



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia Química

DANIEL KOLLING

AMPLIAÇÃO DE ESCALA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR FUNGO FILAMENTOSO EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA

CAMPINAS
2017

DANIEL KOLLING

AMPLIAÇÃO DE ESCALA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR FUNGO FILAMENTOSO EM
FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Dissertação de Mestrado apresentado à
Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Coorientador: Dr. José Geraldo da Cruz Pradella

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado defendida pelo aluno
Daniel Kolling e orientada pela Profa. Dra.
Aline Carvalho da Costa.

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6807-8216>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

K833a Kolling, Daniel, 1986-
Ampliação de escala do processo de produção de enzimas lignocelulolíticas por fungo filamentosos em fermentação submersa / Daniel Kolling. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.

Coorientador: José Geraldo da Cruz Pradella.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Aumento de escala. 2. Produção enzimática. 3. Fungos filamentosos. 4. Fermentação submersa. 5. Etanol 2G. I. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. II. Pradella, José Geraldo da Cruz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Process scale-up of lignocellulolytic enzyme production from filamentous fungi in submerged fermentation **Palavras-chave em inglês:**

Scale-up

Enzymatic production

Filamentous fungi

Submerged fermentation

Cellulosic ethanol

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

Jaciane Lutz Ienczak

Charles Dayan Farias de Jesus

Data de defesa: 16-11-2017

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Daniel Kolling e aprovada em 16 de novembro de 2017 pela Comissão Examinadora constituída pelos doutores:

Presidente: Profa. Dra. Aline de Carvalho da Costa

Membro titular: Dra. Jaciane Lutz Ienczak

Membro titular: Dr. Charles Dayan Farias de Jesus

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela família, pelos amigos e por iluminar o caminho sempre.

Aos meus pais, Jacob Roque e Maria Salete, pelo amor, carinho e apoio infinitos, se fazendo próximos mesmo quando estavam fisicamente distantes. Por sempre terem dado plenas condições aos filhos de receberem educação de ótima qualidade. Por uma vida inteira de exemplos positivos a serem seguidos e por muito trabalho e sacrifício em prol da família e da comunidade.

Às minhas irmãs, Raquel e Ester, pelo amor, paciência e disposição para auxiliar na educação de seu irmão caçula, de extrema importância para os posteriores desafios que enfrentei na educação formal e na vida.

À minha esposa Verônica, que está ao meu lado desde a graduação com muito amor, paciência, compreensão e companheirismo. Fundamental na realização deste projeto e de tantas outras conquistas, além de ser um exemplo de dedicação em tudo o que faz.

Aos meus avós (em memória), que lutaram muito para educar seus filhos e construir nossa família no amor e na união, superando todas as dificuldades e sendo grandes exemplos para filhos, netos e para a comunidade. Aos meus tios e primos, pelo apoio constante, pelo amor e união que tornam nossa família tão especial.

À minha orientadora, Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa, e ao meu coorientador Dr. José Geraldo da Cruz Pradella, pelos ensinamentos, orientação, inspiração, paciência e confiança durante este projeto e toda a nossa convivência.

Aos amigos do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), fundamentais no apoio à realização deste projeto. Em especial, aos amigos dos Laboratórios de Bioprocessos e da Planta Piloto para Desenvolvimento de Processos, que direta ou indiretamente participaram desta jornada.

Ao CTBE, por disponibilizar uma excelente infraestrutura acompanhada de pessoas brilhantes e dedicadas, sem os quais o desenvolvimento deste projeto seria muito mais difícil.

“A dúvida é o princípio da sabedoria”

Aristóteles

“Daria tudo que sei pela metade do que ignoro”

René Descartes

*“Temos o destino que merecemos. O nosso
destino está de acordo com os nossos
méritos”*

Albert Einstein

RESUMO

O etanol já está no mercado há algumas décadas como um substituto para combustíveis fósseis e também vem sendo incorporado nas indústrias químicas como matéria-prima. Para ampliar a presença do etanol no mercado, é necessário ampliar sua produção e o etanol de segunda geração (E2G) é uma opção que viabiliza o aumento da produção sem ampliação da área plantada com cana-de-açúcar. No entanto, o custo de produção de E2G ainda é um importante gargalo, particularmente o pré-tratamento do material lignocelulósico e a produção de enzimas lignocelulolíticas. Nesse contexto, o escalonamento de todo o processo – pré-tratamento, produção de enzimas e fermentação alcoólica – é parte importante para viabilização dessa tecnologia renovável. O objetivo deste projeto foi estudar a ampliação de escala de um processo de produção de coquetel enzimático lignocelulolítico (CEL) utilizando fungo filamentososo da espécie *Trichoderma harzianum* através do estudo de variáveis de processo. Foi estudada a influência do cisalhamento e da concentração de oxigênio dissolvido decorrente de diferentes condições de agitação e aeração em fermentador de 2 L de volume útil e seu impacto sobre a produção do CEL e sobre a morfologia fúngica. Foram realizadas medidas de atividades enzimáticas do CEL produzido, concentração de proteína, morfologia do micélio fúngico e viscosidade do meio fermentado, buscando-se correlacionar tais resultados com as variáveis de processo testadas. Também foi realizada a caracterização de fermentadores de 2 L e 100 L quanto à geometria e ao coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). Estes resultados foram utilizados para propor duas estratégias de escalonamento do processo de produção do coquetel enzimático para fermentador de 100 L e elucidar os parâmetros mais importantes para o escalonamento deste tipo de bioprocesso. Os resultados de escalonamento da produção de CEL obtidos utilizando a primeira estratégia, na qual foram empregados como critérios de escalonamento a velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) juntamente com a vazão específica de ar (ϕ_{ar}), resultaram em aproximadamente 50% da produtividade para as atividades enzimáticas avaliadas em relação à escala de 2 L. A segunda estratégia, utilizando faixa de k_{La} constante como critério de escalonamento, apresentou resultados melhores que a primeira estratégia, sendo equivalente à escala de laboratório para atividade celulásica total. As demais atividades enzimáticas obtidas ainda foram inferiores

às obtidas em fermentadores de laboratório, no entanto o incremento obtido com a segunda estratégia em relação à primeira foi expressivo para todas as atividades avaliadas. Ainda assim, os resultados mostram a necessidade de se concentrar esforços em escalonamento de processos, especialmente os aeróbicos com fungos filamentosos que apresentam características bastante desafiadoras.

Palavras-chave: Ampliação de escala; produção enzimática; fungos filamentosos; fermentação submersa; etanol 2G.

ABSTRACT

Ethanol has been on the market for decades as a substitute for fossil fuels as well as has also been incorporated in the chemical industry as a feedstock. In order to increase the ethanol market size, it is necessary to increase its production and the second generation ethanol (2GE) is an option that allows the increase of production without expansion of the land use for sugarcane plantation. However, the production cost of 2GE is still an important bottleneck, particularly the lignocellulosic pretreatment and enzyme production steps. In this context, the whole process scale-up – pretreatment, enzyme production and alcoholic fermentation – is an important step for the technological viability of this renewable technology. The aim of this project was to study the production process scale-up of lignocellulolytic enzyme cocktail using *Trichoderma harzianum* filamentous fungi strains through the study of processes variables. It was evaluated the influence of shear stress levels and dissolved oxygen concentration obtained by different agitation and aeration rates during experiments performed in 2 L working volume stirred tank fermentors and its impact on the enzymatic cocktail productivity and fungi morphology. Enzymatic activities, protein content, fermented broth viscosity and morphology aspects were evaluated aiming to correlate these results with process conditions. 2 L and 100 L fermentors geometry characterization and volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) determination were also performed. These results were used to design two scale-up process strategies to produce the enzymatic cocktail at 100 L working volume stirred tank fermentor and understand the most important parameters for the scale-up to this bioprocess. The scale-up results achieved for enzymatic activities with the first strategy, in which were used impeller tip speed (v_{tip}) and specific air flow (ϕ_{ar}) as scale-up criteria, resulted in approximately 50% of the enzymatic activities obtained at the 2 L fermentor. The second scale-up strategy, performed with constant range of k_{La} as scale-up criterion, was better than the first one, reaching the same total cellulasic activity obtained at the 2 L fermentor. The other enzymatic activities remained lower than those obtained at lab scale, but the activity increment obtained with the second strategy in comparison with the first one was significant for all the enzymatic activities. Even so, the results show the importance of applying resources to process scale-up, particularly for the aerobic bioprocesses with filamentous fungi, which present challenging characteristics.

Key words: Process scale-up; enzymatic production; filamentous fungi; submerged fermentation; cellulosic ethanol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
BG	β -glicanases
C5	Açúcares de cinco carbonos, pentoses
C6	Açúcares de seis carbonos, hexoses
CBH	Celobiohidrolases
CEL	Coquetel enzimático lignocelulolítico
COP 21	21ª Conferência das Partes da Convenção das Nações Unidas sobre mudanças climáticas
CTBE	Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
E1G	Etanol de primeira geração
E2G	Etanol de segunda geração, etanol celulósico
ED	Endoglicanases
FES	Fermentação em estado sólido
FPase	Atividade enzimática celulolítica relativa ao substrato papel de filtro, representa atividade celulásica total
FPU	Filter Paper Unit, unidade de papel de filtro, relativo a atividade enzimática celulolítica
FS	Fermentação submersa
GEE	Gases do efeito estufa
OD	Oxigênio dissolvido

NOMENCLATURA

Símbolo	Definição	Unidade
b	Distância entre a chicana e a parede do biorreator	mm
C	Concentração instantânea de oxigênio dissolvido	mmol.L ⁻¹
C_0	Concentração inicial de oxigênio dissolvido	mmol.L ⁻¹
C_s	Concentração de saturação de oxigênio dissolvido	mmol.L ⁻¹
D_i	Diâmetro do impelidor	mm
D_T	Diâmetro do biorreator	mm
H_i	Distância (altura) entre dois impelidores	mm
H_F	Altura entre o impelidor inferior e o fundo do biorreator	mm
H_L	Altura de líquido no biorreator para o volume considerado	mm
k_e	Constante de atraso do sensor de oxigênio dissolvido	s ⁻¹
k_{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio	h ⁻¹
L_i	Largura da pá do impelidor	mm
\dot{m}	Vazão mássica	g.h ⁻¹
\bar{m}	Massa molar	g.mol ⁻¹
N	Velocidade de agitação	rpm (min ⁻¹)
P	Potência de agitação	W
P_g	Potência aerada de agitação	W
Q	Vazão volumétrica de ar	L.min ⁻¹
rpm	Rotações por minuto	min ⁻¹
t	Tempo	s

t_m	Tempo de mistura	s
t_{oc}	Tempo característico de consumo de oxigênio	s
t_{OT}	Tempo característico de transferência de oxigênio, kLa^{-1}	s
V	Volume de reação	L
V_s	Velocidade superficial de ar	$m.s^{-1}$
v_{tip}	Velocidade da extremidade do impelidor	$m.s^{-1}$
vvm	Volume de ar por volume de líquido por minuto	$L.L^{-1}.min^{-1}$
τ_e	Tempo de resposta do sensor de oxigênio dissolvido	s
ϕ_{ar}	Vazão específica de ar	$vvm (min^{-1})$

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
NOMENCLATURA	12
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVO	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 Etanol de segunda geração.....	23
3.2 Fungos filamentosos e o coquetel enzimático lignocelulolítico (CEL).....	24
3.3 Fisiologia do bioprocesso	27
3.4 Agitação, aeração e concentração de oxigênio dissolvido	29
3.5 Escalonamento de processo para produção de CEL	30
3.5.1 Critérios de escalonamento relacionados à agitação.....	35
3.5.2 Critérios de escalonamento relacionados ao oxigênio dissolvido ou aeração....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Caracterização dos fermentadores	41
4.1.1 Dimensões dos fermentadores	41
4.1.2 Determinação do k_{La}	43
4.2 Microrganismos e estocagem da cultura.....	45
4.3 Preparo do inóculo para fermentação	46
4.4 Cultivo de <i>T. harzianum</i> – produção de CEL em fermentador de 2 L	46
4.4.1 Avaliação da concentração de oxigênio dissolvido.....	47
4.4.2 Avaliação da velocidade de agitação e tipo de impelidor	48
4.4.3 Comparação entre as linhagens de <i>T. harzianum</i> nativa e mutante.....	49
4.5 Cultivo de <i>T. harzianum</i> – produção de CEL em fermentador de 100 L.....	50
4.5.1 Escalonamento – velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) e vazão específica de ar (ϕ_{ar})	51
4.5.2 Escalonamento – faixa de k_{La}	53
4.6 Acompanhamento dos cultivos.....	54
4.6.1 Análise de gases de entrada e saída dos fermentadores	55
4.6.2 Análise morfológica do <i>T. harzianum</i> ao longo dos cultivos.....	56
4.6.3 Medida de viscosidade	57
4.7 Determinação das atividades enzimáticas	58

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Avaliação da concentração de oxigênio dissolvido	59
5.2	Cultivos com velocidades de agitação fixas	65
5.3	Comparação de linhagens de <i>T. harzianum</i>	75
5.4	Caracterização dos fermentadores	79
5.4.1	Determinação de k_{La} em fermentadores de 2 L e 100 L	79
5.5	Estratégias de escalonamento	82
5.5.1	Velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) e vazão específica de ar (ϕ_{ar})	82
5.5.2	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La})	86
6	CONCLUSÕES	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
	APÊNDICE A	97

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas observou-se um forte crescimento de iniciativas voltadas para substituição de fontes de energia fósseis por fontes renováveis e sustentáveis de energia, principalmente devido às mudanças climáticas que estão cada vez mais evidentes e são associadas ao aumento de catástrofes naturais e alterações importantes em muitos ecossistemas.

Há fortes evidências científicas (Stocker et al., 2013) indicando que o homem vem acelerando as mudanças climáticas e aumentando os prejuízos ao meio ambiente com o uso de combustíveis fósseis, já que estes emitem gases causadores do efeito estufa (GEE), como dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4), por exemplo. Entre os GEE, o CO_2 é o principal responsável pelo efeito estufa já que, mesmo outros gases tendo maior potencial de retenção de calor (clorofluorcarbono, óxido nitroso e CH_4), a emissão de CO_2 é feita em quantidade muito superior quando comparada aos demais GEE.

As fontes renováveis – plantas, algas e microrganismos, por exemplo – têm a grande vantagem de promoverem o reciclo de carbono em um curto espaço de tempo. Transformam carbono que está presente na atmosfera na forma de CO_2 em biomassa estrutural (celulose, hemicelulose, lignina, pectina, entre outros) ou em substâncias de reserva como lipídios e carboidratos, os quais são acumulados no interior de suas células ou em estruturas específicas para esta função. Muitas destas fontes orgânicas podem ser utilizadas direta ou indiretamente para obtenção de energia e, ao fim do ciclo, voltam para a atmosfera em forma de CO_2 . Assim, se desconsiderarmos as máquinas e equipamentos utilizados para a produção e processamento destas biomassas – muitos dos quais utilizam energias fósseis para seu funcionamento –, o carbono fixado pelas fontes renováveis é igual ao carbono emitido, não havendo aumento de CO_2 na atmosfera ao longo do tempo. Com a evolução tecnológica, é de se esperar que as máquinas utilizadas para a produção e processamento destas biomassas também usem energias de fontes renováveis e, portanto, não haja emissões nestas etapas.

Mesmo com inúmeros aspectos socioambientais contrários ao uso de combustíveis fósseis, países com grande importância econômica no cenário mundial, como Estados Unidos e Brasil, ainda adotam ou adotaram recentemente políticas que

favorecem o uso das fontes de energia fósseis e, como consequência, diminuem a atratividade econômica de fontes renováveis. Um exemplo de retrocesso recente foi a saída dos Estados Unidos do Acordo de Paris, deixando clara a vontade de um dos países com maior importância econômica do mundo em não cooperar com os demais países na luta contra as alterações climáticas. Já em âmbito nacional, observamos nos últimos anos uma diminuição do consumo de etanol combustível em comparação ao consumo de gasolina a partir de 2009, como pode ser observado na Figura 1.1.

Figura 1.1. Consumo de etanol combustível em relação ao consumo de gasolina C no Brasil de 2000 a fevereiro de 2017 (Elaboração própria a partir de dados da ANP, 2017).

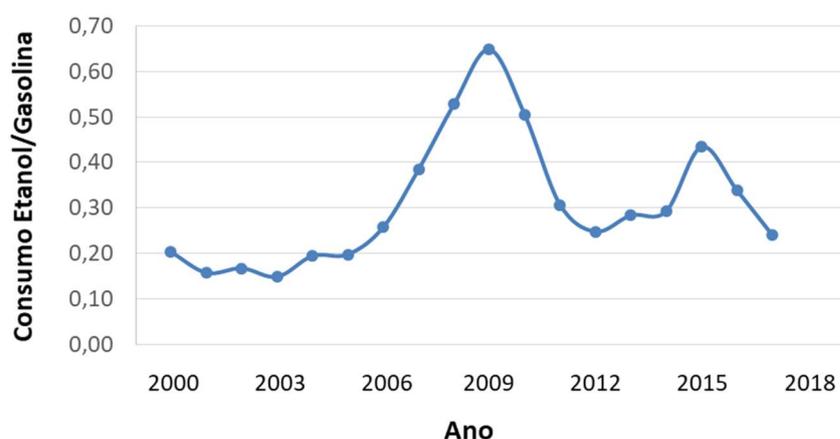


Figura 1.2. Preço em dólar do barril de petróleo Brent de 2000 a 2017 (IFC Markets).



O consumo de etanol cresceu até 2009, impulsionado principalmente pelo aumento de carros *flex fuel* em circulação e pelo crescente preço mundial do petróleo (Figura 1.2), cenário em que o etanol pôde ser vendido a preços vantajosos ao consumidor em relação ao preço da gasolina (preço do etanol deve ser menor que 70% do preço da

gasolina, devido à menor densidade energética do etanol) e ao mesmo tempo ser lucrativo ao produtor. Naquele ano, cerca de 80% dos carros *flex fuel* eram abastecidos prioritariamente com etanol. Porém, em 2012, quando o preço internacional do petróleo já havia voltado a patamares próximos ao seu pico histórico após uma grande queda entre 2008 e 2009, apenas 27% daqueles veículos continuavam a utilizar etanol na maior parte do tempo. Este revés se deu principalmente por três fatores: (i) falta de políticas sistêmicas e de longo prazo para o setor de etanol que propiciasse um mínimo de segurança para o produtor e que trouxesse maior estabilidade aos preços praticados; (ii) utilização da gasolina por parte do governo federal como elemento de política econômica para controle da inflação, mantendo a gasolina a preços consideravelmente mais baixos que o preço deste combustível no mercado internacional, especialmente a partir de 2011; (iii) queda na produtividade dos canaviais, impactada pela crise de 2008 que reduziu crédito, aumentou os custos de produção e, por consequência, reduziu investimentos na renovação dos canaviais. Também, coincidiu com o período de intensificação da mecanização para colheita e plantio, o que contribuiu para a queda de produtividade no campo devido ao maior tráfego de máquinas pesadas no campo. (BBC Brasil, 2013).

Assim, o volume relativamente baixo de etanol combustível comercializado atualmente no Brasil em comparação à gasolina é o resultado negativo causado por uma série de equívocos políticos que desfavoreceram o etanol no mercado interno juntamente com um cenário global com baixos preços do petróleo, especialmente a partir de 2015. No entanto, o Brasil tem a oportunidade de utilizar o clima favorável, a disponibilidade de grandes áreas de terras subutilizadas e a tecnologia já desenvolvida e em desenvolvimento no país para ampliar a participação do etanol no mercado interno e externo. Este é um importante passo para que o Brasil cumpra o Acordo de Paris firmado entre representantes dos principais países do mundo durante a 21ª Conferência das Partes da ONU (COP 21, 2015), cujo principal objetivo é a diminuição da emissão de gases de efeito estufa para desacelerar as consequências negativas causadas pelo homem ao meio ambiente.

Nesta direção, recentemente foi lançada pelo Governo Federal uma proposta para o Programa RenovaBio com o objetivo de incentivar a produção de biocombustíveis (etanol, biodiesel, biogás e bioquerosene de aviação) no país, tendo em vista os compromissos assumidos no Acordo de Paris. Para isso, o Programa visa assegurar

previsibilidade para a participação dos biocombustíveis no mercado, promover a geração de investimentos e empregos e promover a competitividade do Brasil no mercado internacional de biocombustíveis (Delgado et al., 2017).

Uma informação de grande relevância da estimativa de ganhos ambientais do etanol em relação à gasolina é a grande redução de emissões resultante da substituição da gasolina pelo biocombustível. Segundo Wang et al. (2007), o etanol brasileiro de primeira geração reduz as emissões em 78% em comparação com a gasolina. Já o etanol de segunda geração tende a ter resultados ainda melhores, chegando à redução de 86% das emissões. Apenas como comparação adicional, o etanol de milho produzido pelos Estados Unidos tem apenas 19% de redução de emissões, mostrando que o Brasil tem grande potencial para liderar a consolidação global dos biocombustíveis, em especial do etanol.

Neste contexto, a produção de etanol de segunda geração (E2G) vem se tornando cada vez mais uma alternativa interessante do ponto de vista técnico e econômico para a substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis. Para sua produção, utiliza-se biomassa lignocelulósica proveniente especialmente de subprodutos agroindustriais, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, casca de arroz e de trigo, sabugo e palha de milho, bagaço de sorgo sacarino, gramíneas e resíduos florestais. No Brasil, uma vez que a cana-de-açúcar é a matéria-prima predominante para produção de E1G, é natural que os subprodutos da cana-de-açúcar sejam os mais utilizados para estudos, bem como nas primeiras plantas de produção de E2G (Bon et al., 2008; Milanez et al., 2015). Além da abundância de matéria-prima presente nas usinas de E1G, outro fator importante para a viabilidade técnico-econômica do E2G é a possibilidade de se realizar a integração energética das usinas de E1G e E2G. Uma das grandes vantagens da inclusão do E2G é a possibilidade de se aumentar a produção de etanol em litros por hectare de cana-de-açúcar plantada, diminuindo a necessidade de ampliação de área plantada para a expansão do mercado de etanol, deixando disponível mais área de terra para a expansão de outras culturas que podem ser utilizadas para produção de alimentos ou outros biocombustíveis, por exemplo.

A utilização dos subprodutos da indústria sucro-energética pode resultar, dependendo da otimização do ciclo energético das destilarias, em aumento da produção de etanol de até 50% em relação aos níveis atuais sem aumento da área plantada de

cana-de-açúcar (IPT, 1990; Macedo, 2005). Há projeções que indicam um aumento ainda maior, de 70% até 2030, o qual considera ganhos de rendimento e produtividade da tecnologia e inclusão de outras biomassas, como a cana energia (Milanez et al., 2015).

A produção de E2G envolve uma série de etapas. As principais delas são: pré-tratamento da biomassa lignocelulósica para exposição de seus polissacarídeos constituintes à ação das enzimas envolvidas na etapa seguinte, a hidrólise enzimática. Esta etapa, por sua vez, promove a liberação dos açúcares que constituem os polissacarídeos da biomassa através da ação de um coquetel enzimático composto por uma série de enzimas que atuam sinergicamente na degradação da biomassa, liberando açúcares. Estes carboidratos são liberados nas formas monoméricas e posteriormente enviados para a etapa de fermentação alcoólica, na qual são utilizadas leveduras para transformar os açúcares em etanol.

O coquetel enzimático, responsável pela hidrólise da biomassa, é produzido usualmente por fungos filamentosos em fermentação submersa, cujo processo tem como principais características ser aeróbico, apresentar alterações de viscosidade ao longo do tempo e ser mais afetado por cisalhamento em comparação a leveduras e bactérias. Os coquetéis enzimáticos utilizados atualmente pela indústria para hidrólise de materiais lignocelulósicos são produzidos por poucas empresas multinacionais, como Novozymes e DSM. Estas empresas já estão há décadas investindo no desenvolvendo destes coquetéis e regularmente lançam coquetéis mais avançados que apresentam melhor desempenho que os coquetéis anteriores frente a diferentes materiais lignocelulósicos. No entanto, por serem poucas as empresas que dominam esta tecnologia, tiram vantagem econômica de sua posição.

Pensando em maior competitividade e, conseqüentemente, menor preço do E2G ao consumidor final, é importante que o Brasil viabilize o aumento nos investimentos para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos lignocelulolíticos visando a produção de biocombustíveis e outros produtos. Este desenvolvimento precisa compreender tanto os aspectos de ciência básica – responsável pela descoberta de novas enzimas ou melhoramento de enzimas já conhecidas, conduzindo as pesquisas em pequena escala – como também os aspectos de transferência das tecnologias criadas em laboratório até a escala produtiva.

No que se refere a ciência e desenvolvimento de tecnologia em pequena escala, o Brasil está desenvolvendo um bom trabalho nas universidades e centros de pesquisa com grande abrangência temática e linhas de financiamento para fomentar de forma razoável tais pesquisas. No entanto, no que se refere a transferência de tecnologia para o setor produtivo, o Brasil ainda precisa melhorar muito sua atuação em todas as áreas, aproximando a ciência e a indústria. Está é uma crítica constante e generalizada ao Brasil, já que em 2017 novamente decepcionou e ocupou apenas a 69ª colocação entre 127 países analisados pelo Índice Global de Inovação, divulgado pela Universidade Cornell da Suíça, atrás de países economicamente muito menos relevantes no cenário mundial (Agência de Notícias CNI, 2017).

Na área de ampliação de escala da produção de coquetel enzimático em que este trabalho está inserido, há poucos trabalhos publicados, mesmo considerando a produção científica e tecnológica mundial. Este tema é crítico por envolver uma série de características de processo, como utilização de fungos filamentosos que possuem certa sensibilidade a cisalhamento e, ao mesmo tempo, demanda de oxigênio relativamente alta em determinadas fases do processo. Também há alterações reológicas e uso de fontes de carbono sólidas que dificultam a condução do processo, principalmente em relação a transferência de massa. Por estes motivos, é importante que mais conhecimento a respeito deste tema seja gerado e difundido, de forma a subsidiar melhorias tecnológicas na área de biocombustíveis e, por fim, possibilitar a implantação de novas unidades industriais ou ampliação de unidades existentes.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é propor condições viáveis para realização da ampliação de escala de processo de produção de CEL partindo de fermentador de 2 L para fermentador de 100 L utilizando linhagens de fungos filamentosos da espécie *Trichoderma harzianum*.

Os objetivos específicos inseridos neste contexto são:

1. Caracterização de biorreatores de 2 L e 100 L quanto à geometria e ao $k_L a$;
2. Produção de CEL por fermentação submersa em batelada:
 - a. Comparação dos resultados de produtividade de CEL de cultivos realizados em fermentadores de 2 L utilizando dois tipos de impelidores (Rushton e pás inclinadas) e velocidade de agitação de 200 a 600 rpm;
 - b. Comparação entre as linhagens de *Trichoderma harzianum*: linhagem P49P11 (cepa selvagem) e linhagem mutante obtida em projetos complementares realizados no grupo de pesquisa UNICAMP/CTBE. Cultivos realizados em fermentadores de 2 L para escolher a linhagem mais adequada para o escalonamento do processo em termos de produtividade do CEL e aspectos relacionados à viabilidade técnica para realização da ampliação de escala;
 - c. Proposição e validação de critérios de ampliação de escala para produção de CEL em fermentador de 100 L.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A necessidade contínua e crescente de energia demandada pela sociedade e as graves mudanças climáticas que são cada vez mais evidentes em muitas regiões e ecossistemas faz crescer a importância de soluções para fornecimento de energias limpas, provenientes de fontes renováveis e não poluidoras do meio ambiente. A eficiência na produção energética é fundamental tanto no aspecto ambiental, para a redução de uso de recursos e diminuição das emissões de GEE, como também no aspecto econômico, fornecendo vantagens competitivas às empresas com melhor desempenho. Os materiais lignocelulósicos são alternativas muito interessantes para a produção sustentável de diversas formas de energia, como térmica, elétrica e combustíveis líquidos e gasosos. O etanol se apresenta como uma ótima opção para substituição da gasolina, por exemplo, mas também possui uma aceitação crescente na indústria química como matéria-prima para a produção de polímeros plásticos e outros produtos. O etanol de segunda geração é uma alternativa para aumentar a oferta de etanol, colaborando para que a matriz energética se torne mais sustentável.

