



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

CAROLINE LOPES PEREZ

**Avaliação da viabilidade técnica da ampliação de escala da
produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por FES
em biorreatores de leito empacotado**

São José do Rio Preto, Março de 2017

CAROLINE LOPES PEREZ

**Avaliação da viabilidade técnica da ampliação de escala da
produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por FES
em biorreatores de leito empacotado**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciatori

São José do Rio Preto

2017

Perez, Caroline Lopes.

Avaliação da viabilidade técnica da ampliação de escala da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por FES em biorreatores de leito empacotado / Caroline Lopes Perez. -- São José do Rio Preto, 2017
98 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: João Cláudio Thoméo

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Enzimas de fungos – Aplicações industriais. 3. Celulase. 4. Biorreatores. 5. Fermentação em estado sólido. 6. Fungos termofílicos - Culturas e meios de cultura. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

CAROLINE LOPES PEREZ

**Avaliação da viabilidade técnica da ampliação de escala da
produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por FES
em biorreatores de leite empacotado**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de concentração Engenharia de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão examinadora

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Fábio Bentes Freire
Ufscar – São Carlos

Prof. Dr. Roger Darros-Barbosa
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

3 de Março de 2017

Caroline Lopes Perez

À minha irmã, Rebeca;
Aos meus pais, Renata e Danilo.
Dedico.

Caroline Lopes Perez

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir sentir sua presença em todos os momentos, por guiar e iluminar meus caminhos.

Ao prof. Dr. João Cláudio Thoméo, orientador desta dissertação, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e confiado no meu trabalho, por ter me permitido aprender e, mais ainda, crescer e amadurecer como pessoa e profissional. Obrigada por tudo profe.

Ao meu papi Danilo e minha mami Renata, pelo estímulo, pelo exemplo de esforço, honestidade e dedicação, e principalmente por estarem sempre presentes, me dando força e suporte. Amo vocês.

À minha irmã Rebeca, por estar presente mesmo que longe, me apoiando, acalmando, cuidando de mim e, principalmente, sendo meu exemplo e inspiração. Te lovo.

Aos meus avós Maria Lúcia e Renato (*in memorian*) pelas ligações diárias e orações, por sempre me esperarem de braços abertos e com muitos mimos. Aos avós Maria Ignêz e Dino (*in memorian*) pelo carinho e apoio. Amor de vó é muito bom de sentir.

À minha amiga Kerstin, que mesmo vivendo na Alemanha, é fonte de aconchego durante nossas horas de Skype, e é a prova viva que amizade atravessa oceanos e anos de distância física. *Te echo de menos!*

Aos meus amigos de laboratório que tornaram esses dois anos muito prazerosos, Giu, Erikinha, Pri, Carol, Lucas, Léo e Xuxa. Ao Xuxa ainda pelos meses que foi meu estagiário e me ajudou nos experimentos e à Pri, por tirar todas as minhas dúvidas sempre com muita paciência e carinho. Quero levar todos vocês pra sempre.

À Profa. Dra. Fernanda, coorientadora desta dissertação, por me ensinar a dar meus primeiros passos dentro do laboratório de biorreatores, pela amizade, disponibilidade, parceria e rapidez em ajudar. Obrigada Fer!

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para desenvolvimento do meu trabalho: ao Daniel Atala pela contribuição com meus conhecimentos de LAbView, ao João Paulo pela instalação do fluxômetro, ao Márcio pela construção de um cabo conector, ao Diego por quebrar muitos galhos e ainda a todos meus amigos de laboratório que tiraram dúvidas, ensinaram métodos, empregaram seu tempo para colaborar. Obrigada.

Ao Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, e ao Programa de Pós-

Caroline Lopes Perez

Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, por ser minha segunda casa há 8 anos, me proporcionar conhecimento, amadurecimento e instrumentos para meu aprendizado. O IBILCE vai deixar muitas saudades e ótimas lembranças.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro no segundo ano deste mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo incentivo financeiro ao nosso grupo de pesquisa.

Aos técnicos Luiz e Ginaldo, por estarem quase sempre dispostos a ajudar a solucionar os problemas. Ao técnico Jesuíno, mesmo que com suas peculiaridades, por ter atendido a todos os meus pedidos.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram em minha caminhada até aqui. Levo comigo um pouco de cada um de vocês.

Obrigada!

Caroline Lopes Perez

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

Caroline Lopes Perez

RESUMO

Esta dissertação apresenta um estudo sobre a ampliação de escala de biorreatores de leito empacotado para produção de celulasas e hemicelulasas por fermentação em estado sólido (FES) empregando o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e substrato composto por bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo. As etapas de desenvolvimento do projeto consistiram em ensaios em biorreator de diâmetro interno e altura iguais a 7,62 e 10 centímetros, de modo que foram realizados ensaios variando tamanho das partículas de bagaço de cana, densidade *bulk* do leito, taxas de aeração e modo de distribuição da vazão de ar. Com base nos resultados obtidos, observou-se que partículas de bagaço de tamanho reduzido fornecem bons rendimentos de atividades enzimáticas quando submetidas a altas taxas de aeração em leitos de elevada densidade. Partículas maiores forneceram melhores resultados para leitos de $\rho_{bulk} = 0,395 \text{ g/cm}^3$, bem como a utilização de vazão de ar determinada com base no número de Damköhler modificado igual a 1. Resultados obtidos em ensaios em biorreatores de 0,8 metros, com e sem distribuição de ar, mostraram que inserir ar ao longo do leito é uma estratégia que permite aeração eficiente ao longo do sistema fermentativo, sem que ocorra secagem excessiva do substrato. Atividades relativas de CMCase e xilanase atingiram cerca de 1,2 e 0,7, respectivamente. As etapas finais consistiram em fermentações realizadas em biorreator de diâmetro interno e altura iguais a 20 centímetros. Nessas condições, foram testadas duas formas de distribuição de ar ao longo do leito de quatro módulos fermentativos: utilizando um tubo interno perfurado no módulo central inserindo metade da vazão total, e a outra metade inserida pelo inferior do leito e utilizando um tubo interno central, com quatro orifícios por módulo para espalhamento da vazão. Em termos de produção de celulase, o tubo no módulo central se mostrou a melhor alternativa para o aumento de escala, chegando a apresentar 0,8 de atividades enzimáticas relativas de CMCase, e em termos de atividades relativas de xilanase, a melhor opção foi o tubo interno longitudinal, apresentando valores de 0,55. Diante do exposto, o número de Damköhler modificado é interessante do ponto de vista de aumento de escala, no entanto é preciso ainda entender o mecanismo de atividade respiratória dos microrganismos para que os conceitos possam ser aplicados em sinergia, podendo-se assim esperar bom desempenho do processo em escala industrial.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido; Biorreatores; Enzimas; Ampliação de escala.

Caroline Lopes Perez

ABSTRACT

*This work presents a study of scale-up packed bed bioreactors for the production of cellulases and hemicellulases by solid-state fermentation (SSF) using the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b and substrate composed by sugar cane bagasse and wheat bran. The development phases of the project consist in tests using bioreactors composed by internal diameter and height equal to 7.62 and 10 centimeters, respectively, so that the assays vary the size of the sugar cane bagasse particles, the bulk density, the airflow rate and how's distributed along the bed. Based on the results obtained, it was defined that the particles of small size provide good results of enzymatic activity yields when submitted to high aeration rates in high bulk density beds. When testing normal size sugarcane bagasse particles, the best results were obtained for the beds with $\rho_{bulk} = 0,395 \text{ g/cm}^3$ as well as airflow rate based on the modified Damköhler number equal to 1. Results obtained in tests in 0,8 meter height bioreactors, with and without airflow distribution, show that inserting air in different bed heights is a strategy to ensure efficient aeration throughout the fermentation system without excessive drying of the substrate. Activities related to CMCase and xylanase reached about 1.2 and 0.7, respectively. The final stages consisted in perform fermentation assays in a bioreactor of internal diameter and height equal to 20 centimeters. Under these conditions, two forms of long-term distribution were tested: using an internal ring to insert half of the total flow, together with the other half inserted in the lower part of the bed and using a central internal pipe with 4 holes per module for airflow distribution. In terms of cellulase production, the internal ring showed a better alternative for scaling-up, reaching a value of 0.8 CMCase relative enzymatic activities, and with respect to xylanase relative enzymatic activities, the best option was the central pipe, presenting values of 0,55. On the above, the modified Damköhler number is interesting when it refers to scale-up, although it's necessary to understand the mechanism of respiratory activity of the microorganisms so that the concepts can be applied in synergy, and it can be expected good process performance in industrial scale.*

Keywords: Solid-state fermentation; Bioreactors; Enzyme; Scale-up.

Caroline Lopes Perez

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Objetivo geral	3
2.1	Objetivos específicos	3
3.	Revisão Bibliográfica	4
3.1	Produção de etanol de segunda geração e enzimas envolvidas	4
3.2	Fermentação em estado sólido (FES)	8
3.3	Microrganismos para FES	12
3.4	Biorreatores para FES	13
3.5	Ampliação de escala de biorreatores de leite empacotado para FES.....	14
4.	Materiais e Métodos	20
4.1	Microrganismo, substratos e solução nutriente	20
4.2	Biorreatores em embalagens plásticas	21
4.3	Ensaio fermentativo em biorreatores de leite empacotado.....	22
4.4	Extração das enzimas.....	25
4.5	Determinação das atividades enzimáticas	25
4.6	Ensaio em embalagens plásticas	25
4.7	Ensaio em biorreatores.....	26
4.7.1	Biorreator <i>estreito</i>	26
4.7.1.1	Efeito do tamanho de partícula de bagaço de cana sobre a produção de enzimas	26
4.7.1.2	Utilização do número de Damköhler modificado para estabelecimento da vazão ideal de operação	27
4.7.1.3	Efeito da inserção distribuída de ar sobre a produção de enzimas	27
		28
4.7.1.4	Efeito da densidade <i>bulk</i> do leite utilizando número de Damköhler para determinação da taxa de escoamento de ar.....	29
4.7.2	Biorreator <i>largo</i>	29
4.7.2.1	Efeito da distribuição de vazão de ar sobre a produção de enzimas em biorreator <i>largo</i>	29
5.	Resultados e Discussões	31
5.1	Biorreatores em embalagens plásticas	31
5.2	Biorreator estreito	32

5.2.1 Efeito do tamanho de partícula de bagaço de cana sobre a produção de enzimas ..	32
5.2.2 Utilização do número de Damköhler modificado para estabelecimento da vazão ideal de operação	39
5.2.3 Efeito da inserção distribuída de ar sobre a produção de enzimas	52
5.2.4 Efeito da densidade <i>bulk</i> do leite utilizando número de Damköhler modificado para determinação da taxa de escoamento de ar.....	58
5.3 Biorreator <i>largo</i>	65
5.3.1 Efeito da distribuição de vazão de ar sobre a produção de enzimas em biorreator <i>largo</i>	65
6. Conclusões.....	75
7. Sugestões para trabalhos futuros	77
Referências Bibliográficas.....	78

1. Introdução

A produção de combustíveis de segunda geração a partir de biomassa vegetal é uma alternativa importante para a substituição dos combustíveis fósseis, em vista do esgotamento das jazidas e poluição causada pela queima dos mesmos. Resíduos vegetais constituem matérias primas de baixo custo e elevada disponibilidade, principalmente no Brasil, um país majoritariamente agrário. Parte desses resíduos é queimada para produzir calor e eletricidade, no entanto, possuem enorme potencial para produção de etanol de segunda geração.

O processo para produção de etanol de segunda geração envolve quatro etapas: pré-tratamento do resíduo, hidrólise, fermentação e destilação. O pré-tratamento é importante para desestruturar a biomassa lignocelulósica, deixando celulose e hemicelulose disponíveis para a hidrólise, que por sua vez consiste na conversão dos carboidratos de cadeias longas em açúcares fermentescíveis. Na fermentação, estes açúcares liberados na etapa de hidrólise são convertidos em etanol, e o mosto fermentado pode seguir para a destilação. A etapa de hidrólise pode ser realizada pela rota química ou enzimática, sendo que esta última apresenta vantagens, como menor gasto energético e baixa produção de resíduos tóxicos. Apesar de vantajosa, a hidrólise enzimática é a etapa mais onerosa do processo, uma vez que demanda enzimas de custo elevado. O fato de, atualmente, o mercado mundial de enzimas estar fortemente concentrado nas mãos de três grandes produtores, Novozymes – 48%, Du Pont – 20% e DSM – 6% (NOVOZYMES, 2013), torna necessário e estratégico o desenvolvimento de métodos alternativos e de baixo custo para a produção de enzimas específicas.

A fermentação em estado sólido (FES) consiste no crescimento de microrganismos sobre partículas sólidas úmidas, e é uma alternativa de baixo custo para a produção de enzimas. Destaca-se que, em termos bioquímicos, a definição clássica de fermentação refere-se a um processo que ocorre em condições anaeróbias, no entanto, por ser amplamente utilizado na literatura para caracterizar o processo em estudo, este termo será utilizado no presente texto, ainda que se referindo ao cultivo de um microrganismo em aerobiose.

Para que a FES tenha perspectiva de aplicação industrial, deve-se demonstrar sua viabilidade técnica. É pensando nisso que este trabalho objetiva a produção de enzimas em larga escala em biorreator de leito empacotado, através do estudo do processo de fermentação em estado sólido (FES), analisando as condições ótimas de processo, a fim de viabilizar econômica e industrialmente a produção de biocombustíveis.

Para tanto, foram realizados diversos ensaios fermentativos em biorreatores de leito empacotado empregando o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e substrato composto por bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 7:3, em massa. Os ensaios foram realizados em biorreatores de diferentes alturas e larguras, variando tamanho de partículas de bagaço de cana de açúcar, densidade de empacotamento dos leitos fermentativos, vazão de ar e distribuição da vazão de ar. Em vista da inexistência de métodos para determinar a vazão ideal de operação em sistemas para FES, foi testado o número de Damköhler modificado, que leva em consideração a quantidade de calor gerada e removida do sistema, a fim de evitar o sobreaquecimento do mesmo. Todos os testes realizados foram de extrema relevância para a determinação de características importantes para um sistema fermentativo, como o tamanho de partícula de substrato a ser utilizado e a densidade do leito. O número de Damköhler modificado apresentou bons resultados para os sistemas estudados, no entanto é preciso realizar uma abordagem mais completa dos mecanismos biológicos que ocorrem dentro de um biorreator para FES para que um critério de ampliação de escala com base na vazão de ar a ser inserida no sistema seja promissor.

2. Objetivo geral

O objetivo geral desta dissertação de mestrado é demonstrar que a ampliação de escala da FES é viável em biorreatores de leito empacotado empregando o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e substrato composto por bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a viabilidade de se utilizar o número de Damköhler modificado como critério para estabelecimento da vazão de operação do sistema;
- ✓ Determinar a faixa ótima de vazão de ar, tamanho de partículas e altura e porosidade do leito a serem empregadas;
- ✓ Modificar a arquitetura interna do biorreator a fim de obter resultados promissores para produção de enzimas;
- ✓ Avaliar se as alternativas tecnológicas testadas viabilizam o aumento de escala de biorreatores para FES.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO E ENZIMAS ENVOLVIDAS

No início do século XX, as pesquisas deram grande destaque para o desenvolvimento de refinarias de petróleo, carvão e gás natural, a fim de explorar o estoque disponível de combustíveis fósseis, alternativas relativamente baratas de produção de combustível. Em vista do esgotamento das jazidas desse tipo de combustível, além do fato de não serem considerados sustentáveis, uma vez que a queima dos mesmos contribui em grande parte para o aumento do nível de CO₂ na atmosfera (que tem sido associado diretamente ao aquecimento global), a busca por alternativas sustentáveis e ambientalmente amigáveis como fontes de energia se tornou urgente nos últimos anos (NAIK et al., 2010). Dessa forma, a produção de combustíveis limpos em larga escala é uma área estratégica a ser explorada.

No Brasil, em 1975 foi criado o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), impulsionado pelo primeiro “choque do petróleo”, em 1973, e foi um passo inicial para tornar o país o segundo maior produtor de etanol no mundo, atrás apenas dos EUA. O sucesso do programa é notório, uma vez que a produção brasileira de etanol cresceu de 555 milhões de litros em 1975/1976 para 28 bilhões de litros na safra 2015/2016 (UNICA, 2016). Como consequência do aumento da produção de etanol, também houve o aumento da produção de cana de açúcar, principal matéria-prima utilizada para a produção desse combustível no país.

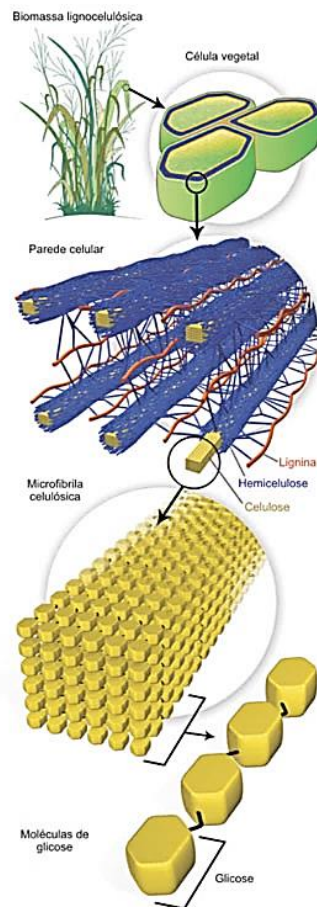
Ao passo que a produção de etanol se destacou, as vantagens econômicas e a facilidade de produção, somados ao fato de ser uma energia limpa e renovável, aumentaram a demanda desse combustível. As estratégias adotadas para o aumento de produção foram, além do aumento da área plantada, aumento da produtividade. No entanto, preocupações com o meio ambiente e com o aumento do preço dos alimentos fixam limites à produção de biocombustíveis de primeira geração. Nesse contexto, uma alternativa é a utilização de matéria-prima lignocelulósica, que consiste basicamente de resíduos vegetais,

Revisão Bibliográfica

para a produção dos chamados biocombustíveis de segunda geração. Entretanto, a tecnologia necessária para tal ainda está em desenvolvimento, sendo que muitos obstáculos econômicos e técnicos precisam ser superados para a viabilização de sua produção em larga escala (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008).

