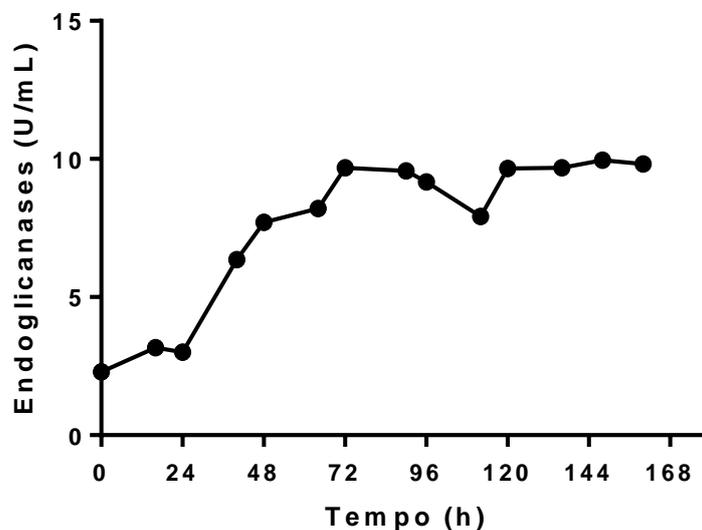


Figura 29. Atividade de endoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 4).

Nesse cultivo, a atividade máxima superou a obtida por Reis *et al.* (2014) em RD, com 10 g.L⁻¹ de celulose em pH 5,0 (7,9 U.mL⁻¹ em 116 h), e chegou próximo à obtida em pH 6,0 (10,2 U.mL⁻¹ em 96h), mas não superou a atividade obtida por Reis (2017) em RDA, com total de 60 g.L⁻¹ de celulose adicionada, que chegou a 116 U.mL⁻¹ em 208h.

As exoglicanases (Figura 30), por sua vez, também iniciaram o crescimento da atividade em 24 h, apresentando um aumento na atividade entre 96 e 112h, coincidindo com a alimentação e atingiram seu valor máximo de 5,1 U.mL⁻¹ em 136h, com pH do meio em 5,1. O Cultivo 4 também não atingiu a atividade de 10,8 U.mL⁻¹ reportada em RDA com pH 6,0 e uma quantidade total de 60 g.L⁻¹ de celulose (REIS, 2017)

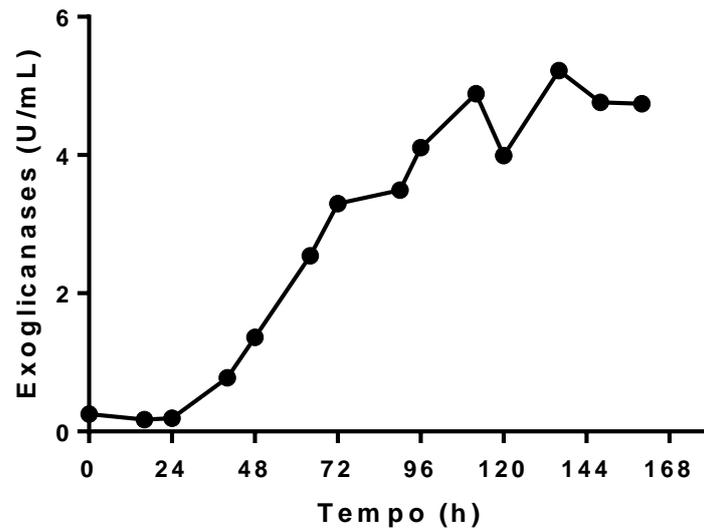


Figura 30. Atividade de exoglicanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 4).