3.1 Etanol de segunda geração

Para que os materiais lignocelulósicos sejam convertidos a etanol, os polímeros constituintes da biomassa, celulose e hemicelulose, devem ser convertidos em seus monômeros, açúcares fermentescíveis de seis carbonos (hexoses, C6, principalmente D-glicose) e cinco carbonos (pentoses, C5, principalmente D-xilose e L-arabinose).

A rota mais tradicional desta conversão baseia-se em pré-tratamento físico-químico da biomassa que tem como principal função a desconstrução da estrutura lignocelulósica pela remoção da hemicelulose e parte da lignina. Também promove a abertura das cadeias de celulose para viabilizar a etapa de hidrólise enzimática, na qual o coquetel enzimático lignocelulolítico (CEL) precisa ter acesso às cadeias de polissacarídeos a fim de hidrolisá-las até seus monômeros constituintes.

A etapa de hidrólise enzimática deve ser realizada preferencialmente com altas cargas de sólido (15% a 30% m/m) para diminuir tamanho e/ou o número de reatores destinados a esta etapa, de forma a diminuir o custo necessário para instalação. Também,

é necessário utilizar coquetéis enzimáticos eficientes e baratos que possibilitem obter boas conversões (50% a 70%) dos polímeros de celulose e hemicelulose até seus monômeros constituintes em tempos razoáveis. Neste sentido, avaliações econômicas do processo global de E2G podem indicar se é mais interessante realizar hidrólises enzimáticas com tempos mais curtos ou buscar maximizar a conversão. Na primeira hipótese, se obtêm conversões ligeiramente menores, porém o número de reatores necessários para processar o mesmo volume de material lignocelulósico é menor. Na segunda hipótese, a conversão é maximizada, diminuindo a necessidade de concentração deste licor para obtenção de um vinho fermentado com uma determinada concentração de etanol e, por consequência, diminuindo o gasto energético nos evaporadores. Diminui também a quantidade de material a ser destinado para a produção de uma mesma quantidade de E2G, já que está se aproveitando uma fração maior do açúcar contido na biomassa para obtenção de etanol. Ao final da hidrólise enzimática, os sólidos remanescentes podem ser enviados para as caldeiras a fim de, juntamente com uma parte do bagaço e/ou palha de cana-de-açúcar, gerar vapor e energia elétrica de forma a suprir as necessidades da usina e possibilitar aumento de receita com a venda de energia elétrica excedente.

As correntes de carboidratos monoméricos geradas a partir do pré-tratamento e da hidrólise enzimática do material lignocelulósico podem passar por separação sólido-líquido e/ou destoxificação, se necessário, para serem posteriormente fermentadas a etanol. Os açúcares C6 são facilmente fermentados por leveduras convencionais do gênero *Saccharomyces*, utilizadas comumente nas usinas de primeira geração para produção de etanol. Já os açúcares C5 podem ser fermentados a etanol por leveduras geneticamente modificadas ou por outros gêneros de leveduras que naturalmente consomem C5, como algumas dos gêneros *Spathaspora* e *Scheffersomyces*, entre outros (Mosier et al., 2005; Milanez et al., 2015; Kuyper et al., 2005; Hou, 2012).

3.2 Fungos filamentosos e o coquetel enzimático lignocelulolítico (CEL)

Fungos filamentosos têm papel central na produção de etanol de materiais lignocelulósicos. Este grupo de microrganismos tem sido tradicionalmente utilizado para produção de coquetel enzimático lignocelulolítico (CEL) para hidrólise dos principais componentes da celulose e da hemicelulose, justamente por já produzir naturalmente um

coquetel praticamente completo, sendo eventualmente necessário incluir poucas enzimas acessórias ou aumentar a quantidade de algumas enzimas que estejam presentes em proporção menor que o ideal.

Os principais produtores de hidrolases são linhagens selvagens ou modificadas de fungos filamentosos (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Humicola* sp.) (Kadam, 1996; Lynd et al., 2002; Bon et al., 2008), embora linhagens geneticamente modificadas das leveduras *Pichia pastoris* (Damaso et al., 2003; Jahic et al., 2006; Thongekkaew et al., 2008), *Saccharomyces cerevisiae* (Qin et al., 2008) e *Kluyveromyces* sp. (Hong et al., 2007) também sejam potenciais produtoras de hidrolases.

As hidrolases responsáveis pela despolimerização dos materiais lignocelulósicos ou da polpa de celulose podem ser divididas em dois grandes grupos: celulases e hemicelulases. Celulases formam um grupo de enzimas que catalisam sinergicamente a hidrólise da celulose e podem ser classificadas em três grandes grupos: endoglicanases (ED, EC. 3.2.1.4.); celobiohidrolases (CBH, EC. 3.2.1.91) e β -glicanases (BG, EC. 3.2.1.21). As ED atacam internamente e randomicamente as cadeias da celulose gerando oligossacarídeos. As CBH atacam as extremidades das cadeias da celulose formando celobiose ou celotriose (dissacarídeo e trissacarídeo, respectivamente, compostos por unidades de glicose ligadas por ligações covalentes nas posições β 1-4). Pela especificidade de ataque aos terminais da cadeia de celulose elas também são conhecidas como exoglicanases. As BG hidrolisam celobiose e outros celooligossacarídeos de cadeia curta até D-glicose (Thongekkaew et al., 2008).

A família das hemicelulases é complexa e contempla várias enzimas dos grupos endoxilanase, exoxilanase e esterase que hidrolisam a hemicelulose em seus principais carboidratos: xilose, arabinose, manose, glicose e galactose (Jeffries, 1994; Wyman, 1996).

Trichoderma reesei tem sido o microrganismo de escolha para produção industrial de celulases (Wyman, 1996; Ellilä et al., 2017). Várias empresas comercializam ou já comercializaram complexos enzimáticos lignocelulolíticos que foram provavelmente baseados neste microrganismo (Celluclast 1.5L, Cellic CTec, Cellic CTec2 e Cellic CTec3 da Novozymes A/S, Dinamarca; Accellerase 1000TM da Genencor-Danisco, EUA; Celloviridin G20 da Berdsky Fermentation Plant, Rússia; BioAce da Dyadic International, Inc., EUA). Entretanto, outros sistemas parecem possuir perfis de celulases

mais adequados, já que o equilíbrio entre as principais enzimas deste complexo – celobiohidrolases, endoglucanases, β -glicosidase, xilanases, principalmente – deve ser considerado para conversão adequada dos polissacarídeos de biomassas pré-tratadas a carboidratos fermentescíveis (Merino e Cherry, 2007). Martins et al. (2008) compararam diversas atividades dos complexos celulásicos de *T. reesei* (Celucast 1.5L, Novozymes) e *P. echinulatum*, concluindo que o segundo possui um complexo celulásico mais balanceado, especialmente por produzir maior quantidade de β -glicosidase.

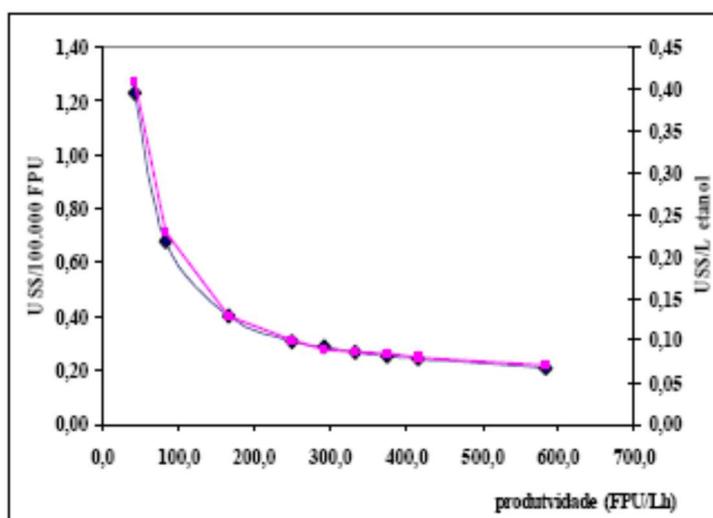
Mais recentemente, Delabona et al. (2012a) isolaram uma linhagem selvagem identificada como *Trichoderma harzianum* P49P11 que apresentou resultados de produtividade de complexo lignocelulolítico promissores, além de também apresentar equilíbrio entre as principais enzimas produzidas (endoglucanase, celobiohidrolase, β -glicosidase e xilanase). Desde então, este fungo é um dos focos de estudo do grupo de produção de enzimas do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) com a utilização de diferentes substratos, condições de cultivo, suplementação com enzimas acessórias e técnicas de mutação genética, a fim de melhorar a produtividade do complexo enzimático e eficiência deste complexo frente a materiais lignocelulósicos pré-tratados (Delabona et al., 2013a, Delabona et al., 2013b, Costa, 2017, Costa et al., 2016).

É reconhecido que a produção do coquetel enzimático é fator chave para desenvolvimento da tecnologia de produção de E2G, já que seu custo de produção está consideravelmente vinculado ao preço daquele insumo, podendo representar de US\$ 0,06 a US\$ 0,38 por litro de etanol produzido (Himmel et al., 1999; Galbe et al., 2007; Klein-Marcuschamer et al., 2012; Milanez et al., 2015; Johnson, 2016). Portanto, para a aplicação destas enzimas em processos de produção de E2G, ainda há importantes desafios a serem vencidos, especialmente no que diz respeito a custos de produção.

Himmel et al. (1999) publicaram uma revisão onde apontam os principais gargalos da produção de celulases no contexto da produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos. Na simulação de custos de produção realizada, os seguintes parâmetros de produção de celulases foram considerados: processo em batelada utilizando-se celulose como fonte de carbono, produtividade de 75 FPU/L.h e fator de conversão da ordem de 200 FPU/g de fonte de carbono. Segundo aqueles autores, o custo de etanol deve ser minimizado com produtividades da ordem de 200 a 250 FPU/L.h.

Estudo econômico realizado por Pradella et al. (2009) corrobora este resultado de produtividade, como pode ser observado na Figura 3.1, no qual foram avaliados os custos de produção de CEL *in house*, ou seja, com a unidade de produção de enzimas localizada dentro da usina. Concluiu-se que produtividades acima de 150 FPU/L.h são desejáveis e resultariam em custo de produção de CEL abaixo de US\$ 0,10/L de etanol produzido.

Figura 3.1. Variação do custo da enzima e custo relativo da enzima/L etanol produzido em relação à produtividade enzimática (potência = 2,0 kW/m³; produção de etanol = 10⁶ L/dia) (Pradella et al., 2009).



Esta mesma faixa de custo de produção de enzimas é utilizada no estudo publicado por Milanez et al. (2015), que utilizam de US\$ 0,13 a US\$ 0,06 por litro de etanol para cenários de curto (5 anos) e longo prazo (15 anos), respectivamente, o que representa aproximadamente 25% do custo total de produção de E2G para ambos os cenários.

3.3 Fisiologia do bioprocesso

A produção de enzimas lignocelulolíticas pode ser realizada em fermentação submersa (FS) ou em estado sólido (FES). A FES apresenta algumas vantagens em relação à FS, como alta produtividade, maior estabilidade do produto, menor repressão catabólica e baixo custo de produção. No entanto, também apresenta dificuldades importantes, principalmente relacionadas ao escalonamento do processo e à separação e purificação do produto. Estudos que abordam tipos de reatores capazes de realizar

adequadamente o escalonamento de processos estão ainda em fase inicial. Neste sentido, aspectos de transferência de massa e de energia são os principais desafios a serem superados. Já a separação ou purificação das enzimas para aplicação em produção de etanol 2G possivelmente pode ser suprimida, utilizando-se diretamente o meio fermentado para a hidrólise enzimática do material lignocelulósico. Portanto, para esta área tecnológica, a purificação apresenta um menor desafio a ser superado. Assim, o principal gargalo da FES é o escalonamento do processo fermentativo, já que ainda não é possível conduzir este tipo de processo de forma eficiente e em escala industrial compatível com o tamanho do mercado, especialmente visando a produção de etanol 2G. Por este motivo, a grande maioria dos processos industriais utiliza FS para produção enzimática em larga escala (Hölker e Lenz, 2005; Singhanía et al., 2009).

Os biorreatores FS se caracterizam por possuírem uma fase abiótica composta em grande parte por água na qual estão dissolvidos ou suspensos os componentes do meio de cultura (fontes de carbono, sais de nitrogênio, fósforo, magnésio etc), oxigênio dissolvido (OD) e produtos do metabolismo excretados pelas células (CO_2 e outros gases, álcoois, ácidos orgânicos, proteínas, etc), além de uma fase biótica composta pelas células microbianas. O meio de cultura e o biorreator podem ser esterilizados em conjunto ou separadamente e o biorreator, após ajustadas suas condições de processamento (pH, temperatura, concentração de OD, agitação e aeração), é inoculado com uma população de microrganismo denominada de inóculo ou semente, que corresponde a cerca de 2% a 10% da massa de microrganismos a ser produzido.

O processo é operado em modo batelada ou em batelada alimentada. Neste caso, o aporte intermitente ou contínuo de indutores de síntese, fontes de carbono ou de outros componentes do meio de cultura é realizado ao longo do cultivo. Há fontes de carbono que servem principalmente para crescimento celular, como é o caso, por exemplo, da sacarose e do glicerol. Por outro lado, há materiais que servem tanto para crescimento microbiano como também para indução da síntese enzimática, como é o caso de materiais celulósicos ou lignocelulósicos modificados a partir de diferentes biomassas vegetais. Tais modificações são realizadas normalmente por tratamentos físico-químicos a fim de permitir o acesso das enzimas às cadeias poliméricas para a liberação de açúcares que são consumidos pelos microrganismos.

O ajuste do valor de pH e temperatura ao valor do *set point* é feito automaticamente. Também, por se tratar de um bioprocessamento aeróbico, os níveis de agitação e aeração são alterados durante o processo para manutenção dos níveis de OD em condições adequadas. Ocasionalmente se faz necessária a suplementação com oxigênio puro, sobretudo nos bioprocessos com fungos filamentosos e os que utilizam cultivo a alta densidade celular (Lee, 1996; Riesenber e Guthke, 1999).

3.4 Agitação, aeração e concentração de oxigênio dissolvido

A produção de celulases em biorreatores é dependente de uma série de variáveis ambientais que são controláveis em maior ou menor nível. Entre elas podemos destacar a temperatura, o pH, a concentração de OD no meio fermentativo e a tensão de cisalhamento imposta pelos impelidores às células dos microrganismos.

Lejeune e Baron (1995) realizaram estudos utilizando lactose e Avicel (basicamente composta por celulose) como fontes de carbono para investigar os efeitos da agitação na produção enzimática de *Trichoderma reesei* mantendo a concentração de oxigênio a 30% da saturação. As agitações utilizadas corresponderam a velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) de 0,9 a 2,7 m/s. Os resultados mostraram que, utilizando Avicel como substrato, o crescimento microbiano e a produção de enzimas são limitados pela hidrólise de Avicel, enquanto que utilizando lactose como fonte de carbono, o crescimento microbiano seguiu um perfil semelhante nas diferentes agitações, mas a produção de enzima foi fortemente afetada pela agitação, apresentando uma forte queda em condições de maior agitação. Isso sugere uma relação entre a menor produção de celulases e a maior destruição das hifas.

A tensão de cisalhamento causada pela agitação pode influenciar negativamente a produção do coquetel enzimático. Contudo, deve-se utilizar um nível mínimo de agitação que possibilite a manutenção do OD em no mínimo 10% ou 20% da saturação com ar para manutenção da viabilidade celular e produção do CEL sem que seja atingida a concentração crítica de oxigênio para o microrganismo (Lejeune e Baron, 1995).

O fornecimento de oxigênio no decorrer de todo o cultivo aeróbico se faz necessário pela baixa solubilidade do oxigênio em meio aquoso, cuja concentração

costuma ser entre 5 a 7 mg de O₂/L. Neste sentido, a Lei de Henry propõe uma relação entre a concentração de oxigênio dissolvido no equilíbrio (solução saturada) e a pressão parcial do oxigênio no gás, representada na Equação 1.

$$C_s = H \cdot p_g \quad (1)$$

Onde: C_s é a concentração de oxigênio na saturação

H é a constante de Henry

p_g é a pressão parcial do oxigênio na fração gasosa, sendo:

$$p_g = x_{O_2} \cdot P$$

x_{O₂} é a fração molar do oxigênio no gás

P é a pressão total do gás

Os solutos gasosos, diferentemente dos solutos sólidos, possuem menor solubilidade em água conforme a temperatura aumenta. Também, a presença de outras substâncias dissolvidas diminui a solubilidade do oxigênio no meio, o que de fato acontece nos bioprocessos devido à presença de nutrientes e sais no meio de cultura. Nestes casos, o que se altera na equação 1 é a constante de Henry, a qual, portanto, é dependente da temperatura e da concentração de outras substâncias dissolvidas.

Ainda a partir desta equação 1 é possível concluir que o aumento da pressão parcial do oxigênio na fração gasosa (p_g), seja por enriquecimento de oxigênio no ar de entrada ou por aumento da pressão do reator, resulta proporcionalmente em aumento da concentração de oxigênio na saturação (C_s). Estas são estratégias adotadas para, juntamente com aumento de agitação e aeração, manter a transferência de oxigênio em nível adequado (Schmidell, 2001).

3.5 Escalonamento de processo para produção de CEL

A ampliação de escala de processos fermentativos foi identificada como um aspecto crucial na biotecnologia na década de 40 durante a produção de penicilina em escala industrial. Durante o escalonamento de processos espera-se obter rendimentos, reprodutibilidade e qualidade do produto iguais ou melhores em comparação às escalas

menores. No entanto, o que se costuma observar são uma série de dificuldades que acompanham a transferência do processo para escalas industriais. No geral, o aumento do tamanho de reatores é acompanhado pelo aumento do tempo de mistura, causado principalmente pelo aumento da coluna de líquido. Em um processo em batelada alimentada, por exemplo, no qual os nutrientes são alimentados pela parte superior do reator e o oxigênio pela parte inferior, a parte superior se mantém mais rica em nutrientes e pobre em oxigênio, enquanto que a parte inferior apresenta maior concentração de oxigênio, porém é mais pobre em nutrientes. Tendo em vista que os microrganismos circulam pelo reator, em um momento estão em um ambiente com bastante nutriente e pobre em oxigênio e em outro momento estão em um ambiente em condições contrárias. Alterações constantes de ambiente pelas quais os microrganismos passam podem ocasionar mudanças significativas em seu metabolismo, reduzindo o crescimento microbiano e a produtividade geral do processo, além de aumentar a formação de subprodutos (Schmidt, 2005).

Em escala de laboratório, é possível fornecer condições de homogeneidade e transferência de massa adequadas aos microrganismos de forma relativamente fácil e eficiente. No entanto, conforme a escala de produção aumenta, também se torna mais difícil a manutenção destas condições. De forma a ilustrar as diferenças e semelhanças observadas entre equipamentos de escalas diferentes, Li et al. (2016) realizaram caracterizações de fermentadores de 1, 10, 100 e 800 L de volume útil. Foi observado que conforme o volume do fermentador aumenta, o tempo de mistura correspondente à mesma velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) também aumenta na grande maioria dos casos. Este aumento é especialmente percebido entre os fermentadores de 1 L e 100 L, como pode ser observado na Tabela 3.1, que apresenta valores de tempo de mistura para fermentadores de 1 L, modelo DASGIP, e 100 L, modelo BioFlo 610, ambos fabricados pela empresa Eppendorf.

Tabela 3.1. Tempos de mistura para fermentadores de 1 L e 100 L. (Adaptado de Li et al., 2016).

Velocidade da extremidade do impelidor, v_{tip} (m/s)	Tempo de Mistura para Fermentador de 1 L (s)	Tempo de Mistura para Fermentador de 100 L (s)
0,6	10	39
1,2	8	30
1,8	5	26
2,8	4	20

No que diz respeito à transferência de oxigênio, é desejável que os fermentadores de diferentes tamanhos envolvidos em escalonamento de bioprocessos aeróbicos tenham capacidade de suprimento de oxigênio similares. Dessa forma, processos dependentes de altas taxas de transferência de oxigênio poderão ser escalonados. Para os fermentadores de 1 L e 100 L citados anteriormente, apesar de seus tempos de mistura serem bastante diferentes, é possível se obter taxas de transferência de oxigênio similares para ambos (Li et al., 2016).

O escalonamento de processos fermentativos com fungos filamentosos aeróbicos continua a ser um desafio na indústria biotecnológica. Como o oxigênio possui baixa solubilidade em água (6,99 mg de O_2/L em água a 35 °C e 1 atm) e, portanto, é comumente um fator limitante para bioprocessos aeróbicos, é necessário suprir a demanda de oxigênio do microrganismo em um ambiente em que, além dos aspectos já abordados anteriormente, há grandes alterações reológicas ao longo do tempo, dificultando ainda mais a transferência de oxigênio e homogeneidade do meio. Assim, é necessário aumentar os níveis de agitação e aeração do processo de forma a superar estas dificuldades e fornecer um ambiente adequado aos microrganismos. Ao mesmo tempo, a morfologia filamentosa destes fungos os torna suscetíveis a tensões de cisalhamento que não costumam afetar negativamente microrganismos não filamentosos (Hardy et al., 2017). No entanto, a sensibilidade dos fungos filamentosos ao cisalhamento depende da espécie do fungo, bem como das características do meio de cultura (presença ou não de componentes sólidos) e da forma de crescimento dos fungos (disperso no meio ou em pellets, por exemplo).

A produção de CEL por fermentação submersa possui importantes requisitos de processo que devem ser observados, principalmente temperatura, pH, transferência de oxigênio, tensão de cisalhamento e homogeneidade. Isso se torna especialmente importante no momento da ampliação de escala, onde tais requisitos, que já foram otimizados em pequena escala, precisam ser transpostos para biorreatores maiores. Nesta circunstância, é necessário empregar um ou mais critérios de escalonamento para viabilizar a condução do processo em biorreatores de maior escala com a mesma produtividade.

A partir de um processo em escala de laboratório, normalmente é recomendável passar por algumas escalas intermediárias até se atingir a escala de produção. Especificamente para o caso do etanol de segunda geração, dependendo da produtividade obtida no processo de produção do coquetel enzimático, seriam necessários fermentadores com 50 a 200 m³ de volume para atender a demanda de uma usina de E2G. Para escalonar um processo de produção de enzimas lignocelulolíticas a partir de fermentadores de bancada até fermentador industrial, é prudente realizar o escalonamento com dois tamanhos intermediários de fermentadores, sendo o primeiro em escala piloto, com 100 a 500 L, e o segundo em escala de demonstração, com volumes de 5 a 10 m³.

Há poucos estudos publicados na literatura a respeito de escalonamento de processo para produção de enzimas aplicadas ao processo de produção de etanol 2G. Por esta razão, este trabalho utilizou como base outros estudos relacionados a escalonamento de processos que empregaram fungos filamentosos para obtenção de diversos produtos.

Neste contexto, Pollard et al. (2007) realizaram um completo estudo com fungo filamentoso para escalonamento da produção de pneumocandina B₀, precursor da caspofungina, que é um importante fungicida para tratamentos clínicos. Os autores avaliaram separadamente os efeitos de velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) e de OD sobre a produtividade da pneumocandina. Também compararam os tempos característicos de mistura (t_m), de transferência de oxigênio (t_{OT}) e de consumo de oxigênio (t_{OC}) para identificar o parâmetro limitante do processo. Verificaram que v_{tip} não influenciava diretamente no processo, ao contrário do OD que, em determinadas concentrações, favorecia a produção de análogos indesejáveis de pneumocandina.

Também concluíram que a transferência de oxigênio era a etapa crítica do processo. Dessa forma, como critério de ampliação de escala, mantiveram a concentração de OD constante em 80% da saturação de ar para as diferentes escalas de fermentadores, o que manteve a produtividade de pneumocandina B_0 constante entre as escalas, bem como manteve as impurezas em níveis toleráveis.

Em se tratando de bioprocessos aeróbicos, os critérios de escalonamento mais utilizados e que tem possibilitado a obtenção de resultados satisfatórios têm sido o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) e a taxa de transferência de oxigênio, que tem relação direta com o k_{LA} . Um exemplo é o estudo de Futatsugi et al. (1993) que reportaram escalonamento da produção de glucoamilase utilizando fungo do gênero *Saccharomycopsis* a partir de frascos agitados até fermentadores de 20 L, 100 L, 200 L e 4 m³ utilizando como critério constante a taxa de transferência de oxigênio, obtendo resultados semelhantes em todas as escalas. Kanda et al. (2010) também reportaram um caso de sucesso no aumento de escala de 500 vezes (de 30 L para 15 m³) para um processo de produção de equinocandina (antibiótico lipopeptídico) em fermentação submersa utilizando fungo filamentosos. O aumento de escala foi realizado utilizando k_{LA} como critério de escalonamento, sendo mantido fixo durante todo o cultivo em 26 h⁻¹. Um ponto crítico levantado neste estudo foi a alta viscosidade observada a partir do terceiro dia de cultivo (entre 5000 e 20000 cP). Além disso, a partir de vários cultivos realizados, foi sugerida uma relação entre diminuição das viscosidade e aumento da produção de equinocandina. Em estudo realizado para produção de lipídeos utilizando microalga, Qu et al. (2013) utilizaram k_{LA} como critério de escalonamento, partindo de frascos agitados de 500 mL, passando posteriormente por fermentadores de 10 e 50 L até chegarem em fermentadores de 1500 e 7000 L. Verificaram que o melhor k_{LA} para o processo foi de 88,9 h⁻¹ e que acima ou abaixo deste valor a produtividade de lipídeos era prejudicada. Por fim, obtiveram resultados equivalentes ou até superiores em fermentadores maiores em comparação aos de menor escala.

Badino Jr. e Schmidell (2001) elencaram os principais critérios de escalonamento utilizados para processos fermentativos agitados e aerados, bem como suas principais características e situações para as quais cada critério é indicado. Alguns dos critérios de escalonamento abordados são apresentados a seguir.

3.5.1 Critérios de escalonamento relacionados à agitação

Neste subgrupo estão relacionados os critérios de ampliação de escala que, na maioria dos casos, resultam em correlações envolvendo velocidade de agitação (N) e diâmetro do impelidor (D_i). Alguns deles, no entanto, podem apresentar também contribuição da taxa de aeração.

3.5.1.1 Potência por unidade de volume (P/V)

Representa a quantidade de energia utilizada para gerar movimento em um fluido contido em um sistema agitado. Há algumas décadas, era o critério de escalonamento mais utilizado, sendo posteriormente superado pelo $k_L a$ para processos aeróbicos. No regime turbulento, a potência não aerada correspondente a um impelidor é calculada pela equação 2.

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D_i^5 \quad (2)$$

Onde: P é a potência não aerada de agitação para cada impelidor, em Watts;

N_p é o número de potência, característico para cada tipo de impelidor e variável conforme o número de Reynolds, adimensional;

ρ é a densidade do fluido sob agitação, em kg/m^3 ;

N é a velocidade de agitação do agitador, em revoluções por segundo;

D_i é o diâmetro do impelidor, em metros.