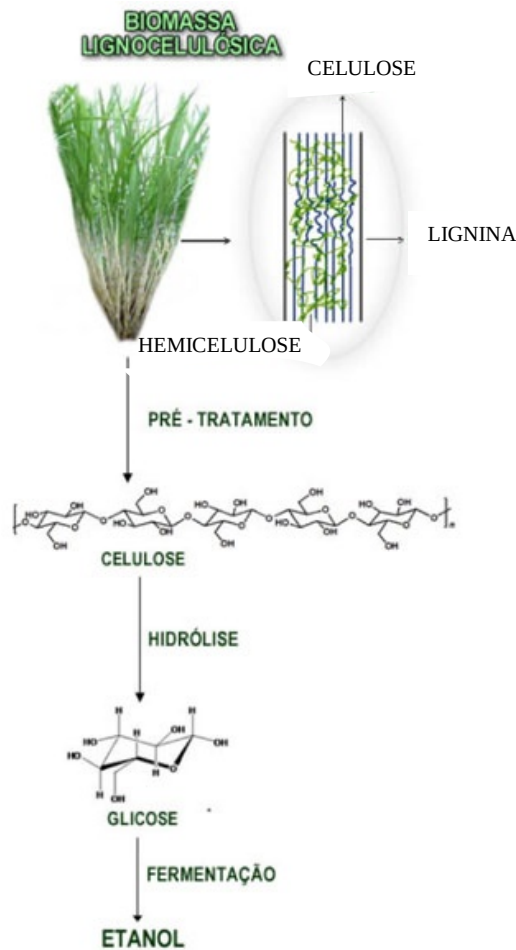
O bagaço de cana-de-açúcar, resíduo da produção de etanol de primeira geração, é considerado promissor como matéria prima para a produção de etanol de segunda geração, uma vez que o Brasil produz cana-de-açúcar em grandes quantidades, gerando um enorme volume desse resíduo. Além da disponibilidade, o bagaço é constituído por aproximadamente 50 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 25 % de lignina, caracterizando-se como uma fonte potencial de açúcares fermentescíveis. A utilização deste resíduo agroindustrial em bioprocessos é uma alternativa racional para produção de substratos para fermentação e uma contribuição para solucionar o problema da poluição ambiental, causada pelo acúmulo de resíduos no meio ambiente (PANDEY et al., 2000).

A Figura 3.1 mostra a estrutura da parede celular de biomassa lignocelulósica, que é normalmente constituída por três camadas: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é uma camada intercelular, composta por substâncias pécticas, situada entre as paredes primárias de células vizinhas, consolidando a união dessas células (MENON; RAO, 2012). A parede primária apresenta fibrilas de celulose e sua matriz é composta, principalmente, por substâncias pécticas e hemicelulose, podendo também ser lignificada. A parede secundária é constituída principalmente de celulose e hemicelulose, além de quantidades variáveis de lignina, sendo mais rígida que a membrana primária. A complexidade da biomassa lignocelulósica influencia os microrganismos a produzirem complexos igualmente múltiplos de enzimas. Desta forma, a degradação enzimática da biomassa vegetal por microrganismos é realizada por uma mistura complexa de celulasas, hemicelulasas e ligninases, que quebram os polímeros em fragmentos menores, os quais são hidrolisados a sacarídeos solúveis metabolizáveis (SANDGREN et al., 2005).

Figura 3.1: Ilustração esquemática da estrutura da lignocelulose

Fonte: SANTOS et al., 2012

A produção de etanol de segunda geração envolve quatro principais passos sequenciais, como mostra a Figura 3.2: (i) pré-tratamento químico e/ou físico-químico da biomassa lignocelulósica; (ii) hidrólise da celulose e da hemicelulose a açúcares fermentescíveis; (iii) fermentação microbiana para a produção de etanol (DUBEY et al., 2016); (iv) recuperação do álcool por evaporação/destilação. A segunda etapa envolve não apenas a hidrólise das fibras de celulose e hemicelulose, mas também a quebra da lignina que envolve essas fibras, a fim de disponibilizar os açúcares fermentescíveis para a produção de etanol. Essa é a etapa que torna o processo mais oneroso que a produção de etanol de primeira geração, pois essa conversão em açúcares só é possível através de processos térmicos, químicos ou enzimáticos (LASER et al., 2002).

Figura 3.2: Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica

Fonte: SANTOS et al., 2012.

A hidrólise química, apesar de eficiente e rápida, é realizada utilizando ácidos inorgânicos sob condições de tratamento severas. O produto hidrolisado obtido nessa hidrólise contém não apenas açúcares fermentescíveis, mas também produtos de degradação do açúcar, como furfurais, que são tóxicos para as leveduras utilizadas na etapa seguinte de fermentação. Além disso, é necessário aplicar tratamentos posteriores aos efluentes dessa operação, uma vez que são contaminantes químicos, aumentando assim o custo do processo (JUTURU; WU, 2012). A aplicação de celulasas para hidrolisar celulose ocorre em condições mais brandas, demanda menor gasto energético e, devido à alta especificidade das enzimas pelo substrato, a geração de resíduos é mínima, tornando-se uma opção atrativa, uma vez que a despolimerização enzimática não implica em danos ambientais (KARMAKAR; RAY, 2011). Tendo em vista a importância das enzimas celulolíticas para o desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol de segunda

geração, juntamente com as enzimas hemicelulolíticas, ambas constituem os produtos biotecnológicos de interesse do presente trabalho.

Três tipos principais de celulasas permitem a hidrólise completa da celulose, são elas: endoglucanases, exoglucanases e β -glucosidases. As endoglucanases hidrolisam as ligações glicosídicas nas regiões amorfas da celulose, gerando oligômeros de cadeia longa (extremidades redutoras e não-redutoras) para a ação das exoglucanases ou celobiohidrolases. Para a determinação da atividade endoglucanase, utilizam-se derivados de celulose com elevado grau de polimerização, como a carboximetil-celulose (CMC) (SHUANGQI et al., 2011). As exoglucanases clivam a longa cadeia de oligossacarídeos gerados pela ação de endoglucanases em pequenas cadeias de oligossacarídeos. Existem dois tipos de exoglucanases, que agem de maneira unidirecional nos oligômeros de cadeia longa, em extremidades redutoras (tipo I) ou não redutoras (tipo II), liberando celobiose, que é ainda hidrolisada a glicose pelas β -glucosidases (MEDIE et al., 2012; SARANRAJ, STELLA e REETHA, 2012).

Uma vez que a biomassa vegetal contém não apenas celulose, mas também hemicelulose, que é o segundo polissacarídeo mais abundante em vegetais, as hemicelulasas também são enzimas importantes que hidrolisam a complexa rede de hemicelulose. Elas clivam as fortes ligações cruzadas entre celulose e hemicelulose. As xilanasas são enzimas hemicelulolíticas responsáveis por degradar a xilana, produzindo xilobiose e xilooligossacarídeos. Em seguida, as β -xilosidases clivam a xilobiose e os xilooligossacarídeos a partir das extremidades não redutoras, liberando xilose (SAHA, 2000; MOREIRA; FILHO, 2008).

3.2 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A fermentação em estado sólido pode ser definida como um processo que se refere à cultura de microrganismos sobre a superfície de uma matriz sólida porosa (BEHERAA; RAMESH E RAY, 2016), onde o conteúdo de líquido ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda a máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (DEL BIANCHI; MORAES; CAPALBO, 2001). Em termos bioquímicos, a definição clássica de fermentação refere-se a um processo que ocorre em condições anaeróbias; no entanto, por ser amplamente utilizado na literatura para caracterizar o processo em estudo, este termo

Revisão Bibliográfica

será utilizado no presente texto, ainda que se referindo ao cultivo de um microrganismo em aerobiose.

Desde as duas últimas décadas, a fermentação em estado sólido (FES) tem atraído atenção devido às vantagens biotecnológicas que apresenta em relação a outras técnicas, tais como: maior capacidade de fermentação, maior estabilidade do produto final, menor repressão catabólica; tecnologia de baixo custo (EL-BAKRY et al., 2015; SINGHANIA et al., 2010; PANDEY, 1991a); simplicidade do meio de cultura; volumes reduzidos de efluentes líquidos a tratar; redução das contaminações devido à baixa umidade do meio fermentativo; fácil aeração decorrente da porosidade do material; extração facilitada pela alta concentração de produtos; volume do fermentador menor que o da cultura líquida e baixa demanda de energia (UMSZA-GUEZ, 2009). Apesar da maioria das enzimas ser produzida por fermentação submersa (FSm), a FES se destaca por permitir a obtenção de compostos de alto valor agregado, como ácidos orgânicos, aromas e fragrâncias, pigmentos, polissacarídeos, hormônios (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003) e enzimas, a partir de resíduos agroindustriais (EL-BAKRY et al., 2015; BÜCK et al., 2015) disponíveis em grande quantidade e com baixo ou nenhum valor comercial, como cascas de laranja, maçã e banana, sementes, farelo de soja, trigo, arroz e bagaços de mandioca e de cana de açúcar (KARATAS et al., 2013; CHUTMANOP et al., 2008; MONTON et al., 2013).

Na FSm, o meio fermentativo consiste basicamente de água com nutrientes dissolvidos. A técnica de cultivo submerso apresenta vantagens relacionadas à instrumentação e controle de processo, sendo amplamente utilizada para a produção industrial de enzimas e outros bioprodutos. No entanto, a FES pode ser particularmente vantajosa para o cultivo de fungos filamentosos, já que simula o habitat natural desses microrganismos (HOLKER et al., 2004; TENGEDY; SZAKACS, 2003; BARRIOS-GONZALES, 2012), uma vez que são mais versáteis que as bactérias, de fácil manejo e não patogênicos (GUTIERREZ-ROJAS e TORRES, 1992), conduzindo a uma elevada produção de enzimas em comparação a processos de FSm (FARINAS, 2015).

Como mencionado anteriormente, o Brasil apresenta um cenário econômico amplamente focado na agricultura, especialmente soja, trigo, milho e cana de açúcar, tornando evidente o potencial tecnológico do país em utilizar os resíduos agroindustriais para a produção de produtos de alto valor agregado, como enzimas, utilizando diferentes tipos de tecnologias. Esses processos biotecnológicos, especialmente a FES, podem ser utilizados para reduzir custos e possibilitar o uso de enzimas para diversas finalidades, em

Caroline Lopes Perez

especial na etapa de hidrólise do bagaço de cana de açúcar na cadeia de produção do etanol de segunda geração.

A Tabela 3.1 exemplifica alguns trabalhos que utilizaram a FES para produzir diferentes tipos de enzimas. Nota-se que podem ser utilizados diversos tipos de materiais como substrato, inclusive misturas deles, a fim de compor um substrato sólido adequado, uma vez que o mesmo deve não apenas suprir a demanda de nutrientes para a cultura microbiana em crescimento, mas também deve fornecer a estrutura porosa adequada ao meio de cultivo (PANDEY, 1992).

Tabela 3.1: Enzimas obtidas por FES a partir de rejeitos sólidos agroindustriais

Microrganismo	Substrato	Bioproduto	Referência
<i>Thermoascus aurantiacus</i> ATCC 204492	Bagaço de mandioca e farelo de arroz	Xilanase	Palma (2003)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Xilanase	Milagres et al. (2004)
<i>Aspergillus niger</i> LPB 326	Bagaço de cana de açúcar e farelo de soja	Xilanase	Maciel (2006)
<i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1	Bagaço de cana e farelo de trigo	Celulase e xilanase	Camassola e Dillon (2007)
<i>A. fumigatus</i> M.7.1 e <i>Myceliophthora sp.</i> M.7.7	Palha de milho e papelão	Celulase e xilanase	Gomes, Moretti e Biocchini-Martins (2010)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 e <i>Aspergillus niger</i> MTCC 7956	Farelo de trigo	Celulase	Sukumaran et al. (2009)
<i>Trichoderma sp.</i>	Bagaço de cana de açúcar	Celulase	Scheufele et al. (2012)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	Bagaço de cana e farelo de trigo	Celulase e xilanase	Zanelato et al. (2012)
<i>Rhizoctonia solani</i> AG-1 IA	Farelo de trigo	Celulase e xilanase	Santos et al. (2014)

Tabela 3.1: Continuação

<i>Aspergillus awamori</i> 2B.361 U2/1	Resíduos de pão	Glucoamilase e protease	Melikoglu, Lin e Webb (2015)
<i>Aspergillus niger</i> CH4	Bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo	Proteases	Pitol et al. (2016)
<i>Aspergillus niger</i>, <i>Aspergillus flavip</i>, <i>Aspergillus brasiliensis</i>, <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium roquefortii</i>	Farelo de trigo e farelo de soja	Proteases	Novelli et al. (2016)
<i>Thermomyces</i> sp.	Soja e resíduo de pão	Amilase	Cerda et al. (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de oliva	Celulase e xilanase	Leite et al. (2016)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Polpa de laranja e bagaço de cana de açúcar	Pectinase	Biz et al. (2016)

Além de porosidade e nutrientes adequados para o cultivo de microrganismos, o tamanho das partículas e teor de umidade são fatores importantes para o crescimento microbiano e produção de enzimas utilizando um substrato em particular (PANDEY, 1991b). Geralmente, partículas menores de substrato fornecem maior área superficial para o ataque microbiano, melhorando a digestibilidade enzimática (MATSUMURA et al., 1977) e, portanto, são um fator desejável. No entanto, se a partícula de substrato for muito pequena, pode ocorrer uma compactação do substrato, o que pode interferir na aeração do meio e consequentemente na respiração microbiana, podendo ocasionar baixo crescimento. Em contraste, partículas maiores permitem maior eficiência na respiração dos microrganismos e aeração do meio devido ao aumento dos espaços entre partículas; no entanto, proporcionam área superficial limitada para o ataque microbiano (PANDEY et al., 1999). Sabendo disso, é preciso adaptar o tamanho de partícula visando bons rendimentos de cada processo em particular.

3.3 MICRORGANISMOS PARA FES

Com base na classificação teórica fundamentada na atividade de água, apenas fungos e leveduras seriam denominados microrganismos adequados para FES. Essa determinação foi estipulada devido à atividade de água tipicamente encontrada neste tipo de processo, que seria entre 0,95 e 0,98, segundo Mitchell et al. (2000), podendo não ser adequada para o crescimento de culturas bacterianas. No entanto, estudos têm revelado que, se bem controladas e gerenciadas, culturas bacterianas podem também ser utilizadas para FES (NAMPOOTHIRI; PANDEY, 1996; PANDEY, SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Os fungos filamentosos são organismos ideais para sistemas de FES devido à sua capacidade de crescimento e produção de enzimas extracelulares em altas concentrações em ambientes com umidade suficiente apenas para manutenção do crescimento e metabolismo do microrganismo (ausência de água livre) (FARINAS, 2015) e também devido à sua versatilidade de aplicação (BALASUBRAMANIAM et al., 2001; DEL BIANCHI et al., 2001), uma vez que são capazes de crescer em grãos, resíduos agroindustriais ou frutas. De acordo com Mitchell et al. (2000), os fungos filamentosos ainda são capazes de crescer em locais de baixo pH e têm elevada capacidade de produzir esporos, o que facilita tanto a estocagem das células em sua forma vegetativa, como o preparo de inóculos. Ademais, os fungos filamentosos secretam naturalmente grandes quantidades de enzimas para o meio extracelular, facilitando a recuperação dessas enzimas nas etapas de *downstream*.

O fungo empregado no presente trabalho é o termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. Sabe-se que espécies do gênero *Myceliophthora* têm atraído grande interesse devido ao seu potencial para produzir enzimas termoestáveis, como amilase (SADHUKHAN et al., 1992), queratinase (LIANG et al., 2011), lacase (BERKA et al., 1997 e BULTER et al., 2003) e celulase (BADHAN et al., 2007; ZANELATO et al., 2012; CASCIA TORI; CASCIA TORI; THOMÉO, 2013; CASCIA TORI, 2015). Devido ao potencial de *Myceliophthora* para degradar materiais vegetais lignocelulolíticos, muitas enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas de *M. thermophila* têm sido caracterizadas e patenteadas (BHAT; MAHESHWARI, 1987; ROY et al., 1990; SADHUKHAN et al., 1992; BADHAN et al., 2007; BEESON et al., 2011). Além disso, espécies do gênero *M. thermophila* são comumente utilizadas para pesquisa, uma vez que podem crescer em temperaturas acima de 50 °C em materiais ricos em celulose, sendo capazes de decompor substratos complexos, como cascas de árvore, polpa de madeira e palha de trigo (BHAT;

MAHESHWARI, 1987). Essa capacidade de degradação, por sua vez, demanda liberação de enzimas extracelulares em grandes quantidades, o que pode justificar a elevada produção de enzimas pelos fungos termofílicos (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BATH, 2000).

3.4 BIORREATORES PARA FES

A escolha do biorreator é extremamente importante para obtenção de bons resultados na FES, afinal é nele que a bioconversão acontece. As funções básicas de um biorreator consistem em sustentar o leito de substrato, constituindo uma barreira para impedir a liberação do microrganismo para o ambiente, bem como a contaminação do leito inoculado com o microrganismo de interesse por outros microrganismos dispersos no ambiente. Além disso, o biorreator deve ser capaz de propiciar controle adequado das condições nas quais opera, como temperatura do leito e atividade de água, para que sejam mantidas as condições ótimas para o crescimento e a formação de produtos pelo microrganismo em estudo (MITCHELL et al., 2006a).

Vários tipos de biorreatores têm sido utilizados em processos de FES, sendo que são classificados de várias maneiras. Durand (2003) classifica os tipos de biorreatores em duas categorias: (a) biorreatores em escala de laboratório, que usam quantidades de meio sólido seco entre poucos gramas a poucos quilogramas; (b) biorreatores em escala piloto ou industrial, nos quais vários quilogramas a várias toneladas são empregados. Já Mitchell et al. (2006b) classificam biorreatores com base no tipo de aeração ou sistema de agitação empregado, sendo eles:

- ✓ Biorreatores de bandeja: Biorreatores que possuem leito estático ou que são movimentados com pouca frequência. O substrato é espalhado em bandejas, formando uma camada fina. O biorreator é mantido em uma câmara a temperatura constante, onde ar úmido circula ao redor do leito. O principal inconveniente desta configuração é que muitas bandejas e grande espaço são necessários para produção em grande escala, tornando o projeto pouco atraente (CHEN et al., 2005);
- ✓ Biorreatores de leito empacotado: Biorreatores cujo leito é estático ou posto em movimento com pouca frequência. Através do leito do substrato, ar úmido é continuamente alimentado no sistema. O biorreator pode ser equipado com camisa de circulação de água para controlar a temperatura durante o processo.

Caroline Lopes Perez

Os principais inconvenientes associados a esta configuração são crescimento não uniforme, pobre remoção de calor e dificuldade de aumento de escala;

- ✓ Biorreatores de tambor rotativo: Biorreatores que consistem em cilindros horizontais que possibilitam a movimentação e a mistura das partículas em torno do seu eixo central. O ar circula acima do leito e não forçadamente através dele. Os biorreatores podem ser movimentados constantemente ou de maneira intermitente. Sua maior desvantagem é que a capacidade de enchimento do tambor é de apenas 30 % da sua capacidade total, pois de outra forma a agitação não seria eficiente.