Já a atividade de β -glicosidases (Figura 31) começou a ser significativa após 48 h, atingindo seu máximo de $5,1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 136h, com pH do meio em 5,1

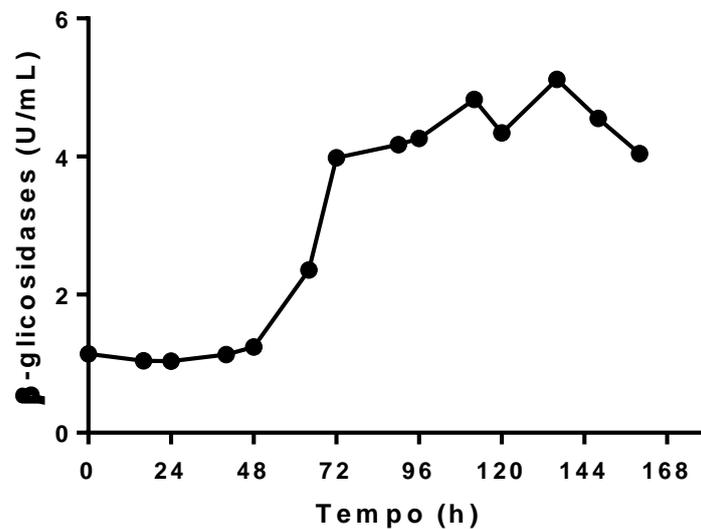


Figura 31. Atividade de β -glicosidases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 4).

O Cultivo 4, assim como o Cultivo 1, se destacou por apresentar maiores atividades que as obtidas por Reis *et al.* (2014) de $0,64 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 96h em RD, com $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de celulose em pH ótimo de 5,5, e a obtida por Reis (2017) de $4,7 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ em 216h com total de $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de celulose com pH controlado em 6,0. Somente o trabalho de Reis *et al.* (2013) reportou

atividades maiores que a obtida nesse cultivo ($5,8 \text{ U.mL}^{-1}$ com 60 g.L^{-1} de celulose, tanto em RD quanto em RDA, em 168h)

A atividade de xilanases (Figura 32) apresentou valores maiores a partir de 24h, permanecendo em crescimento até 64h, com posterior estabilização até 120h, voltando a crescer em 136h e atingindo seu máximo de $25,8 \text{ U.mL}^{-1}$ em 148 h com pH do meio em 4,9.

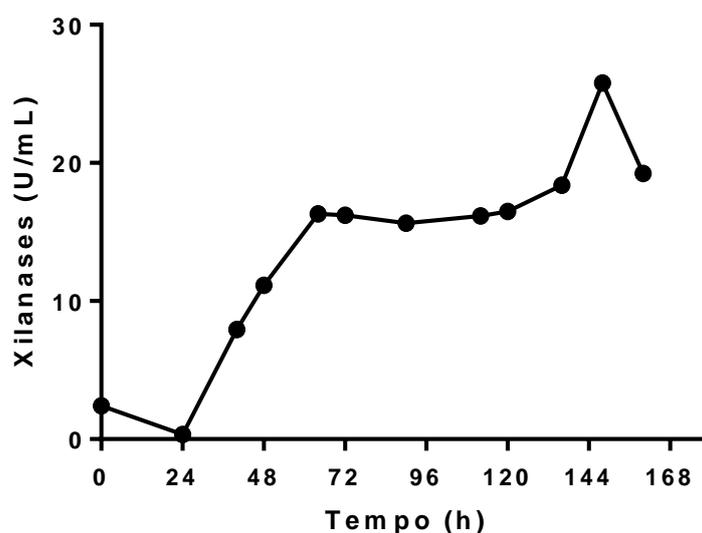


Figura 32. Atividade de xilanases em regime descontínuo alimentado da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivo 4).

De forma semelhante aos Cultivos 1 e 2, o Cultivo 4 registrou atividade superior a de $17,5 \text{ U.mL}^{-1}$ em 40h em pH 5,0 e RD com 10 g.L^{-1} de celulose (REIS *et al.*, 2014), mas não atingiu a atividade de $33,5 \text{ U.mL}^{-1}$ em 92h em pH 6,0 nem a de 1032 U mL^{-1} em 216h em RDA e 60 g.L^{-1} de celulose (REIS, 2017).