Para fins de escalonamento considerando regime turbulento e considerando que V é proporcional a D_i^3 , temos a seguinte proporcionalidade a ser utilizada para definir as condições operacionais para a escala que se pretende atingir:

$$\frac{P}{V} \propto N^3 \cdot D_i^2 \quad (3)$$

Para os casos em que há mais de um impelidor no sistema de agitação, pode-se utilizar o gráfico apresentado na Figura 1.4 que correlaciona a potência de agitação de dois impelidores em relação à distância entre estes impelidores no eixo de agitação (H_i) para determinar a potência total dissipada pelo sistema. Percebe-se que impelidores muito

próximos (H_i/D_i menor que 0,5) transmitem pouca potência ao meio, não sendo efetiva a utilização de mais de um impelidor. É recomendável que a distância entre impelidores seja maior que D_i e menor que $2.D_i$. Quando o sistema de agitação conta com mais de dois impelidores equidistantes entre si, utiliza-se o fator fornecido pela Figura 3.2 proporcionalmente ao número de impelidores. Dessa forma, uma configuração com 3 impelidores na qual $H_i = D_i$, P_2/P_1 seria aproximadamente 1,5. No entanto, a configuração conta com 3 impelidores em vez de 2. Portanto, o fator a ser considerado para cálculo da potência total deve ser proporcional, resultando em 2,25 para este caso. Isso significa que a potência dissipada pelo sistema com 3 impelidores é 2,25 vezes maior que a potência dissipada por um sistema com apenas um impelidor.

Em processos aerados é adequado utilizar a potência aerada por unidade de volume (P_g/V) ao invés de utilizar a potência não aerada por unidade de volume (P/V) de forma a levar em consideração a diminuição da potência de agitação devido à presença de bolhas de ar. Para isso, Hudcova et al. (1989) realizaram medidas relacionando P_g/P em relação ao número de aeração (N_A) para configurações com um impelidor e com dois impelidores tipo Rushton, gerando o gráfico apresentado na Figura 3.3.

Figura 3.2. Relação entre a potência transmitida por dois impelidores em relação à transferida por um impelidor (P_2/P_1) em função da relação H_i/D_i para impelidores de pás planas (Hudcova et al., 1989).

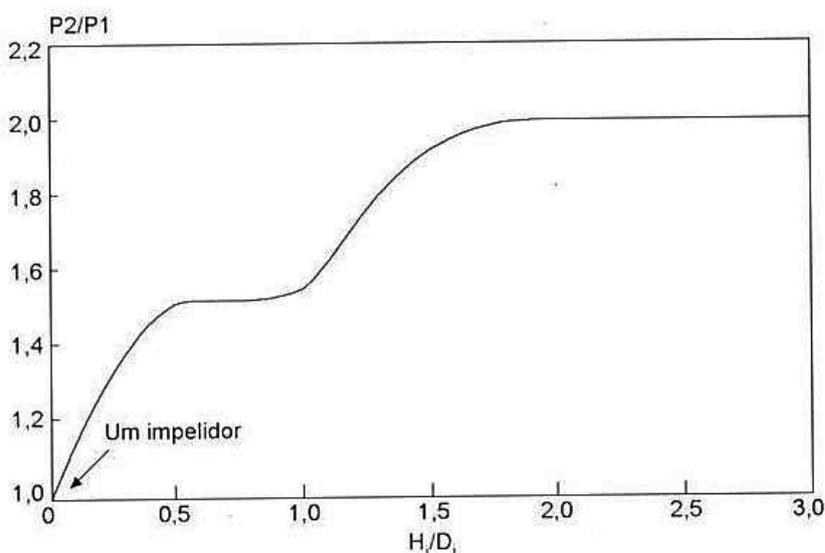
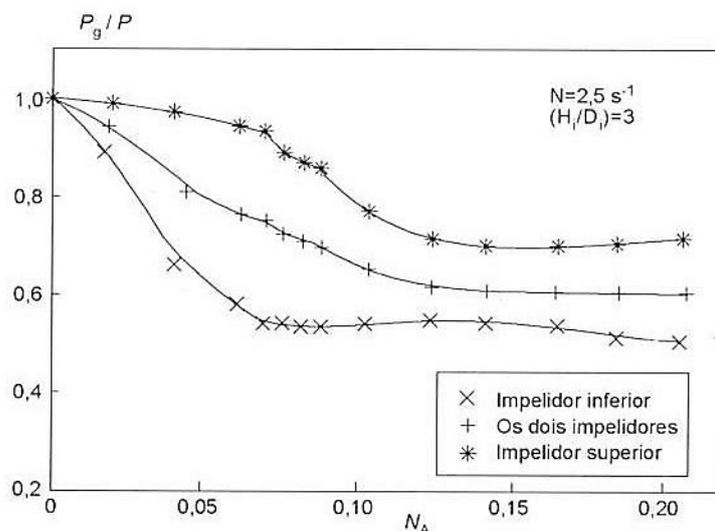


Figura 3.3. P_g/P em função de $N_A = Q/N_i D_i^3$ para sistema de agitação com dois impelidores tipo Rushton (Hudcova et al., 1989).



3.5.1.2 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)

Representa a taxa de transferência de oxigênio para o meio de cultura e está relacionado principalmente com a velocidade de agitação, taxa de aeração, pressão parcial do ar de entrada – composição do ar e pressão interna do reator – e componentes solúveis do meio de cultura. Para bioprocessos altamente dependentes de oxigênio, se mostra como um critério adequado para muitos casos, conforme alguns exemplos apresentados anteriormente. Para utilização deste parâmetro como critério de escalonamento, apesar de haver correlações matemáticas para inferência do valor de $k_L a$, é recomendável realizar medições de $k_L a$ nas duas escalas em questão, de forma a encontrar condições de processo que resultem no mesmo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

3.5.1.3 Velocidade na extremidade do impelidor (v_{tip})

Trata-se de critério de escalonamento especialmente importante para situações em que a manutenção do cisalhamento em níveis aceitáveis é crítica como, por exemplo, para microrganismos filamentosos que são sensíveis a taxas de cisalhamento elevadas (Junker, 2004). Para o cálculo de v_{tip} utiliza-se a equação 4. Assim, para a

definição das condições operacionais entre duas escalas de reatores, utiliza-se a equação 5 que apresenta a proporcionalidade a ser utilizada.

$$v_{tip} = \pi \cdot N \cdot D_i \quad (4)$$

Onde: v_{tip} é a velocidade do impelidor, em m/s;

D_i é o diâmetro do impelidor, em metros;

N é a frequência de agitação, em rotações por segundo.

$$v_{tip} \propto N \cdot D_i \quad (5)$$

3.5.1.4 Tempo de mistura (t_m)

Representa o tempo necessário para homogeneização do meio de cultura, importante parâmetro relacionado com a eficiência do sistema de agitação em fornecer as mesmas condições aos microrganismos em todos os pontos do biorreator. Para processos fermentativos, não é muito utilizado como critério de escalonamento principal, já que na maioria das situações o tempo de mistura não é o parâmetro limitante do processo se comparado à transferência de oxigênio. No entanto, pode ser utilizado como um critério acessório. Além disso, em alguns casos, utilizar o tempo de mistura como critério de escalonamento pode gerar condições de agitação extremamente altas, superando até mesmo os limites dos equipamentos. Isso ocorre pelo fato de, no geral, o tempo de mistura ser maior para reatores maiores.

Conforme comentado anteriormente, Li et al. (2016) observaram que os tempos de mistura para fermentador de 100 L variam de 40 a 30 segundos para a faixa de 0,6 a 1,2 m/s de v_{tip} , considerando apenas a contribuição da agitação, enquanto que para estes mesmos valores de v_{tip} , fermentadores de 1 L apresentam tempos de mistura em torno de 10 segundos ou menos. Para fermentadores industriais é esperado que este tempo de mistura aumente ainda mais, podendo se tornar crítico especialmente em processos fermentativos que apresentem viscosidade mais elevada. Por outro lado, é de se esperar que para agitações baixas como estas, a taxa de aeração auxilie na diminuição do tempo de mistura.

3.5.2 Critérios de escalonamento relacionados ao oxigênio dissolvido ou aeração

Os critérios de ampliação de escala apresentados neste grupo complementam os critérios relatados anteriormente, fornecendo informação sobre a vazão volumétrica de ar (Q) ou concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

3.5.2.1 Oxigênio dissolvido (OD)

Parâmetro relativo que representa a quantidade de oxigênio dissolvido disponível aos microrganismos no meio de cultura. Normalmente, apresentado em porcentagem de oxigênio dissolvido em relação à saturação do meio de cultura com ar. A aplicação deste critério de escalonamento usualmente implica em condições operacionais de agitação e aeração variáveis ao longo do cultivo para manter a concentração de oxigênio dissolvido constante, já que a quantidade de oxigênio demandada pelos microrganismos se altera ao longo das fases do processo fermentativo em função principalmente da concentração celular e da disponibilidade de substrato a ser consumido, entre outros fatores. Este critério precisa ser suportado pelo uso de critérios secundários relacionados à agitação e aeração, caso os microrganismos tenham restrições quanto aos limites de operação, como por exemplo, os microrganismos sensíveis a altas taxas de cisalhamento.

3.5.2.2 Velocidade superficial de ar (V_s)

Se refere à vazão volumétrica de ar em relação à área de seção do biorreator, representada pela equação 6. A relação de proporcionalidade entre duas escalas é apresentada pela equação 7.

$$V_s = \frac{4Q}{\pi D_t^2} \quad (6)$$

Onde: Q é a vazão volumétrica de ar, em m³/s;

D_t é o diâmetro do fermentador, em metros;

Sendo $D_t \propto D_i$, conforme relações geométricas padrão definidas por Rushton, et al. (1950), temos que:

$$V_s \propto \frac{Q}{D_i^2} \quad (7)$$

Onde: Q é a vazão volumétrica de ar;

D_i é o diâmetro do impelidor;

3.5.2.3 Vazão específica de ar (ϕ_{ar})

Se refere à vazão volumétrica de ar em relação ao volume de meio de cultura. É um critério relacionado exclusivamente à vazão de ar e é bastante utilizado em conjunto com critérios de escalonamento que abordam somente aspectos de agitação. A vazão específica de ar é definida pela equação a seguir, cuja unidade utilizada é min^{-1} ou vvm:

$$\varphi_{ar} = \frac{Q}{V} \quad (8)$$

3.5.2.4 Número de aeração (N_A)

O número de aeração é um número adimensional que correlaciona a velocidade superficial de ar (equação 7) com a velocidade da extremidade do impelidor (equação 5), resultando na equação a seguir:

$$N_A = \frac{Q/D_i^2}{N \cdot D_i} = \frac{Q}{N \cdot D_i^3} \quad (9)$$

4 MATERIAIS E MÉTODOS

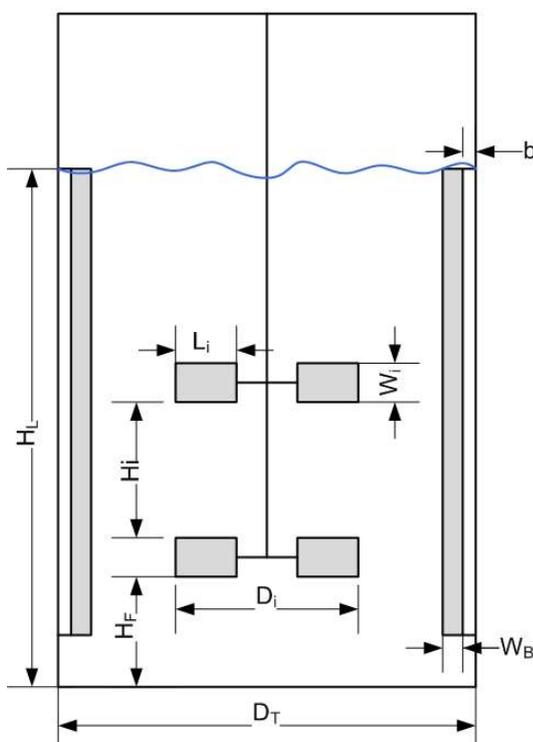
4.1 Caracterização dos fermentadores

A caracterização dos fermentadores de 2 e 100 L foi proposta de forma a abordar dois aspectos. O primeiro refere-se às dimensões dos fermentadores e respectivos sistemas de agitação a fim de fornecer dados para cálculos dos critérios de escalonamento. O segundo aspecto está relacionado a medidas de k_La para faixas de agitação e aeração utilizadas nos cultivos.

4.1.1 Dimensões dos fermentadores

Foram realizadas medidas das principais dimensões dos fermentadores de 2 L e 100 L. Um desenho esquemático com a simbologia das referidas dimensões é apresentado na Figura 4.1.

Figura 4.1. Desenho esquemático com a simbologia das medidas dos fermentadores.



A Tabela 4.1 apresenta as dimensões obtidas para fermentadores de 2 e 100 L, sendo que o primeiro contou com duas configurações diferentes devido ao uso de impelidores tipo Rushton ou de pás inclinadas.

Tabela 4.1. Medidas e correlações dos fermentadores de 2 L e 100 L.

Parâmetros	Fermentador de 2 L	Fermentador de 2 L	Fermentador de 100 L
	Rushton	pás inclinadas	Rushton
V, L	1,5	1,5	100
D_i , cm	5,2	6,0	16,5
D_T , cm	12,5	12,5	38,0
D_i / D_T	0,42	0,48	0,43
H_L , cm	12	12	88,0
H_L / D_T	0,96	0,96	2,32
H_F , cm	2,3	2,3	17,0
H_i , cm	5,2	NA	23
H_i / D_i	1	NA	1,39
W_i , cm	1,8	5,5	2,8
L_i , cm	1,5	2,2	4,0
W_B , cm	1,3	1,3	3,0
b, cm	0,3	0,3	1,2
Nº impelidores	2	1	3

Observa-se que a relação D_i/D_T para os diferentes impelidores e tamanhos de fermentadores é aproximadamente a mesma, especialmente para os impelidores tipo Rushton dos fermentadores de 2 L e 100 L. No entanto, todas as configurações apresentam D_i/D_T maior que 0,33, entendido na literatura como o padrão para reatores (Rushton, 1950; Schmidell, 2001).

Outro ponto relevante é a relação H_i/D_T que, para os fermentadores de 2 L é de aproximadamente 1, enquanto que para o fermentador de 100 L esta relação é de 2,3. Desta forma, é natural que se tenha um maior número de impelidores no fermentador de 100 L para garantir homogeneidade e transferência de massa adequadas ao longo de toda a altura de líquido.

Ainda em relação aos impelidores, outra correlação importante para se obter bom desempenho do sistema de agitação é a distância entre impelidores, H_i , a qual sugere-se que obedeça a seguinte expressão: $D_i < H_i < 2D_i$. Desta forma, um impelidor não interfere negativamente no fluxo gerado pelo outro impelidor (Wang et al., 1979). Para o fermentador de 2 L com dois impelidores Rushton, o valor de H_i está no limite inferior da recomendação. Já para o fermentador de 100 L, H_i está próximo ao centro da faixa recomendada.

Os parâmetros obtidos para as três configurações de fermentador apresentadas anteriormente foram utilizadas para cálculos relacionados ao escalonamento do processo.

4.1.2 Determinação do k_{LA}

Para a determinação de k_{LA} , foi adotado o método apresentado por Wise (1951) para o qual foi utilizada água potável na ausência de biomassa fúngica e empregado sensor óptico de OD, Visiferm Arc DO (Hamilton, EUA). Este sensor possui tempo de resposta de 22 segundos para atingir 63,2% do valor de saturação, o que corresponde a uma constante de atraso (k_e) de $163,6 \text{ h}^{-1}$. Tal tempo de resposta é mais baixo que o observado para sensores polarográficos (da ordem de 35 segundos), tornando possível a determinação mais precisa de valores de k_{LA} mais elevados.

O método consiste em manter a água sob agitação na velocidade desejada e inicialmente borbulhar nitrogênio para retirar todo o oxigênio dissolvido do meio. Na sequência, inicia-se a aquisição dos dados de OD e ao mesmo tempo ativa-se a aeração na vazão desejada. A coleta de dados foi realizada até a estabilização da leitura de OD, indicando saturação do meio.

O cálculo do valor de k_{La} pode ser determinado de duas formas. A primeira delas pode ser utilizada quando os valores de k_{La} são muito menores que a constante de atraso do sensor de OD ($k_e = \frac{1}{\tau_e}$), onde τ_e é o tempo de resposta do sensor de OD para atingir 63,2% do valor de saturação quando se introduz o sensor em meio saturado com oxigênio (Badino, et al., 2000). A equação 10 apresenta a forma integrada para cálculo do k_{La} .

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C_s}\right) = -k_{La} \cdot t \quad (10)$$

Onde: C_s é a concentração de saturação de OD no meio;

C é a concentração de OD ao longo do tempo.

Neste caso, $-k_{La}$ é o coeficiente angular da reta obtida de $\ln\left(1 - \frac{C}{C_s}\right)$ em função do tempo.

A segunda forma de se obter o valor de k_{La} é utilizada nos casos em que a constante de atraso do sensor de OD não é desprezível. Para estes casos, utiliza-se a equação integrada do balanço de massa de oxigênio para a fase líquida modificada por Aiba et al. (1973), que propuseram um modelo de primeira ordem para corrigir o atraso na resposta do sensor de OD. A equação resultante, apresentada a seguir (Equação 11), é ajustada aos dados experimentais de OD utilizando algoritmo de Marquardt (1963).

$$C = C_0 \cdot e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau_e}} + C_s \cdot \left(1 - e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau_e}}\right) + \frac{1/\tau_e \cdot (C_s - C_0)}{1/\tau_e - k_{La}} \cdot \left(e^{-\frac{(t-t_0)}{\tau_e}} - e^{-k_{La} \cdot (t-t_0)}\right) \quad (11)$$

Onde: C é a concentração de OD no tempo t ;

C_0 é a concentração de OD no tempo t_0 ;

C_s é a concentração de saturação de OD;

τ_e é o tempo de resposta do sensor de OD.

Neste projeto foi utilizado o segundo método para cálculo do k_{La} , uma vez que valores de k_{La} relativamente altos foram obtidos e utilizar o primeiro método agregaria erro adicional ao valor obtido.

Também é importante ressaltar que, apesar de o meio de cultura ao longo dos cultivos apresentar viscosidade bastante superior à água, foi utilizado água para as determinações de k_{LA} , já que nosso interesse está nas condições de agitação e aeração que fornecem mesmo k_{LA} para as duas escalas de biorreatores. Neste caso, o k_{LA} real durante o cultivo não é absolutamente importante para se empregar este critério como uma das estratégias de escalonamento do processo.

As medidas de k_{LA} foram realizadas utilizando-se as seguintes condições operacionais para fermentadores de 2 L:

- **Tipos de impelidores:** pás retas tipo Rushton (dois impelidores) e pás inclinadas tipo orelha de elefante com bombeamento para baixo (um impelidor);
- **Agitação:** velocidades de agitação de 200 a 600 rpm;
- **Aeração:** 0,25, 0,5 e 1,0 vvm.

Para fermentador de 100 L, as determinações de k_{LA} foram realizadas com as seguintes condições operacionais:

- **Tipos de impelidores:** pás retas tipo Rushton (três impelidores);
- **Agitação:** velocidades de agitação de 63 a 189 rpm, que correspondem ao mesmo v_{tip} em relação à faixa de agitação utilizada para fermentador de 2 L;
- **Aeração:** 0,25, 0,5 e 0,75 vvm.

A partir das determinações de k_{LA} em cada escala de fermentador, verificaram-se quais as condições de agitação e aeração correspondentes para os mesmos valores de k_{LA} nas diferentes escalas.

4.2 Microrganismos e estocagem da cultura

Neste projeto foram utilizadas duas linhagens do fungo filamentoso *Trichoderma harzianum*. A primeira delas, P49P11, trata-se de uma linhagem selvagem isolada do bioma amazônico, conforme reportado por Delabona et al. (2012b). A segunda linhagem, 5PCE15, foi obtida através de mutações a partir da linhagem selvagem P49P11

durante tese de doutorado desenvolvida em co-orientação entre a Faculdade de Engenharia Química (UNICAMP) e o Laboratório de Hidrolases Fúngicas do CTBE (Costa, 2017). A estocagem das linhagens foi realizada em forma de suspensões de esporos em solução de glicerol 20% (v/v) e mantida em freezer a -80 °C.

4.3 Preparo do inóculo para fermentação

A preparação de inóculo para as fermentações foi feita utilizando as suspensões de esporos estocadas em freezer a -80 °C, as quais foram repicadas em placas de Petri contendo meio PDA (Potato Dextrose Agar) e incubadas em estufa a 29 °C por 6 dias (até formação de esporos sobre todo o micélio). Em seguida, os esporos de cada placa de Petri foram ressuspensos em 20 mL de solução aquosa de Tween 80 a 0,1% (v/v) em condições assépticas com o auxílio de uma alça de platina. Os 20 mL de suspensão de esporos foram inoculados em frasco Erlenmeyer de 2 L com 480 mL de meio de cultura e incubado em agitador orbital a 29 °C e 200 rpm durante 72 horas (adaptado de Delabona, 2012a).

O meio de cultura para o inóculo, adaptado de Mandels e Weber (1969), foi preparado observando a seguinte composição final: 10,0 g/L de Celufloc 200 (Celuflok Indústria e Comércio de Celulose Ltda., Brasil); 10,0 g/L de glicose; 1,0 g/L de peptona vegetal; 1,0 mL de Tween 80; 2,0 g/L de KH_2PO_4 ; 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3 g/L de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (ureia); 0,4 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,6 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,3 e posteriormente esterilizado a 121 °C por 20 minutos.

4.4 Cultivo de *T. harzianum* – produção de CEL em fermentador de 2 L

Para a realização dos experimentos em fermentador de bancada, foram utilizados fermentadores modelo BioFlo 115 (New Brunswick – Eppendorf) de 2 L de volume útil com volume de meio de cultivo de 1,5 L, sendo 150 mL de inóculo (taxa de inóculo de 10%), produzido conforme relatado no item anterior. O fermentador utilizado possui controle automático de temperatura, pH, agitação, aeração e controle em cascata para manutenção de OD. Este controle em cascata modifica os valores de agitação,

aeração e suplementação com oxigênio para que o OD não fique abaixo do *set point* definido. Inicialmente, é necessário definir os valores mínimos e máximos de agitação, aeração e de suplementação de oxigênio nos quais o controle irá atuar. Quando o OD cai abaixo do valor do set point, o controle em cascata atua inicialmente na agitação até que esta atinja o valor máximo. Se mesmo assim o OD continuar abaixo do set point, o controle atua aumentando a aeração e, se ainda for necessário, passa a atuar através da suplementação com oxigênio.

O meio de cultura utilizado para os experimentos de produção de CEL foi o mesmo apresentado para a preparação do inóculo, exceto pela não utilização de glicose e pelo aumento da concentração da Celufloc para 20,0 g/L. Esta composição de meio de cultura foi definida em experimentos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, nos quais foram avaliadas diferentes concentrações de sais, bem como variação do tipo e da quantidade de fonte de carbono (dados não publicados). Cultivos realizados com Celufloc a 20 g/L apresentaram resultados satisfatórios, similares aos obtidos com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação (BED). Para facilitar a padronização do meio de cultura em todos os experimentos, definiu-se pela utilização de Celufloc, já que se trata de um produto comercial e, portanto, com menos probabilidade de apresentar variações significativas de composição ou características físicas em comparação ao BED.

A temperatura dos cultivos foi controlada em 29 °C; o pH foi mantido em $5,0 \pm 0,2$ com adição de ácido sulfúrico 0,4 mol/L ou hidróxido de amônio 6,25% (v/v); OD foi mantido em 30% da saturação com ar utilizando controle em cascata com velocidade de agitação (exceto nos experimentos em que a rotação foi mantida em valores fixos), vazão de ar variando entre 0,25 e 1,0 vvm e suplementação de oxigênio de 0% a 50% em relação à vazão de ar.

Foram realizados três blocos de experimentos em fermentadores de 2 L, os quais são apresentados detalhadamente nos itens a seguir.

4.4.1 Avaliação da concentração de oxigênio dissolvido

O primeiro conjunto de experimentos realizados em fermentador de 2 L teve como objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações de OD na produção do

coquetel enzimático e definir o melhor nível de OD a ser utilizado em experimentos posteriores. Para tanto, foram definidos os níveis de 2%, 5%, 10%, 30% e 50% de OD e tais valores foram controlados utilizando controle em cascata com agitação (200 a 300 rpm), vazão de ar (0,25 a 1,0 vvm) e suplementação de oxigênio ao ar de entrada quando necessário.

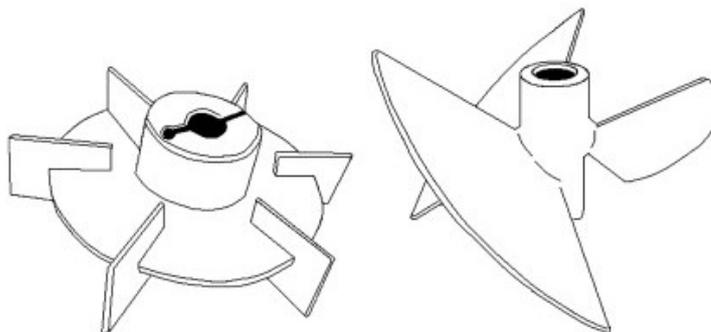
As concentrações de OD testadas foram escolhidas de forma a compreenderem uma ampla faixa de condições. Os experimentos com 2% e 5% de OD foram realizados para avaliar a performance do cultivo em condições que costumam ser bastante desfavoráveis ao crescimento de fungos filamentosos, usualmente abaixo da concentração crítica de oxigênio. As outras três condições foram definidas de forma a avaliar a condição de 30% de OD, comumente utilizada em cultivos aeróbicos, além de condições com mais e menos OD, 50% e 10%, respectivamente.

Foram utilizadas velocidades de agitação baixas para o controle do OD, com o máximo de 300 rpm, para que não houvesse possível influência negativa na produção do CEL causada por alto cisalhamento. Além disso, foram utilizados em todos os casos impelidores de pás inclinadas que geram menor cisalhamento em comparação aos impelidores tipo Rushton para um mesmo valor de v_{tip} .

4.4.2 Avaliação da velocidade de agitação e tipo de impelidor

O segundo bloco de experimentos foi realizado em duplicata utilizando o fungo *Trichoderma harzianum* P49P11 com o objetivo de determinar o tipo de impelidor e a velocidade de agitação que resultam em melhores produtividades de coquetel enzimático e que não causam problemas de cisalhamento à biomassa fúngica. Para isso, foram utilizados dois tipos de impelidores, pás retas tipo Rushton e pás inclinadas tipo orelha de elefante com bombeamento para baixo, apresentados na Figura 4.2.

Figura 4.2. Tipos de impelidores utilizados nos cultivos com *T. harzianum* P49P11. À esquerda, impelidor de pás retas tipo Rushton. À direita, impelidor de pás inclinadas tipo orelha de elefante com bombeamento para baixo.



Foram testadas 5 diferentes agitações para cada um dos impelidores: 200, 300, 400, 500 e 600 rpm. Tais velocidades de agitação foram mantidas constantes durante todo o cultivo. A rotação mínima foi estipulada em 200 rpm, já que experimentos preliminares mostraram que velocidades de agitação menores que 200 rpm não são suficientes para manter em suspensão de forma homogênea as partículas de Celufloc (componente insolúvel do meio de cultura). A velocidade de agitação máxima escolhida também foi baseada em ensaios preliminares realizados por nosso grupo de pesquisa com a mesma linhagem de *T. harzianum* utilizada neste projeto. Inicialmente, foram conduzidos experimentos que contemplavam velocidade de agitação máxima de 500 rpm para os dois tipos de impelidores. Porém, ao longo dos experimentos, ensaios com velocidade de agitação fixa em 600 rpm também foram adicionados para complementar o estudo.

Em todos estes experimentos o OD foi mantido em 30%. Como a agitação foi mantida fixa, o controle do OD foi realizado através de controle em cascata com vazão de ar e, quando necessário, suplementação com oxigênio puro com vazão de até 50% da vazão de ar.

4.4.3 Comparação entre as linhagens de *T. harzianum* nativa e mutante

O terceiro bloco de experimentos foi realizado com o objetivo de comparar as linhagens de *Trichoderma harzianum* P49P11 (nativa) e 5PCE15 (mutante) em relação à produtividade de coquetel enzimático frente às melhores condições operacionais de agitação e aeração determinadas nos blocos de experimentos anteriores. Também,

buscou avaliar aspectos diretamente relacionados com o escalonamento do processo, especialmente a formação de espuma (proteínas aumentam a formação de espuma quando associadas à agitação e à aeração). Para tanto, foram realizados experimentos em duplicata para os dois tipos de impelidores e respectivas faixas de agitação.