O biorreator de leito empacotado é o mais utilizado para FES, principalmente em escala laboratorial, uma vez que permite a realização de estudos que envolvem triagem de microrganismos e determinação da composição adequada do meio a ser utilizado. Além disso, a geometria da coluna contribui para a manutenção de temperatura estável no biorreator (DURAND, 2003). Seu projeto é simples e de baixo custo e o equipamento apresenta baixas exigências de manutenção. Por esses motivos, este tipo de biorreator foi tomado para estudo também no presente trabalho. O mesmo já foi capaz de fornecer bons resultados para produção de celulasas e hemicelulasas em trabalhos realizados pelo Grupo de Pesquisa em Bioenergia do IBILCE/UNESP, integrante do Centro Paulista de Pesquisa em Bioenergia, do qual o orientador deste trabalho é membro. No caso de leitos móveis, agitação e rotação, apesar de melhorarem transferências de calor e massa durante o processo, podem ocasionar danos ao micélio de fungos, além de provocar efeitos adversos na porosidade do meio (COUTO; SANROMÁN, 2006).

3.5 AMPLIAÇÃO DE ESCALA DE BIORREATORES DE LEITO EMPACOTADO PARA FES

A eficiência de processos de FES para obtenção dos produtos desejados é dependente do microrganismo utilizado, bem como de condições operacionais e ambientais. Fatores como temperatura, pH, teor de umidade, aeração, concentração de nutrientes e a natureza do substrato estão entre as variáveis-chave que influenciam a FES (PANDEY et al., 2000). É também de extrema importância considerar cuidadosamente a escolha do projeto do biorreator (ALI; ZULKALI et al., 2011), bem como combinações adequadas de microrganismos, substratos e produtos. Apesar das vantagens da FES em relação à FSm, a

Revisão Bibliográfica

implementação da FES em escala industrial ainda não foi realizada, principalmente devido à dificuldade de monitoramento e controle das variáveis de processo (CHEN; HE, 2012; NAGEL et al., 2001; MITCHELL et al., 2000), à falta de critério para ampliação de escala, à carência de estudos na área de engenharia de biorreatores, à limitada reprodutibilidade do processo e a dificuldades na padronização do mesmo. Dessa forma, dentre outras vertentes de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, existe a necessidade de se desenvolver a instrumentação para o controle efetivo das variáveis primordiais do processo de FES. Essa é uma etapa crítica no desenvolvimento de biorreatores para FES em escala industrial, que quando superada será capaz de provocar enorme impacto no setor bioenergético, no qual a demanda de enzimas capazes de degradar biomassa é extremamente elevada.

Na tentativa de compreender e descrever fenômenos de transferência de calor e massa em biorreatores de leito empacotado, diversos autores têm utilizado modelos matemáticos representativos que incorporem características do sistema em estudo e que sejam validados experimentalmente baseados em dados obtidos em escala laboratorial. Alguns desses modelos podem ser utilizados para orientar processos de ampliação de escala, a fim de propiciar controle e domínio sobre as condições ótimas de operação dos processos de FES em larga escala.

Nos biorreatores de leito empacotado, o uso de aeração forçada permite um controle mais efetivo dos parâmetros de processo através da manipulação da taxa de aeração e da temperatura do ar percolante, sendo que o fornecimento de oxigênio não é limitante no processo. Por outro lado, a dinâmica de remoção do calor metabólico gerado, associada ao arrefecimento por advecção, leva a um aumento constante nas temperaturas de saída de ar e do meio sólido contido no biorreator. Dessa forma, prevenir o aumento indesejável de temperatura no leito é um desafio a ser superado em estudos de aumento de escala de biorreatores (SANGSURASAK; MITCHELL 1995).

Mitchell et al. (1999) desenvolveram em seu trabalho um critério de ampliação de escala de biorreatores de leito empacotado para FES baseado no número adimensional de Damköhler modificado pelos autores, relacionando a máxima capacidade de acúmulo e geração de calor à máxima capacidade de remoção de calor no sistema. O foco do estudo é prevenir elevações indesejáveis de temperatura no leito. Neste adimensional modificado, o numerador (Q_x) é a taxa máxima da produção de calor durante o crescimento fúngico, enquanto o denominador (Q_R) descreve a taxa máxima de remoção de calor pelo ar por convecção axial e por evaporação de água entre a entrada e a saída do leito. Nesse estudo, assumindo um modelo logístico de cinética de crescimento e desconsiderando os efeitos de

manutenção do metabolismo, a máxima taxa de geração de calor ocorre quando a concentração de biomassa é metade do seu valor máximo ($X = 0,5X_m$).

Para o balanço de energia, a transferência de calor para a parede é considerada desprezível, e apenas a transferência de calor axial é considerada. A equação 3.1 representa o balanço de energia macroscópico através do leito fermentativo, incluindo termos para remoção de calor convectivo e evaporativo, condução na direção axial e geração de calor por crescimento microbiano.

$$\rho_b C_{pb} \left(\frac{\delta T}{\delta t} \right) + \rho_a (C_{pa} + f\lambda) v_z \left(\frac{\delta T}{\delta z} \right) = k_b \left(\frac{\delta^2 T}{\delta z^2} \right) + \rho_s (1 - \varepsilon) Y \left(\frac{dX}{dt} \right)$$

3.1

Substituindo dX/dt pela equação logística no termo de geração de calor na equação 3.1 e adicionando $X = 0,5X_m$, obtém-se:

$$Q_x = 0,25 \rho_s (1 - \varepsilon) Y \mu_{opt} X_m$$

3.2

Para o cálculo do denominador, como descrito na equação 3.3, assume-se que o ar está sempre saturado, motivo pelo qual o fator $f\lambda$ é inserido na equação, uma vez que a evaporação da água para manter o ar saturado conduz a um aumento na capacidade calorífica aparente (SANGSURASAK; MITCHELL, 1995):

$$Q_R = \rho_a (C_{pa} + f\lambda) v_z (T_{out} - T_{in}) / H$$

3.3

As unidades de Q_x e Q_R são $J/m^3 s^{-1}$. A razão entre Q_x e Q_R fornece um número adimensional, o número de Damköhler modificado (Da_m):

$$Da_m = \frac{0,25\rho_s(1 - \varepsilon)Y\mu_{opt}X_m}{\rho_a(C_{pa} + f\lambda)v_z(T_{out} - T_{in})/H}$$

3.4

Tabela 3.2: Descrição de parâmetros e variáveis

Parâmetro ou variável	Descrição	Parâmetro ou variável	Descrição
ρ_s	Densidade do substrato	X	Concentração de biomassa
ε	Porosidade do leito	ρ_b	Densidade do leito
Y	Coeficiente de rendimento metabólico	C_{pb}	Calor específico do leito
μ_{opt}	Taxa de crescimento específico na temperatura ótima	T	Temperatura do leito
X_m	Máxima concentração de biomassa	t	Tempo de fermentação
ρ_a	Densidade do ar úmido	z	Posição axial
C_{pa}	Calor específico do ar úmido	K_b	Condutividade térmica do leito
f	Taxa que a capacidade de transporte de água varia com a temperatura do ar	Q_x	Taxa volumétrica de produção de calor pelo metabolismo
λ	Entalpia de vaporização da água	Q_R	Taxa volumétrica de remoção de calor
v_z	Velocidade superficial	T_{in}	Temperatura do ar de entrada
H	Altura do leito	Da_m	Número de Damköhler modificado
T_{out}	Temperatura do ar de saída		

Os parâmetros da equação 3.4 podem ser facilmente determinados. Tabelas de propriedades físicas podem ser utilizadas para definir ρ_a , C_{pa} , f e λ . Os parâmetros dependentes do substrato ρ_s e ε e os parâmetros cinéticos de crescimento X_m e μ_{opt} podem ser determinados experimentalmente. Valores obtidos na literatura podem ser utilizados para o coeficiente de rendimento metabólico (Y). O projeto do biorreator fornece H e as variáveis T_{in} , T_{out} e v_z podem ser estabelecidas. A tabela 3.3 fornece os valores das variáveis utilizadas nesse experimento.

Tabela 3.3: Valores de parâmetros e variáveis

Parâmetro ou variável	Valor / unidade	Fonte
ρ_s	1100 Kg/m ³	Casciadori et al., 2014
E	0,75	Casciadori et al., 2014
Y	8366000 J/kg _{biomass}	Saucedo-Castañeda et al., 1990
μ_{opt}	0,06 h ⁻¹	Casciadori, 2015
X_m	32,7 mg/g	Casciadori, 2015
ρ_a	1,14 Kg/m ³	Mitchell et al., 1999
C_{pa}	1180 J/Kg °C	Mitchell et al., 1999
F	0,0038 Kg _{água} /Kg _{ar} °C	Mitchell et al., 2006
λ	2414300 J/Kg _{água}	Himmelblau, 1982
v_z	m/s	-
H	0,4 m	Experimental

O número modificado de Damköhler pode ser utilizado para prever tanto o desempenho de um biorreator já existente, como também para direcionar o aumento de escala. Um valor de Da_m maior que 1 indica que, no momento da máxima geração de calor, a temperatura crítica será excedida na extremidade final do leito. Para a temperatura ser a máxima aceitável para o sistema, as taxas de produção e remoção de calor devem ser iguais, e por isso Da_m deve ser igual a 1.

Revisão Bibliográfica

Como o presente projeto de dissertação de mestrado trata da avaliação de viabilidade técnica da ampliação de escala da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por FES em biorreatores de leito empacotado, o número modificado de Damköhler será utilizado como um dos critérios de ampliação de escala, sendo também testadas outras alternativas de aumento da produtividade do biorreator em estudo.

4. Materiais e Métodos

Os ensaios experimentais desta dissertação foram realizados no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do IBILCE/UNESP.

4.1 MICRORGANISMO, SUBSTRATOS E SOLUÇÃO NUTRIENTE

Foi empregado o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, isolado pela Prof^a. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini (IQ/UNESP) a partir de pilhas de bagaço de cana da Usina Guarani, de Olímpia-SP, e utilizado por Zanelato (2011) e Casciatori (2015), que obtiveram resultados promissores de produção de celulasas em biorreatores de bancada.

As cepas do fungo foram mantidas em tubos de ensaio contendo BDA inclinado, submersos em óleo mineral e mantidos em câmara fria a 5 °C. Para utilização, a cultura foi repicada em Erlenmeyers inclinados contendo o meio BDA, os quais foram mantidos em câmara climática DBO por 48 horas a 45 °C, como mostra a Figura 4.1a. Para inoculação do substrato, a superfície do meio foi raspada com alça de platina para suspensão dos esporos, e quantidade suficiente de solução nutriente foi adicionada ao meio a fim de obter a suspensão de esporos. Em todos os ensaios foi empregada a concentração de esporos de 10^7 esporos por grama de substrato sólido seco (gss). Para a montagem do biorreator de 20 cm de diâmetro interno, a cultura de *M. thermophila* foi repicada em embalagens plásticas contendo 400 mL de BDA, como mostra a Figura 4.1b.

Figura 4.1: Cultura de *M. thermophila* após 48 horas em BOD: (a) em Erlenmeyer e (b) em embalagens plásticas.



(a)



(b)

Como substratos, foram empregados bagaço de cana (BC) e farelo de trigo (FT). O bagaço foi doado pela Usina Vale, de Onda Verde-SP, e o farelo foi comprado no comércio local. Ambos os materiais foram secos em estufa a 60 °C até peso constante. Para fins de padronização do tamanho das fibras, o bagaço foi peneirado em peneiras de 4 mm para retirada das fibras maiores. Bagaço de cana e farelo de trigo foram acondicionados em sacos de polietileno de parede espessa em câmara de refrigeração até utilização. A proporção em massa dos substratos em todos os ensaios foi igual a 7:3 para bagaço de cana e farelo de trigo (ZANELATO, 2011; CASCIATORI, 2015).

Quando da umidificação dos substratos, empregou-se a solução nutriente constituída pelos seguintes sais com as respectivas concentrações: 0,35 % (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 % (m/v) de KH_2PO_4 , 0,05 % (m/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % (m/v) de CaCl_2 e 0,1 % (v/v) de Tween 20, com pH 5,0 (ZANELATO, 2011).

4.2 BIORREATORES EM EMBALAGENS PLÁSTICAS

Foram empregadas embalagens de polipropileno de 12 cm x 20 cm acopladas a tubos de PVC de 3,6 cm de diâmetro, os quais foram tampados com algodão envolto por gaze, a fim de garantir a troca de gases e assegurar que não houvesse contaminação por outros

Caroline Lopes Perez

microrganismos, conforme pode ser visto na Figura 4.2. No interior das embalagens foram colocados arames na forma de espiral, visando facilitar a aeração e evitar o colapso da embalagem após autoclavagem.

Figura 4.2: Biorreator em embalagem de polipropileno para FES.

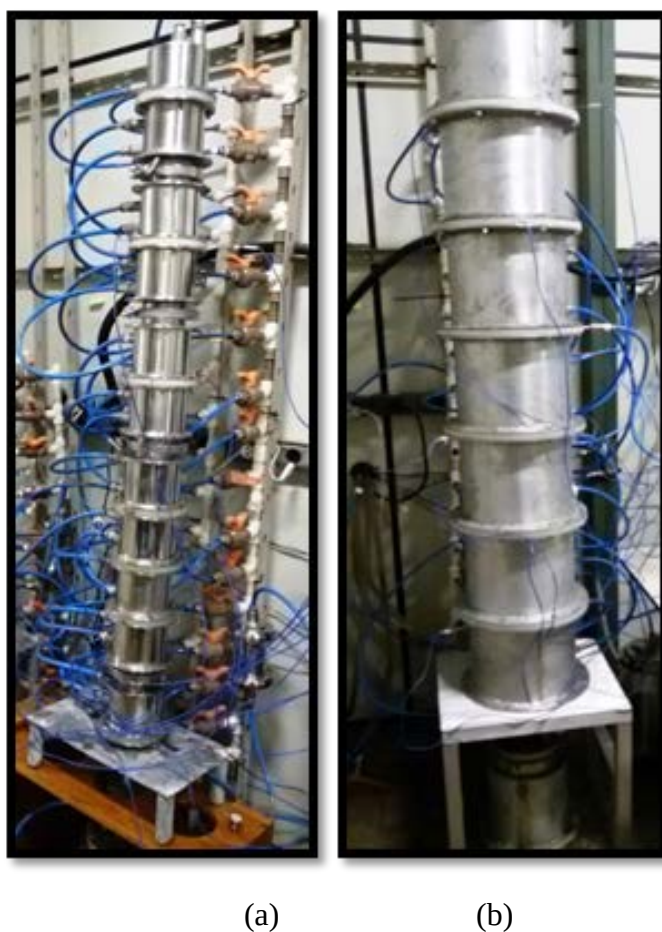


4.3 ENSAIOS FERMENTATIVOS EM BIORREADORES DE LEITO EMPACOTADO

Os ensaios fermentativos em biorreatores de leito empacotado foram realizados em um sistema similar ao empregado por Zanelato (2011) e Casciatori (2015). Neste sistema, o ar foi fornecido por compressor e filtrado para retirada de impurezas grosseiras e direcionado a um medidor de vazão mássico modelo Cole Parmer®, Vernon Hills, EUA. Antes do fermentador, o ar passou por um filtro de algodão estéril e, em seguida, foi umidificado em coluna encamisada cheia de água destilada e recheada com esferas de vidro, mantidas na temperatura do processo, de modo que o ar entrou saturado no fermentador.

Foram empregados biorreatores de dois diâmetros distintos: 7,62 cm, daqui por diante chamado de *estreito*, e 20 cm, a ser chamado de *largo*. Ambos os biorreatores foram construídos de forma modular, sendo que o estreito foi composto por módulos de aço inox encamisados de comprimento 10 cm e o largo feito em alumínio com módulos de 20 cm de comprimento, de modo que seus comprimentos totais eram variáveis. Em ambos os fermentadores, flanges de nylon foram colocadas entre dois módulos consecutivos para a inserção de termopares. Na camisa dos biorreatores circulou água, mantida na temperatura de processo por um banho termostático. Na Figura 4.3a e 4.3b são mostrados os fermentadores.

Figura 4.3: Biorreatores de leito empacotado: (a) diâmetro interno 7,62 cm (*estreito*); (b) diâmetro interno 20 cm (*largo*).



Para evitar problemas de umidificação insuficiente do ar nas colunas de saturação, o primeiro módulo do biorreator *estreito*, mais próximo da entrada de ar, foi empacotado somente com bagaço de cana úmido (75 % b.u.), composto por fibras grossas, acima de 4 mm. Para o biorreator *largo* o mesmo foi feito, o módulo mais próximo da entrada de ar foi composto por fibras grossas úmidas. Por outro lado, na saída do biorreator o ar está saturado na temperatura do processo, acima da temperatura ambiente, de modo que ocorre condensação de água. Portanto, para o biorreator estreito, o último módulo foi empacotado apenas com fibras grossas de bagaço de cana seco, e para o biorreator largo o mesmo foi feito. Ambos os módulos mencionados não foram inoculados e seu uso foi justamente proteger os módulos intermediários inoculados da secagem excessiva, no caso da base, e da condensação de umidade, no caso do topo, como realizado por Zanelato (2011) e Casciatori (2015). Os módulos fermentativos foram enumerados de baixo para cima, sendo o módulo 1 localizado logo após o módulo contendo bagaço grosso úmido (base), em seguida o módulo 2 e assim sucessivamente, até o último módulo, composto por fibras grossas de bagaço de cana seco (topo), que não recebe numeração. Cada módulo fermentativo foi separado dos demais por telas metálicas de modo que, ao final do processo fermentativo, o material fermentado de cada módulo foi individualmente encaminhado para a extração das enzimas e análise de umidade.

Termopares tipo T foram instalados ao longo do comprimento do biorreator através de cada uma das flanges de acoplamento entre módulos consecutivos, com as extremidades dos sensores posicionadas no centro do leito ($r/R = 0$, onde r é a variável da posição radial e R o raio do tubo), rente à parede do leito ($r/R = 1$) e em posições radiais intermediárias ($r/R = 0,25$ e $r/R = 0,5$), o que permitiu acompanhar a temperatura ao longo do processo em várias posições no interior do fermentador. Os sinais elétricos dos sensores foram registrados por sistema de aquisição de dados COMPAQ-DAQ (National Instruments, Austin, USA) gerenciado por rotina em ambiente Labview (National Instruments, Austin, USA).

Testes de umidade do meio após a fermentação foram realizados em um analisador halógeno de umidade MB 45 (Ohaus Corporation, Parsippany, EUA).

4.4 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS

Ao final da fermentação, a extração do extrato enzimático foi feita pela adição de 20 mL de água destilada por grama de substrato sólido seco inicial, seguido de agitação à temperatura ambiente a 100 rpm. O extrato foi filtrado em tecido sintético fino e posteriormente centrifugado a 10000 rpm durante 30 min a 5 °C, sendo o sobrenadante empregado como solução enzimática bruta para as análises de atividade.