5.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS CULTIVOS 1, 2, 3 E 4

5.6.1. Perfil de pH e concentração de celulose

Conforme relatado em cada cultivo individualmente, o comportamento do pH apresentou algumas semelhanças. Nos quatro cultivos, houve primeiramente uma acidificação do meio, com uma posterior estabilização e, finalmente, um aumento do pH do meio.

O Cultivo 1 foi o que atingiu menores valores de pH, chegando a 2,9 em 64h. Foi também o cultivo que apresentou maior tempo de resposta, uma vez que seu pH atingiu o valor de 4,0 em 24h, e só voltou a apresentar esse valor em 164h, fazendo com que o meio não alcançasse o pH necessário para que fosse realizada uma nova alimentação até o fim do cultivo.

Já o Cultivo 2 teve uma queda menos brusca no pH, atingindo o valor mínimo de 3,3 em 40h, porém seu tempo de resposta também foi elevado, uma vez que apresentou pH 5,7 no tempo 0 e só chegou a valores semelhantes (5,9) em 136h. Entretanto, neste cultivo foi observada uma alimentação, pois o pH do meio atingiu o valor de controle.

Por sua vez, o Cultivo 3 apresentou a queda de pH menos acentuada e o menor tempo de resposta nas primeiras 48h, sendo o cultivo que atingiu o valor de controle mais cedo entre todos. Todavia, após a adição de celulose, a queda de pH foi mais brusca e o tempo de resposta aumentou, não havendo novas alimentações até o fim do cultivo.

Finalmente, o Cultivo 4 teve o pH controlado nas primeiras 48h, mas após o encerramento do controle, também apresentou queda brusca. Seu tempo de resposta foi mais rápido que os Cultivos 1 e 2, tendo queda, estabilização e aumento ocorrido em 96h (entre 48h e 144h), mas ainda com tempo de resposta maior que as 48h do cultivo 3.

Ao considerar a concentração de celulose, juntamente com o pH do meio, há uma tendência inversa entre os dois parâmetros em todos os cultivos. Este comportamento indica que a variação do pH pode refletir o consumo do substrato pelo microrganismo. A queda do pH durante o consumo da celulose pode ser explicada pelo consumo paralelo de NH_4^+ , como relatado por Sternberg e Dorval (1979) em experimentos com produção de celulasas por *T. reesei*. Outra explicação para o aumento da acidez é o efluxo de prótons mediado pela membrana plasmática, com participação de ATPases com consumo de ATP, como visto em fungos e leveduras (PEÑA *et al.*, 2015; AMBESI *et al.*, 2000). Já o aumento de pH quando a concentração de celulose está mais baixa pode ter sido causado pela liberação de NH_3 pelo fungo no meio, conforme observado por Sternberg e Dorval (1979).

Avaliando os comportamentos de pH e concentração de celulose de cada cultivo, juntamente com o tempo de resposta, é possível perceber que, embora o pH tenha demonstrado o comportamento esperado, com queda, estabilização e aumento, e que essas variações estejam relacionadas com a concentração de celulose, a quantidade de alimentações ocorridas não foi satisfatória. Diferentes abordagens foram adotadas com o objetivo de aumentar a quantidade de alimentações, gerando variações de pH e tempos de resposta distintos, mas nenhuma dessas abordagens foi suficiente para que as alimentações fossem mais frequentes. Dessa forma, uma estratégia não avaliada nesse trabalho, mas que poderia aumentar a frequência das alimentações seria estabelecer um valor de controle mais baixo. Estudos de crescimento microbiano também podem ser úteis para estabelecer o pH ótimo de crescimento, caso a estratégia do Cultivo 4 seja repetida com um valor de controle mais baixo.