4.5 Cultivo de *T. harzianum* – produção de CEL em fermentador de 100 L

Para a realização dos cultivos em fermentador de 100 L, foi utilizado fermentador modelo BioFlo 610 (New Brunswick – Eppendorf) de 100 L de volume útil com controle automático de temperatura, pH, agitação, aeração, pressão da dorna e controle em cascata para manutenção de OD. A produção do inóculo foi realizada da mesma forma que o realizado para os experimentos em fermentadores de 2 L, conforme apresentado no item 4.3. Para os experimentos realizados em fermentador de 100 L, a propagação do inóculo também ocorreu em frascos Erlenmeyer de 2 L a fim manter o mesmo padrão utilizado para os experimentos realizados em fermentadores de 2 L. Desta forma, assim como ocorreu nas fermentações em escala de laboratório, o inóculo foi produzido em apenas uma etapa, a fim de evitar a introdução de uma variável adicional para o escalonamento da produção de CEL. Para manter a taxa de inoculação em aproximadamente 10%, foram utilizados doze frascos Erlenmeyers de 2 L, cada um contendo 800 mL de meio de cultura, totalizando 9,6 L. Este volume de inóculo foi utilizado para a inoculação do fermentador de 100 L, no qual os cultivos foram realizados com volume final de 100 L após a inoculação.

A partir dos resultados obtidos em fermentadores de 2 L, foram propostas duas estratégias para escalonamento da produção de coquetel enzimático até fermentador de 100 L. Ambas visavam manter a concentração de OD fixa através de controle em cascata com agitação e aeração. A diferença entre elas foram os critérios de escalonamento utilizados para definir os limites inferiores e superiores para velocidade de agitação e vazão de ar que foram utilizadas no controle de OD.

A seguir são apresentadas detalhadamente as duas estratégias.

4.5.1 Escalonamento – velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) e vazão específica de ar (ϕ_{ar})

Como primeira estratégia testada para escalonamento da produção de CEL em fermentador de 100 L, foram utilizadas a velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) e a vazão específica de ar (ϕ_{ar}) como critérios a serem mantidos constantes para as duas escalas. Esta estratégia foi definida principalmente com base no critério de agitação, v_{tip} , que está relacionado com o cisalhamento aplicado pelo impelidor ao meio que está sob agitação. Pela morfologia filamentosa dos fungos, estes se tornam mais suscetíveis aos efeitos mecânicos e, portanto, a velocidade do impelidor utilizada para mistura e transferência de oxigênio deve ser mantida em um nível adequado, conforme estabelecido nos experimentos em fermentadores de 2 L. Para complementar os parâmetros de processo para o escalonamento, ϕ_{ar} foi escolhido como critério relacionado à aeração por ser um critério bastante utilizado e, neste caso, ter resultado em condições operacionais factíveis para os limites de operação do equipamento.

Tais parâmetros não foram mantidos em valores fixos durante todo o cultivo, mas sim em uma faixa que possibilitasse manter o OD constante durante o cultivo, da mesma forma que os experimentos em fermentador de 2 L foram executados. Desta forma, com o aumento da demanda de oxigênio durante o cultivo, o controle de OD estava programado para aumentar primeiramente a velocidade de agitação e, quando esta já não fosse suficiente, o controle promovia também o aumento da taxa de aeração com o objetivo de manter o OD no valor pré-determinado.

Para a definição dos limites inferiores e superiores de velocidade de agitação e taxa de aeração aplicadas no controle de OD, foram utilizadas as equações 12 a 15.

$$N_{1,min} D_{i,1} = N_{2,min} D_{i,2} \quad (12)$$

$$N_{1,max} D_{i,1} = N_{2,max} D_{i,2} \quad (13)$$

$$\frac{Q_{1,min}}{V_1} = \frac{Q_{2,min}}{V_2} \quad (14)$$

$$\frac{Q_{1,max}}{V_1} = \frac{Q_{2,max}}{V_2} \quad (15)$$

Onde, N é a velocidade de agitação do agitador, em revoluções por segundo;

D_i é o diâmetro do impelidor, em metros;

Q é a vazão de ar, em $L \cdot \text{min}^{-1}$;

V é o volume de cultivo, em litros;

Índice 1 representa os parâmetros para fermentador de 2 L;

Índice 2 representa os parâmetros para fermentador de 100 L.

Os limites inferiores e superiores de agitação e aeração para fermentador de 2 L utilizados para a definição dos parâmetros operacionais desta estratégia de escalonamento foram determinados pelos experimentos, conforme metodologia apresentada no item 4.4.2. A partir daqueles resultados, as condições operacionais definidas para fermentador de 2 L foram:

- Impelidor: Pás retas tipo Rushton;
- Velocidade de agitação: 200 a 400 rpm, correspondente a v_{tip} de 0,54 a 1,09 m/s;
- Aeração de 0,375 a 1,5 LPM, correspondente a 0,25 a 1,0 vvm;
- OD fixo em 30% da saturação de ar, mantido por controle em cascata de agitação e aeração.

Para manter as mesmas faixas de v_{tip} e ϕ_{ar} , as condições de agitação e aeração definidas para a escala de 100 L foram:

- Impelidor: Pás retas tipo Rushton;
- Velocidade de agitação: 63 a 126 rpm;
- Aeração de 25 a 100 LPM;
- OD fixado em 25% da saturação de ar, mantido por controle em cascata de agitação e aeração.

4.5.2 Escalonamento – faixa de k_{LA}

A segunda estratégia proposta para escalonamento do processo de produção de CEL em fermentador de 100 L utilizou como critério de escalonamento a faixa de k_{LA} com o objetivo de manter o OD em valor pré-estabelecido. Para isso, foram determinados os valores mínimo e máximo de k_{LA} correspondentes às condições operacionais (velocidade de agitação e taxa de aeração) utilizadas em fermentador de 2 L. Na sequência, foram realizadas determinações de k_{LA} em fermentador de 100 L para definir as condições operacionais de velocidade de agitação e taxa de aeração que resultassem nos mesmos valores de k_{LA} mínimo e máximo utilizados em fermentador de 2 L.

O k_{LA} foi escolhido como critério de escalonamento por ser o mais utilizado em bioprocessos aeróbicos, já que representa a taxa de fornecimento de oxigênio em condições adequadas para o microrganismo. Este ponto merece especial atenção pelo fato de que o oxigênio tem baixa solubilidade em água e qualquer problema em seu fornecimento pode torna-lo limitante no processo. No entanto, pelo fato de ser possível obter um mesmo k_{LA} através de mais de uma combinação do binômio agitação-aeração, em se tratando de fungos filamentosos é necessário ter cuidado no momento da definição das condições operacionais para não criar um ambiente estressante do ponto de vista de cisalhamento.

Optou-se por utilizar k_{LA} variável dentro de uma faixa pré-estabelecida em vez de k_{LA} fixo durante todo o cultivo, já que utilizar um valor de k_{LA} fixo que possibilitasse a manutenção do OD em nível adequado no início do cultivo resultaria em transferência de oxigênio insuficiente em grande parte do cultivo – aumento da demanda de oxigênio pelo crescimento celular e pelo aumento da viscosidade do meio, o que dificulta a transferência de oxigênio. Por outro lado, utilizar k_{LA} alto o suficiente para suprir a demanda de oxigênio no momento de maior consumo de oxigênio seria energeticamente antieconômico, com gastos desnecessários de agitação e aeração no início e fim do cultivo, momentos reconhecidos como de menor demanda de oxigênio. Dessa forma, utilizar k_{LA} variável tem o objetivo de suprir a demanda de oxigênio, conforme a necessidade do processo, com um menor gasto energético.

Foram consideradas as seguintes condições operacionais dos cultivos realizados em fermentador de 2 L como base para a ampliação de escala até fermentador de 100 L:

- Impelidor: Pás retas tipo Rushton;
- Velocidade de agitação: 200 a 400 rpm;
- Aeração de 0,375 a 1,5 LPM, correspondente a 0,25 a 1,0 vvm;
- k_{La} mínimo (agitação de 200 rpm e aeração de 0,25 vvm): $8,5 \text{ h}^{-1}$;
- k_{La} máximo (agitação de 400 rpm e aeração de 1,0 vvm): $73,8 \text{ h}^{-1}$;
- OD fixado em 30% da saturação de ar, mantido por controle em cascata de agitação e aeração.

Para manter a mesma faixa de k_{La} em fermentador de 100 L, foram utilizadas as seguintes condições operacionais:

- Tipo de impelidor: Pás retas tipo Rushton;
- Velocidade de agitação: 63 a 158 rpm;
- Aeração de 20 a 60 LPM, correspondente a 0,20 a 0,60 vvm;
- k_{La} mínimo (agitação de 63 rpm e aeração de 0,20 vvm): $8,5 \text{ h}^{-1}$;
- k_{La} máximo (agitação de 158 rpm e aeração de 0,60 vvm): 84 h^{-1} ;
- OD fixado em 25% da saturação de ar, mantido por controle em cascata de agitação e aeração e pressão da dorna.

4.6 Acompanhamento dos cultivos

Ao longo dos cultivos, alíquotas de aproximadamente 40 mL dos cultivos foram coletadas a cada 24 horas. Parte deste volume (aproximadamente 10 mL) foi centrifugado a 3.000 xg e o sobrenadante foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas e concentração de proteínas totais. O restante da amostra foi utilizado integralmente para análise comparativa de viscosidade e avaliação da morfologia dos microrganismos ao longo dos cultivos. Adicionalmente, foi feito o monitoramento dos gases de entrada e saída dos fermentadores para avaliar consumo de O_2 e produção de CO_2 . As análises são detalhadas a seguir:

4.6.1 Análise de gases de entrada e saída dos fermentadores

As concentrações de O₂ e CO₂ dos gases de entrada e saída dos fermentadores foram determinadas por espectrometria de massas (HPR-20 QIC Gas Analysis System, Hiden Analytical, Inglaterra) com amostragens do ar comprimido utilizado para aeração e dos gases de exaustão dos fermentadores. Estas determinações foram feitas apenas para os cultivos realizados em fermentador de 2 L. Amostras dos gases foram analisadas com intervalos de aproximadamente 5 minutos.

Para o cálculo do CO₂ produzido e do O₂ consumido durante os cultivos, foram necessárias quatro informações para cada ponto a ser calculado: (i) a massa molar média do ar atmosférico de entrada (considerada constante durante o cultivo, devido à alteração da composição ter sido relativamente pequena); (ii) a vazão volumétrica de ar de entrada, obtida através do software de aquisição de dados do fermentador, *BioCommand*, a qual foi considerada igual à vazão de saída para efeitos de cálculo; (iii) porcentagens mássicas dos gases de interesse (CO₂ e O₂) no ar de entrada do fermentador, obtidas através de análise do ar de entrada pelo espectrômetro de massas; (iv) porcentagens mássicas do CO₂ e O₂ nos gases de exaustão dos fermentadores, obtidas através de análise dos gases de exaustão pelo espectrômetro de massas.

Para obtenção da massa molar média do ar atmosférico (\bar{m}), utilizou-se a composição volumétrica média do ar como sendo: 78,10% de nitrogênio; 20,96% de oxigênio; 0,94% de argônio (Ar). A partir dessa composição volumétrica, é possível encontrar a massa molar média do ar atmosférica através da equação 16:

$$\bar{m}_{ar} = f_{N_2} \cdot \bar{m}_{N_2} + f_{O_2} \cdot \bar{m}_{O_2} + f_{Ar} \cdot \bar{m}_{Ar} \quad (16)$$

Onde: \bar{m} é a massa molar de cada componente

f é a fração volumétrica de cada componente no ar atmosférico

Aplicando as frações volumétricas e massas molares de cada componente na equação 16, temos:

$$\bar{m}_{ar} = 0,7810 \times 28,01 + 0,2096 \times 32,00 + 0,0094 \times 35,95 = \mathbf{28,96 \text{ g/mol}}$$

Utilizando-se a massa molar média, é possível obter a vazão mássica de ar em cada instante do cultivo a partir da equação 17.

$$\dot{m}_{ar,t} = \frac{\bar{m}_{ar} \cdot Q_{ar,t}}{V_{CATP}} \quad (17)$$

Onde: $\dot{m}_{ar,t}$ é a vazão mássica de ar no instante t

\bar{m}_{ar} é a massa molar de ar

$Q_{ar,t}$ é a vazão volumétrica de ar no instante t

V_{CATP} é o volume em litros de 1 mol de gás em condições ambientais de temperatura e pressão, correspondente a 24,76 L/mol para 29 °C e 1 atm (condições de cultivo), calculada pela Equação de Clapeyron.

Como passo seguinte, foram obtidas as porcentagens mássicas de CO₂ produzido e O₂ consumido no tempo t através das equações 18 e 19, respectivamente:

$$\%CO_{2,produzido,t} = \%CO_{2,exaustão,t} - \%CO_{2,entrada,t} \quad (18)$$

$$\%O_{2,consumido,t} = \%O_{2,entrada,t} - \%O_{2,exaustão,t} \quad (19)$$

A partir destes valores foi possível obter as vazões mássicas de CO₂ produzido e O₂ consumido através das equações 20 e 21, respectivamente:

$$\dot{m}_{CO_2\ produzido,t} = \%CO_{2,produzido,t} \cdot \dot{m}_{ar,t} \quad (20)$$

$$\dot{m}_{O_2\ consumido,t} = \%O_{2,consumido,t} \cdot \dot{m}_{ar,t} \quad (21)$$

4.6.2 Análise morfológica do *T. harzianum* ao longo dos cultivos

As amostras coletadas ao longo dos cultivos foram analisadas quanto à morfologia fúngica utilizando microscópio óptico Nikon Eclipse modelo Ci-S com câmera acoplada, modelo DS-Fi2. Foram registradas imagens obtidas em aumentos de 200 e 400 vezes, através das quais foram avaliadas diferenças morfológicas das hifas, como comprimento, presença ou não de fragmentos de hifas e nível de produção de esporos.

4.6.3 Medida de viscosidade

Para a medição de viscosidade das amostras coletadas ao longo dos cultivos realizados, utilizou-se reômetro digital modelo LV DV-III Ultra (Brookfield, EUA) com *Spindle* modelo ULA (cilíndrico), usado para baixas viscosidades e volume de amostra relativamente pequeno (aproximadamente 25 mL). A temperatura foi controlada em 29 °C, mesma temperatura dos cultivos, durante as medições de viscosidade utilizando-se recipiente de amostra encamisado, através do qual foi mantida água em recirculação proveniente de banho termostático.

Devido à rápida decantação dos sólidos em suspensão (aglomerados de Celufloc e biomassa fúngica) não foi possível realizar análises reológicas completas para obtenção dos parâmetros reológicos relativos a fluidos não-newtonianos pseudoplásticos – índice de consistência do fluido (k) e índice de potência (n) do modelo da Lei da Potência. Desta forma, para cada tempo de cultivo, foi utilizada rotação do *Spindle* de forma que os valores de torque estivessem entre 20% e 100% do torque do equipamento, conforme recomendação do fabricante, para obtenção da viscosidade aparente. As rotações utilizadas para cada tempo de cultivo foram mantidas para todos os cultivos analisados, de forma a possibilitar a comparação de amostras de mesmos tempos, exceto quando o torque ficou fora da faixa recomendada pelo fabricante (entre 20% e 100%). A Tabela 4.2 apresenta as rotações utilizadas para cada amostra e a faixa de viscosidade que é possível de se determinar pelo reômetro para as respectivas rotações, tendo em vista a precisão do equipamento e as limitações de torque.

Tabela 4.2. Rotação utilizada no viscosímetro para medidas de viscosidade de amostras de cultivo.

Tempo de cultivo (h)	Rotação no viscosímetro (rpm)	Faixa de viscosidade (cP)
0	80	1,5 a 7,5
24	5	24 a 120
48	5	24 a 120
72	80	1,5 a 7,5
96	80	1,5 a 7,5

4.7 Determinação das atividades enzimáticas

A atividade celulásica total ou FPase é referenciada por FPU/mL (*filter paper unit/mL*) e foi determinada pelo método do papel de filtro conforme descrito por Ghose (1987), com modificações a fim de diminuir a escala do procedimento em 10 vezes (Delabona et al., 2012a). Este método quantifica a glicose liberada utilizando dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Um FPU corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de glicose equivalente.

Para determinação da atividade xilanásica (U/mL) utilizou-se o método descrito por Bailey e Poutanen (1989), o qual utiliza xilana (*Xylan from beechwood*, Sigma-Aldrich, EUA) como substrato e quantifica a xilose liberada através de dosagem de açúcares redutores pelo método do DSN (Miller, 1959). Uma unidade de atividade xilanásica corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de xilose equivalente.

A atividade β -glicosidásica ou celobiásica (U/mL) foi determinada usando o método proposto por Zhang et al. (2009) que usa p-nitrofenol- β -D-glicosídeo (Sigma-Aldrich, EUA) como substrato e quantifica a liberação de p-nitrofenol. Uma unidade de atividade β -glicosidásica corresponde à quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de p-nitrofenol.

Também foi determinada a concentração de proteína total baseada no método de Bradford (1976), usando microplacas de 96 poços e empregando reagente da Bio-Rad, (Bio-Rad Laboratories, USA). Albumina de soro bovino foi utilizada como padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da concentração de oxigênio dissolvido

O primeiro bloco de experimentos foi realizado com o objetivo de determinar a melhor concentração de OD a ser mantida ao longo dos cultivos. Os níveis de OD testados foram 2%, 5%, 10%, 30% e 50% em relação à saturação com ar. Os resultados de atividades celulásica total (FPase), xilanásica, β -glicosidásica e concentração de proteínas totais são apresentados nas Figuras 5.1 a 5.4.

Figura 5.1. Comparação de FPase de cultivos realizados com diferentes concentrações de OD utilizando *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. Níveis de OD testados: 2%, 5%, 10%, 30% e 50%.

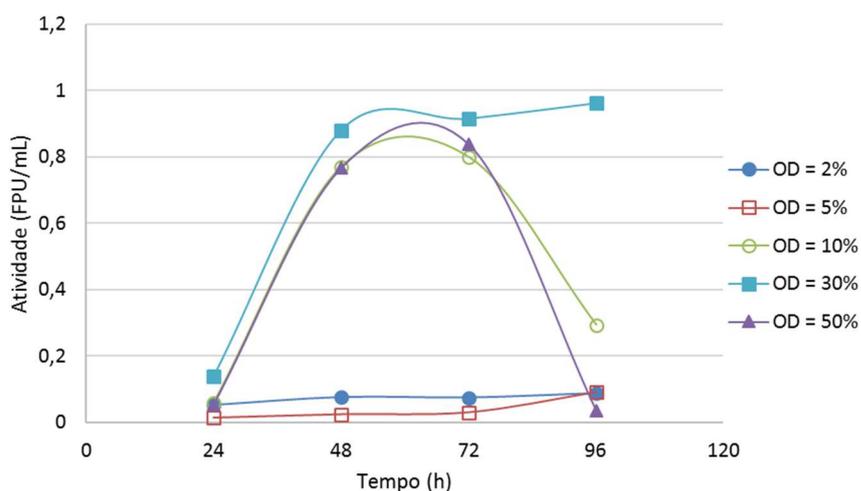


Figura 5.2. Comparação de atividade xilanásica de cultivos realizados com diferentes concentrações de OD utilizando *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. Níveis de OD testados: 2%, 5%, 10%, 30% e 50%.

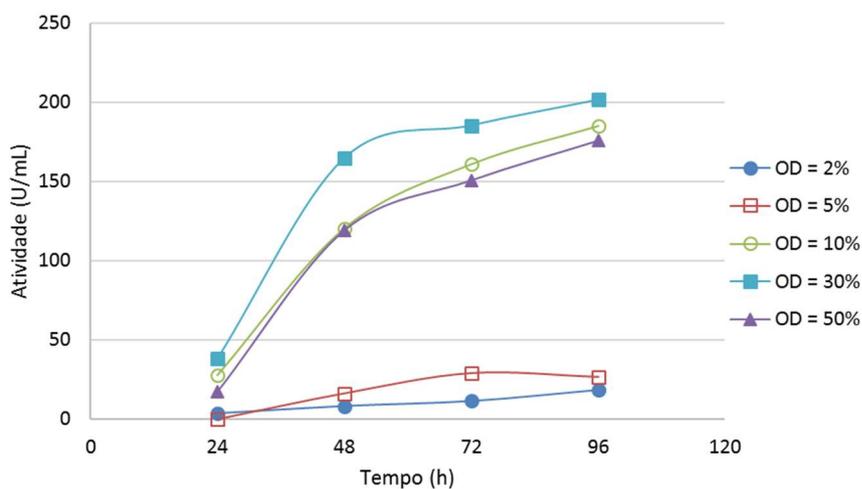


Figura 5.3. Comparação de atividade β -glicosidásica de cultivos realizados com diferentes concentrações de OD utilizando *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. Níveis de OD testados: 2%, 5%, 10%, 30% e 50%.

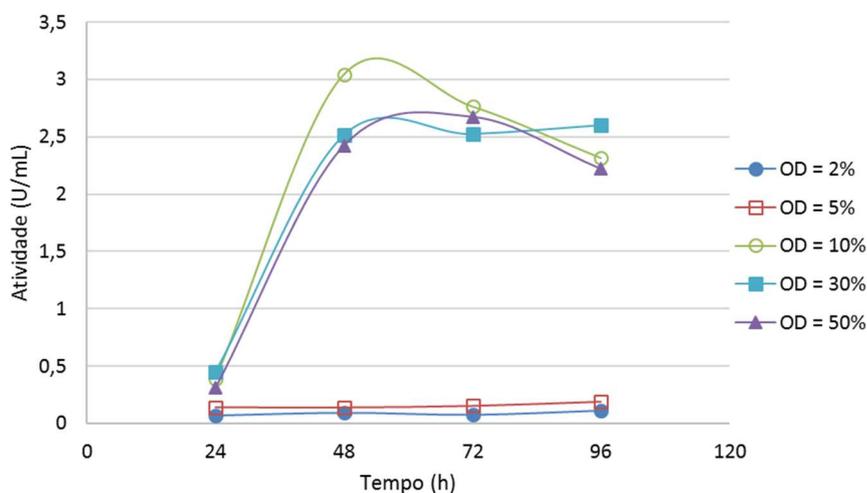
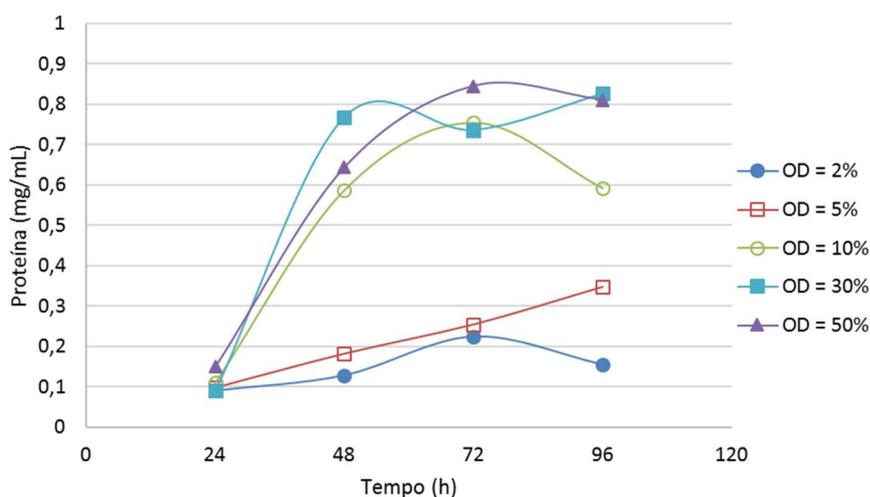


Figura 5.4. Comparação da concentração de proteínas de cultivos realizados com diferentes concentrações de OD utilizando *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. Níveis de OD testados: 2%, 5%, 10%, 30% e 50%.

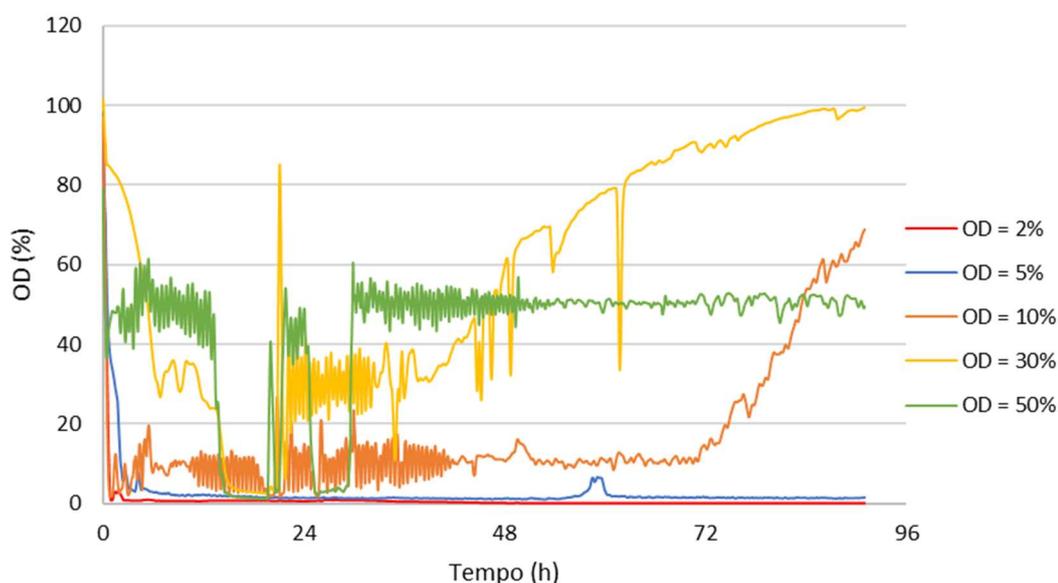


Observa-se que, para todas as atividades enzimáticas e também para a concentração de proteínas, os cultivos conduzidos a 2% e 5% de OD apresentaram resultados quase nulos. Já os cultivos conduzidos a 10%, 30% e 50% de OD apresentaram perfis semelhantes entre si para todas as análises realizadas, especialmente para os pontos de 48 h e 72 h.

Não foi possível manter o OD nos níveis pretendidos durante os cultivos controlados a 2% e 5%. Para o primeiro, o OD ficou próximo a zero durante boa parte do

cultivo, enquanto que para o segundo caso, o OD ficou em aproximadamente 3% com oscilações até 10% em alguns momentos. Já no cultivo com 10% de OD, a concentração de OD variou entre 3% e 20% durante as primeiras 40 h, ficando relativamente estável ao redor de 10% entre 40 e 72 h após ajuste dos parâmetros PID (proporcional, integral e derivativo) do controle de OD. A grande oscilação nas primeiras 40 horas é explicada pelo fato de o controle PID ser ajustado de fábrica para cultivos com bactérias, o que foi corrigido no decorrer do cultivo de forma a fazer com que o controle modificasse os valores de agitação e aeração de forma mais lenta. Situação similar ocorreu para os cultivos conduzidos a 30% e 50% de OD, com oscilação maior do oxigênio dissolvido nas primeiras 36 h e 48 h, respectivamente. Porém, nestes casos isso ocorreu devido à suplementação com oxigênio puro, o que perturbou bastante a estabilidade do controle de OD. Adicionalmente, verificou-se em todos os cultivos que durante algumas horas no intervalo de 12 e 24 horas de cultivo o OD permaneceu muito baixo, próximo a zero. Mesmo assim, as atividades enzimáticas obtidas foram satisfatórias. A partir de 48 ou 72 horas o OD apresentou perfil ascendente, período no qual a demanda de oxigênio foi menor que o oxigênio fornecido pelo sistema. Este fato é explicado pelo esgotamento de substrato assimilável, causando diminuição da atividade metabólica dos microrganismos e consequente menor consumo de oxigênio. A Figura 5.5 apresenta os perfis de OD para os cinco cultivos com diferentes *set points* de OD.