4.5 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Foram determinadas as atividades de endoglucanase (CMCase) e de xilanase dos extratos enzimáticos brutos. As atividades enzimáticas foram determinadas seguindo-se Ghose (1987) e Ghose e Bisaria (1987), com modificações, reagindo-se 0,1 mL de solução enzimática e 0,9 mL de solução de substrato, respectivamente, carboximetilcelulose (CMC, Sigma) e xilana (Sigma). A reação se deu em banho termostático a 60 °C por 10 minutos, sendo interrompida por adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido-1,3-dinitrosalicílico). A quantificação de açúcares redutores liberados da reação de análise da atividade foi feita segundo Miller (1959). A solução foi mantida em banho de água em ebulição por 10 minutos, e logo após transferida para banho de gelo. Finalmente, foram adicionados aos tubos 8,0 mL de água destilada, e em seguida foi feita leitura da absorbância em espectrofotômetro Lambda 25 UV Winlab (Perkin Elmer, Shelton, EUA) a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de glicose (para celulase) ou de xilose (para xilanase) por minuto de reação por mL de extrato.

4.6 ENSAIOS EM EMBALAGENS PLÁSTICAS

Nestes ensaios, bem como em todos os ensaios em biorreatores de leite empacotado, a proporção em massa de bagaço de cana e farelo de trigo foi fixada em 7:3 massa/massa, seguindo-se a recomendação de Zanelato (2011) e Casciotori (2015).

Os ensaios em embalagens fermentativas foram realizados simultaneamente a todos os ensaios em biorreatores utilizando o mesmo tipo de substrato, como controle do

Caroline Lopes Perez

processo fermentativo. Dentro de cada embalagem plástica, foram adicionadas 5,0 gramas de substrato sólido seco inicial, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Posteriormente, o substrato foi inoculado com a suspensão de esporos, na concentração de 10^7 esporos/gss, em quantidade suficiente para que a umidade do substrato atingisse 75 % (b.u.).

Os biorreatores em embalagens plásticas foram colocados em câmara climática DBO a 45 °C por 96h, tempo este definido por Zanelato (2011) como ótimo para a secreção das enzimas. Os ensaios em biorreatores de leite empacotado também foram realizados com este tempo de cultivo.

4.7 ENSAIOS EM BIORREATORES

4.7.1 Biorreator *estrito*

4.7.1.1 Efeito do tamanho de partícula de bagaço de cana sobre a produção de enzimas

Para os testes variando o tamanho das partículas de bagaço de cana, parte do material foi triturada em moinho de facas e peneirada em peneira vibratória utilizando peneira com abertura de 0,84 mm, número 20 da série Tyler. A peneira foi mantida em vibração por 5 minutos, sendo empregado o bagaço que passou pela peneira, de diâmetro menor que 0,84 milímetros ($d_p < 0,84$ mm). Outra fração do bagaço foi peneirada utilizando as peneiras 6 e 7 da série Tyler, com aberturas de 3,36 mm e 2,83 mm, respectivamente. O sistema de peneiras foi mantido em vibração por 5 minutos, sendo empregada a fração retida entre as duas peneiras, constituindo uma fração de BC de diâmetro menor que 3,36 milímetros e maior que 2,83 milímetros ($2,83 < d_p < 3,36$ mm).

Para análise do efeito do tamanho de partículas de bagaço de cana sobre a produção de enzimas, foram realizados testes em biorreatores com dois módulos fermentativos e comprimento total de 0,4 metros, contando-se os módulos de entrada e de saída não inoculados (base e topo). O procedimento de preparo do substrato foi similar ao descrito para os ensaios em embalagens plásticas, item 4.6, sendo o mesmo composto por BC:FT, 7:3 (m/m). Após a inoculação do substrato o biorreator de coluna foi empacotado no local de montagem e operação do equipamento. Um dos ensaios fermentativos foi realizado

utilizando BC composto por partículas menores que 0,84 milímetros ($d_p < 0,84$ mm) e outro ensaio utilizando BC composto por partículas maiores que 2,83 milímetros e menores que 3,36 milímetros ($2,83 < d_p < 3,36$ mm), com vazões de ar iguais a 150 L/h e em ambos os ensaios, massa de 75 gramas de substrato foi empacotada em cada um dos módulos fermentativos.

4.7.1.2 Utilização do número de Damköhler modificado para estabelecimento da vazão ideal de operação

Para os experimentos utilizando o número de Damköhler como critério para a determinação da vazão ideal de escoamento de ar, foram realizados ensaios fermentativos em biorreatores compostos por quatro e por oito módulos fermentativos. Além dos módulos de entrada e de saída, não inoculados, foram empacotadas 45 gramas de substrato por módulo (BC:FT, 7:3 m/m), sendo utilizadas as fibras de bagaço de cana que não foram retidas pela peneira de 4 mm de abertura. Para os ensaios com quatro módulos fermentativos, as vazões utilizadas foram calculadas de acordo com a equação 3.4 da seção *Revisão Bibliográfica* desta dissertação, utilizando para o número de Damköhler modificado os valores de 0,5; 1,0 e 1,5, enquanto que, para os ensaios em biorreatores com oito módulos fermentativos, os valores de Da_m adotados foram iguais a 0,5 e 1. Para o cálculo de Da_m , foram utilizados os valores dos parâmetros fornecidos na Tabela 3.3 da seção *Revisão Bibliográfica*.

4.7.1.3 Efeito da inserção distribuída de ar sobre a produção de enzimas

Foi adotada a estratégia de introduzir ar através da base do biorreator e através de um tubo perfurado inserido em uma flange perfurada, Figura 4.4, postada na porção intermediária do comprimento do leito. Para tanto, o leito foi empacotado com oito módulos fermentativos, 45 gramas de substrato por módulo (BC:FT, 7:3 m/m) e a vazão de ar total foi determinada para Da_m igual a 0,5 e 1, sendo que metade desta vazão foi introduzida pela base e a outra pelo meio da coluna, através do tubo perfurado, mostrado na Figura 4.5, onde a seta vermelha indica o ponto de inserção de ar no centro do sistema. O tubo perfurado possuía quatro orifícios de 2 mm cada, espaçados de 90°. Ambas as correntes de ar foram compostas por sistemas de filtros de ar, medidores de vazão mássica e umidificadores de ar independentes.

Figura 4.4: Anel interno para distribuição de ar em biorreator de 7,62 cm de diâmetro interno.



Figura 4.5: Biorreator utilizando inserção distribuída de ar.



4.7.1.4 Efeito da densidade *bulk* do leito utilizando número de Damköhler para determinação da taxa de escoamento de ar

Para análise do efeito da densidade de empacotamento sobre a produção de enzimas, foram realizados ensaios em biorreatores contendo dois módulos fermentativos. As massas de substrato empacotadas em cada módulo fermentativo foram de 45, 60 e 75 gramas (BC:FT, 7:3 m/m). No ensaio utilizando 75 gramas de substrato por módulo fermentativo, o bagaço de cana foi triturado e peneirado utilizando peneiras Tyler com abertura de 0,84 mm, para que o substrato coubesse no interior dos módulos. As peneiras foram mantidas em vibração por 5 minutos, sendo empregado o bagaço que passou pela peneira, de diâmetro menor que 0,84 milímetros ($d_p < 0,84$ mm). As vazões de ar utilizadas para as massas de 45, 60 e 75 g foram calculadas com base em $Da_m = 1$, corrigindo-se as variações de porosidade dos leitos resultantes das distintas densidades de empacotamento.

4.7.2 Biorreator *largo*

4.7.2.1 Efeito da distribuição de vazão de ar sobre a produção de enzimas em biorreator *largo*

No biorreator de 20 cm de diâmetro interno foram realizados ensaios de inserção do ar de duas formas distintas: em duas correntes independentes, uma pela base e outra no meio da coluna, através de um tubo perfurado inserido ao longo do perímetro interno em uma flange perfurada (anel interno) e através de um tubo perfurado disposto longitudinalmente ao longo da coluna (tubo interno). A Figura 4.6a apresenta a flange contendo o tubo perfurado e a Figura 4.6b o tubo longitudinal.

Em cada módulo fermentativo foi empacotado substrato composto por bagaço de cana e farelo de trigo também na proporção 7:3 (BC:FT m/m) na quantidade de 620 gramas de substrato por módulo fermentativo, inoculado com solução de esporos composta por 10^7 esporos/gss até a umidade de 75% (b.u.). Após o término dos ensaios preliminares, constatou-se que houve acomodação do material fermentado e que a altura total havia diminuído. Desta forma, foram inseridas telas metálicas entre os módulos do biorreator. A vazão de ar empregada foi correspondente a $Da_m = 1$. Para ambos os ensaios, base e topo

do leito foram empacotados com bagaço de cana grosso não inoculado. Os ensaios foram realizados em biorreatores compostos por 4 módulos fermentativos.

Para os ensaios com a inserção distribuída de ar entre a base da coluna e através da flange posicionada no meio da mesma, foi empregado o tubo circular apresentado na Figura 4.6a. Este tubo possuía seis orifícios de 2 mm de diâmetro, espaçados de 60°. Ambas as correntes de ar possuíam monitoramento da vazão, filtração e umidificação do ar independentes.

Para os ensaios com inserção do ar através do tubo interno longitudinal, foi empregado o tubo ilustrado na Figura 4.6b, cuja perfuração consistiu em conjuntos de quatro furos de 2 milímetros espaçados de 90°, sendo que cada conjunto foi posicionado na altura do início de cada um dos módulos fermentativos.

Figura 4.6: Formas de inserção do de ar utilizadas no biorreator largo: (a) anel interno central e (b) tubo interno central.



(a)



(b)

5. Resultados e Discussões

5.1 BIORREATORES EM EMBALAGENS PLÁSTICAS

A média dos resultados de produção de CMCase e xilanase nos ensaios em embalagens fermentativas utilizando o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e umidade de 75 % (b.u.) realizados simultaneamente aos ensaios em biorreatores está representada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Média das atividades enzimáticas obtidas nos biorreatores em embalagens plásticas.

Média de atividades enzimáticas (U/gss)	
CMCase	147,08
Xilanase	1094,04

Nota-se que as atividades de CMCase são inferiores aos valores médios obtidos por Zanelato (2011) nas mesmas condições, 497 U/gss, enquanto que as atividades de xilanase foram maiores em relação aos valores determinados pelo mesmo autor, de 714 U/gss.

Deve-se destacar que a cepa de fungo empregada nesta dissertação foi repicada a partir da matriz mantida a -80 °C, de modo que não se espera que tenham ocorrido alterações genéticas no fungo que possam resultar nos valores distintos das atividades das enzimas selecionadas. Uma possível causa da disparidade pode estar relacionada aos substratos, farelo de trigo e bagaço de cana, que podem ter suas composições muito variadas.

De acordo com Canilha (2012), o bagaço de cana de açúcar do território brasileiro é quantitativamente composto por 38,4-45,5% de celulose, 22,7-27,0% de hemicelulose e 19,1-32,4% de lignina, componentes não estruturais da biomassa, nomeados cinzas (1,0-2,8%) e minerais (4,6-9,1%). A composição química do bagaço de cana de açúcar varia

consideravelmente, conforme reportado em literatura (PITARELO, 2007; da SILVA et al., 2010; CANILHA et al., 2011; ROCHA et al., 2011; BRIENZO et al., 2009; RABELO et al., 2011), e esse fato é decorrente de variações da genética vegetal, do ambiente de crescimento e das condições de processo.

Sabendo que o bagaço de cana utilizado por Zanelato (2011) foi doado por uma usina diferente da Usina Vale, infere-se que a disparidade nos resultados obtidos nesta dissertação esteja diretamente relacionada à composição do bagaço de cana de açúcar utilizado nos ensaios fermentativos.

5.2 BIORREATOR ESTREITO

5.2.1 Efeito do tamanho de partícula de bagaço de cana sobre a produção de enzimas

Inicialmente, foram realizados ensaios em embalagens plásticas com as partículas de bagaço de cana de duas dimensões ($d_p < 0,84$ mm e $2,83 < d_p < 3,36$ mm) para posterior comparação com os resultados no biorreator com dois módulos fermentativos e 7,62 cm de diâmetro interno, aqui denominado de *estrito*. Na Figura 5.1 estão apresentados os resultados em escala de embalagens fermentativas para CMCase e xilanase, onde se nota que os resultados são similares para ambos os tamanhos de partículas.

Os ensaios no biorreator estreto com dois módulos fermentativos foram feitos utilizando vazão de 150 L/h e massa de 75 gramas de substrato por módulo fermentativo para ambos os tamanhos de partícula. Os resultados apresentados na Figura 5.2 foram expressos em atividades enzimáticas relativas, equivalentes à razão entre as atividades enzimáticas produzidas pelos ensaios em biorreatores pelas atividades enzimáticas produzidas em embalagens plásticas.

Na Figura 5.2, observa-se que as atividades enzimáticas relativas de CMCase foram mais elevadas no módulo 1 para ensaios utilizando $d_p < 0,84$ mm, enquanto que no módulo 2, foram maiores para os ensaios utilizando as partículas maiores de BC ($2,83 < d_p < 3,36$ mm). Em termos de atividade enzimática média, representadas pelas linhas horizontais na Figura 5.2, ambas foram muito próximas.

Figura 5.1: Atividades de CMCase e xilanase do extrato produzido por *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em nos ensaios em escala de embalagens plásticas para os dois tamanhos de partícula de bagaço de cana.

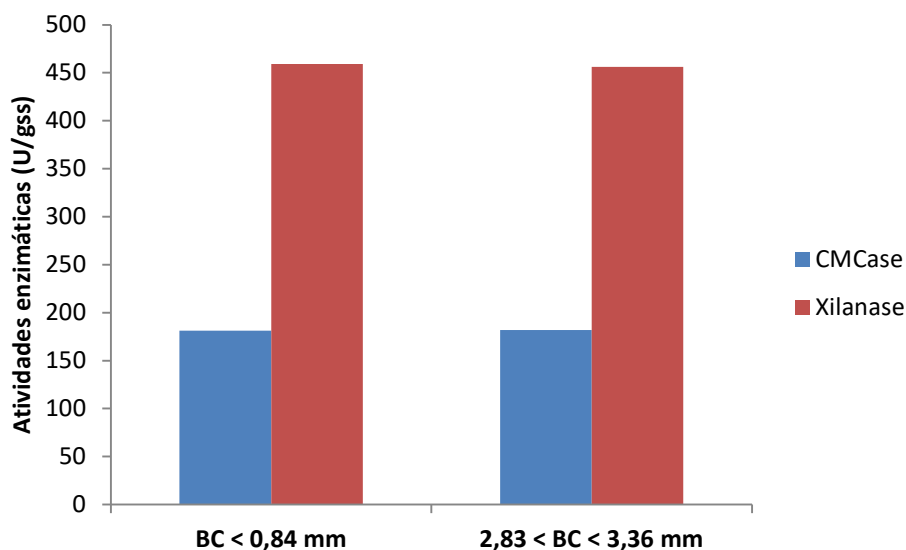
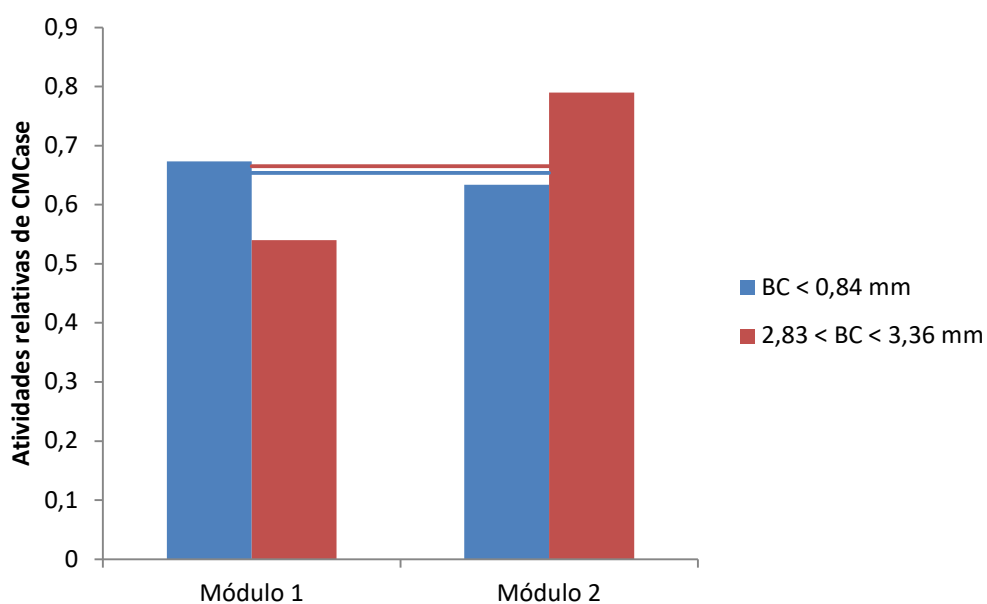
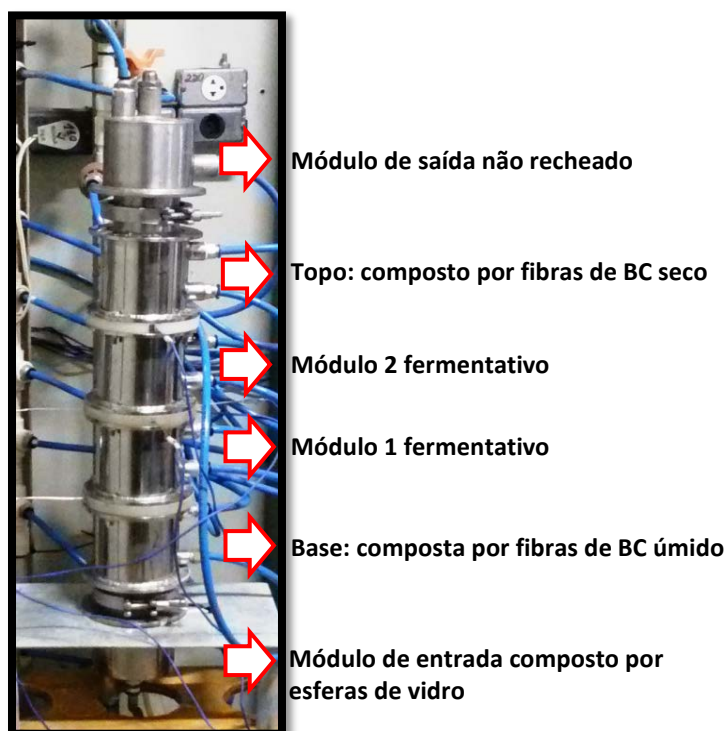


Figura 5.2: Atividades relativas de CMCase do extrato produzido por *M. thermophila* nos ensaios no biorreator de 7,62 cm de diâmetro (*estrito*) para os dois tamanhos de partícula de bagaço de cana.