5.6.2. Atividades enzimáticas

A relação das atividades enzimáticas máximas em cada cultivo, e seus respectivos tempos, são mostradas na Tabela 5, com os melhores valores destacados em negrito.

Tabela 5. Atividades enzimáticas em cultivo da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum* (Cultivos 1, 2, 3 e 4)

	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4
FPA máx (U.mL ⁻¹)	1,2	0,8	1,4	1,1
t FPA máx (h)	112	120	112	148
Endoglicanases máx (U.mL ⁻¹)	11,5	10,3	10,3	10,0
t Endoglicanases máx (h)	148	148	96	148
Exoglicanases máx (U.mL ⁻¹)	3,1	3,1	3,0	5,1
t Exoglicanases máx (h)	148	160	168	136
β-glicosidades máx (U.mL ⁻¹)	5,1	4,0	4,4	5,1
t β-glicosidades máx (h)	148	136	136	136
Xilanases máx (U.mL ⁻¹)	13,4	18,9	16,5	25,8
t Xilanases máx (h)	112	160	160	148

O Cultivo 4 apresentou um maior número de atividades máximas. Esse comportamento pode ser justificado pela maior concentração de celulose inicial e pelo pH controlado em 6,0, nas primeiras 48h. O segundo cultivo a apresentar maior quantidade de atividades máximas foi o Cultivo 1, que recebeu alimentação nas primeiras 24h, resultando em concentrações de celulose mais elevadas. A maior atividade FPA foi observada no Cultivo 3 que, embora possuísse as menores concentrações de celulose de todos os cultivos, foi o que apresentou quedas menos bruscas de pH e, uma vez que pHs baixos podem influenciar negativamente a atividade FPA, essa maior atividade observada pode ser justificada por esse comportamento. O Cultivo 2 não apresentou a maior atividade em nenhuma das enzimas.

Como foi discutido individualmente em cada cultivo, as atividades obtidas não superaram as atividades relatadas anteriormente por Reis *et al.* (2013), Reis *et al.*, (2014) e Reis (2017) para *P. echinulatum*. As menores atividades obtidas podem ser explicadas tanto pela concentração de celulose menor, quanto pelo pH, que se afastou muito do pH ótimo para

produção das enzimas. Para melhorar as atividades e contornar esses fatores negativos, o aumento da frequência de alimentações pode trazer resultados positivos, e, conforme discutido no item 5.6.1, estabelecer um menor valor de controle pode ser uma possibilidade para aumentar o número de alimentações em cada cultivo. Além disso, um sistema de controle de pH adicional poderia ser utilizado para que a acidificação do meio não prejudicasse as atividades enzimáticas. Afim de que o controle de pH não interfira no controle da alimentação, o pH estabelecido no limite inferior deve ser menor que o valor de controle.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados do presente trabalho permitem retirar as seguintes conclusões:

- foi possível desenvolver um sistema de alimentação automático de celulose em biorreator condicionado aos valores de pH do meio;
- o consumo de celulose durante o cultivo de *P. echinulatum* resultou em queda no pH, que pode chegar a valores inferiores a 4,0;
- a concentração de celulose no meio apresentou tendência inversa ao pH, permitindo, dessa forma, a possibilidade de o sistema de alimentação proposto atender às necessidades de substrato do fungo;
- cultivos de *P. echinulatum* em biorreator com controle automático da adição de celulose pelo pH são passíveis de resultar na secreção de FPAses, endoglicanases, exoglicanases, β -glicosidades e xilanases;
- as atividades enzimáticas respondem diferentemente à variação dos níveis de pH utilizados para controle da adição de celulose durante o cultivo com *P. echinulatum*;
- o controle da adição de celulose pelo pH resulta em altas atividades de β -glicosidades quando comparado com dados da literatura para cultivos com *P. echinulatum*, mas inferiores para as demais enzimas estudadas;
- são necessários ajustes no equipamento para registrar todas as alimentações de celulose, o perfil de pH e reduzir o ganho de umidade pela celulose localizada no alimentador, que resulta em entupimento;
- a baixa frequência das alimentações fez com que a concentração de celulose permanecesse baixa no meio, o que, conseqüentemente, resultou em atividades enzimáticas que não atingiram valores anteriormente reportados para o mesmo fungo em trabalhos anteriores, quando maiores concentrações de celulose foram empregadas;

- existe a necessidade de um controle de limite inferior de pH para não permitir quedas a valores que causem inativação do microrganismo e de suas enzimas.