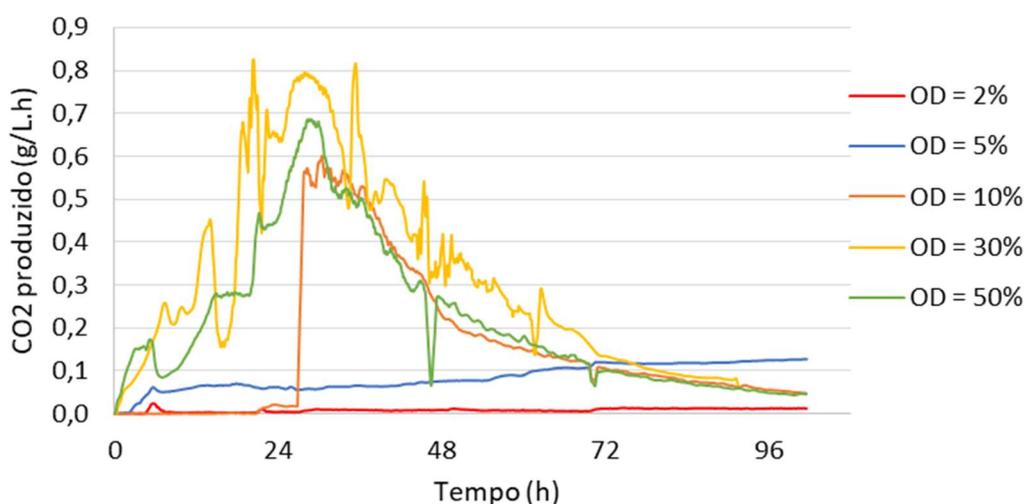
Figura 5.5. Perfis de OD durante de cultivos realizados com diferentes concentrações de OD utilizando *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. Níveis de OD testados: 2% (vermelho), 5% (azul), 10% (laranja), 30% (amarelo) e 50% (verde).



Mesmo com as dificuldades de controle de OD, é possível concluir pelos dados de atividades enzimáticas e concentração de proteínas que concentrações de OD abaixo de 3 a 5% devem ser evitadas para se obter produção do CEL. Oscilações de OD a níveis abaixo de 5% por curto espaço de tempo parecem não influenciar fortemente na queda de produção de CEL.

Como resultados adicionais, são apresentados na Figura 5.6 os perfis de CO₂ produzido ao longo dos cultivos conduzidos com diferentes concentrações de OD. Observa-se que, assim como ocorreu para as atividades enzimáticas e para a concentração de proteínas totais, o perfil de CO₂ produzido para os cultivos conduzidos a 2% e 5% de OD foi muito inferior aos perfis dos cultivos com níveis mais altos de OD. Para os cultivos com OD de 10% a 50%, os perfis de CO₂ produzido foram equivalentes entre si, com pico em aproximadamente 30 h de cultivo. O CO₂ produzido está diretamente relacionado com a atividade metabólica dos fungos. Assim, é possível afirmar que o maior nível de atividade metabólica está em aproximadamente 30 h, coincidente com o período em que foram observados os maiores níveis de agitação e aeração.

Figura 5.6. Perfis de CO₂ produzido durante de cultivos realizados com diferentes concentrações de OD utilizando *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. Níveis de OD testados: 2% (vermelho), 5% (azul), 10% (laranja), 30% (amarelo) e 50% (verde).



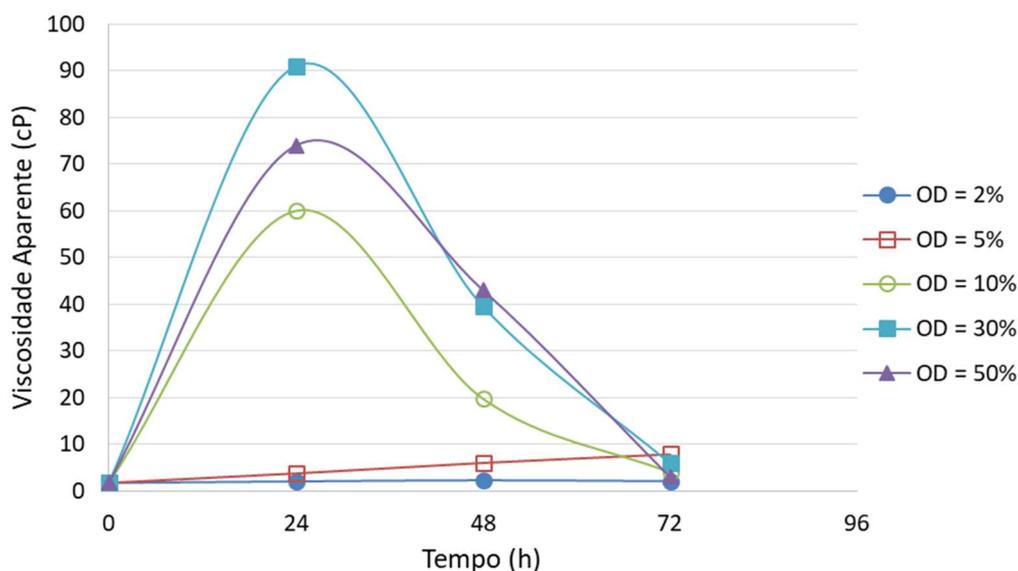
Não foi possível apresentar gráfico semelhante ao anterior para o consumo de O₂, já que devido à utilização de suplementação de oxigênio puro e o pequeno descompasso na aquisição dos dados do fermentador e do analisador de gases, os dados

gerados a partir dos cálculos apresentam grandes variações sem significado, mascarando as pequenas alterações reais esperadas entre o oxigênio de entrada e o de saída.

O período próximo a 24 horas é também o momento em que foram observados os picos de viscosidade aparente nos cultivos conduzidos a 10%, 30% e 50% de OD, como apresentado na Figura 5.7. Este é um ponto importante de atenção, já que a viscosidade dificulta a transferência de oxigênio para o meio de cultura e ocorreu justamente no momento em que a produção de CO₂ é maior, sugerindo que este momento também seja o de maior consumo de O₂.

Através dos gráficos de atividades enzimáticas, produção de CO₂ e de viscosidade do meio ao longo do cultivo é possível afirmar que a produção de coquetel enzimático não está associada ao crescimento, já que este ocorre principalmente até 30 ou 36 horas, enquanto a produção de CEL é iniciada a partir ou após este tempo, atingindo o pico de atividade entre 48 e 72 horas.

Figura 5.7. Perfis de viscosidade aparente observados ao longo de cultivos realizados com diferentes concentrações de OD utilizando *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. Níveis de OD testados: 2%, 5%, 10%, 30% e 50%.



Com o objetivo de possibilitar a comparação com dados da literatura, os dados de OD (porcentagem em relação à saturação com ar) foram convertidos para valores em concentração mássica. Dessa forma, considerando que: (i) a concentração molar de substâncias dissolvidas no meio de cultura utilizado foi inferior a 0,1 mol/L; (ii) a

temperatura de cultivo foi de 29 °C e (iii) interpolando e normalizando os dados da literatura apresentados na Tabela 5.1 (Bailey e Ollis, 1986) para as condições de processo, pode-se obter o valor aproximado da concentração de OD, como segue:

Tabela 5.1. Concentração de oxigênio dissolvido na saturação para diferentes condições de temperatura e concentração de sais. (Adaptado de Bailey e Ollis, 1986)

Temperatura (°C)	Concentração NaCl (mol/L)	Pressão Parcial O ₂ (atm)	Concentração de O ₂ na saturação (mg/L)
25	0	0,209	8,10
35	0	0,209	6,99
25	0	1,0	40,3
25	0,5	1,0	34,2

- Por interpolação linear dos dados de concentração de OD entre 25 °C e 35 °C, temos que para água a 29 °C, a concentração de OD na saturação é de **7,66 mg/L**;
- Por interpolação linear dos dados de concentração de OD em relação à concentração de sal dissolvido em água, temos que o fator de correção para 0,1 mol/L de sal é **0,9697** em relação à água sem sal dissolvido;
- Aplicando o fator de correção pelo conteúdo de sal à concentração de OD na saturação para água a 29 °C, obtemos **7,42 mg/L** de OD na saturação de água com 0,1 mol/L de sal a 29 °C;
- Logo, para 10% de saturação, temos **0,742 mg/L** de OD.

Este valor de concentração de OD está bastante próximo da concentração crítica de OD (C_{crit}), da ordem de 0,70 mg/L, apresentado por Rolinson (1952) para *Penicillium chrysogenum*. Já outro estudo realizado por Henriksen et al. (1997), também com a mesma espécie de *Penicillium*, reportaram que, para máxima produtividade de penicilina, é necessário que a concentração de oxigênio dissolvido esteja em pelo menos 0,06 mmol/L, equivalente a 1,92 mg/L ou aproximadamente 25% de OD na saturação com ar.

Por outro lado, Rocha-Valadez et al. (2000) concluíram que a C_{crit} para *T. harzianum* em fermentação líquida foi em torno de 4% da saturação com ar ou 0,32 mg/L. Adicionalmente, abordaram o fato de que Marten et al. (1996) obtiveram C_{crit} da ordem de

15% da saturação com ar para *Trichoderma reesei*, porém em cultivo contendo celulose como substrato. Além disso, o microrganismo cresceu em forma de pellets, o que dificulta a difusão do oxigênio e que pode ser um importante fator para explicar a observação de C_{crit} maior para este caso.

Por todo o exposto e pelo fato de não ter sido realizada a determinação experimental de C_{crit} para a linhagem de fungo e condições de cultivo utilizados neste projeto, optou-se por não utilizar condições de oxigênio dissolvido que estivessem próximas às condições críticas observadas em alguns dos estudos abordados anteriormente. Dessa forma, definiu-se não utilizar a concentração de OD de 10% para experimentos posteriores.

Restringindo-se a comparação dos resultados de atividades e concentração de proteínas apenas aos cultivos com 30% e 50% de OD, não houve variação significativa para os valores de 48 h e 72 h, usualmente os tempos em que o pico de atividade enzimática é observado. De posse destes resultados, foi definido que os cultivos seguintes seriam realizados com oxigênio dissolvido controlado a 30% da saturação com ar, valor frequentemente utilizado em bioprocessos aeróbicos.

5.2 Cultivos com velocidades de agitação fixas

Em um conjunto de experimentos prévios realizados com *Trichoderma harzianum* P49P11 (selvagem) utilizando como fonte de carbono bagaço pré-tratado por explosão a vapor seguido de deslignificação (BED), foram observados fragmentos de hifas em microscopias de cultivos utilizando impelidores Rushton com velocidades de agitação de 500 rpm, diferentemente dos demais cultivos realizados com níveis de agitação inferiores. Tais fragmentos de hifas indicavam cisalhamento acima do limite suportado pelo fungo, causado, provavelmente, por alta velocidade de agitação. Além disso, como resultado mais relevante, no cultivo conduzido a 500 rpm houve drástica diminuição do CEL produzido.

Com o objetivo de aprofundar os resultados prévios obtidos nos cultivos realizados com BED como fonte de carbono, foram realizados experimentos em duplicata em fermentador de 2 L com 1,5 L de volume de meio de cultura utilizando a mesma linhagem de *T. harzianum* a fim de avaliar a produtividade do CEL frente a variações no

tipo de impelidor e na velocidade de agitação. Nestes novos experimentos foi utilizado Celufloc como fonte de carbono em substituição ao BED anteriormente utilizado.

A velocidade de agitação foi mantida constante ao longo de toda a duração dos cultivos em 5 diferentes níveis: 200, 300, 400, 500 e 600 rpm. Também foram testados dois tipos de impelidores, pás retas tipo Rushton e pás inclinadas tipo orelha de elefante com bombeamento para baixo. A concentração de OD foi mantida em 30% da saturação com ar, conforme determinado no bloco de experimentos anterior, utilizando controle em cascata com vazão de ar comprimido (0,25 a 1,0 vvm) e suplementação de oxigênio (0% a 50% da vazão de ar) quando necessário.

A seguir são apresentados gráficos com os resultados de atividade de FPase (Figura 5.8), atividade xilanásica (Figura 5.9), atividade β -glicosidásica (Figura 5.10) e concentração de proteína total (Figura 5.11) frente às diferentes condições de agitações.

Figura 5.8. Atividade celulásica total (FPase) de cultivos realizados com *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil para os tempos de 48 h, 72 h e 96 h. (PI) Impelidores de pás inclinadas tipo orelha de elefante; (RU) Impelidores Rushton. Agitações fixas durante todo o cultivo: 200, 300, 400, 500 ou 600 rpm.

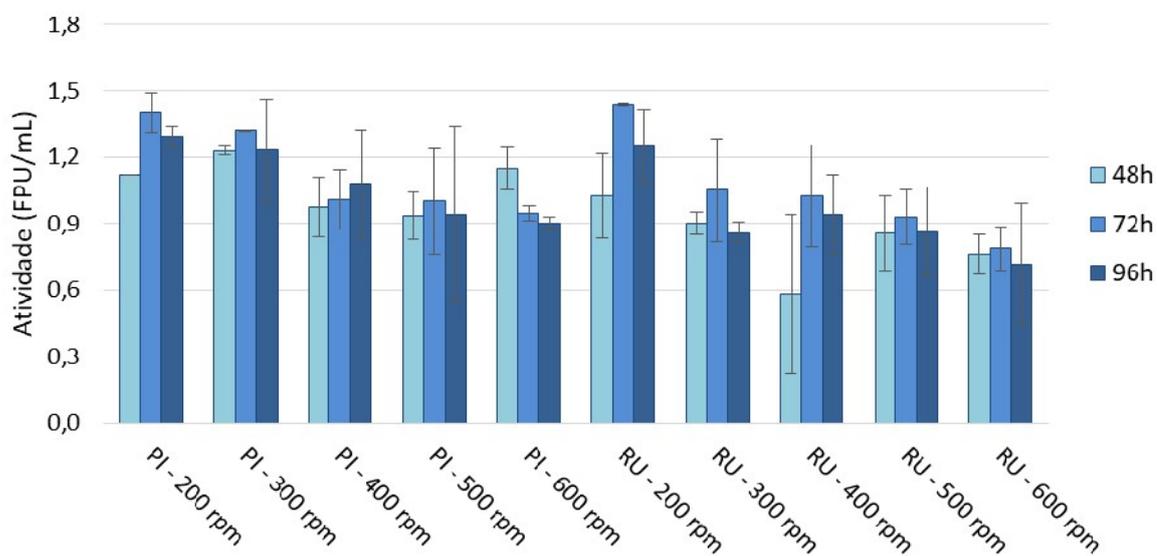


Figura 5.9. Atividade xilanásica de cultivos realizados com *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil para os tempos de 48 h, 72 h e 96 h. (PI) Impelidores de pás inclinadas tipo orelha de elefante; (RU) Impelidores Rushton. Agitações fixas durante todo o cultivo: 200, 300, 400, 500 ou 600 rpm.

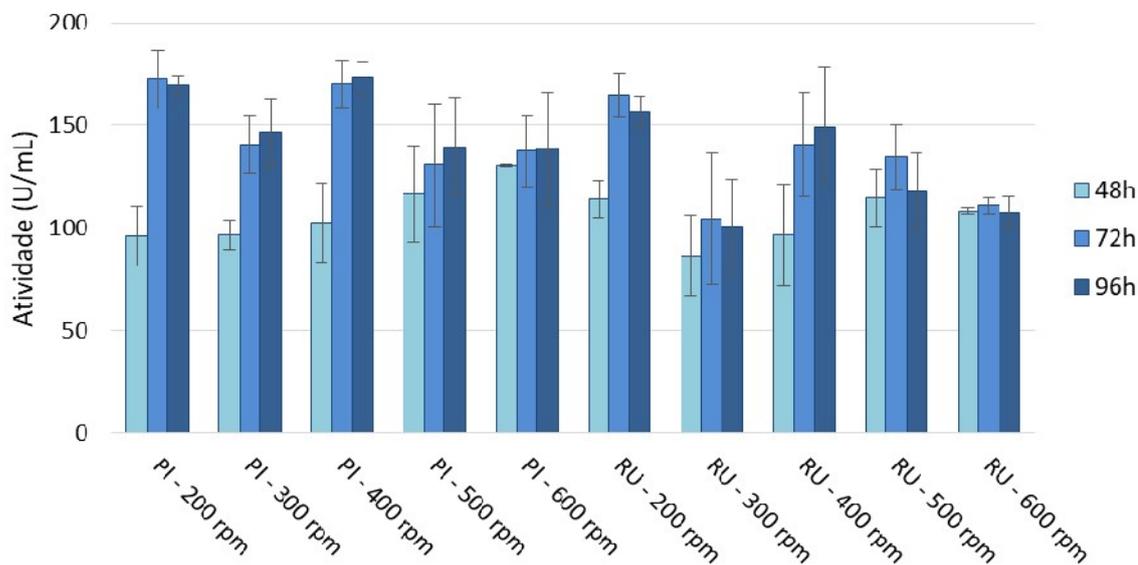


Figura 5.10. Atividade β -glicosidásica de cultivos realizados com *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil para os tempos de 48 h, 72 h e 96 h. (PI) Impelidores de pás inclinadas tipo orelha de elefante; (RU) Impelidores Rushton. Agitações fixas durante todo o cultivo: 200, 300, 400, 500 ou 600 rpm.

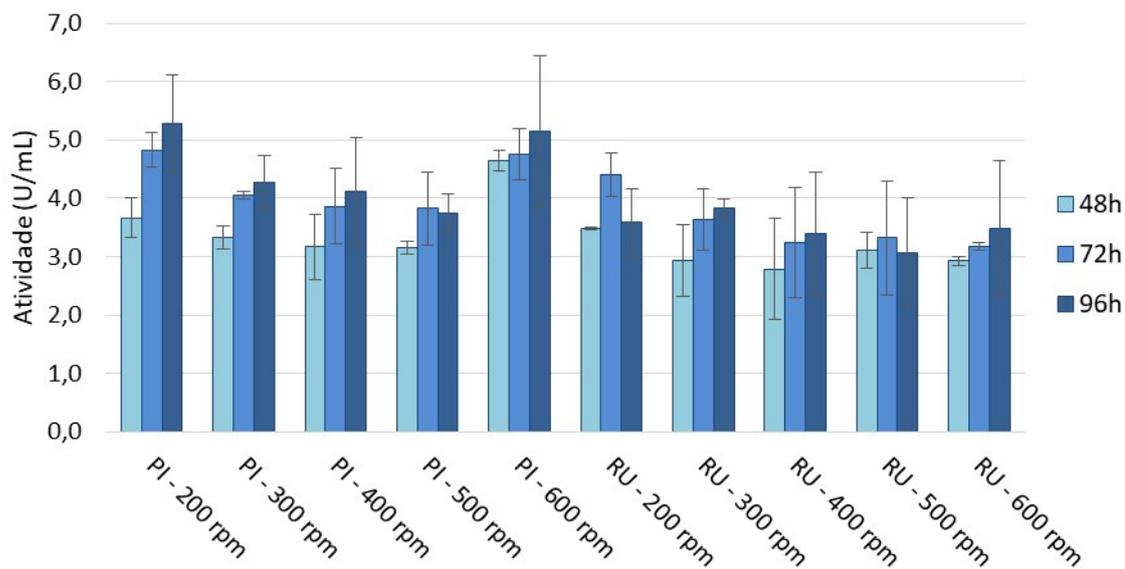
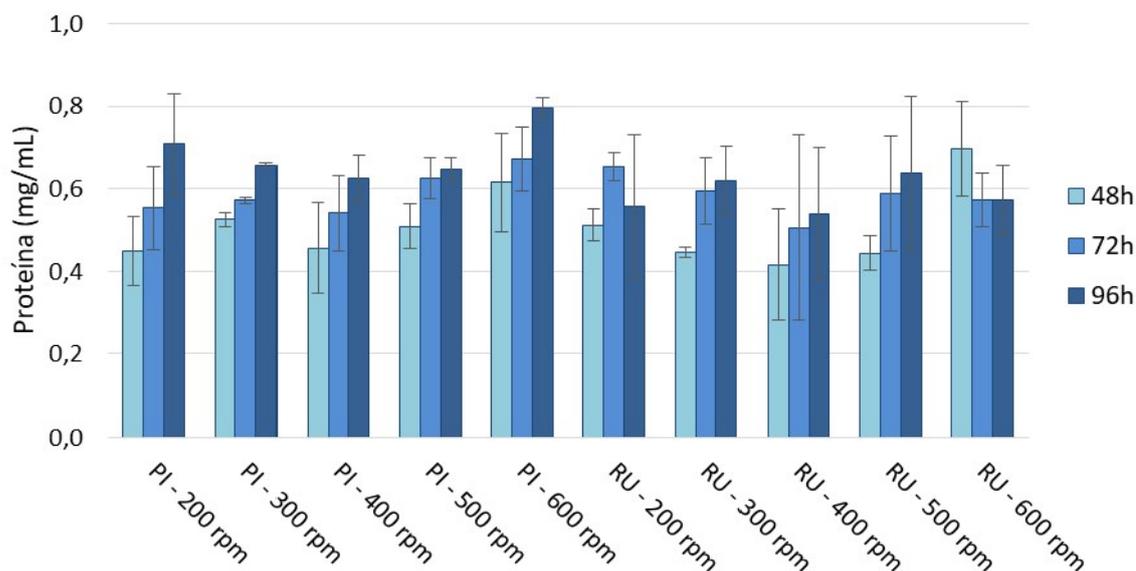


Figura 5.11. Concentração de proteína total de cultivos realizados com *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil para os tempos de 48 h, 72 h e 96 h. (PI) Impelidores de pás inclinadas tipo orelha de elefante; (RU) Impelidores Rushton. Agitações fixas durante todo o cultivo: 200, 300, 400, 500 ou 600 rpm.



As atividades enzimáticas apresentadas nos gráficos anteriores foram analisadas estatisticamente por Análise de Variância utilizando método de Tukey para comparação de médias com 90% de confiança através do software Statistica (Statsoft) (análises apresentadas no Apêndice A). Entre os resultados que apresentaram diferença significativa, os mais relevantes são os resultados de FPase em 72 h dos cultivos com Rushton a 200 rpm que se mostraram significativamente superiores em relação aos cultivos com Rushton a 500 e 600 rpm. Também, resultados de FPase em 72 h dos cultivos com Rushton a 600 rpm são significativamente inferiores aos cultivos com pás inclinadas a 200 e 300 rpm. Isso sugere que agitações mais altas, a partir de 500 rpm, com impelidor tipo Rushton possam ser prejudiciais para a obtenção de atividade celulásica total (FPase). No que diz respeito às atividades β -glicosidásicas, a análise estatística mostrou que os resultados de 48 h de cultivos com pás inclinadas a 600 rpm foram significativamente superiores a quase todas as demais condições com ambos os impelidores. No entanto, em 72 h esta diferença não é mais observada, sugerindo que PI a 600 rpm pode adiantar a obtenção de um mesmo nível atividade β -glicosidásica. Pode-se concluir que cultivos com agitação entre 200 e 400 rpm com impelidores tipo Rushton e cultivos com agitação entre 200 e 500 rpm com impelidores de pás inclinadas não interferem significativamente na produção do CEL.

As amostras dos cultivos realizados com velocidades de agitação fixas também foram utilizadas para avaliação da morfologia fúngica em microscópio óptico com câmera acoplada. Foram registradas microscopias das amostras coletadas em cada tempo de cultivo com aumento de 200 e 400 vezes. As microscopias mais relevantes, todas de amostras coletadas em 72 horas de cultivo e 200 vezes de aumento, são apresentadas nas figuras a seguir: Figura 5.12 – Cultivo com impelidor tipo Rushton a 200 rpm; Figura 5.13 – Cultivo com impelidor tipo Rushton a 400 rpm; Figura 5.14 – Cultivo com impelidor tipo Rushton a 600 rpm; Figura 5.15 – Cultivo com impelidor tipo pás Inclínadas a 200 rpm; Figura 5.16 Cultivo com impelidor tipo pás Inclínadas a 500 rpm; Figura 5.17 Cultivo com impelidor tipo pás Inclínadas a 600 rpm.

Figura 5.12. Microscopia de cultivo de *T. harzianum* P49P11 realizado com velocidade de agitação de 200 rpm e impelidor tipo Rushton. Amostra de 72 h de cultivo, aumento de 200 vezes.



Figura 5.13. Microscopia de cultivo de *T. harzianum* P49P11 realizado com velocidade de agitação de 400 rpm e impelidor tipo Rushton. Amostra de 72 h de cultivo, aumento de 200 vezes.



Figura 5.14. Microscopia de cultivo de *T. harzianum* P49P11 realizado com velocidade de agitação de 600 rpm e impelidor tipo Rushton. Amostra de 72 h de cultivo, aumento de 200 vezes.

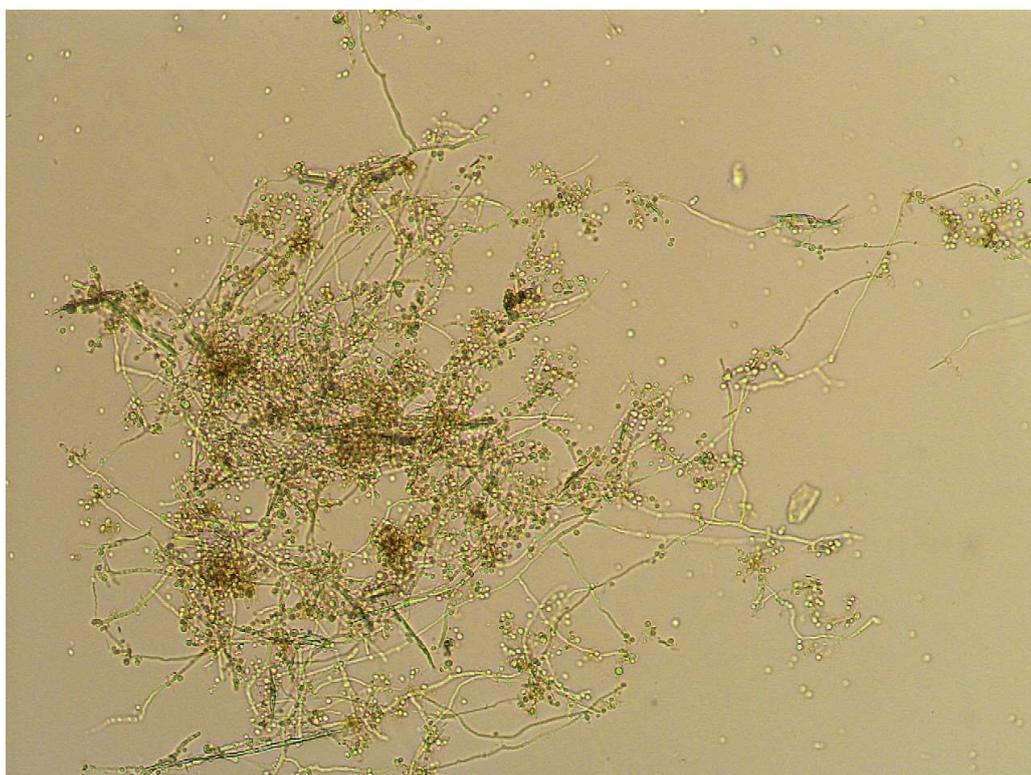


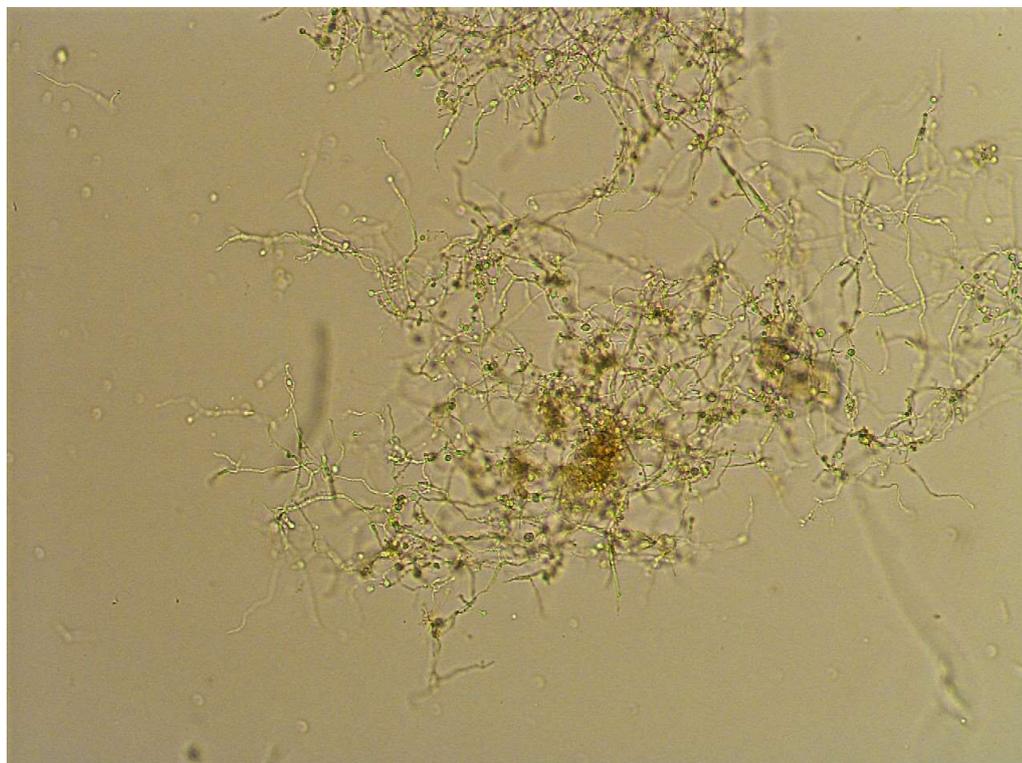
Figura 5.15. Microscopia de cultivo de *T. harzianum* P49P11 realizado com velocidade de agitação de 200 rpm e impelidor tipo pás Inclínadas. Amostra de 72 h de cultivo, aumento de 200 vezes.