As maiores atividades enzimáticas relativas de CMCase, obtidas utilizando as fibras maiores de BC no segundo módulo fermentativo, são resultado de um problema físico do biorreator utilizado para os experimentos. O biorreator, apresentado em detalhes na Figura 5.3, é um cilindro vertical, construído de modo que a parte inferior, cônica, é recheada com esferas de vidro de 3 mm de diâmetro. Sobre este cone foi colocado um módulo recheado com bagaço de cana úmido, a fim de evitar a secagem excessiva do leite, como já citado na seção de *Materiais e métodos*. A seguir foram inseridos os dois módulos fermentativos recheados com bagaço de cana e farelo de trigo inoculados. Acima dos módulos fermentativos foi colocado um módulo recheado com partículas de bagaço de cana de fibras grossas e secas, para retenção da umidade excedente do ar, e, acima deste, foi instalado um módulo não recheado, para dar maior uniformidade térmica ao topo do biorreator.

Figura 5.3: Fotografia do biorreator estreito composto por dois módulos fermentativos e módulos de entrada e de saída, não inoculados.



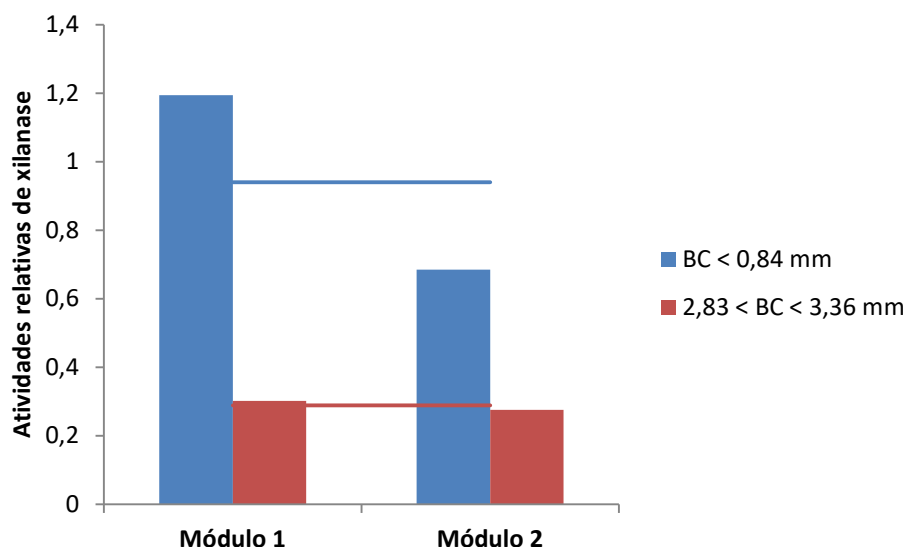
No ensaio fermentativo realizado com partículas de bagaço de cana com diâmetro entre 2,83 e 3,36 mm, as partículas foram intensamente compactadas. Devido ao caráter flexível do bagaço de cana, há uma tendência natural de que este material se expanda. Como o módulo inferior é precedido por um módulo recheado de bagaço de cana não inoculado e este pelo leito de esferas de vidro, a expansão do leito inoculado não ocorre significativamente nesta direção. No entanto, a parte superior do biorreator é composta por um módulo recheado de bagaço de cana composto por fibras grossas e um módulo não recheado, possibilitando assim a expansão do leito do segundo módulo para cima. Esse evento foi constatado no momento de desmontagem do biorreator.

Dada a constatação de um problema operacional no fermentador pela falta de uma barreira física que limite o espaço físico disponível para cada módulo, as análises dos resultados obtidos nesse experimento serão restritas apenas ao primeiro módulo fermentativo, que correspondeu às condições previamente estipuladas para os ensaios.

Com relação aos resultados de atividades enzimáticas relativas de CMCase obtidas no módulo 1, no ensaio utilizando partículas de $d_p < 0,84$ mm, os resultados foram superiores em relação aos ensaios utilizando $2,83 < d_p < 3,36$ mm, mesmo efeito observado para as atividades de xilanase, como pode ser visto na Figura 5.4. Isso ocorre devido à diferença no tamanho das partículas de bagaço de cana utilizadas como substrato para as fermentações.

Uma vez que em ambos os ensaios variando tamanho de partícula de BC foram empacotadas 75 gramas de substrato por módulo fermentativo, as maiores atividades enzimáticas relativas no ensaio com fibras menores é consequência da maior superfície de contato entre microrganismo e substrato, bem como maior facilidade de percolação do ar através do leito, ocasionada também pelo tamanho reduzido das partículas. Além disso, partículas menores de BC são menos densas em relação às maiores, constituindo um leito mais poroso, o que facilita a percolação de ar pelo mesmo, favorecendo o crescimento fúngico. Por outro lado, a compactação excessiva do leito composto pelas fibras maiores de BC, por formar um leito menos poroso, reduziu significativamente a percolação adequada de ar pelo sistema. Após a fermentação, foi constatado o baixo crescimento fúngico, que normalmente é representado pelo crescimento de biomassa de coloração esbranquiçada por entre as fibras de bagaço de cana.

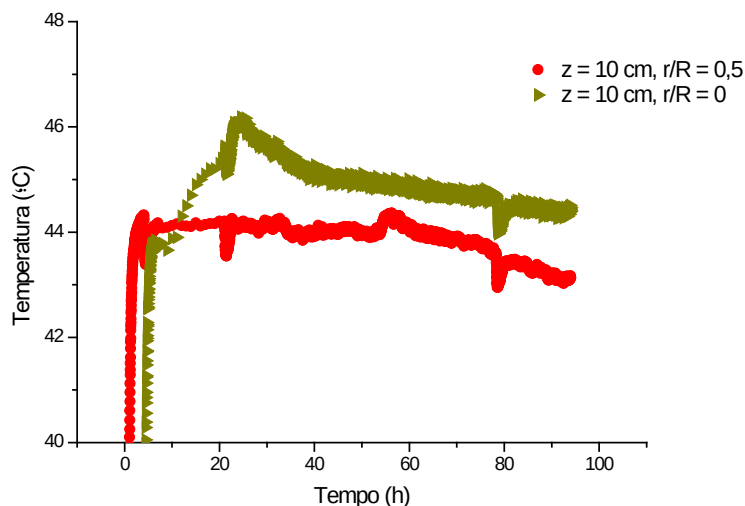
Figura 5.4: Atividades relativas de xilanase do extrato produzido por *M. thermophila* nos ensaios no biorreator de 7,62 cm de diâmetro (*estrito*) para os dois tamanhos de partícula de bagaço de cana.



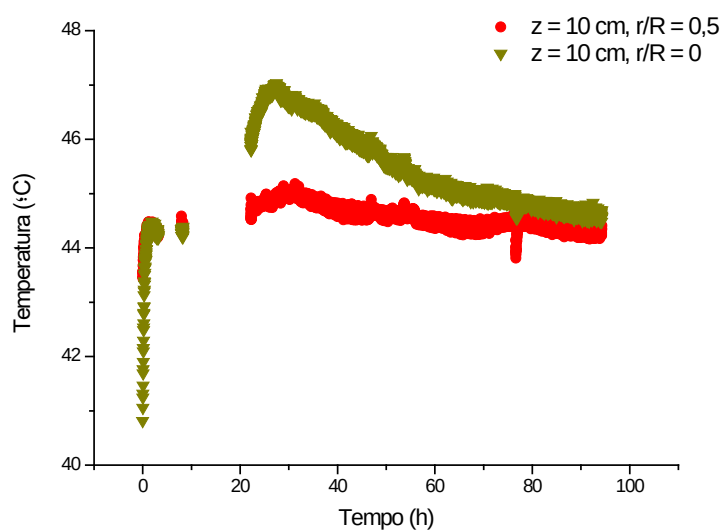
Na Figura 5.5 são apresentados os perfis temporais de temperatura nos ensaios com os distintos tamanhos de partícula de BC em diferentes posições radiais do biorreator na metade da altura do mesmo. A altura foi determinada a partir da base do módulo inferior fermentativo até o topo do módulo superior fermentativo neste e em todos os ensaios desta dissertação. Dessa forma, o comprimento total deste leito composto pelos dois módulos fermentativos totalizou 20 centímetros. Portanto, a altura $z = 10$, na legenda, significa a porção central do biorreator, entre os módulos fermentativos 1 e 2 do mesmo. As posições $r/R = 0$ e $r/R = 0,5$ indicam termopares localizados no centro do sistema e em posição intermediária, entre o centro e o leito, respectivamente.

No ensaio utilizando partículas maiores, Figura 5.5a, a máxima temperatura registrada foi em torno de 46,5 °C, enquanto no ensaio utilizando partículas menores, Figura 5.5b, a máxima temperatura registrada foi em torno de 47,2 °C. Portanto, não ocorreu sobreaquecimento considerável no interior do biorreator em ambos os ensaios. A maior temperatura atingida na Figura 5.5b indica maior geração de calor metabólico, e consequentemente, maior metabolismo fúngico, favorecidos pela estrutura porosa do leito, consequência das partículas menores de substrato e também pela maior superfície de contato resultante dos menores tamanhos de partículas. Para ambos os ensaios, a temperatura máxima foi atingida com cerca de 30 horas de fermentação.

Figura 5.5: Temperaturas ao longo do cultivo de *M. thermophila* em diferentes posições do biorreator estreito empacotado com diferentes tamanhos de partícula de BC: (a) $2,83 < d_p < 3,36$ mm e (b) $d_p < 0,84$ mm.



(a)

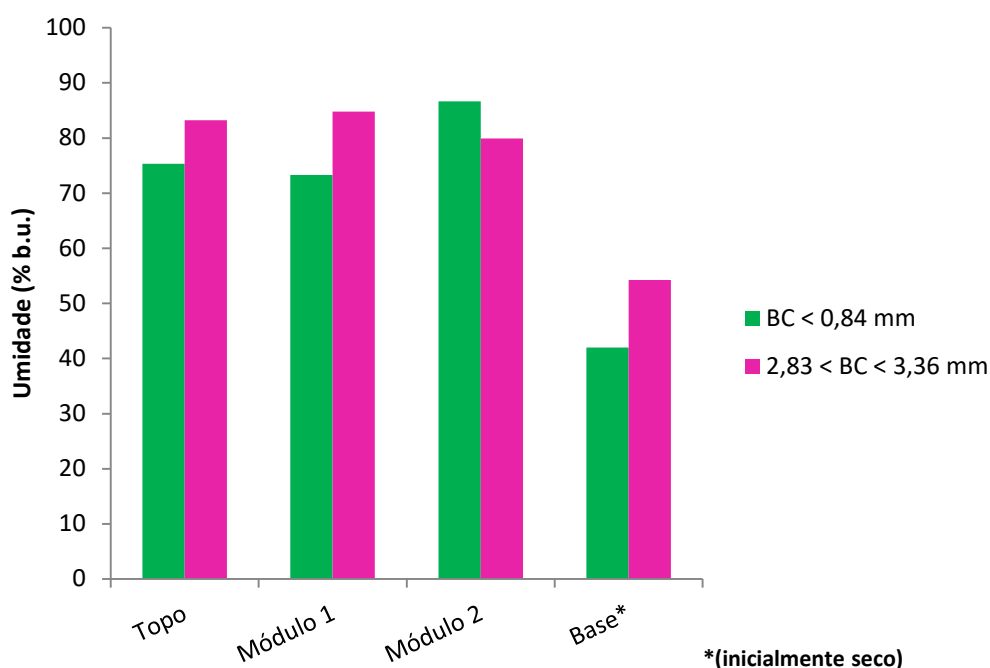


(b)

Analisando a Figura 5.6, que mostra as umidades após o cultivo dos dois módulos fermentativos e também da base e do leito dos sistemas, juntamente com a Figura 5.5, pode-se dizer que a vazão de ar de 150 L/h foi suficiente para evitar o sobreaquecimento dos sistemas fermentativos, ao passo que não promoveu a secagem do substrato, uma vez

que a umidade dos leitos permaneceu dentro da faixa de 75 % nos módulos fermentativos tanto no sistema para as partículas maiores de substrato, quanto para as partículas menores.

Figura 5.6: Umidade final do material fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator estreito com dois fermentativos, utilizando diferentes tamanhos de partícula de BC como substrato.



Além disso, verifica-se que as umidades finais permaneceram próximas das umidades iniciais, que é a umidade ótima recomendada por Zanelato (2011), enquanto que não houve sobreaquecimento do leito. Dessa forma, conclui-se que, no caso da fermentação utilizando as partículas de $2,83 < d_p < 3,36$ mm, o fator limitante para a produção de atividades enzimáticas foi a quantidade de oxigênio disponível no sistema.

Apesar da vazão de ar utilizada no experimento ter sido a mesma em ambos os ensaios utilizando os diferentes tamanhos de partículas de BC, a distribuição dela através do leito composto pelas partículas maiores ($2,83 < d_p < 3,36$ mm) foi deficiente, devido à compactação do mesmo, formando caminhos preferenciais de escoamento do ar. Esse fenômeno é conhecido como “canalização do ar” devido à formação de fissuras no leito, onde o ar flui preferencialmente a outras partes do leito, de maneira que o fluxo de ar

convectivo reabastece apenas o oxigênio nas paredes das rachaduras. O reabastecimento do oxigênio em outras regiões do leito é limitado apenas à difusão (MITCHELL et al., 1999).

Raghavarao et al. (2003) pontuou que a aeração forçada é crucial para o crescimento fúngico, dado que fornece um meio para a transferência de oxigênio inter-partículas. Dessa forma, constata-se que, no caso da fermentação utilizando as maiores partículas de BC, a condição operacional do sistema não favoreceu a fermentação, podendo-se concluir que compactações excessivas de substrato no leito prejudicam a aeração do mesmo e também todo o metabolismo microbiano.

Com base nesse estudo, destaca-se que, para situações que requerem um leito de fermentação com densidade elevada, uma alternativa para a obtenção de bons resultados é a aplicação de tratamentos mecânicos no substrato, a fim de obter partículas menores para facilitar o empacotamento do leito e evitar compactação excessiva que possa comprometer a uniformidade de escoamento do ar.

5.2.2 Utilização do número de Damköhler modificado para estabelecimento da vazão ideal de operação

Um dos principais problemas reportados em literatura a respeito do aumento de escala de biorreatores de leito empacotado é a limitação de altura, uma vez que, para a remoção do calor metabólico gerado no leito é necessário o aumento na vazão de ar percolante no sistema. Esse aumento, no entanto, não pode ser feito indiscriminadamente, pois a elevação na velocidade superficial do ar pode causar secagem excessiva no leito, além de poder causar danos às hifas fúngicas, afetar negativamente o crescimento de microrganismos e, consequentemente, limitar a produção de enzimas. Sangsurasak e Mitchell (1998) sugeriram que a evaporação pode remover até 78% do calor do leito durante o período de pico de geração de calor, porém, isso resulta em grandes perdas de umidade e na secagem do meio de cultivo. Dessa forma, sabe-se que as velocidades superficiais devem aumentar com a escala, embora não seja viável aumentá-las indefinidamente, tampouco existe um critério bem definido para o aumento da vazão de ar.

Para o cálculo das vazões a serem empregadas nas fermentações, foi utilizada a equação 3.4 que define o número de Damköhler modificado (MITCHELL et al., 1999) e a Tabela 3.3, apresentada na seção *Revisão Bibliográfica*, que define os parâmetros e seus

valores necessários para o cálculo de Da_m . Nestes ensaios foram empregados dois biorreatores, um com quatro e outro com oito módulos fermentativos, aos quais devem ser acrescidos os módulos de entrada e de saída (base e topo do leito).

Com base nos valores apresentados na Tabela 3.3, foram calculadas as velocidades superficiais do ar para Da_m igual a 1,5; 1,0 e 0,5 para o leito composto por quatro módulos fermentativos, obtendo-se os valores de vazões (Q) equivalentes a 23, 35 e 70 L/h, respectivamente.

Na Tabela 5.2 são apresentados os valores de vazão utilizados em cada um dos ensaios em biorreatores compostos por quatro e oito módulos fermentativos, bem como as atividades médias relativas de CMCase e xilanase obtidas em cada um dos ensaios para as vazões determinadas segundo o número de Damköhler modificado. Para leitos compostos por 8 módulos fermentativos, foram realizados testes usando apenas vazões de ar correspondentes à $Da_m = 1$ e 0,5, uma vez que foram equivalentes aos melhores resultados em produção de atividades enzimáticas nos ensaios com 4 módulos fermentativos.

Tabela 5.2: Números de Damköhler modificados e respectivas vazões de ar calculadas para leitos compostos por quatro e oito módulos fermentativos, bem como os resultados de atividades relativas de CMCase e xilanase.

Quatro módulos fermentativos			Oito módulos fermentativos		
Damköhler	Vazão de ar	Atividades enzimáticas relativas	Damköhler	Vazão de ar	Atividades enzimáticas relativas
$Da_m = 0,5$	Q = 70 L/h	CMCase = 2,2 Xilanase = 0,75	$Da_m = 0,5$	Q = 100 L/h	CMCase = 0,9 Xilanase = 0,77
$Da_m = 1$	Q = 35 L/h	CMCase = 1,75 Xilanase = 1,25	$Da_m = 1$	Q = 70 L/h	CMCase = 1,15 Xilanase = 0,95
$Da_m = 1,5$	Q = 23 L/h	CMCase = 1,3 Xilanase = 0,7	N/A	N/A	N/A

N/A: Não analisado

De maneira geral, verificou-se que a vazão de 23 L/h no biorreator de quatro módulos fermentativos limitou a produção de atividades enzimáticas e que, de alguma forma, para os ensaios em biorreatores compostos por oito módulos fermentativos, a dinâmica do sistema utilizando vazão de ar equivalente a 70 L/h favoreceu a produção de atividades enzimáticas relativas e coincidiu com o fato de ser a vazão determinada com base no número de Damköhler igual a 1, que representa, em termos matemáticos, taxas de produção e remoção de calor equivalentes.

A seguir será feita uma discussão em torno dos resultados obtidos em biorreatores com quatro módulos fermentativos, englobando análises de temperatura, produção de atividades enzimáticas e umidade de acordo com a taxa de aeração utilizada. Separadamente, com base nos resultados obtidos da análise das fermentações em biorreatores de quatro módulos fermentativos, serão apresentados os resultados correspondentes às fermentações em sistemas com oito módulos fermentativos, e uma discussão dos perfis de temperatura, produção de atividades enzimáticas e umidade será feita, relacionando os dados obtidos às taxas de aeração utilizadas.