Como perspectivas para a continuidade do trabalho indica-se:

- ajustar o equipamento para registrar todas as alimentações de celulose e o perfil de pH;
- reduzir o ganho de umidade pela celulose localizada no alimentador, para diminuir a existência de entupimento;
- acrescentar um sistema de controle de pH durante as alimentações, apenas para impedir que o meio atinja pHs que possam prejudicar a produção e atividades das enzimas;
- estabelecer um valor de controle de pH em níveis menores aos utilizados, a fim de permitir um maior número de alimentações.
- realizar estudos de cinética de crescimento microbiano, a fim de compreender se há diferença de pH ótimo para crescimento e para produção de enzimas, uma vez que tais informações são importantes para estabelecer novos valores de pH, ao considerar as novas estratégias propostas.

7. REFERÊNCIAS

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 399-407, 2008.

AMBESI, A.; MIRANDA, M.; PETROV, V. V.; SLAYMAN, C. W. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H (+)-ATPase. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 155-160, 2000.

BAILEY M. J.; TAHTIHARJU J. Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 62, p. 156–162, 2003.

BAILEY, J. M.; NIKFARJAM, F.; SHENOY, N. R.; SHIVELY, J. E. Automated carboxy-terminal sequence analysis of peptides and proteins using diphenyl phosphorisoithiocyanatidate. **Protein Science**, v. 1(12), p. 1622-1633, 1992:

BENASSI, V. M.; DA SILVA, T. M.; PESSELA, B. C.; GUIBAN, J. M.; MATEO, C.; LIMA, M. S.; MARIA DE LOURDES, T. M. Immobilization and biochemical properties of a

β -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with transxylosylation activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 93–101, 2013.

BIELY, P., PUCHART, V., STRINGER, M. A., MØRKEBERG KROGH, K. B. *Trichoderma reesei* XYN VI—a novel appendage-dependent eukaryotic glucuronoxylan hydrolase. **The FEBS journal**, v. 281(17), p. 3894-3903, 2014.

CAMASSOLA, M.; DE BITTENCOURT, L. R.; SHENEM, N. T.; ANDREAUS, J.; DILLON, A. J. P. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 22(5-6), p. 391-396, 2004.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulase Determination: Modifications to make the filter paper assay easy, fast, practical and efficient. **Open Access Scientific Reports**, v. 1(1), 2012. <http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports.125>

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103(6), p. 2196-2204, 2007.

CHUNDAWAT, S. P. S.; DONOHOE, B. S.; SOUSA, L. da C.; ELDER, T.; AGARWAL, U. P.; LU, F.; *et al.* Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. **Energy & Environmental Science**, v. 4(3), p.973-84, 2011.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 3–23, 2005.

DEPARTMENT OF ENERGY. **U.S. Department of energy to invest up to \$33.8 million to further development of commercially viable renewable fuels**. 2008. Disponível em: www.energy.gov/articles/us-department-energy-invest-338-million-further-development-commercially-viable-renewable. Acesso em 23 de Agosto de 2018.

DESHPANDE, M. V.; ERIKSSON, K. E.; PETTERSSON, L. G. An assay for selective determination of exo-1,4-B-glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. **Analytical biochemistry** v. 238, p. 481-487, 1984.