Figura 5.16. Microscopia de cultivo de *T. harzianum* P49P11 realizado com velocidade de agitação de 500 rpm e impelidor tipo pás Inclínadas. Amostra de 72 h de cultivo, aumento de 200 vezes.



Figura 5.17. Microscopia de cultivo de *T. harzianum* P49P11 realizado com velocidade de agitação de 600 rpm e impelidor tipo pás Inclínadas. Amostra de 72 h de cultivo, aumento de 200 vezes.



Através das microscopias apresentadas, é possível verificar que nos cultivos com velocidade de agitação de 200 rpm as hifas fúngicas apresentaram menor quantidade de esporos em comparação aos cultivos com 600 rpm. Além disso, entre os cultivos realizados a 600 rpm, os realizados com impelidores tipo pás inclinadas apresentaram níveis consideravelmente menores de esporos em comparação aos cultivos realizados com impelidores tipo Rushton. Adicionalmente, observa-se maior comprimento das hifas em cultivos com velocidades de agitação menores que 600 rpm para os dois tipos de impelidores, sugerindo que sob velocidades de agitação altas o fungo tenha mais dificuldades para se desenvolver.

Como fato adicional, não foi observada quantidade significativa de fragmentos de hifas em microscopias de nenhum cultivo (Figuras 5.12 a 5.17 e demais microscopias não apresentadas), diferentemente do que era esperado tendo como base os experimentos prévios realizados com BED como fonte de carbono. Este fato sugere que a interação entre as hifas fúngicas e diferentes tipos de biomassas pode variar consideravelmente, sendo que em algumas biomassas o fungo consegue aderir de tal

forma que as partículas de biomassa podem servir como uma espécie de proteção ao fungo e impedir que as hifas sejam danificadas por um nível de cisalhamento mais alto.

Foi reportado na literatura por Kao et al. (2007) que a esporulação de microrganismos é uma forma de proteção desencadeada em momentos de grande estresse. Pode ser causada por ausência de substrato, ausência de oxigênio, excesso de compostos tóxicos ou fatores físicos inadequados ao microrganismo, como alta tensão de cisalhamento, por exemplo. Esta última opção é a hipótese mais provável para os resultados obtidos, visto que as demais condições de processo foram mantidas nos mesmos níveis em todos os cultivos. Adicionalmente, Serrano-Carreón et al. (1997) reportaram alta sensibilidade de linhagem de *T. harzianum* sob condições de agitação relativamente brandas de 0,2 kW/m³. A título de comparação, Wang, et al. (1979) reportaram uso de potência de agitação na ordem de 2,0 kW/m³ para produção de penicilina, tanto em escala de laboratório quanto em escala industrial, obtendo bons resultados. Essa comparação mostra a grande diferença de resistência que pode ser percebida entre dois fungos filamentosos de gêneros diferentes, ressaltando a importância de se realizar uma avaliação aprofundada quanto a estes aspectos.

Para comparação com os dados deste projeto, foi utilizada a equação 2 para cálculo de potência não aerada para um impelidor considerando N_p de 6 para impelidores Rushton e 1,5 para impelidores de pás inclinadas. Para fazer a correção do cálculo para considerar dois impelidores para os cultivos com impelidores Rushton e também para obter a potência aerada foram utilizados os gráficos das Figuras 3.2 e 3.3, considerando vazão específica de ar de 1 vvm. Devido às Figuras 3.2 e 3.3 serem específicas para impelidores Rushton, a correção de P_g/P não foi considerada para impelidor de pás inclinadas, sendo apresentado para estes casos apenas os resultados para potência não aerada. Os dados para as diferentes velocidades de agitação e impelidores são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Cálculo de potência não aerada e potência aerada para cultivos realizados em fermentador com 1,5 L de volume de meio de cultura com dois impelidores Rushton (RU) e um impelidor de pás inclinadas (PI) sob agitações fixas ao longo de todo o cultivo. P – Potência não aerada; P_g – Potência aerada; N – Velocidade de agitação.

N (rpm)	P/V (kW/m ³) (Eq. 2)		P/V – dois impelidores (kW/m ³) (Fig. 1.4)		P _g /V (kW/m ³) (Fig. 1.5)
	Pás Inclinadas	Rushton	Rushton		Rushton
200	0,03	0,06	0,08		0,07
300	0,10	0,19	0,29		0,25
400	0,23	0,45	0,68		0,62
500	0,45	0,88	1,32		1,23
600	0,78	1,52	2,28		2,19

Verifica-se que a potência dissipada em cultivos com impelidores Rushton é relativamente grande para as frequências de agitação de 500 e 600 rpm. Por outro lado, para impelidor de pás inclinadas, a potência dissipada é consideravelmente menor para a mesma velocidade de agitação, devido especialmente ao número de potência ser bastante inferior ao número de potência para impelidores Rushton, além de ter sido utilizado apenas um impelidor de pás inclinadas. Para a maioria dos casos, os valores estão acima do valor de 0,2 kW/m³ reportado por Serrano-Carreón et al. (1997) como sendo um valor crítico para *T. harzianum*. No entanto, sugere-se que hajam diferenças para valores críticos de v_{tip} e P_g/V dependendo dos componentes do meio de cultura utilizado, sendo possível que componentes sólidos, como Celufloc ou bagaço, forneçam algum tipo de proteção física às hifas fúngicas.

Desta forma, através dos resultados de atividades enzimáticas foi possível constatar que os dois tipos de impelidores testados geram resultados estatisticamente inferiores para algumas atividades enzimáticas e em alguns tempos específicos quando utilizados acima de determinadas velocidades de agitação – Rushton a partir de 500 rpm e pás inclinadas a partir de 600 rpm. Também, através das microscopias foi possível verificar algumas características morfológicas diferentes no micélio fúngico dependendo do nível de agitação e do tipo de impelidor utilizado. Assim, constatou-se que existe uma faixa de velocidade de agitação entre 200 a 500 rpm para pás inclinadas e entre 200 a 400 rpm para Rushton, que pode ser utilizada em cultivos com *T. harzianum*. Estes aspectos são importantes para o escalonamento do processo por permitir flexibilidade

tanto na escolha do impelidor quanto na velocidade de agitação – e por consequência, da tensão de cisalhamento – a ser empregada para a manutenção da homogeneidade e transferência de massa no processo.

Como um dos objetivos propostos, a partir dos dados de experimentos em fermentador de 2 L, as faixas de velocidade de agitação definidas para serem utilizadas nos experimentos seguintes nesta mesma escala de fermentador foram de 200 a 400 rpm para impelidor tipo Rushton e 200 a 500 rpm para impelidor tipo pás Inclínadas.

Tendo em vista o gasto energético do processo referente a agitação e aeração, uma questão a ser respondida a fim de delinear condições de processo que o tornem mais econômico em termos de gasto de energia é: Qual a combinação de velocidade de agitação e taxa de aeração que fornece oxigênio suficiente ao processo e gera o menor custo operacional em termos energéticos?

Para esta resposta, algumas variáveis precisam ser levadas em conta:

- Limites de rotação e aeração do fermentador;
- Modelo para transferência de oxigênio levando em conta frequência de agitação e taxa de aeração para o fermentador a ser utilizado;
- Demanda de oxigênio ao longo do tempo do cultivo;
- Custo de produção de ar comprimido;
- Curva de consumo de energia elétrica do agitador em relação à velocidade de agitação;

Com estes dados, é possível determinar a melhor condição de agitação e aeração para cada momento do processo de forma a fornecer o oxigênio necessário com o menor gasto energético. No entanto, este projeto não abordou a avaliação econômica, sendo um possível caso de estudo futuro.

5.3 Comparação de linhagens de *T. harzianum*

Durante a realização dos experimentos anteriores um problema que tornou difícil a condução dos cultivos ficou evidente. Houve a formação de uma espessa espuma

que ocupou todo o espaço do fermentador acima do líquido. Não foi observada diferença visual entre a espuma formada em cultivos com parâmetros de agitação diferentes. Vários antiespumantes tradicionais, tanto nacionais quanto importados, foram testados para tentar controlar a espuma. Com o uso de alguns deles foi possível manter a espuma razoavelmente controlada, porém estes influenciaram negativamente na produção do CEL. Os demais antiespumantes não foram eficientes na diminuição da espuma.

A presença de espuma com tais características e que apresenta tamanha dificuldade para ser controlada torna o escalonamento do processo de produção de CEL desafiador e até perigoso, já que existe a possibilidade de entupimento do filtro de exaustão de gás. Quando isso ocorre, há pressurização do fermentador e risco de abertura dos dispositivos de segurança do vaso, arruinando a fermentação. Em escala industrial, é possível se pensar em soluções para controle ou remoção mecânica da espuma através de um projeto específico de fermentador com dispositivos mecânicos para quebra de espuma ou saídas superiores para a espuma, por exemplo. No entanto, não foi possível realizar modificações no fermentador de 100 L utilizado para o escalonamento do processo, portanto foi necessário resolver o problema da espuma através de alterações de processo. É importante ressaltar que o filtro de exaustão de gás é necessário para o escalonamento do processo em fermentador de 100 L, já que nas duas escalas estudadas o processo é executado de forma asséptica. Assim, o filtro de exaustão e o filtro de entrada de ar garantem que as trocas gasosas com o meio ambiente ocorram sem a entrada de microrganismos indesejados no processo e, adicionalmente, sem que o microrganismo cultivado seja liberado para o meio ambiente.

Por estes motivos, resolveu-se testar a linhagem mutante *T. harzianum* 5PCE15 que havia sido obtida há pouco tempo por nosso grupo de pesquisa (Costa, 2017). Tal linhagem possui a característica de não produzir espuma e dados obtidos em cultivos realizados em condições semelhantes em frascos agitados indicavam que a linhagem possuía produtividade de CEL semelhante à linhagem selvagem. Dessa forma, foram realizados experimentos nas condições de velocidade de agitação definidas no bloco de experimentos anterior, a fim de comparar as linhagens selvagem e mutante em fermentador de 2 L frente aos dois tipos de impelidores, Rushton (RU) e pás Inclínadas (PI). A Figura 5.18 apresenta fotografias de cultivos em que foram utilizadas as linhagens de *T. harzianum* selvagem (A) e *T. harzianum* mutante (B), nas quais é possível observar

a diferença na formação de espuma. Na sequência, as Figuras 5.19, 5.20, 5.21 e 5.22 apresentam, respectivamente, os resultados de atividade celulásica total (FPase), atividade xilanásica, atividade β -glicosidásica e concentração de proteínas para os CEL produzidos pelas duas linhagens.

Figura 5.18. Diferença na formação de espuma de cultivos para produção de CEL: (A) Cultivo com a linhagem de *T. harzianum* P49P11 (selvagem); (B) Cultivo com a linhagem de *T. harzianum* 5PCE15 (mutante). Fotos de 48 horas após o início dos cultivos.

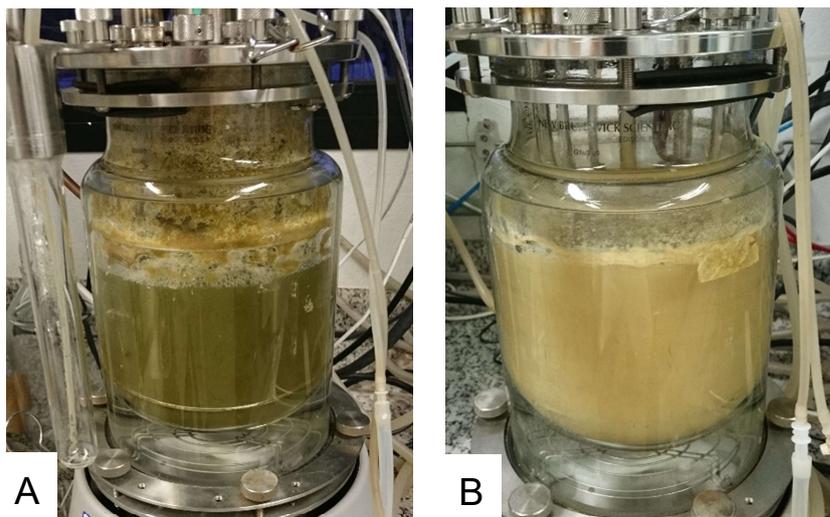


Figura 5.19. Comparação da atividade celulásica total (FPase) entre as linhagens *T. harzianum* P49P11 e *T. harzianum* 5PCE15 em fermentador com 1,5 L utilizando impelidores tipo Rushton (RU) e pás Inclínadas (PI).

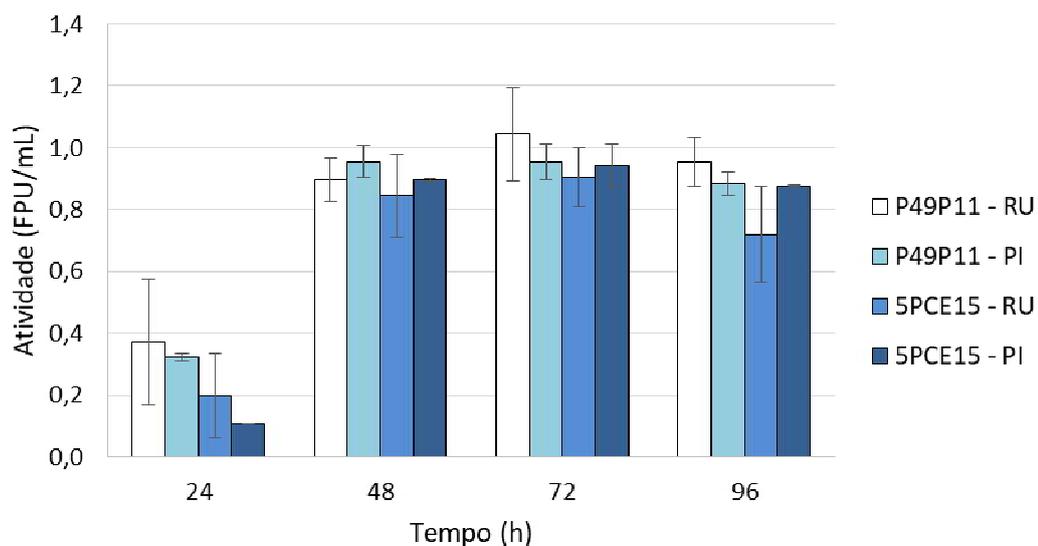


Figura 5.20. Comparação da atividade xilanásica entre as linhagens *T. harzianum* P49P11 e *T. harzianum* 5PCE15 em fermentador com 1,5 L utilizando impelidores tipo Rushton (RU) e pás Inclínadas (PI).

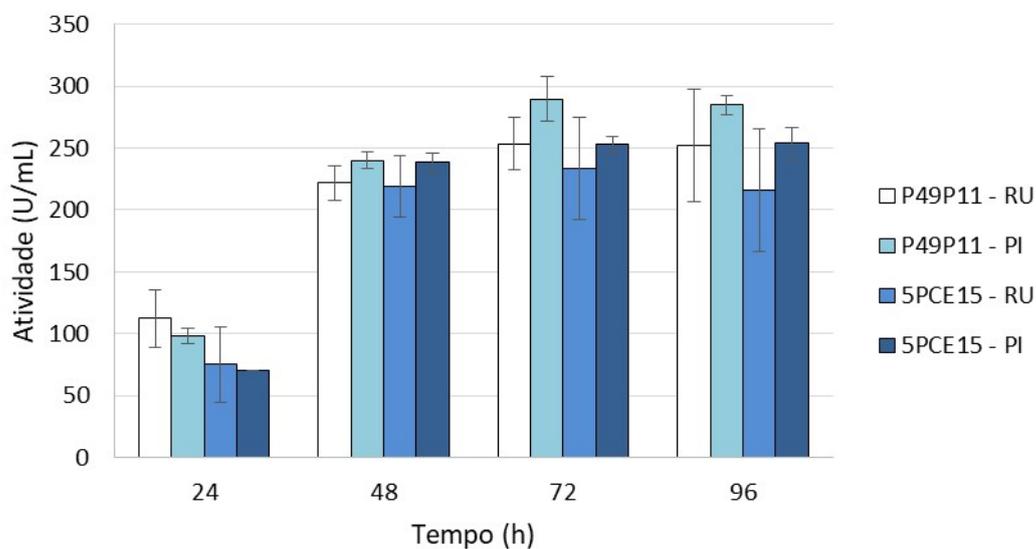


Figura 5.21. Comparação da atividade β -glicosidásica entre as linhagens *T. harzianum* P49P11 e *T. harzianum* 5PCE15 em fermentador com 1,5 L utilizando impelidores tipo Rushton (RU) e pás Inclínadas (PI).

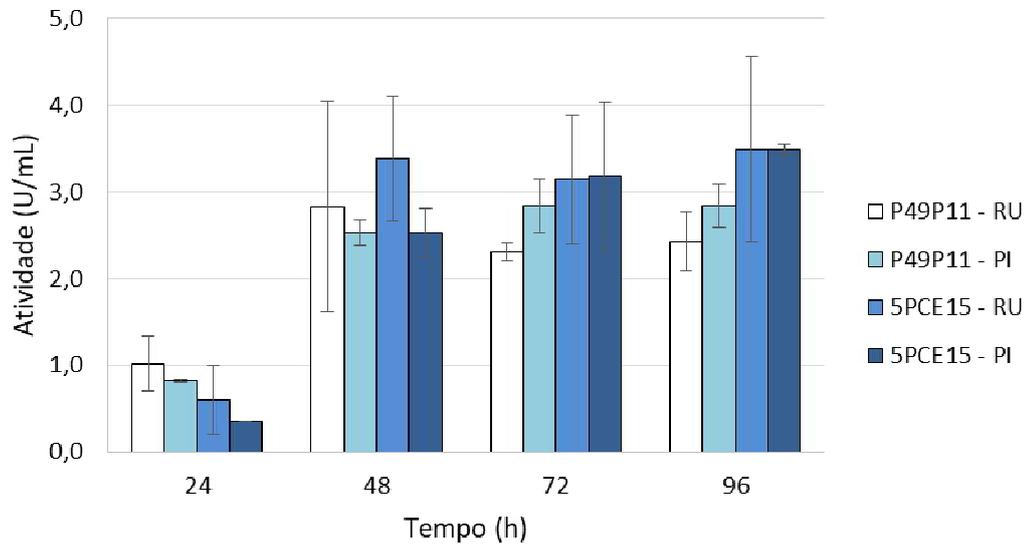
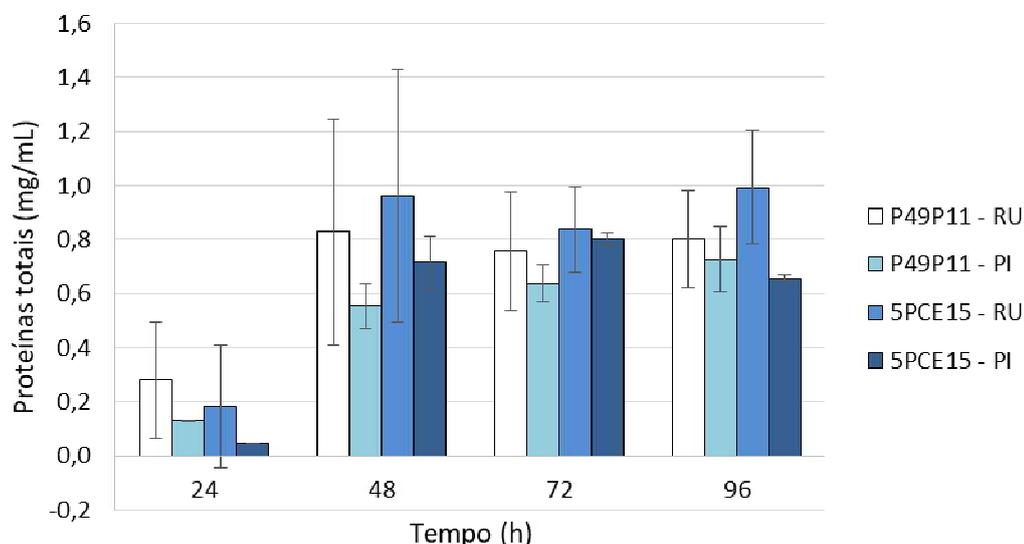


Figura 5.22. Comparação da concentração de proteínas entre as linhagens *T. harzianum* P49P11 e *T. harzianum* 5PCE15 em fermentador com 1,5 L utilizando impelidores tipo Rushton (RU) e pás Inclínadas (PI).



Os resultados mostram que as linhagens são equivalentes em termos de produção de CEL, sendo possível substituir a linhagem selvagem pela linhagem mutante que apresenta o benefício de não formar espuma durante o cultivo. Também, em razão de os resultados de produção de CEL serem equivalentes para os dois tipos de impelidores, definiu-se a utilização de impelidores tipo Rushton para experimentos posteriores, já que este é o tipo padrão de impelidor, normalmente fornecido de fábrica para fermentadores de escala de bancada e piloto, facilitando as primeiras etapas de escalonamento propostas neste trabalho.

5.4 Caracterização dos fermentadores

5.4.1 Determinação de k_{LA} em fermentadores de 2 L e 100 L

Foram realizadas determinações de k_{LA} em fermentadores de 2 L e 100 L de volume útil com o objetivo de se obter a faixa de k_{LA} das condições de cultivo definidas previamente para fermentador de 2 L e determinar as condições de agitação e aeração que fornecem a mesma faixa de k_{LA} para fermentador de 100 L.

Para fermentadores de 2 L, foram utilizados 1,5 L de volume de água, velocidade de agitação de 200 a 600 rpm e vazão específica de ar de 0,25 a 1,0 vvm. As determinações de k_{La} para fermentador de 2 L foram realizadas para a faixa completa de agitações testadas em cultivos com agitações fixas, já que no momento das medições de k_{La} , os experimentos com agitações fixas ainda não haviam sido concluídos. Adicionalmente, esta faixa ampliada de resultados pode subsidiar futuros trabalhos que necessitem de dados de k_{La} para este modelo e tamanho de fermentador.

Já para o fermentador de 100 L, foram utilizados 100 L de água, velocidade de agitação de 63 a 189 rpm e vazão específica de ar de 0,1 a 0,75 vvm. A faixa de velocidade de agitação escolhida para o fermentador de 100 L foi determinada de forma a manter a mesma faixa de velocidade da extremidade do impelidor em relação à escala de 2 L.

Os resultados de k_{La} apresentados a seguir foram calculados utilizando o método de ajuste à equação integrada do balanço de massa de oxigênio para a fase líquida (Equação 11), a qual considera no cálculo o tempo de resposta do sensor de OD. Dessa forma, foi determinado em quintuplicata o tempo de resposta do sensor de OD utilizado, resultando em tempo de resposta τ_e de 22 s, equivalente a constante de atraso do sensor k_e de 163 h^{-1} . Assim, apesar de ser matematicamente possível de se obter valores de k_{La} acima de 163 h^{-1} , isso não faria sentido físico devido à limitação do tempo de resposta do sensor de OD. Até mesmo valores de k_{La} próximos ao k_e devem ser utilizados com cautela, já que há maior incerteza em seu cálculo.

As Figura 5.23 e 5.24 apresentam os resultados de k_{La} obtidos para fermentador de 2 L e fermentador de 100 L, respectivamente.

Figura 5.23. Resultados de $k_{L,a}$ obtidos para fermentador de 2 L com 1,5 L de água, velocidade de agitação de 200 a 600 rpm e vazão específica de ar de 0,25 a 1,0 vvm.

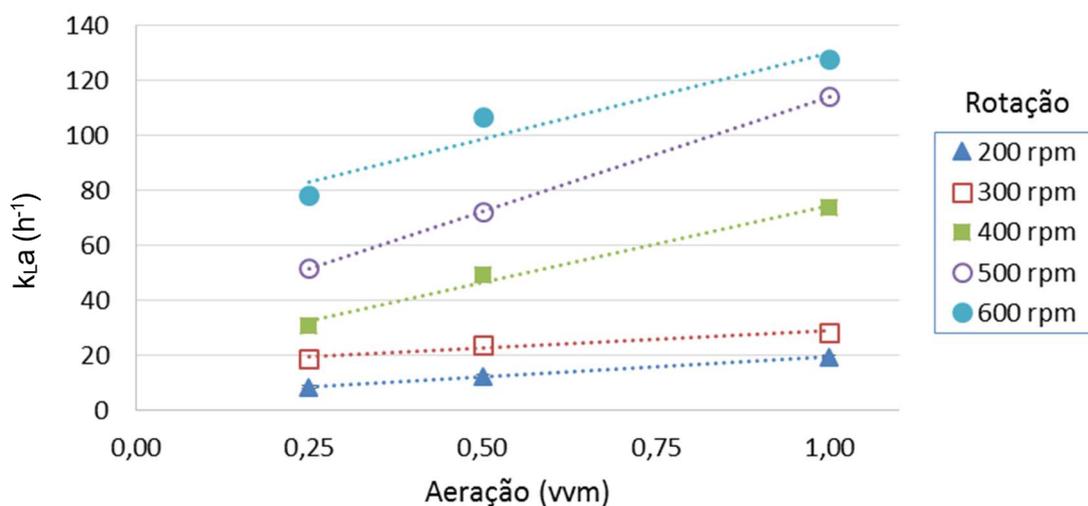
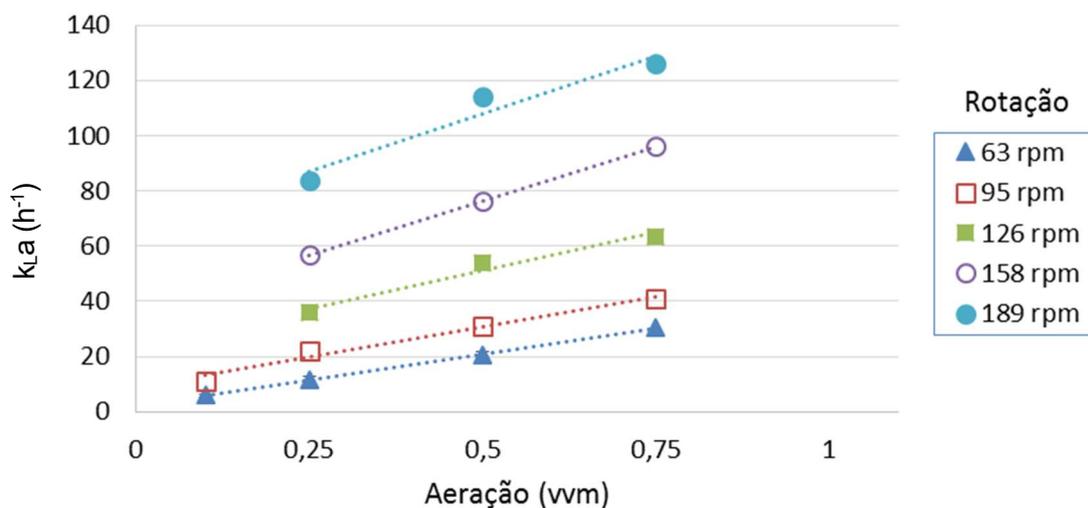


Figura 5.24. Resultados de $k_{L,a}$ obtidos para fermentador de 100 L com 100 L de água, velocidade de agitação de 63 a 189 rpm e vazão específica de ar de 0,1 a 0,75 vvm.