Sabendo-se que o critério limitante para o número de Damköhler modificado obtido por Mitchell et al. (1999) é evitar que o leite atinja temperaturas indesejáveis capazes de prejudicar o crescimento fúngico, os valores de vazão utilizados para os diferentes valores de Da_m foram satisfatórios, uma vez que não permitiram o sobreaquecimento dos leitos, conforme mostra a Figura 5.7 a, b e c. No entanto, outras análises são necessárias para que se chegue a uma conclusão neste estudo.

Nota-se que, nos ensaios realizados em biorreatores compostos por quatro módulos fermentativos, para as menores vazões, 23 e 35 L/h, as temperaturas máximas atingidas no processo foram próximas a 47 °C, enquanto que para a maior vazão selecionada, 70 L/h, o valor máximo é próximo a 46 °C. O tempo para que a temperatura máxima fosse atingida variou mais expressivamente para as vazões selecionadas, ficando entre 13 e 20 horas de operação. Por ser um fungo termofílico, *M. thermophila* não produz grandes quantidades de calor metabólico, mas para um fungo mesófilo, como o empregado por Pitol et al. (2016), a temperatura pode causar danos expressivos ao processo. Os autores utilizaram *Aspergillus niger* em biorreator de leite empacotado com substrato composto por farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar na proporção 9:1 (m/m). No ensaio, com cerca 20 horas de fermentação a temperatura atingiu um pico de 43 °C, provocando desnaturação das enzimas, uma vez que a atividade de pectinase medida no topo do leite caiu quase 50 % entre 14 e 20 horas de fermentação.

Considerando o microrganismo utilizado na presente dissertação, *M. thermophila*, destaca-se que um ponto favorável à aplicação de fungos termófilos em FES é a síntese de enzimas termoestáveis, de modo que a ligeira elevação de temperatura observada no fermentador é incapaz de desnaturá-las.

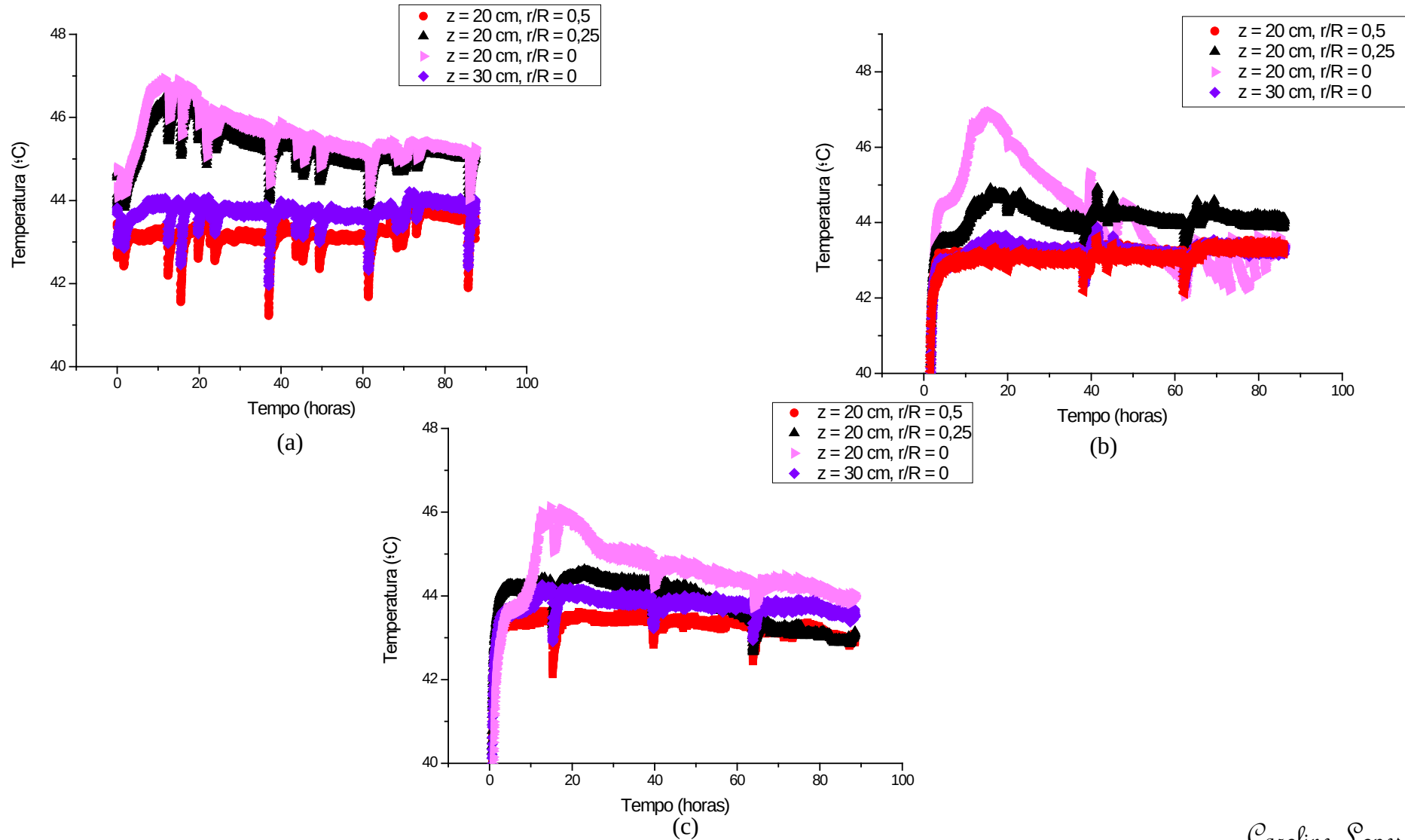
Nas Figuras 5.7a, 5.7b e 5.7c que representam as temperaturas em diferentes pontos do biorreator quando utilizada vazão de ar equivalente às vazões de 35, 23 e 70 L/h, respectivamente, nota-se que as temperaturas mais elevadas ocorreram próximas ao centro do leito ($r/R = 0$ e $0,25$), uma vez que nessa região a remoção de calor pela camisa é mais difícil comparada às bordas do leito.

O perfil de temperatura da Figura 5.7a revela que a temperatura média do sistema ao longo das posições longitudinais foi em torno de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. As Figuras 5.7b e 5.7c apresentam temperaturas médias dos sistemas em torno de $44\text{ }^{\circ}\text{C}$, podendo sofrer pequenas variações de acordo com a posição longitudinal dos termopares. As temperaturas mais próximas ao centro dos leitos apresentaram os aumentos mais expressivos.

A Figura 5.7c, representando as temperaturas da fermentação com vazão de ar equivalente a $Q = 70\text{ L/h}$, apresenta menor variação de temperatura em relação às demais condições e somente a temperatura no centro do leito ($r/R = 0$) foi expressivamente superior às demais, indicando remoção de calor mais eficiente ao longo do leito pelo mecanismo advectivo e convectivo devido à maior vazão de ar.

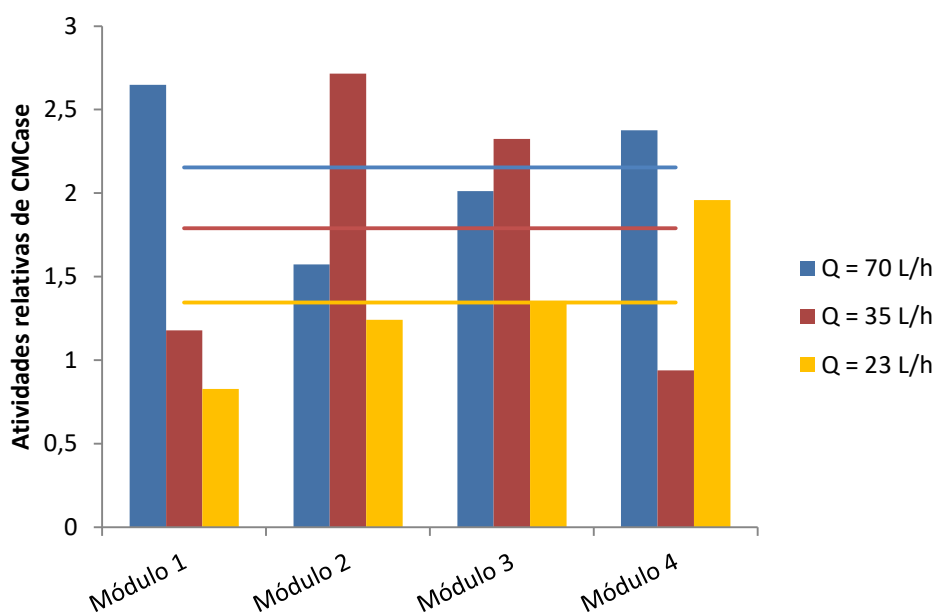
Ainda que as elevações de temperatura tenham sido discretas, as atividades de CMCase e xilanase foram fortemente afetadas pelas vazões de ar. Na Figura 5.8, são mostradas as atividades enzimáticas relativas de CMCase e xilanase obtidas em cada um dos quatro módulos fermentativos nas vazões correspondentes a Da_m igual a 1,5; 1 e 0,5. Nota-se que, para xilanase, as máximas atividades enzimáticas relativas foram obtidas para $Q = 35\text{ L/h}$ e as mínimas atividades para $Q = 23\text{ L/h}$. Para as atividades enzimáticas de CMCase, os valores máximos obtidos foram referentes a $Q = 70\text{ L/h}$, seguidos pelos valores obtidos com $Q = 35\text{ L/h}$, e, por último, valores mais baixos para $Q = 23\text{ L/h}$.

Figura 5.7: Temperaturas ao longo da fermentação com *M. thermophila* em diferentes posições radiais e longitudinais em biorreator composto por quatro módulos fermentativos: (a) $Q = 35$ L/h, (b) $Q = 23$ L/h e (c) $Q = 70$ L/h.

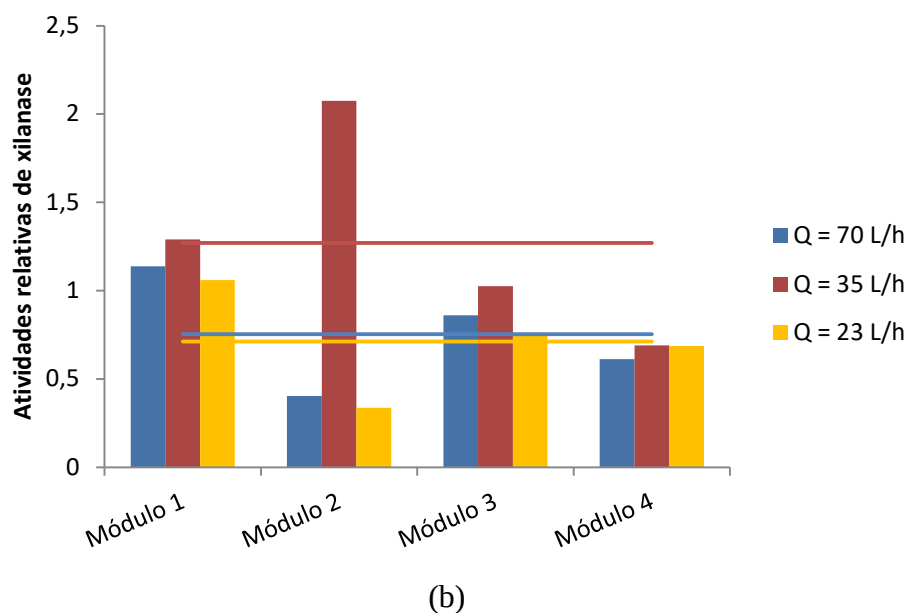


Dessa forma, é possível inferir que a menor vazão utilizada, 23 L/h ($Da_m = 1,5$) de certa forma prejudicou o metabolismo fúngico, devido à menor atividade de CMCase e de xilanase, verificando-se assim que, nesse caso, são indicadas vazões mais elevadas de ar para maior produção de enzimas. Raimbault (1998) destacou que a aeração deve ser capaz de manter condições aeróbicas no sistema, remover o dióxido de carbono e controlar a temperatura, fato que ocorreu de maneira mais eficaz quando utilizadas vazões de 35 e 70 L/h nesse estudo de caso.

Figura 5.8: Atividades enzimáticas relativas obtidas em cada módulo fermentativo do biorreator estreito com quatro módulos fermentativos para $Q = 70, 35$ e 23 L/h, correspondentes a Da_m igual a $0,5, 1$ e $1,5$, respectivamente: (a) CMCase; (b) xilanase, As linhas horizontais representam a média das atividades enzimáticas entre os módulos referentes às vazões utilizadas.

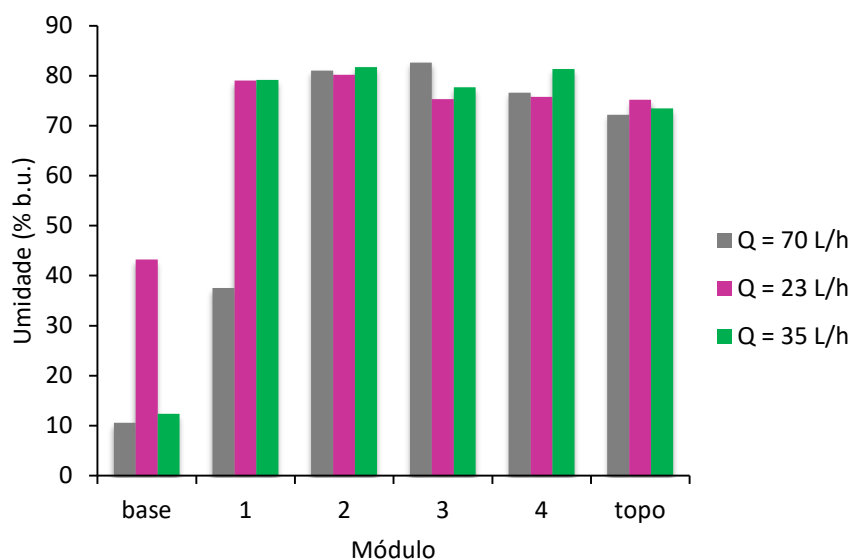


(a)



Na Figura 5.9 são apresentadas as umidades finais dos módulos, observando-se que a única vazão que provocou alteração na umidade inicial do primeiro módulo do meio de cultura foi a de 70 L/h, correspondente a $Da_m = 0,5$. Possivelmente, o ressecamento observado deve-se a problemas operacionais na umidificação do ar e não pode ser relacionado ao processo fermentativo no biorreator. Para microrganismos que tenham maior taxa de geração de calor metabólico, os problemas de ressecamento seriam mais intensos.

Figura 5.9: Umidade final do material fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator estreito com quatro módulos fermentativos para Q = 70, 23 e 35 L/h, correspondentes a $Da_m = 0,5$, 1 e 1,5, respectivamente.

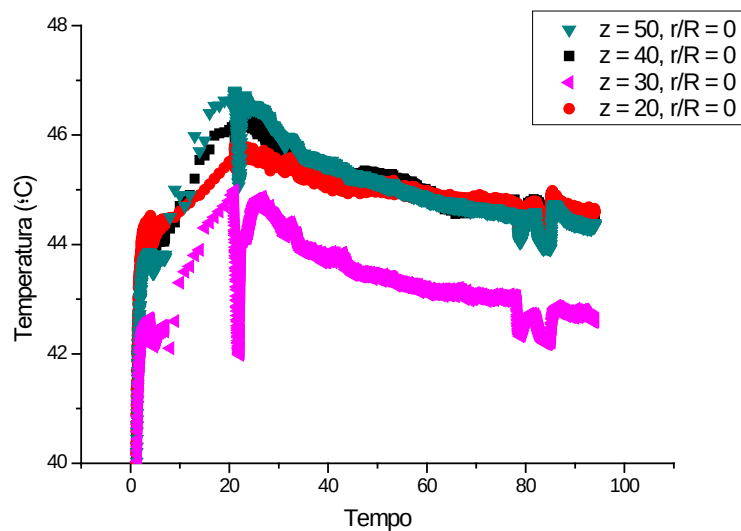


Vitcosque et al. (2012) também avaliaram os efeitos de condições operacionais na produção de complexos multienzimáticos por *Aspergillus niger* cultivado por FES utilizando grãos de soja. Os efeitos da taxa de aeração, bem como umidade relativa do ar de entrada e teor de umidade inicial do substrato na produção do complexo multienzimático foram avaliados utilizando metodologia de superfície de resposta e a taxa de aeração não resultou em efeito significativo nas atividades de CMCase e xilanase dentro dos valores estudados. Mo et al. (2004) afirmaram que a aeração forçada teve efeito positivo na produção de celulasas por *Penicillium decumbens* cultivado por FES, observando que a atividade das celulasas aumentou com a elevação da taxa de aeração até determinado valor, passando a decrescer devido à secagem de substrato. Ressalte-se que os autores citados não empregaram o conceito do número de Damköler para estabelecer as vazões.

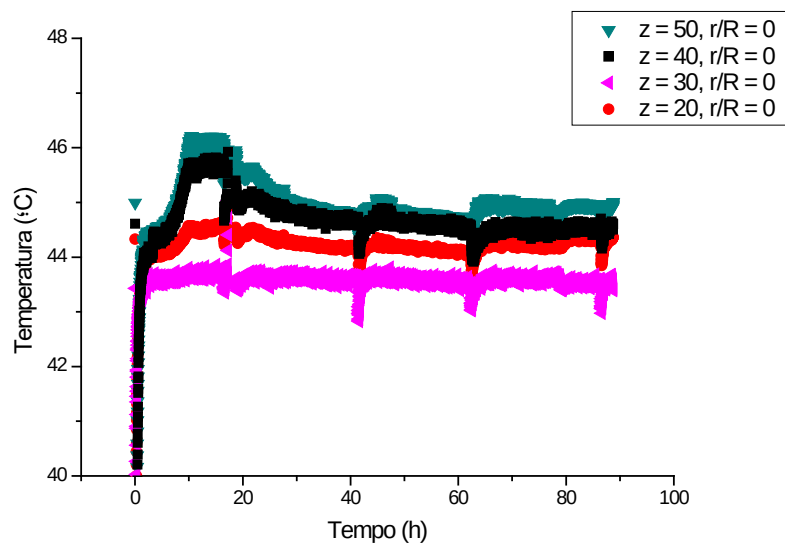
Rocky-Salimi e Hamidi-Esfahani (2010) também estudaram o efeito da taxa de aeração na produção de celulasas por *Trichoderma reesei* QM9414 cultivado por FES utilizando farelo de arroz como substrato. Efeito significativo da aeração foi identificado, apesar do aumento da taxa de aeração ter resultado em secagem de substrato e diminuição da produção de celulasas. Rodriguez-Zuñiga et al. (2013) compararam a produção de CMCase, e xilanase por *Aspergillus niger* cultivado por FES utilizando bagaço de cana de açúcar como substrato, empregando condições de aeração forçada e estática. Para substratos nas mesmas condições de umidade inicial, a máxima atividade de CMCase obtida foi 2,2 vezes mais elevada sob condições dinâmicas em comparação a condições estáticas. No entanto, a atividade de xilanase não aumentou quando o cultivo foi submetido a condições de aeração forçada. Pirota et al. (2013) estudaram a produção de xilanase por uma cepa de *A. oryzae* P6B2 cultivada por FES usando um biorreator de bancada e encontraram um efeito positivo substancial de aeração forçada controlada, em comparação com condições estáticas.