DILLON, A. J. P.; BETTIO, M.; POZZAN, F. G.; ANDRIGHETTI, T.; CAMASSOLA, M. A new *Penicillium echinulatum* strain with faster cellulase secretion obtained using hydrogen peroxide mutagenesis and screening with 2-deoxyglucose. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111(1), p. 48-53, 2011.

DILLON, A.J.P., CAMASSOLA, M. Cellulases. In.: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R (eds) **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Editora Legis Summa, 101-132, 2014.

DILOKPIMOL, A.; NAKAI, H.; GOTFREDSEN, C. H.; APPELDOORN, M.; BAUMANN, M. J.; NAKAI, N.; ... SVENSSON, B. Enzymatic synthesis of β -xylosyl-oligosaccharides by transxylosylation using two β -xylosidases of glycoside hydrolase family 3 from *Aspergillus nidulans* FGSC A4. **Carbohydrate Research**, v. 346(3), p. 421-429, 2011.

ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LABUDOVA, I.; HERMANN, A.; HAYN, M. Production of Trichoderma cellulase in laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology** v. 36: p. 51-65, 1991.

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

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10–18, 2009.

HENDY, N.; WILKE, C.; BLANCH, H. Enhanced cellulase production using solka floc in a fed-batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 4, p. 785-788, 1982.

IEA – The International Energy Association. **Perspectives for the Energy Transition**. 2017. Disponível em : www.iea.org/publications/insights/insightpublications/PerspectivesfortheEnergyTransition.pdf f. Acesso em 10 de setembro de 2018.

IYAMA, K.; LAM, T. B. T.; STONE, B. A. Covalent cross-links in the cell wall. **Plant physiology**, v. 104(2), p. 315, 1994.

JEFFRIES, T. W. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: RATLEDGE, C. **Biochemistry of microbial degradation** Springer, Dordrecht. 1994, p. 233-277.

KIM, B. S.; LEE, S. C.; LEE, S. Y.; CHANG, Y. K.; CHANG, H. N. High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26(3), p. 147-150, 2004.

KIM, S. W.; KANG, S. W.; LEE, J. S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 63–67, 1997.

KUMAR, V.; SHUKLA, P. Functional Aspects of Xylanases Toward Industrial Applications. In: SHUFLA, P. (eds) **Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology**. Springer, 2016, p. 157–165.

KURASAWA, T.; YACHI, M.; SUTO, M.; KAMAGATA, Y.; TAKAO, S.; TOMITA, F.. Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 106-110, 1992.

LI, C.; YANG, Z.; ZHANG, R. H. C.; ZHANG, D.; CHEN, S.; MA, L. Effect of pH on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, v. 168, p. 470-477, 2013.

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

MANDELS, M.; PARRISH, F. W.; REESE, E. T. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. **Journal of Bacteriology**, v. 83, p. 400-408, 1962.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. **Journal of Bacteriology**, v. 73(2), p. 269-78, 1957.

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

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31(3), p. 426-428, 1959.

NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; DE EUGENIO, L. I.; BARRIUSO, J.; PRIETO, A.; DE TORO, B. F.; CANALES-MAYORDOMO, Á.; MARTÍNEZ, M. J. Novel pH-stable glycoside

hydrolase family 3 β -Xylosidase from *Talaromyces amestolkiae*: An enzyme displaying regioselective Transxylosylation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81(18), p. 6380–6392, 2015.

NUMAN, M.; BHOSLE, N. α -l-Arabinofuranosidases: The potential applications in Biotechnology **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 247–260, 2006.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4(3), p. 173-207, 1997.

PAN, I.-H.; YAO, H.-J.; LI, Y.-K. Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28(2-3), p. 196-201, 2001.

PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3(1), 10p., 2010.

PASSOS, D. de F.; PEREIRA, N.; DE CASTRO, A. M. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 14, p. 60-66, 2018.

PEÑA, A.; SÁNCHEZ, N. S.; ÁLVAREZ, H.; CALAHORRA, M., & RAMÍREZ, J. Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 15(2), 2015.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67(5), p. 577-591, 2005.