Os gráficos mostram que as faixas de velocidade de agitação e vazão específica de ar utilizadas foram adequadas para obter o mesmo intervalo de $k_{L,a}$ nas duas escalas, entre 6 e 125 h^{-1} . Tais resultados foram utilizados para definir as condições de agitação e aeração para fermentador de 100 L a fim de se utilizar os mesmos $k_{L,a}$ mínimo e máximo utilizados em fermentador de 2 L.

5.5 Estratégias de escalonamento

Foram realizados experimentos considerando duas estratégias definidas para o escalonamento do processo de produção de coquetel enzimático lignocelulolítico. Estes cultivos foram realizados em duplicata com a linhagem mutante (5PCE15) do fungo *T. harzianum*. A seguir, são apresentados os principais resultados obtidos.

5.5.1 Velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) e vazão específica de ar (ϕ_{ar})

Como primeira estratégia testada para escalonamento da produção de CEL em fermentador de 100 L, foram utilizadas a velocidade da extremidade do impelidor (v_{tip}) e a vazão específica de ar (ϕ_{ar}) como critérios a serem mantidos em faixas equivalentes para as duas escalas. Tais critérios não foram mantidos em um valor fixo durante todo o cultivo, mas sim variável dentro de uma faixa que possibilitasse manter o OD em patamar equivalente aos 30% da saturação que foram utilizados em escala de 2 L. Para isso, conforme já mencionado anteriormente, foram consideradas as seguintes condições operacionais dos cultivos realizados em fermentador de 2 L como base para o escalonamento do processo:

- Impelidor: Pás retas tipo Rushton;
- Velocidade de agitação: 200 a 400 rpm, correspondente a v_{tip} de 0,54 a 1,09 m/s;
- Aeração de 0,375 a 1,5 LPM, correspondente a 0,25 a 1,0 vvm;
- OD fixo em 30% da saturação de ar, mantido por controle em cascata de agitação e aeração.

Dessa forma, mantendo-se as mesmas faixas de v_{tip} e ϕ_{ar} , as condições de agitação e aeração definidas para a escala de 100 L foram:

- Impelidor: Pás retas tipo Rushton;
- Velocidade de agitação: 63 a 126 rpm;

- Aeração de 25 a 100 LPM;
- OD fixado em 25% da saturação de ar, mantido por controle em cascata de agitação e aeração.

O *set point* do OD utilizado em fermentador de 100 L foi de 25%, já que o fermentador é mantido sob pressão positiva de 0,2 bar ao longo do cultivo a fim de evitar que contaminações microbiológicas externas ao fermentador possam entrar através de qualquer pequeno vazamento que possa haver no equipamento. Esta pressão positiva é responsável por aumentar proporcionalmente a solubilidade do oxigênio no meio de cultura, conforme a Lei de Henry apresentada na equação 1.

Assim, para se ter a mesma concentração de oxigênio dissolvido, em mg/L, que o fermentador de bancada (pressão muito próxima à ambiente) possui quando está com OD a 30% da saturação, é necessário manter o OD do fermentador de 100 L a 25% da saturação com 0,2 bar de pressão positiva (20% superior à pressão ambiente).

Foram realizados cultivos em duplicata utilizando esta estratégia e os resultados de FPase, xilanase, β -glicosidase e concentração de proteínas totais são apresentados nas Figuras 5.25 a 5.28 em comparação à média dos cultivos realizados em escala de 2 L.

Figura 5.25. Resultados de FPase de CEL produzido em fermentador de 100 L em comparação com resultados obtidos em fermentador de 2 L. Como critérios de escalonamento, foram mantidas constantes as faixas de v_{tip} e ϕ_{ar} .

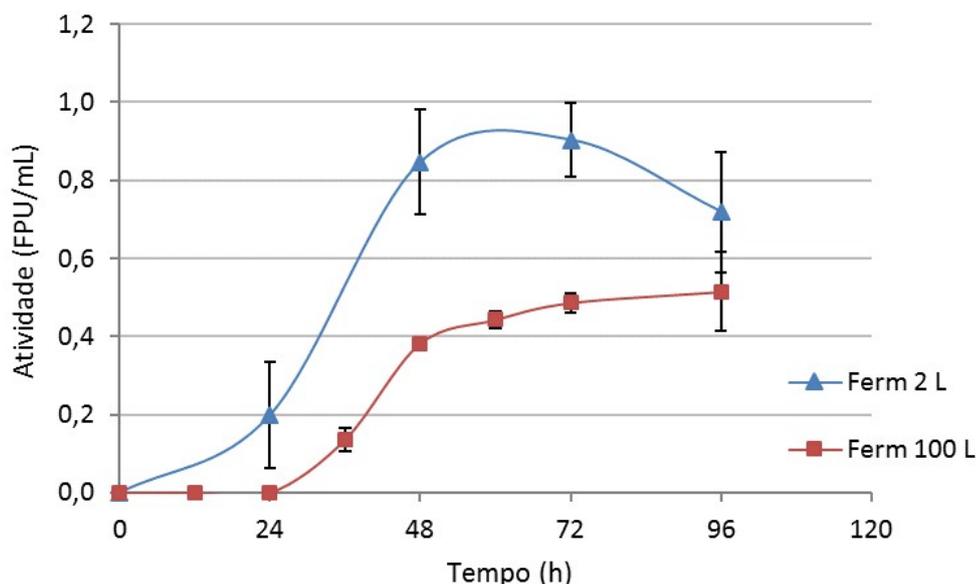


Figura 5.26. Resultados de xilanase do CEL produzido em fermentador de 100 L em comparação com resultados obtidos em fermentador de 2 L. Como critérios de escalonamento, foram mantidas constantes as faixas de v_{tip} e ϕ_{ar} .

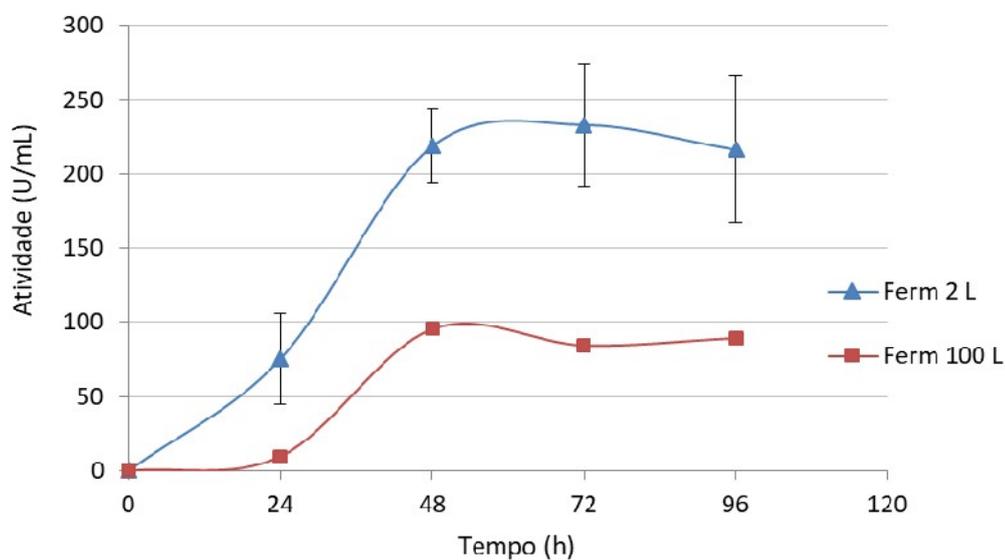


Figura 5.27. Resultados de β -glicosidase de CEL produzido em fermentador de 100 L em comparação com resultados obtidos em fermentador de 2 L. Como critérios de escalonamento, foram mantidas constantes as faixas de v_{tip} e ϕ_{ar} .

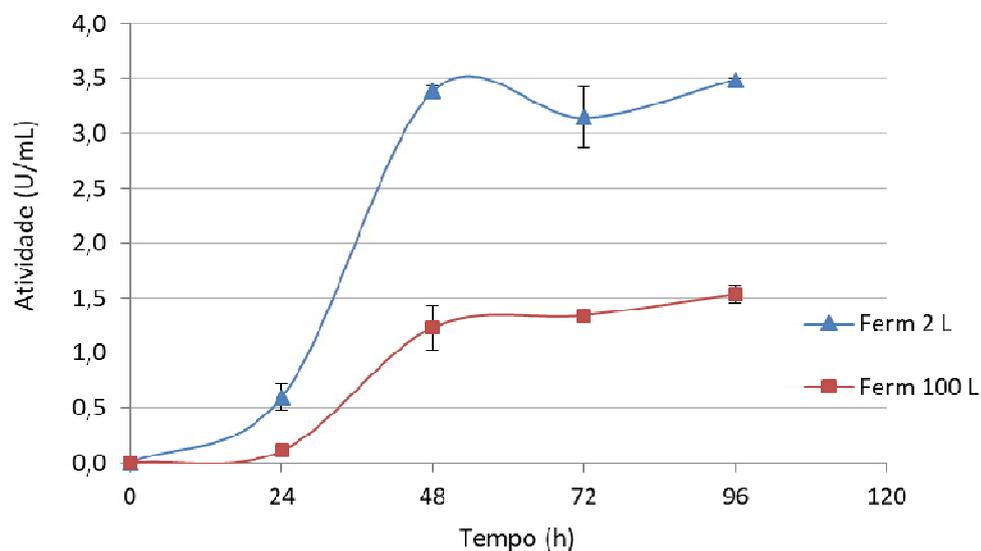
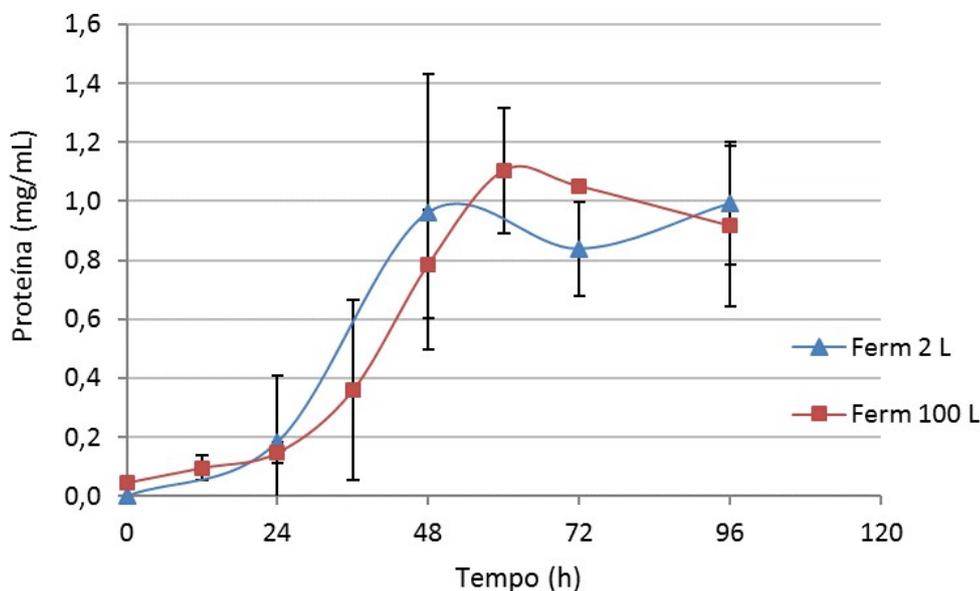


Figura 5.28. Concentração de proteínas totais do CEL produzido em fermentador de 100 L em comparação com resultados obtidos em fermentador de 2 L. Como critérios de escalonamento, foram mantidas constantes as faixas de v_{tip} e ϕ_{ar} .



Os resultados de atividades enzimáticas (FPase, xilanase e β -glicosidase) obtidos com os CEL produzidos em fermentador de 100 L foram aproximadamente a metade em comparação aos resultados obtidos em fermentador de 2 L. Já a concentração de proteínas totais foi similar para as duas escalas. Isso mostra que a concentração de proteínas pode ser usada em alguns casos específicos para inferência dos resultados, no entanto não é informação suficiente para avaliação completa da capacidade de hidrólise do coquetel enzimático produzido.

Em geral, os resultados foram aquém do satisfatório, concluindo-se que as condições operacionais utilizadas em fermentador de 100 L a partir desta estratégia foram inadequadas para escalonamento da produção de CEL.

É importante salientar que entre 16 e 36 horas de cultivo (fase exponencial de crescimento celular) o OD ficou próximo a 0% (gráfico não apresentado), já que as condições de agitação e aeração definidas para o fermentador de 100 L não foram suficientes para fornecer todo o oxigênio demandado pelos microrganismos. É possível que esta tenha sido uma das causas da obtenção de CEL com baixa atividade enzimática para esta estratégia de escalonamento do processo, já que durante o período de crescimento, o nível de oxigênio foi deficiente, o que pode ter resultado em menor quantidade de biomassa fúngica e, conseqüentemente, menor produtividade enzimática.

5.5.2 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La})

Além da estratégia de v_{tip} e ϕ_{ar} , também foi proposta estratégia de escalonamento utilizando faixa de k_{La} constante entre as escalas de fermentadores como critério alternativo de escalonamento. Para tanto, como já apresentado no capítulo de Materiais e métodos, foram consideradas as seguintes condições operacionais dos cultivos realizados em fermentador de 2 L como base para a ampliação de escala até fermentador de 100 L:

- Impelidor: Pás retas tipo Rushton;
- Velocidade de agitação: 200 a 400 rpm;
- Aeração de 0,375 a 1,5 LPM, correspondente a 0,25 a 1,0 vvm;
- k_{La} mínimo (agitação de 200 rpm e aeração de 0,25 vvm): $8,5 \text{ h}^{-1}$;
- k_{La} máximo (agitação de 400 rpm e aeração de 1,0 vvm): $73,8 \text{ h}^{-1}$;
- OD fixado em 30% da saturação de ar, mantido por controle em cascata de agitação e aeração.

Para manter a mesma faixa de k_{La} em fermentador de 100 L, foram utilizadas as seguintes condições operacionais:

- Tipo de impelidor: Pás retas tipo Rushton;
- Velocidade de agitação: 63 a 158 rpm;
- Aeração de 20 a 60 LPM, correspondente a 0,20 a 0,60 vvm;
- k_{La} mínimo (agitação de 63 rpm e aeração de 0,20 vvm): $8,5 \text{ h}^{-1}$;
- k_{La} máximo (agitação de 158 rpm e aeração de 0,60 vvm): 84 h^{-1} ;
- OD fixado em 25% da saturação de ar, mantido por controle em cascata de agitação e aeração e pressão da dorna.

Foram realizados experimentos em duplicata em fermentador de 100 L e os resultados de atividades enzimáticas de FPase, xilanase, β -glicosidase e concentração de

proteínas totais são apresentados nas Figuras 5.29 a 5.32 em comparação à média dos cultivos realizados em escala de 2 L.

Figura 5.29. Resultados de FPase de CEL produzido em fermentador de 100 L em comparação com resultados obtidos em fermentador de 2 L. Como critérios de escalonamento, foi mantida constante a faixa de k_{La} .

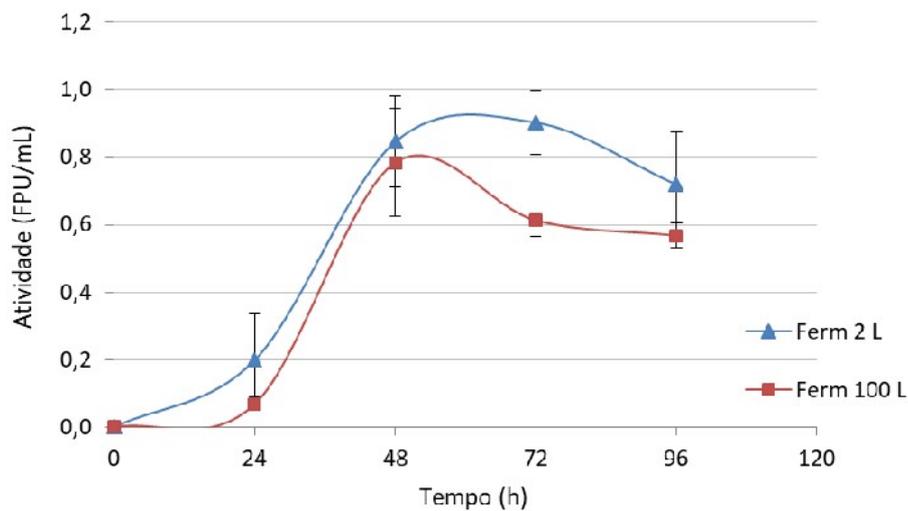


Figura 5.30. Resultados de xilanase do CEL produzido em fermentador de 100 L em comparação com resultados obtidos em fermentador de 2 L. Como critérios de escalonamento, foi mantida constante a faixa de k_{La} .

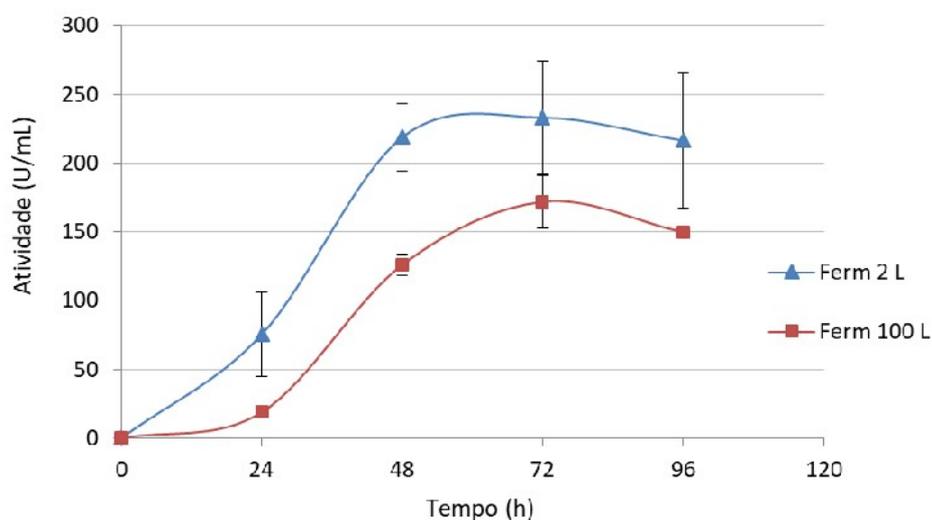


Figura 5.31. Resultados de β -glicosidase de CEL produzido em fermentador de 100 L em comparação com resultados obtidos em fermentador de 2 L. Como critérios de escalonamento, foi mantida constante a faixa de $k_L a$.

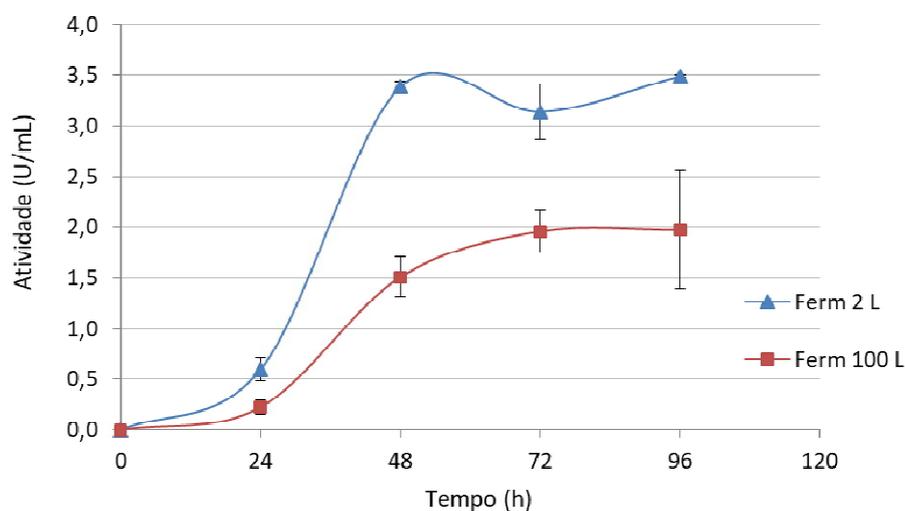
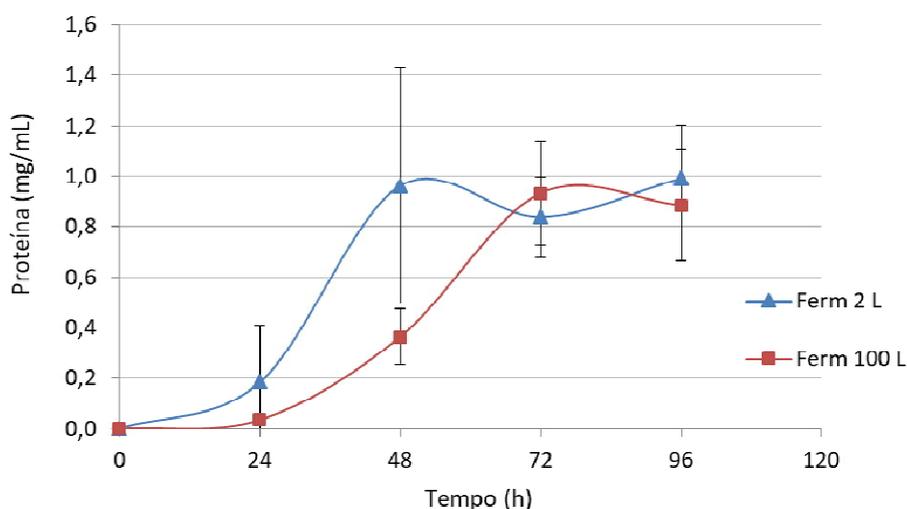


Figura 5.32. Concentração de proteínas totais do CEL produzido em fermentador de 100 L em comparação com resultados obtidos em fermentador de 2 L. Como critérios de escalonamento, foi mantida constante a faixa de $k_L a$.



Cabe salientar que nesta estratégia, a pressão da dorna também foi manipulada entre valores de 0,2 e 0,4 bar para controle do OD. Este aspecto foi introduzido durante a realização dos experimentos já que os limites máximos de agitação e aeração definidos não seriam suficientes para manter o OD a 30%. Com esta modificação, o $k_L a$ máximo foi superior ao inicialmente planejado devido ao aumento da concentração de saturação de oxigênio no meio, que por sua vez foi alterada pelo aumento da pressão parcial do oxigênio – Lei de Henry, equação 1. Mesmo com esta modificação, o OD atingiu valores em torno de 5% entre 16 e 30 horas de cultivo. Estes níveis de OD não ideais

foram observados por menor tempo e a níveis não tão baixos em comparação à primeira estratégia de escalonamento.

Mesmo com o controle não eficiente do oxigênio dissolvido, esta estratégia mostrou resultados melhores em relação à primeira estratégia de escalonamento. A atividade celulásica total (FPase) atingiu valor equivalente ao obtido em fermentador de 2 L para o tempo de 48 horas, porém apresentando leve queda nos pontos seguintes (Figura 5.29). As atividades xilanásica e β -glicosidásica atingiram valores de 150 U/mL e 2 U/mL respectivamente, abaixo dos obtidos em fermentador de 2 L, porém consideravelmente acima dos obtidos com a primeira estratégia, na qual foram obtidos 100 U/mL e 1,5 U/mL para as duas atividades, respectivamente.

Desta forma, observou-se uma melhora bastante importante com a segunda estratégia, chegando bastante próximo à maioria dos resultados obtidos em escala de laboratório. Ainda assim, algumas possibilidades podem ser avaliadas a fim de entender os motivos de os resultados não terem sido os mesmos observados em fermentador de 2 L:

- Verificar efeito do preparo e, principalmente, da esterilização do meio de cultura em fermentador de 100 L, que ocorrem de maneiras diferentes em relação ao realizado para fermentador de 2 L;
- Buscar novas formas de avaliar o cisalhamento entre as diferentes escalas, além de v_{tip} e P/V ;
- Testar estratégia com mesmo nível de agitação utilizado na segunda estratégia de escalonamento, porém com maior vazão de ar e pressão do reator para evitar que o nível de OD caia abaixo de 10% da saturação com ar;
- Testar operação em batelada alimentada, de forma a dosar o substrato de forma que seja possível suprir a demanda de oxigênio ao longo de todo o processo com mais facilidade. No entanto, para este ponto é importante modificar o meio de cultura, especialmente o indutor da síntese de enzimas, para componente solúvel de forma a facilitar a alimentação ao longo do cultivo.

6 CONCLUSÕES

Foram avaliadas produtividades de CEL de *Trichoderma harzianum* P49P11 (linhagem selvagem) sob diferentes concentrações de OD em fermentadores de 2 L. Devido à dificuldade de controle do OD ao longo dos cultivos e de estudos reportarem concentração de oxigênio crítica para fungos filamentosos entre 4% e 15%, foi definida a utilização de OD em 30% da saturação com ar para evitar que concentrações críticas de oxigênio dissolvido pudessem ser atingidas e houvesse possibilidade de diminuição da produtividade de CEL.

Os cultivos realizados em fermentador de 2 L utilizando a linhagem de *T. harzianum* P49P11 (nativa) com velocidade de agitação fixa não apresentaram diferenças significativas de produtividade de CEL para rotações entre 200 e 400 rpm para impelidores Rushton e 200 a 500 rpm para impelidores de pás inclinadas. Velocidades de agitação acima destas faixas resultam em queda de algumas atividades enzimáticas e alterações morfológicas da biomassa fúngica.

Em experimentos para comparação das linhagens P49P11 (nativa) e 5PCE15 (mutante) de *T. harzianum*, esta última apresentou produtividade equivalente à linhagem selvagem e, por apresentar a vantagem de não produzir espuma ao longo do cultivo, importante característica para o escalonamento do processo, foi a linhagem escolhida para ser utilizada no escalonamento da produção de CEL.

Por fim, foram realizados cultivos em fermentador de 100 L utilizando duas estratégias de escalonamento. A primeira estratégia foi realizada utilizando como critérios de escalonamento a velocidade da extremidade do impelidor juntamente com vazão específica de ar ($v_{tip} + \phi_{ar}$) e na segunda estratégia manteve-se fixa a faixa de k_{La} em ambas as escalas de fermentadores testadas. Os resultados obtidos com a primeira estratégia não foram satisfatórios, com produção de CEL em fermentador de 100 L equivalente à metade da produção de CEL em fermentador de 2 L. As demais atividades enzimáticas também apresentaram resultados consideravelmente abaixo dos observados em fermentadores de 2 L. Já a segunda estratégia apresentou resultados significativamente superiores em relação à primeira estratégia, com incrementos de 60% a 90% para as atividades enzimáticas dosadas. Tais resultados não atingiram completamente os obtidos em fermentadores de 2 L, mas são promissores e indicam que critérios de escalonamento relacionados à transferência de oxigênio são os mais indicados

para este tipo de bioprocessos. Ademais, esta metodologia de escalonamento pode servir como base para outros estudos de escalonamento com fungos filamentosos, seja para a produção de enzimas ou de outros bioprodutos.