Para os ensaios em biorreatores compostos por oito módulos fermentativos, nas Figuras 5.10a e 5.10b são fornecidos os perfis de temperatura em quatro posições longitudinais no centro da seção fermentativa do biorreator para Da_m iguais a 1 e 0,5. Nota-se que a temperatura máxima foi atingida entre 18 e 20 horas de fermentação, e foi em torno de 47 °C para a vazão de 70 L/h e de 46,4 °C para a vazão de 100 L/h, de modo que não houve sobreaquecimento em nenhum dos ensaios.

Figura 5.10: Temperaturas medidas na posição radial central, em várias posições longitudinais, ao longo da fermentação com *M. thermophila*, para o biorreator estreito composto por oito módulos fermentativos, em diferentes posições radiais e longitudinais:
(a) $Q = 70$ L/h ($D_{am} = 1$), (b) $Q = 100$ L/h ($D_{am} = 0,5$).



(a)



(b)

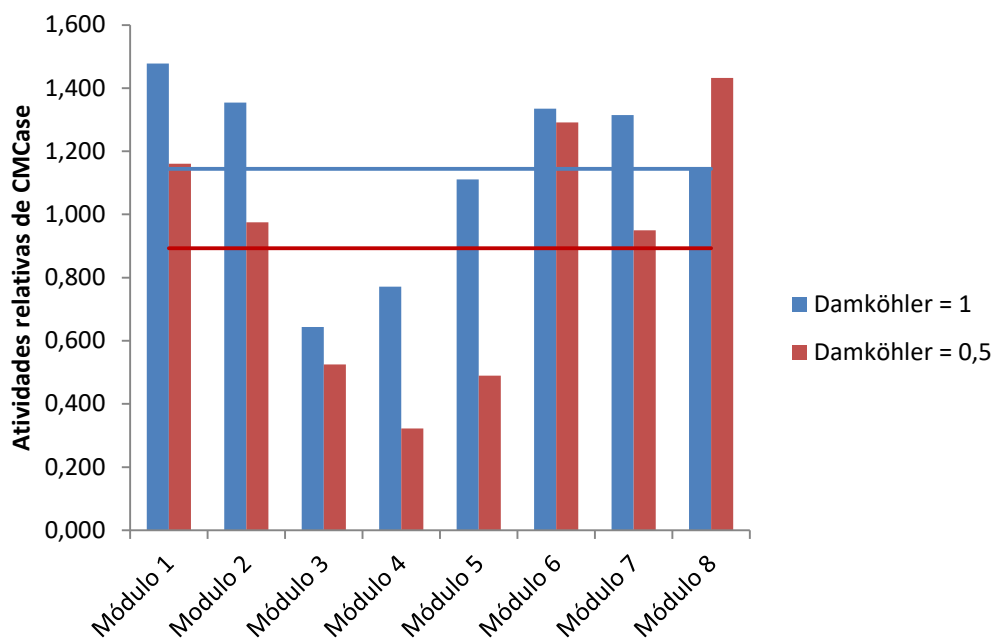
As figuras mostram relativa homogeneidade térmica ao longo do biorreator, um atributo industrial importante, embora seja possível observar-se uma tendência de elevação de temperatura nas porções superiores do fermentador. Essa tendência já havia sido prevista por Casciadori (2015) em simulações empregando-se modelos de transferência de calor a uma fase unidimensionais.

Ademais, a relativa homogeneidade térmica aqui notada já havia sido observada experimentalmente por Zanelato et al. (2012) e por Casciadori (2015), sendo um indicativo de que a combinação dos fatores operacionais, propriedades físicas do meio sólido, dimensões do equipamento, fisiologia e taxa de crescimento do microrganismo podem favorecer a homogeneidade térmica do biorreator.

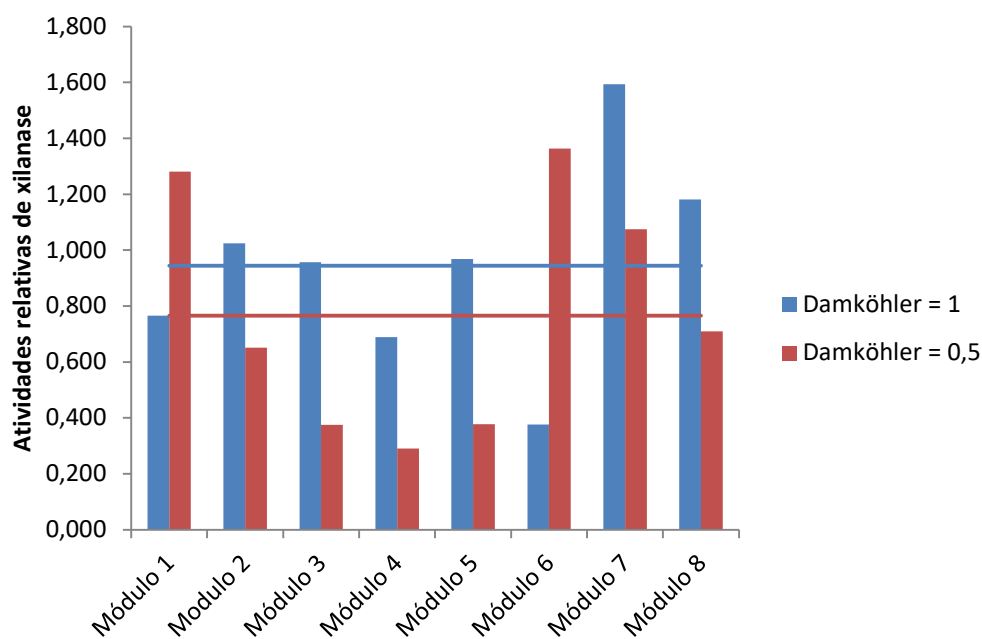
Os dados aqui apresentados contradizem parte da literatura, que destaca o problema de superaquecimento em biorreatores de leito empacotado para FES (GHILDYAL et al., 1994; ASHLEY; MITCHELL e HOWES, 1999; MITCHELL, KRIEGER e BEROVIC, 2006). No entanto, Casciadori (2015) levantou a hipótese de que a elevação de temperatura decorrente da geração de calor metabólico é inferior quando se utilizam cepas termofílicas. Na literatura, existem trabalhos que reiteram essa hipótese, como o de Kalogeris et al. (2003), que relata pequenas elevações de temperatura em seus ensaios fermentativos em biorreator com agitação intermitente utilizando o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* em palha de trigo, nas temperaturas de 45, 49 e 53 °C. Em outro trabalho, Umsza-Guez (2009) observou que as temperaturas ao longo do leito atingiram um pico em torno de 48 °C, mantendo-se constantes nesta faixa nas primeiras 24 horas de processo e decaindo após esse período quando do cultivo do fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N-31 a 45 °C em meio composto por bagaço de cana, bagaço de laranja e farelo de trigo, nas proporções de 1:2:2 (m/m/m), respectivamente.

As Figuras 5.11a e 5.11b apresentam as atividades enzimáticas relativas de CMCase e xilanase, obtidas em biorreatores de leito empacotado constituídos por oito módulos fermentativos, utilizando taxas de aeração determinadas com base no número de Damköhler equivalente a 1 e 0,5, de 70 e 100 L/h, respectivamente. Nestas figuras, as linhas horizontais referem-se às atividades relativas médias entre os módulos fermentativos do biorreator.

Figura 5.11: Atividades enzimáticas relativas obtidas em cada módulo fermentativo do biorreator estreito com oito módulos fermentativos para $Q = 70$ e 100 L/h, correspondentes a Da_m igual a 1 e 1,5, respectivamente: (a) CMCase; (b) xilanase. As linhas horizontais representam a média das atividades enzimáticas entre os módulos referentes às vazões utilizadas.



(a)



(b)

Como se observa para ambas as enzimas, as atividades relativas obtidas foram elevadas nos módulos das extremidades do biorreator, observando-se uma tendência de redução de atividades enzimáticas relativas nos módulos centrais. Casciatori (2015) empregou biorreator, fungo, substratos e demais condições de cultivo similares ao desta dissertação. Seu biorreator continha nove módulos fermentativos e a autora testou as vazões de ar 60, 120 e 240 L/h, observando comportamento similar ao acima descrito, de modo que o comportamento de queda das atividades na porção média do leito não deve ser decorrente de erros experimentais, embora não seja possível dar-lhe explicação no momento.

Da mesma forma que Casciatori (2015), Zanelato (2011) e Zanelato et al. (2012) também empregaram um sistema similar ao desta dissertação. Estes autores observaram que as atividades de CMCase e xilanase foram abaixo da média no último módulo fermentativo, independentemente da taxa de aeração. No entanto, no presente trabalho tal fenômeno não foi observado, constatando-se para ambos os comprimentos de leito adotados (com quatro e oito módulos fermentativos) que no último módulo fermentativo, situado no topo do sistema, a atividade das enzimas foi elevada e, em alguns casos, superior. A Figura 5.12 mostra o aspecto do último módulo fermentativo, cuja parte superior fica em contato com o módulo recheado com bagaço de cana não inoculado e seco, onde observou-se colonização mais intensa do que nos demais módulos.

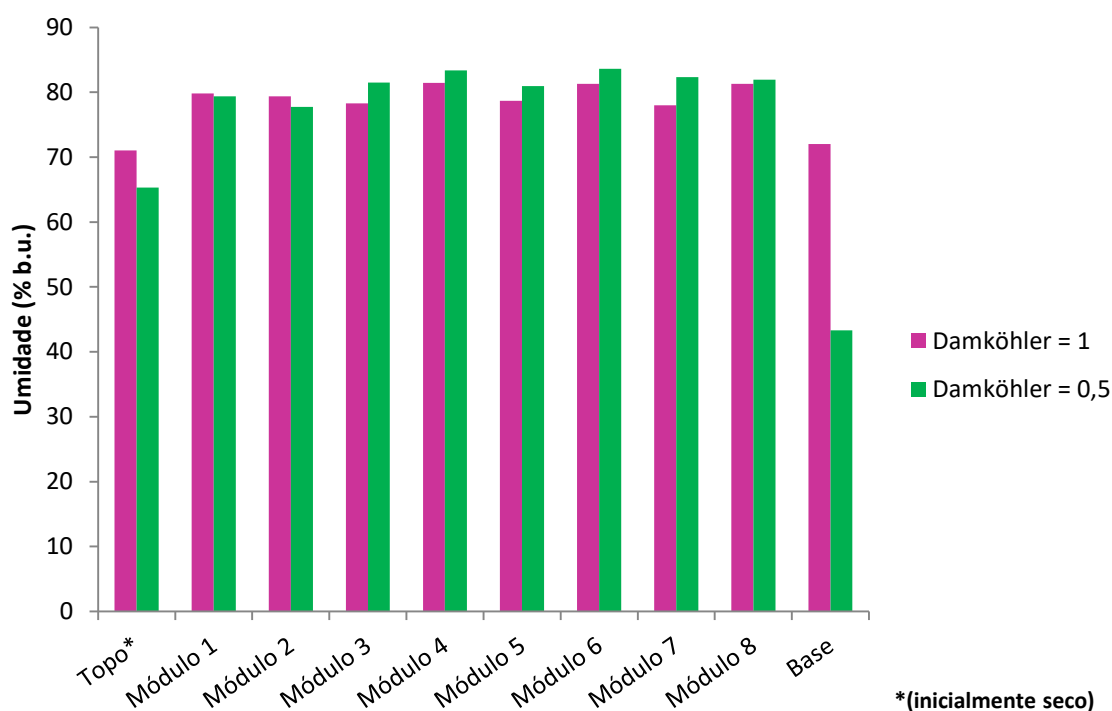
Figura 5.12: Colonização do último módulo fermentativo do biorreator estreito empacotado com oito módulos fermentativos.



A partir das Figuras 5.11a e 5.11b pode-se verificar ainda que as médias das atividades enzimáticas relativas de CMCase e de xilanase foram mais elevadas para o ensaio utilizando vazão de ar equivalente a $Da_{m} = 1$ ($Q = 70$ L/h). Casciotori (2015), empregando nove módulos fermentativos, concluiu que a atividade CMCase média foi significativamente maior para a taxa de aeração de 240 L/h, tendo sido estatisticamente igual para 60 e 120 L/h. Tal resultado se contrapõe aos resultados aqui obtidos, uma vez que a vazão mais elevada, de 100 L/h, produziu menores atividades enzimáticas em relação à menor vazão, de 70 L/h. Para atividades de xilanase, Casciotori (2015) obteve valores significativamente menores para a vazão de 60L/h e estatisticamente equivalentes para taxas de aeração de 120 e 240 L/h.

Na Figura 5.13, são apresentadas as umidades finais do material fermentado com taxas de aeração equivalentes a Da_{m} iguais a 1 e a 0,5 para o ensaios com oito módulos fermentativos. Na figura, a indicação de base e topo referem-se aos módulos de entrada (inicialmente a 75% de umidade) e de saída (inicialmente seco), não inoculados.

Figura 5.13: Umidade final do material fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator estreito com oito módulos fermentativos para $Q = 70$ L/h e $Q = 100$ L/h, correspondentes a $Da_{m} = 1$ e $Da_{m} = 0,5$, respectivamente.



Uma vez que foram adotadas medidas de reposição frequente da água na coluna encamisada de umidificação do ar, na seção entrada de ar do biorreator, pode-se dizer que o ar foi mantido constantemente saturado ao longo da fermentação, provavelmente tendo até mesmo arrastado água líquida para o biorreator, já que o conteúdo de umidade final ao longo dos módulos fermentativos foi ainda superior à umidade inicial, conforme visto na Figura 5.13. Desta forma, o ressecamento do leito não foi um problema para o metabolismo microbiano.

Com base nos dados obtidos nesse estudo, apesar de terem sido obtidos bons resultados para $Da_m = 1$, não foi possível chegar a uma conclusão definitiva a respeito da vazão ideal de operação a partir do número de Damköhler, uma vez a aeração empregada foi eficiente para manter a temperatura dentro de valores aceitáveis para o processo fermentativo, enquanto que as atividades enzimáticas foram fortemente afetadas pela vazão de escoamento, chegando a variar expressivamente em cada um dos módulos fermentativos. Assim, o número de Damköhler mostra-se limitado como critério para estabelecimento da vazão ideal de ar, devendo-se criar um novo critério baseado também na atividade respiratória, de forma que futuros trabalhos para a definição da aeração adequada deverão acoplar ambos os efeitos, o de remoção do calor metabólico e o de restrição de oxigênio.

5.2.3 Efeito da inserção distribuída de ar sobre a produção de enzimas

Na tentativa de contornar o problema de baixas atividades enzimáticas relativas nos módulos centrais do biorreator composto por oito módulos fermentativos e módulos de entrada e saída não inoculados, uma flange contendo um tubo ao redor de seu perímetro interno, Figura 4.4, como descrito na seção 4.7.1.3 de *materiais e métodos*, foi introduzida na altura média do biorreator para os ensaios aqui descritos. Nestes ensaios, foram empregadas vazões de 70 e 100 L/h, correspondentes a Da_m iguais a 1 e 0,5, respectivamente, sendo a vazão total dividida igualmente entre a base e o meio da coluna. Na Tabela 5.3 são mostrados os valores de vazão que foram inseridos nos ensaios fermentativos realizados, bem como uma comparação dos resultados médios de atividades enzimáticas relativas de CMCase e xilanase para os ensaios com e sem distribuição da vazão em biorreatores de oito módulos fermentativos.

Tabela 5.3: Valores de vazão de ar inseridos na parte inferior e no centro do leito e resultados obtidos em atividades relativas nos ensaios com e sem distribuição de vazão em biorreatores constituídos por oito módulos fermentativos.

	Damköhler = 1	Damköhler = 0,5
Vazão de ar inserida na parte inferior do leito ($Q_{inferior}$)	35 L/h	50 L/h
Vazão de ar inserida no módulo central do leito (Q_{centro})	35 L/h	50 L/h
Vazão total utilizada	70 L/h	100 L/h
Atividades enzimáticas relativas: SEM distribuição de ar	CMCase = 1,15 Xilanase = 0,95	CMCase = 0,9 Xilanase = 0,85
Atividades enzimáticas relativas: COM distribuição de ar	CMCase = 0,85 Xilanase = 0,55	CMCase = 0,4 Xilanase = 0,2

Como se observa, para a vazão equivalente a $Da_m = 1$ (70 L/h), as atividades enzimáticas relativas de CMCase e de xilanase foram mais elevadas em relação às atividades relativas obtidas com a vazão equivalente a $Da_m = 0,5$ (100 L/h) para ensaios com e sem distribuição de vazão. No entanto, com a vazão total de 70 L/h distribuída entre base e centro do leito, os módulos centrais continuam mostrando baixas atividades enzimáticas, enquanto os três últimos módulos apresentam elevadas atividades relativas, como mostra a Figura 5.14a e 5.14b.