REIS, L. **Produção de Celulases e Xilanases por *Penicillium echinulatum* S1M29 em Regime Descontínuo Alimentado**. 2017. 99f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2017.

REIS, L.; FONTANA, R. C.; DELABONA, P. S.; LIMA, D. J. S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G. C.; DILLON, A. J. P. Increased production of cellulases and xylanases by

Penicillium echinulatum S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 597–603, 2013.

REIS, L.; SCHNEIDER, W. D. H.; FONTANA, R. C.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. Cellulase and xylanase expression in response to different pH levels of *Penicillium echinulatum* S1M29 medium. **BioEnergy Research**, v. 7(1), p. 60-67, 2014.

RHO, D.; DESROCHERS, M.; JURASEK, L.; DRIGUEZ, H. DEFAYE, J. Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: thiocellobiose as a new inducer. **Journal of Bacteriology**, v. 149, p. 47-53, 1982.

RYU, D. D.; MANDELS, M. Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2(2), p. 91-102, 1980.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185–194, 2009.

SEHNEM, N. T.; DE BITTENCOURT, L. R.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72(1), p. 163-167, 2006.

SHOWALTER, A. M. Structure and function of plant cell wall proteins. **The Plant Cell**, v. 5(1), p. 9, 1993.

SILVEIRA, M. M.; BERBERT-MOLINA, M.; PRATA, A. M. R.; SCHMIDELL, W. Production of 2, 3-butanediol from sucrose by *Klebsiella pneumoniae* NRRL B199 in batch and fed-batch reactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 41(3), 1998.

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical Composition of wood and pulps: basic constituents and their distribution. In: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking**. Berlin: Springer-Verlag, 1999.

SOBOTKA, M.; PROKOP, A.; DUNN, I. J.; EINSELE, A. Review of methods for the measurement of oxygen transfer in microbial systems. **Annual Reports on Fermentation Processes**, v. 5, p. 127-210, 1982:

SOUZA, G. M.; VICTORIA, R. L.; VERDADE, L.M.; JOLY, C.A.; NETTO, P. E. A.; CANTARELLA, H.; *et al.* Bioenergy numbers. In: SOUZA, G. M.; VICTORIA, R. L.;

JOLY, C. A.; VERDADE, L. M. (eds.) **Bioenergy & Sustainability: Bridging the Gaps**. Paris: SCOPE. 2015, p. 28-57.

STERNBERG, D.; DORVAL, S. Cellulase production and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21(2), p. 181-191, 1979.

SUZUKI, T.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Phenomenological background and some preliminary trials of automated substrate supply in pH-stat modal fed-batch culture using a setpoint of high limit. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 69(5), p. 292-297, 1990.

TANGNU, S. K.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Enhanced production of cellulase, hemicellulase and β -glucosidase by *Trichoderma reesei* (RUT C-30). **Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, p. 1837–1849, 1981.

UPDEGRAFF, D. M. Semi micro determination of cellulose in biological materials. **Analytical Biochemistry**, v. 32, p. 1577-1583, 1969.

VAISHNAV, N.; SINGH, A.; ADSUL, M.; DIXIT, P.; SANDHU, S. K.; MATHUR, A.; ... & SINGHANIA, R. R. Penicillium: The next emerging champion for cellulase production. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, p. 131-140, 2018.

WATSON, T. G.; NELLIGAN, I.; LESSING, L. Cellulase production by *Trichoderma reesei* (Rut-C30) in fed-batch culture. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 667-672, 1984.

XIA, W.; SHI, P.; XU, X.; QIAN, L.; CUI, Y.; XIA, M.; YAO, B. High level expression of a novel family 3 neutral β -Xylosidase from *Humicola insolens* y1 with high tolerance to d-xylose. **PLoS ONE**, v. 10(2): e0117578, 2015.