É importante continuar direcionando esforços para o domínio desta importante etapa de aumento de escala de produção, especialmente no caso de bioprocessos aeróbicos com fungos filamentosos que apresentam características mais desafiadoras que outros bioprocessos, como a resistência menor ao cisalhamento e as modificações reológicas ao longo do processo. Além disso, a tecnologia de produção de enzimas lignocelulolíticas é dominada por poucas empresas no mundo, sendo importante que o Brasil detenha tecnologia própria e transfira esta tecnologia ao setor produtivo. Assim, é possível reduzir os custos de produção do etanol de segunda geração e não depender exclusivamente de fornecedores multinacionais deste insumo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S.; HUMPHREY, A. E; MILLIS, N. F. **Biochemical engineering**. 2 ed, Tóquio, University of Tokyo Press, 1973.
- Agência de Notícias CNI – Confederação Nacional da Indústria. Disponível em: <<http://www.portaldaindustria.com.br/agenciacni/noticias/2017/06/brasil-fica-estagnado-no-indice-global-de-inovacao/>> Acesso em: 22 de novembro de 2017.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Venda de Combustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos/blocos-exploratorios-sob-concessao/63-dados-estatisticos/793-vendas-de-combustiveis>> Acesso em: 27 de abril de 2017.
- BADINO, A.C.; FACCIOTTI, M.C.R.; SCHMIDELL, W. Improving $k_L a$ determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 75: 469-474, 2000.
- BADINO, A.C., SCHMIDELL, W. Variação de escala. In: Schmidell, W. et al. Coord. **Biotecnologia Industrial** vol. 2. São Paulo. Editora Blucher, 2001. p. 333-353.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2.ed., Nova York, McGraw-Hill Book Co., 1986.
- BAILEY, M.J.; POUTANEN, K. Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 30: 5-10, 1989.
- BBC Brasil – Quatro fatores para entender a crise do etanol. Disponível em: <http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2013/05/130424_etanol_mdb> Acesso em: 19 de setembro de 2017.
- BON, E.P.S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JR., N. Enzimas na produção de etanol In: E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. Eds. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**, Editora Interciência, 241-271, 2008.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1-2): 248-54, 1976.
- COSTA, P.S. Aumento das atividades das glicohidrolases produzidas por *Trichoderma harzianum* por otimização de meio de cultura e melhoramento genético clássico visando viabilidade do etanol 2G. **Tese de doutorado**, Faculdade de Engenharia Química, Unicamp. Processo Fapesp 2014/21821-5. 2017.
- COSTA, P.S.; COSTA, A.C.; PRADELLA, J.G.C. Cumulative mutation and new selection strategies for *Trichoderma harzianum* 3PCE6 hypercellulolytic mutants. Apresentado em forma de POSTER no **17th European Congress on Biotechnology**, Krakow, Polônia, 3 a 6 de julho de 2016.
- DAMASO, M.C.T.; ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E.; MARTINS, O.B.; PEREIRA, N.; ANDRADE, M.M.C.; ALBANO, R.M. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology**. 6064–6072, 2003.
- DELABONA, P.S.; COTA, J.; HOFFMAM, Z.B.; PAIXÃO, D.A.A.; FARINAS, C.S.; CAIRO, J.P.L.F.; LIMA, D.J.; SQUINA, F.M.; RULLER, R.; PRADELLA, J.G.C.

- Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and α -L-arabinofuranosidase. **Bioresource Technology**. 131: 500-507, 2013a.
- DELABONA, P.S.; FARINAS, C.S.; LIMA, D.J.; PRADELLA, J.G.C. Experimental mixture design as a tool to enhance glycosyl hydrolases production by a new *Trichoderma harzianum* P49P11 strain cultivated under controlled bioreactor submerged fermentation. **Bioresource Technology**. 132: 401-405, 2013b.
- DELABONA, P.S.; FARINAS, C.S.; SILVA, M.R.; AZZONI, S.F.; PRADELLA, J.G.C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**. 107: 517-521, 2012a.
- DELABONA, P.S.; PIROTA, R.D.P.B.; CODIMA, C.A.; TREMACOLDI, C.R.; RODRIGUES, A.; FARINAS, C.S. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**. 37: 243-250, 2012b.
- DELGADO, F.; EVANGELISTA, M.; ROITMAN, T. Biocombustíveis. **Cadernos FGV Energia**. Ano 4, Número 8, 2017.
- ELLILÄ, S.; FONSECA, L.; UCHIMA, C.; COTA, J.; GOLDMAN, G.H.; SALOHEIMO, M.; SACON, V.; SIIKA-AHO, M. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. **Biotechnology for Biofuels**. 10: 30, 2017.
- FUTATSUGI, M.; OGAWA, T.; FUKUDA, H. Scale-Up of Glucoamylase Production by *Saccharomycopsis fibuligera*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 76(5): 419-422, 1993.
- GALBE, M.; SASSNER, P.; WINGREN, A.; ZACCHI, G. Process engineering economics of bioethanol production. In: Olssen, L. **Ed. Biofuels**. 108: 303–327, 2007.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**. 59: 257–268, 1987.
- HARDY, N.; AUGIER, F.; NIENOW, A.W.; BEAL, C.; BEN CHAABANE, F. Scale-up agitation criteria for *Thichoderma reesei* fermentation. **Chemical Engineering Science**. 172: 158-168, 2017.
- HENRIKSEN, C.M.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Influence of the dissolved oxygen concentration on the penicillin biosynthetic pathway in steady-state cultures of *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology Progress**. 13: 776-782, 1997.
- HIMMEL, M.E.; RUTH, M.F.; WYMAN, C.E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current Opinion in Biotechnology**. 10: 358-364, 1999.
- HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**. 8: 301-306, 2005.
- HONG, J.; WANG, Y.; KUMAGAI, H.; TAMAKI, H. Construction of thermotolerant yeast expressing thermostable cellulase genes. **Journal of Biotechnology**. 130: 114-123, 2007.

- HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 94: 205-214, 2012.
- HUDCOVA, V.; MACHON, V.; NIENOW, A.W. Gas-liquid dispersion with dual Rushton turbine impellers. *Biotechnology and Bioengineering*. 34: 617-628, 1989.
- IFC Markets – Preço e Cotação do Petróleo Brent em tempo real. Disponível em: <<https://www.ifcmarkets.com.br/market-data/commodities-prices/brent>> Acesso em: 19 de setembro de 2017.
- IPT. Manual de Recomendações de Conservação de Energia na Indústria do Açúcar e do Álcool. **Publicação IPT** n° 18171, 1a ed., 792, 1990.
- JAHIC, M.; VEIDE, A.; CHAROENRAT, T.; TREI, T.; ENFORS, S.O. Process technology for production and recovery of heterologous protein with *P. pastoris*. **Biotechnology Progress**. 22: 1465–1473, 2006.
- JEFFRIES, T. Biodegradation of lignin and hemicellulose, In: C. Ratledge (ed.) **Biochemistry and Microbial Degradation**, Kluwer Academic Publishers, 233–277, 1994.
- JOHNSON, E. Integrated enzyme production lowers the cost of cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. 10: 164–174, 2016.
- JUNKER, B.H. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 7: 347–364, 2004.
- KADAM, K. Cellulase production. In: Wyman, C, Eds. **Handbook on bioethanol: production and utilization**. Taylor and Francis Publisher, 231–252, 1996.
- KANDA, M.; YAMAMOTO, E.; HAYASHI, A.; YABUTANI, T.; YAMASHITA, M.; HONDA, H. Scale-up fermentation of echinocandin type antibiotic FR901379. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 109(2): 138-144, 2010.
- KAO, P.-M.; CHEN, C.-I.; HUANG, S.-C.; CHANG, Y.-C.; TSAI, P.-J.; LIU, Y.-C. Effect of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Biochemical Engineering Journal*. 34: 172-178, 2007.
- KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B.; BLANCH, H.W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**. 109(4):1083–1087, 2012.
- KUYPER, M.; HARTOG, M.M.; TOIRKENS, M.J.; ALMERING, M.J.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Metabolic engineering of a xyloseisomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. **FEMS Yeast**. 5(4–5): 399–409, 2005.
- LEE, S. Y. High cell density culture of *Escherichia coli*. **TIBTECH**. 14: 98-105, 1996.
- LEJEUNE, R.; BARON, G.V. Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 43: 249-258, 1995.
- LI, B.; BECKEN, U.; SHA, M. Tackling the Challenge of Scalability: Fermentation systems for bioprocess scale-up from small to pilot/production. **Genetic Engineering & Biotechnology News**. 36(9): 28-29, 2016.

- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; Van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 66: 506–577, 2002.
- MACEDO, I.C. Sugar Cane's Energy. **UNICA**. Berlendis Editora, 235, 2005.
- MANDELS, M., WEBER, J. The production of cellulases. **Adv. Chem. Ser.** 95, 391-414, 1969.
- MARQUARDT, D.W. An algorithm for least-square estimation of nonlinear parameters. **Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics**. 11: 431-441, 1963.
- MARTEN, M.R.; VELKOVSKA, S.; KHAN, S.A.; OLLIS, D.F. Rheological, mass transfer and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. **Biotechnology Progress**. 12: 602-611, 1996.
- MARTINS, L.F.; KOLLING, D.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A.J.P.; RAMOS, L.P. Comparison between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**. 99: 1417-1424, 2008.
- MERINO, S.T.; CHERRY, J. (2007). Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization In: Olssen, L. **Ed. Biofuels**. Springer-Verlag, 95-120.
- MILANEZ, A.Y.; NYKO, D.; VALENTE, M.S.; SOUSA, L.C.; BONOMI, A.; JESUS, C.D.F.; WATANABE, M.D.B.; CHAGAS, M.F.; REZENDE, M.C.A.F.; CAVALETT, O.; JUNQUEIRA, T.L.; GOUVÊIA, V.L.R. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar – uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **Biocombustíveis. BNDES Setorial**. 41, 237-294, 2015.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31, 426–428, 1959.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 96: 673-86, 2005.
- POLLARD, D.J.; KIRSCHNER, T.F.; HUNT, G.R.; TONG, I.-T.; STIEBER, R.; SALMON, P.M. Scale up of a viscous fungal fermentation: Application of scale-up criteria with regime analysis and operating boundary conditions. **Biotechnology and Bioengineering**. 96: 307-317, 2007.
- PRADELLA, J.G.C.; ROSSELL, C.E.V.; SCANDIFFIO, M.I.G.; CUNHA, M.P.; PINHO, M.G.O.; BONOMI, A. Estudo Preliminar do Custo de Produção *in house* de Celulases na Biorrefinaria de Etanol de Segunda Geração. In: **Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, 2009.
- QIN, Y.; WEI, X.; LIU, X.; WANG, T.; QU, Y. Purification and characterization of recombinant endonuclease of *Trichoderma reesei* expressed in *Sacharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability. **Protein Expression and Purification**. 58: 162-167, 2008.
- QU, L.; REN, L.-J.; HUANG, H. Scale-up of docosahexaenoic acid production in fed-batch fermentation by *Schizochytrium sp.* based on volumetric oxygen-transfer coefficient. **Biochemical Engineering Journal**. 77: 82-87, 2013.

- ROCHA-VALADEZ, J.A.; GALINDO, E.; SERRANO-CARREÓN, L. Effect of the impeller configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. **Bioprocess Engineering**. 23: 403-410, 2000.
- RIESENBERG, R.; GUTHKE, R. High cell density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 51: 422-430, 1999.
- ROLINSON, G. N. Respiration of *Penicillium chrysogenum* in penicillin fermentations. **Journal of General Microbiology**. 6: 336-343, 1952.
- RUSHTON, J.H.; COSTICH, E.W.; EVERETT, H.J. Power characteristics of mixing impellers – Part I. **Chemical Engineering Progress**. 46: 395-404, 1950.
- SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: Schmidell, W. et al. Coord. **Biotecnologia Industrial** vol. 2. São Paulo. Editora Blucher. p. 277-331, 2001.
- SCHMIDT, F.R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 68: 425-435, 2005.
- SERRANO-CARREÓN, L.; FLORES, C.; GALINDO, E. γ -Decalactone production by *Trichoderma harzianum* in stirred bioreactors. **Biotechnology Progress**. 13: 205-208, 1997.
- SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. 44: 13-18, 2009.
- STOCKER, T.F.; QIN, D.; PLATTNER, G.-K.; TIGNOR, M.; ALLEN, S.K.; BOSCHUNG, J.; NAUELS, A.; XIA, Y.; BEX, V.; MIDGLEY, P.M. **IPCC 2013: Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp. 2013.
- THONGEKKAEW, J.; IKEDA, H.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. An acidic thermostable carboxymethyl cellulase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: Purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. **Protein expression and Purification**. 60: 140-146, 2008.
- WANG, M.; WU, M.; HUO, H. Life-cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. **Environmental Research Letters**. 2, 2007.
- WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAINE, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E.; LILLY, M.D. **Fermentation and enzyme technology**. Nova York, John Wiley & Sons, 1979.
- WISE, W.S. The measurement of the aeration of culture media. **Journal of General Microbiology**. 5: 167-177, 1951.
- WYMAN, C. **Handbook on bioethanol: production and utilization**. Taylor and Francis Publisher, 424, 1996.
- ZHANG, Y.-H.P.; HONG, J.; YE, X. Cellulase assays. **Methods in Molecular Biology**. 581: 213-231, 2009.
- YANG, B.; DAI, Z.; DING, S.-Y.; WYMAN, C.E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. **Biofuels**. 2(4): 421–450, 2011.

APÊNDICE A

ANÁLISE ESTATÍSTICA DE COMPARAÇÃO DE MÉDIAS PELO MÉTODO DE TUKEY

Foram realizadas análises estatísticas de comparação de médias pelo método de Tukey com 90% de confiança para comparação dos resultados referentes às fermentações realizadas em fermentador de 2 L com agitações fixas durante todo o cultivo. A seguir são apresentados os resultados gerados pelo software Statistica (Statsoft) a partir de comparações dos resultados de FPase, xilanase, β -glicosidase e concentração de proteínas em 48 horas e 72 horas de cultivo para as diferentes velocidades de agitação (200 a 600 rpm) e dois tipos de impelidores, pás retas tipo Rushton e pás inclinadas tipo orelha de elefante.

Figura A.1. Análise estatística de comparação de médias pelo método de Tukey para atividades de FPase de amostras de (a) 48 h e (b) 72 h de cultivos realizados com *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. (PI) Impelidores de pás inclinadas tipo orelha de elefante; (RU) Impelidores pás retas tipo Rushton.

(a)											
Tukey HSD test; variable FPase 48h (Spreadsheet3)											
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests											
Error: Between MS = ,03919, df = 14,000											
Cell No.	Rotação	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
1	RU - 200 rpm	1,0252	,90162	,58252	,85780	,76284	1,1202	1,2280	,82495	,93533	1,1479
2	RU - 300 rpm	0,999609	0,999609	0,367378	0,992459	0,931058	0,999955	0,985162	0,975520	0,999939	0,999633
3	RU - 400 rpm	0,367378	0,744872	0,744872	1,000000	0,999033	0,976087	0,805139	0,999984	1,000000	0,951389
4	RU - 500 rpm	0,992459	1,000000	0,777942	0,777942	0,987528	0,171765	0,064045	0,871753	0,507256	0,134587
5	RU - 600 rpm	0,931058	0,999033	0,987528	0,999903	0,999903	0,890142	0,583774	1,000000	0,999955	0,826054
6	PI - 200 rpm	0,999955	0,976087	0,171765	0,890142	0,723358		0,999870	0,812502	0,985306	1,000000
7	PI - 300 rpm	0,985162	0,805139	0,064045	0,583774	0,416904	0,999870		0,480488	0,819184	0,999989
8	PI - 400 rpm	0,975520	0,999984	0,871753	1,000000	0,999997	0,812502	0,480488		0,999210	0,733349
9	PI - 500 rpm	0,999939	1,000000	0,507256	0,999955	0,990747	0,985306	0,819184	0,999210		0,964889
10	PI - 600 rpm	0,999633	0,951389	0,134587	0,826054	0,643974	1,000000	0,999989	0,733349	0,964889	

(b)											
Tukey HSD test; variable FPase 72h (Spreadsheet3)											
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests											
Error: Between MS = ,02567, df = 14,000											
Cell No.	Rotação	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
1	RU - 200 rpm	1,4349	1,0523	1,0238	,93017	,78804	1,3997	1,3218	1,0100	1,0015	,94648
2	RU - 300 rpm	0,397501	0,397501	0,221099	0,078756	0,028465	1,000000	0,998979	0,191419	0,174909	0,153001
3	RU - 400 rpm	0,221099	1,000000	1,000000	0,996401	0,805046	0,515340	0,788575	0,999999	0,999997	0,999392
4	RU - 500 rpm	0,078756	0,996401	0,998867	0,998867	0,822926	0,312676	0,590307	1,000000	1,000000	0,999898
5	RU - 600 rpm	0,028465	0,805046	0,822926	0,822926	0,989551	0,117817	0,268795	0,999676	0,999870	1,000000
6	PI - 200 rpm	1,000000	0,515340	0,312676	0,117817	0,041861		0,999949	0,273839	0,251810	0,215261
7	PI - 300 rpm	0,998979	0,788575	0,590307	0,268795	0,096340	0,999949		0,535837	0,503009	0,420704
8	PI - 400 rpm	0,191419	0,999999	1,000000	0,999676	0,864700	0,273839	0,535837		1,000000	0,999980
9	PI - 500 rpm	0,174909	0,999997	1,000000	0,999870	0,887531	0,251810	0,503009	1,000000		0,999994
10	PI - 600 rpm	0,153001	0,999392	0,999898	1,000000	0,988257	0,215261	0,420704	0,999980	0,999994	

Figura A.2. Análise estatística de comparação de médias pelo método de Tukey para atividades de xilanase de amostras de (a) 48 h e (b) 72 h de cultivos realizados com *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. (PI) Impelidores de pás inclinadas tipo orelha de elefante; (RU) Impelidores pás retas tipo Rushton.

(a)		Tukey HSD test; variable Xil 48h (Spreadsheet3) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 3272,3, df = 14,000									
Cell No.	Rotação	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
1	RU - 200 rpm	113,98	86,528	136,87	151,66	108,30	95,996	96,612	150,75	160,27	130,43
2	RU - 300 rpm	0,999955	0,999955	0,999979	0,998793	1,000000	0,999999	0,999999	0,998999	0,994457	0,999999
3	RU - 400 rpm	0,999979	0,990101	0,990101	0,950650	0,999994	1,000000	1,000000	0,954462	0,904233	0,998079
4	RU - 500 rpm	0,998793	0,950650	0,999999	0,999999	0,999866	0,997774	0,998013	0,999999	0,999935	1,000000
5	RU - 600 rpm	1,000000	0,999994	0,999866	0,996539	0,996539	0,980836	0,982150	1,000000	1,000000	0,999989
6	PI - 200 rpm	0,999999	1,000000	0,997774	0,980836	1,000000		1,000000	0,982763	0,954234	0,999708
7	PI - 300 rpm	0,999999	1,000000	0,998013	0,982150	1,000000	1,000000		0,983977	0,956694	0,999748
8	PI - 400 rpm	0,998999	0,954462	0,999999	1,000000	0,997038	0,982763	0,983977		1,000000	0,999992
9	PI - 500 rpm	0,994457	0,904233	0,999935	1,000000	0,987742	0,954234	0,956694	1,000000		0,999808
10	PI - 600 rpm	0,999999	0,998079	1,000000	0,999989	0,999993	0,999708	0,999748	0,999992	0,999808	

(b)		Tukey HSD test; variable Xil 72h (Spreadsheet3) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2145,2, df = 14,000									
Cell No.	Rotação	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
1	RU - 200 rpm	164,65	104,40	166,50	161,34	110,85	172,41	140,71	206,00	171,62	137,34
2	RU - 300 rpm	0,937662	0,937662	1,000000	1,000000	0,967380	1,000000	0,999915	0,989106	1,000000	0,999753
3	RU - 400 rpm	1,000000	0,883895	0,883895	0,924987	1,000000	0,884037	0,997746	0,390188	0,833104	0,998919
4	RU - 500 rpm	1,000000	0,924987	1,000000	1,000000	0,933610	1,000000	0,999676	0,983184	1,000000	0,999149
5	RU - 600 rpm	0,967380	1,000000	0,933610	0,961593	0,961593	1,000000	0,999497	0,469663	0,895450	0,999806
6	PI - 200 rpm	1,000000	0,884037	1,000000	1,000000	0,930039	0,999197	0,997499	1,000000	0,998265	0,998265
7	PI - 300 rpm	0,999915	0,997746	0,999676	0,999948	0,999497	0,999197		0,853370	0,998666	1,000000
8	PI - 400 rpm	0,989106	0,390188	0,983184	0,964045	0,469663	0,997499	0,853370		0,993395	0,817323
9	PI - 500 rpm	1,000000	0,833104	1,000000	1,000000	0,895450	1,000000	0,998666	0,993395		0,997096
10	PI - 600 rpm	0,999753	0,998919	0,999149	0,999819	0,999806	0,998265	1,000000	0,817323	0,997096	

Figura A.3. Análise estatística de comparação de médias pelo método de Tukey para atividades de β -glicosidase de amostras de (a) 48 h e (b) 72 h de cultivos realizados com *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. (PI) Impelidores de pás inclinadas tipo orelha de elefante; (RU) Impelidores pás retas tipo Rushton.

(a)		Tukey HSD test; variable Beta 48h (Spreadsheet3) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,20914, df = 14,000									
Cell No.	Rotação	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
1	RU - 200 rpm	3,4813	2,9303	2,7914	3,1114	2,9299	3,6678	3,3274	3,1676	3,1557	4,6488
2	RU - 300 rpm	0,959514	0,959514	0,803313	0,994477	0,959355	0,999989	0,999998	0,998357	0,997826	0,320185
3	RU - 400 rpm	0,803313	0,999998	0,999998	0,999980	1,000000	0,822508	0,995220	0,999816	0,999879	0,046461
4	RU - 500 rpm	0,994477	0,999980	0,995645	0,995645	0,999998	0,554617	0,942005	0,986709	0,989271	0,013782
5	RU - 600 rpm	0,959355	1,000000	0,999998	0,999980		0,822134	0,995189	0,999814	0,999878	0,046396
6	PI - 200 rpm	0,999989	0,822508	0,554617	0,929015	0,822134		0,998472	0,960825	0,955098	0,528578
7	PI - 300 rpm	0,999998	0,995220	0,942005	0,999915	0,995189	0,998472		0,999993	0,999988	0,196235
8	PI - 400 rpm	0,998357	0,999816	0,986709	1,000000	0,999814	0,960825	0,999993		1,000000	0,066764
9	PI - 500 rpm	0,997826	0,999879	0,989271	1,000000	0,999878	0,955098	0,999988	1,000000		0,063569
10	PI - 600 rpm	0,320185	0,046461	0,013782	0,052950	0,046396	0,528578	0,196235	0,066764	0,063569	

(b)		Tukey HSD test; variable Beta 72h (Spreadsheet3) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,43066, df = 14,000									
Cell No.	Rotação	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
1	RU - 200 rpm	4,4028	3,6369	3,2363	3,3188	3,1774	4,8309	4,0584	3,8666	3,8262	4,7580
2	RU - 300 rpm	0,966471	0,966471	0,642778	0,720993	0,688562	0,999447	0,999904	0,994072	0,990203	0,999877
3	RU - 400 rpm	0,642778	0,999330	0,999330	0,999895	0,999042	0,715429	0,999511	0,999993	0,999999	0,775242
4	RU - 500 rpm	0,720993	0,999895	1,000000	1,000000	1,000000	0,275000	0,917255	0,964882	0,976536	0,325774
5	RU - 600 rpm	0,688562	0,999042	1,000000	1,000000		0,334858	0,926213	0,969244	0,978820	0,387434
6	PI - 200 rpm	0,999447	0,715429	0,275000	0,332854	0,334858		0,964719	0,823948	0,791164	1,000000
7	PI - 300 rpm	0,999904	0,999511	0,917255	0,953435	0,926213	0,964719		0,999999	0,999993	0,980835
8	PI - 400 rpm	0,994072	0,999993	0,964882	0,985368	0,969244	0,823948	0,999999		1,000000	0,876467
9	PI - 500 rpm	0,990203	0,999999	0,976536	0,991240	0,978820	0,791164	0,999993	1,000000		0,848506
10	PI - 600 rpm	0,999877	0,775242	0,325774	0,390474	0,387434	1,000000	0,980835	0,876467	0,848506	

Figura A.4. Análise estatística de comparação de médias pelo método de Tukey para concentração de proteínas de amostras de (a) 48 h e (b) 72 h de cultivos realizados com *T. harzianum* P49P11 em fermentadores com 1,5 L de volume útil. (PI) Impelidores de pás inclinadas tipo orelha de elefante; (RU) Impelidores pás retas tipo Rushton.

(a)											
Tukey HSD test; variable Proteína 48h (Spreadsheet3)											
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests											
Error: Between MS = ,00870, df = 14,000											
Cell No.	Rotação	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
1	RU - 200 rpm	,51228	,44582	,41612	,44388	,69633	,44936	,52519	,45556	,50954	,61506
2	RU - 300 rpm		0,998903	0,972471	0,997279	0,627318	0,999281	1,000000	0,999348	1,000000	0,976341
3	RU - 400 rpm	0,998903		0,999997	1,000000	0,265444	1,000000	0,995859	1,000000	0,998407	0,717952
4	RU - 500 rpm	0,972471	0,999997		0,999996	0,102963	0,999992	0,942659	0,999914	0,955064	0,423548
5	RU - 600 rpm	0,997279	1,000000	0,999996		0,174387	1,000000	0,990704	1,000000	0,995453	0,605727
6	PI - 200 rpm	0,627318	0,265444	0,102963	0,174387		0,280208	0,706571	0,215348	0,500782	0,995097
7	PI - 300 rpm	0,999281	1,000000	0,999992	1,000000	0,280208		0,997029	1,000000	0,998968	0,738774
8	PI - 400 rpm	1,000000	0,995859	0,942659	0,990704	0,706571	0,997029		0,996900	1,000000	0,990110
9	PI - 500 rpm	0,999348	1,000000	0,999914	1,000000	0,215348	1,000000	0,996900		0,998946	0,684863
10	PI - 600 rpm	1,000000	0,998407	0,955064	0,995453	0,500782	0,998968	1,000000	0,998946		0,952335
		0,976341	0,717952	0,423548	0,605727	0,995097	0,738774	0,990110	0,684863	0,952335	

(b)											
Tukey HSD test; variable Proteína 72h (Spreadsheet3)											
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests											
Error: Between MS = ,01427, df = 14,000											
Cell No.	Rotação	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}
1	RU - 200 rpm	,65411	,59430	,50633	,58797	,57285	,55381	,57198	,54128	,62582	,67158
2	RU - 300 rpm		0,999935	0,922458	0,999690	0,999233	0,996247	0,999167	0,984170	1,000000	1,000000
3	RU - 400 rpm	0,999935		0,997197	1,000000	1,000000	0,999998	1,000000	0,999949	0,999999	0,999483
4	RU - 500 rpm	0,922458	0,997197		0,996330	0,999676	0,999980	0,999708	0,999996	0,955443	0,865434
5	RU - 600 rpm	0,999690	1,000000	0,996330		1,000000	0,999999	1,000000	0,999955	0,999992	0,998092
6	PI - 200 rpm	0,999233	1,000000	0,999676	1,000000		1,000000	1,000000	0,999999	0,999950	0,996655
7	PI - 300 rpm	0,996247	0,999998	0,999980	0,999999	1,000000		1,000000	1,000000	0,999392	0,988486
8	PI - 400 rpm	0,999167	1,000000	0,999708	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,999942	0,996433
9	PI - 500 rpm	0,984170	0,999949	0,999996	0,999955	0,999999	1,000000	1,000000		0,995279	0,961446
10	PI - 600 rpm	1,000000	0,999999	0,955443	0,999992	0,999950	0,999392	0,999942	0,995279		0,999985
		1,000000	0,999483	0,865434	0,998092	0,996655	0,988486	0,996433	0,961446	0,999985	