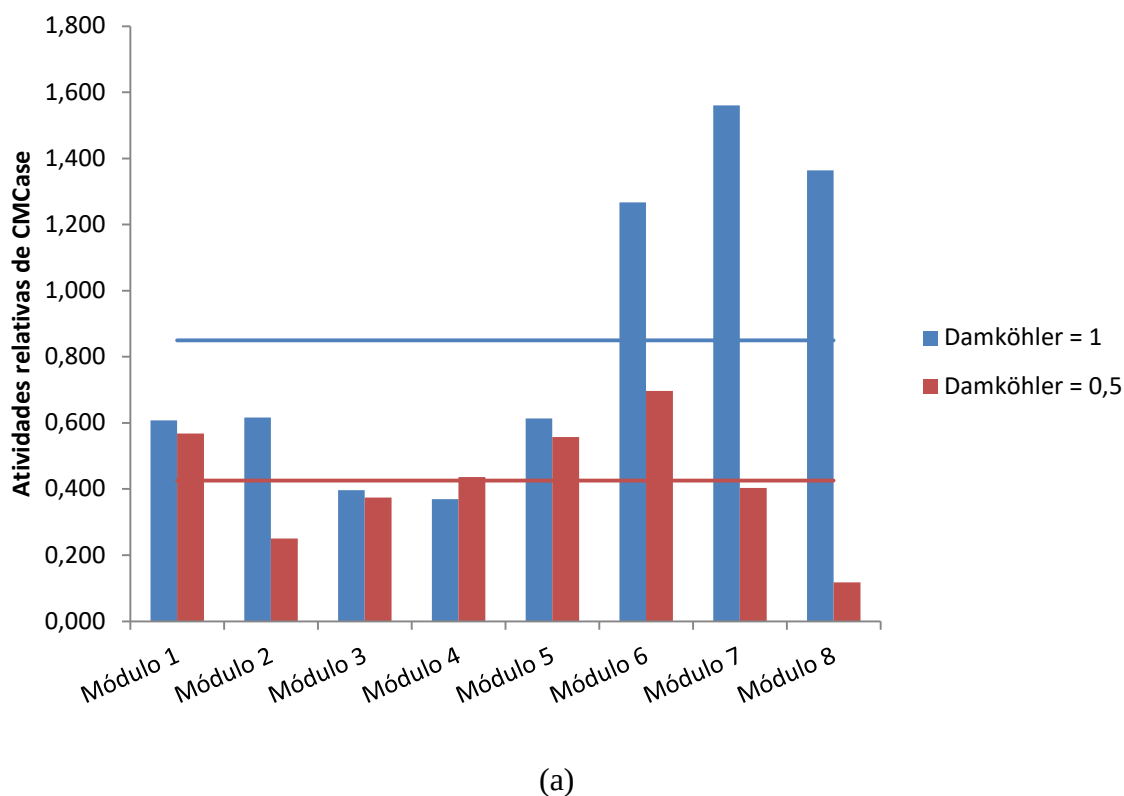
Com base na comparação entre os ensaios utilizando vazão distribuída e não distribuída, verifica-se que os ensaios sem vazão de ar distribuída no biorreator foram os que forneceram os melhores resultados de atividades enzimáticas relativas. Presume-se que tal fato ocorreu devido à maior disponibilidade de ar ao longo de todo o leito, ao contrário do que acontece quando há distribuição de vazão, onde apenas metade da vazão total percola a porção inferior do leito, e a partir do centro do mesmo, as vazões inseridas pelos módulos de entrada e central se juntam e percolam a parte superior do sistema. É possível ainda que as elevadas atividades nos últimos módulos fermentativos utilizando a vazão referente à $Da_m = 1$ se devam a esse motivo. De certa forma, a combinação dos parâmetros

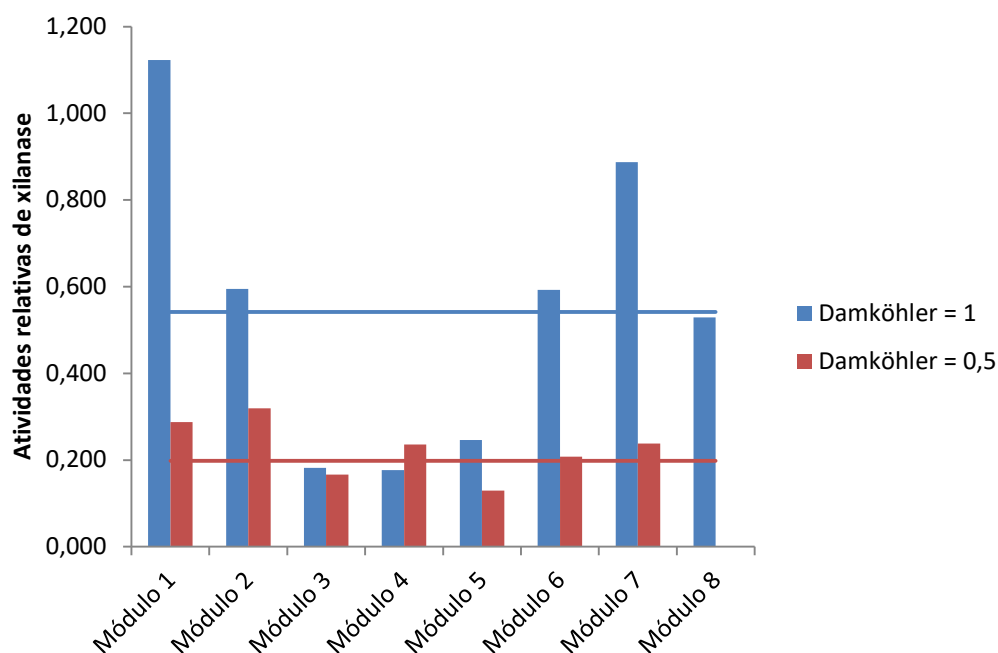
equivalentes à $Da_m = 1$ favoreceu a produção de atividades enzimáticas em comparação aos parâmetros equivalentes a $Da_m = 0,5$.

Os resultados de atividades enzimáticas relativas obtidos para cada módulo são mostrados nas Figuras 5.14a e 5.14b, que apresentam, respectivamente, as atividades relativas de CMCase e xilanase dos extratos obtidos no biorreator estreito composto por oito módulos fermentativos, acrescido da base e do topo, não inoculados.

Nota-se ainda que, apesar das atividades enzimáticas relativas nos ensaios utilizando vazão de 100 L/h, equivalente a $Da_m = 0,5$, terem sido baixas em comparação aos resultados obtidos utilizando vazão de 70 L/h, os valores de atividades obtidos em cada um dos módulos fermentativos desse ensaio se mantiveram relativamente homogêneos, mostrando menores variações entre módulos, ao contrário do observado para $Da_m = 1$.

Figura 5.14: Atividades enzimáticas relativas obtidas em cada módulo fermentativo do biorreator estreito com oito módulos fermentativos para $Q = 70$ e 100 L/h, com alimentação distribuída de ar, correspondentes a Da_m igual a 1 e 0,5, respectivamente: (a) CMCase; (b) xilanase. As linhas horizontais representam a média das atividades enzimáticas entre os módulos referentes às vazões utilizadas.

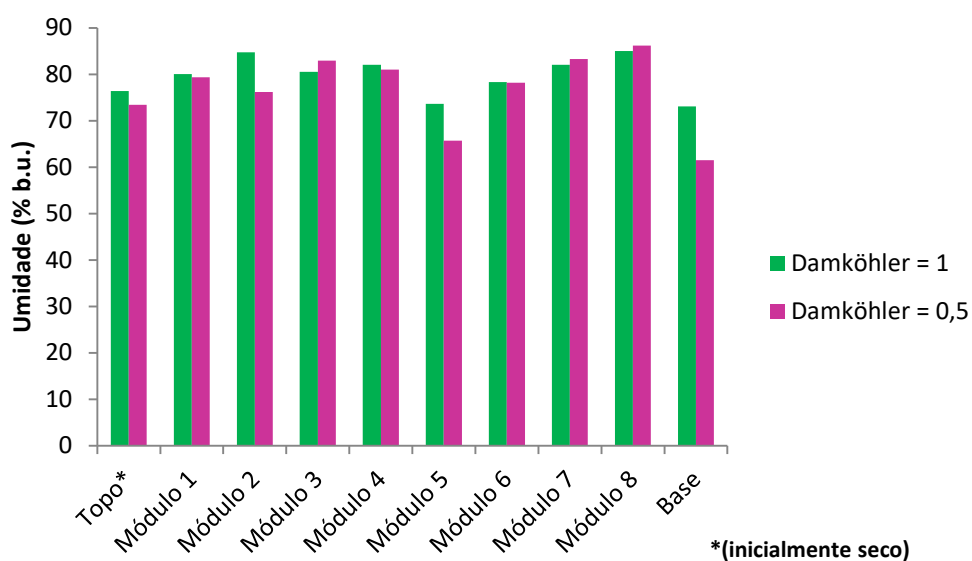




(b)

A Figura 5.15 apresenta as umidades finais do material fermentado por *M. thermophila* com as duas taxas de aeração, ao longo do biorreator com oito módulos fermentativos.

Figura 5.15: Umidade final do material fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator estreito com oito módulos fermentativos e alimentação distribuída de ar, para $Q = 70$ L/h e $Q = 100$ L/h, correspondentes a $Da_m = 1$ e $Da_m = 0,5$, respectivamente.



De acordo com as umidades apresentadas na Figura 5.15, nota-se que as mesmas permaneceram dentro da faixa de 75 % (b.u.) iniciais em ambos os ensaios, à exceção do quinto módulo quando utilizada vazão equivalente a $Damköhler = 0,5$. De posse dessa informação, é possível verificar que a vazão de 50 L/h, inserida a partir do módulo 5, provocou um ligeiro ressecamento no mesmo. Além disso, a vazão mais elevada não cumpriu o objetivo de elevar as atividades enzimáticas ao longo da altura do leito, de modo que, da maneira como foi realizada, não representa uma boa alternativa para o aumento de escala aqui proposto.

A vazão de 70 L/h, distribuída entre a base e o centro do biorreator, apesar de não ter resolvido o problema de atividades enzimáticas reduzidas nos módulos centrais, mostrou-se útil quando se trata de maximizar as atividades enzimáticas relativas médias totais do sistema, bem como dos três últimos módulos fermentativos.

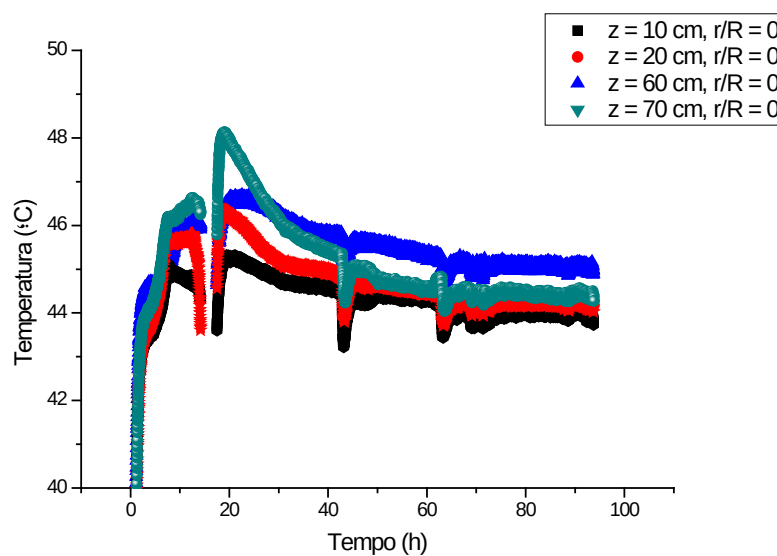
Analizando alternativas para que a produção de enzimas seja mais homogênea ao longo do comprimento do biorreator, sugere-se que a vazão seja distribuída de maneira distinta da empregada neste trabalho, inserindo uma fração maior de ar na base do leito e a outra menor no centro do mesmo, na tentativa de aumentar as atividades enzimáticas nos módulos centrais e evitar o ressecamento do módulo posterior ao local onde outra parte da vazão será inserida no sistema. Mais testes serão necessários para que seja possível promover elevada produção de enzimas ao longo dos módulos, para possibilitar, futuramente, o aumento do número de módulos de um biorreator de leito empacotado de modo que a altura não seja limitante para a produção de enzimas. Os resultados aqui obtidos indicam que o número de $Damköhler$ é limitado como critério para estabelecimento da vazão ideal de ar, devendo-se criar um novo critério baseado também na atividade respiratória, de forma que futuros trabalhos para a definição da aeração adequada deverão acoplar ambos os efeitos, o de remoção do calor metabólico e o de restrição de oxigênio.

A Figura 5.16a e 5.16b apresentam os perfis de temperatura na posição radial central em quatro posições longitudinais no biorreator com oito módulos fermentativos para $D_{am} = 1$ (70L/h) e 0,5 (100 L/h) e vazão distribuída de ar. Observa-se que as temperaturas máximas foram de 48,5 °C para $D_{am} = 1$ e 46 °C para $D_{am} = 0,5$. Nota-se ainda que as maiores temperaturas ocorreram nos módulos onde as atividades enzimáticas relativas foram mais elevadas, indicando maiores atividades metabólicas do fungo nesses locais. O aumento de temperatura de 3,5 °C, por sua vez, não é considerado

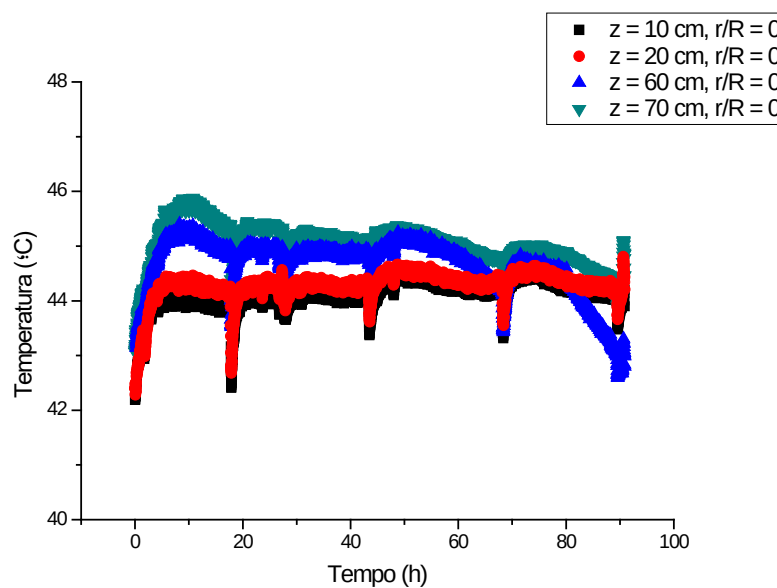
sobreaquecimento do sistema, de modo que não prejudica o metabolismo fúngico ou provoca desnaturação das enzimas.

Figura 5.16: Temperaturas medidas na posição radial central, em várias posições longitudinais, ao longo da fermentação com *M. thermophila*, para o biorreator estreito composto por oito módulos fermentativos para alimentação distribuída de ar:

(a) $Q = 70 \text{ L/h}$ ($Da_m = 1,0$), (b) $Q = 100 \text{ L/h}$ ($Da_m = 0,5$).



(a)



(b)

Em comparação com os ensaios em biorreator com oito módulos fermentativos sem distribuição de ar, as temperaturas máximas foram mais elevadas para o ensaio com distribuição de ar e $Da_m = 1$, uma vez que o valor para o ensaio sem distribuição de ar chegou a 47 °C no centro do leito, contrapondo-se a um valor de 48,5 °C para o ensaio com distribuição de ar. Para $Da_m = 0,5$, os valores máximos de temperatura foram ambos iguais a 46 °C. A maior temperatura máxima, no entanto, não significou maior produção de atividades enzimáticas, de maneira que se presume que a distribuição de ar ao longo do leito dificultou a remoção de calor do sistema nesse caso.

5.2.4 Efeito da densidade *bulk* do leito utilizando número de Damköhler modificado para determinação da taxa de escoamento de ar

Sabe-se que densidade de empacotamento ou densidade *bulk* é a razão entre a massa úmida de substrato e o volume do recipiente. As densidades *bulk* correspondentes aos ensaios em leitos compostos por dois módulos fermentativos contendo 45, 60 e 75 gramas de substrato cada módulo, como descrito na seção 4.7.1.4, estão representadas na Tabela 5.4, bem como as porosidades de cada leito e as respectivas vazões de ar calculadas para os leitos compostos por dois módulos fermentativos e correspondentes a $Da_m = 1$. Ressalte-se que o leito mais denso foi composto por partículas com diâmetro menor do que 0,84 mm ($d_p < 0,84$ mm).

Tabela 5.4: Densidade *bulk* e porosidade de leitos compostos por diferentes massas de substrato e vazões de ar correspondentes aos sistemas utilizando $Da_m = 1$.

Massa substrato/módulo fermentativo [g]	Densidade <i>bulk</i> (ρ_{bulk}) [g/cm ³]	Porosidade (ϵ) [-]	Vazão de ar (Q) [L/h]
45	0,395	0,66	25,06
60	0,526	0,55	33,16
75	0,658	0,35	42,06

Na Figura 5.17, são mostradas fotos dos leitos compostos por diferentes densidades *bulk*.

Figura 5.17: Leitos compostos por distintas massas de substrato, com partículas de bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 7:3 (m/m), antes da fermentação: (a) 45 gramas/módulo, (b) 60 gramas/módulo e (c) 75 gramas de BC triturado/módulo.



(a)

(b)

(c)

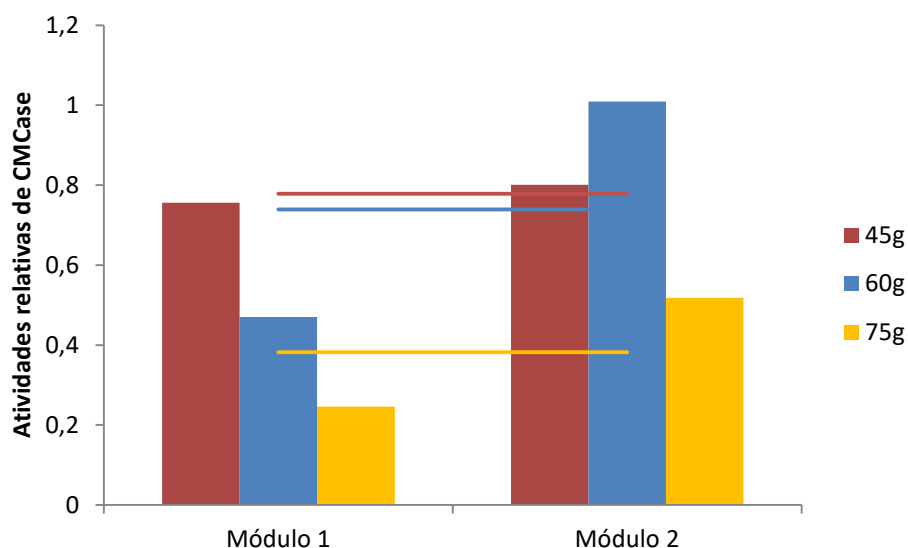
É possível visualizar que o leito menos denso é mais poroso, com maiores interstícios para a passagem de ar e o crescimento fúngico. O leito de densidade intermediária é composto por fibras mais comprimidas, possuindo menos espaços vazios, e o leito mais denso, composto por fibras menores, é nitidamente mais compacto, possuindo muito poucos espaços vazios, podendo assim prejudicar a dispersão de ar através do meio fermentativo e também o crescimento das hifas do fungo.

Os resultados de atividades enzimáticas relativas em cada módulo fermentativo dos leitos compostos pelas distintas densidades *bulk* são mostrados na Figura 5.18. Nota-se que, no módulo 1, as atividades de CMCase e xilanase foram decrescentes com o aumento da densidade do leito. Tal comportamento já era esperado, uma vez que maiores porosidades resultam em dispersão mais uniforme de ar, proporcionando transporte eficiente de oxigênio e de CO₂, o que favorece o metabolismo microbiano.

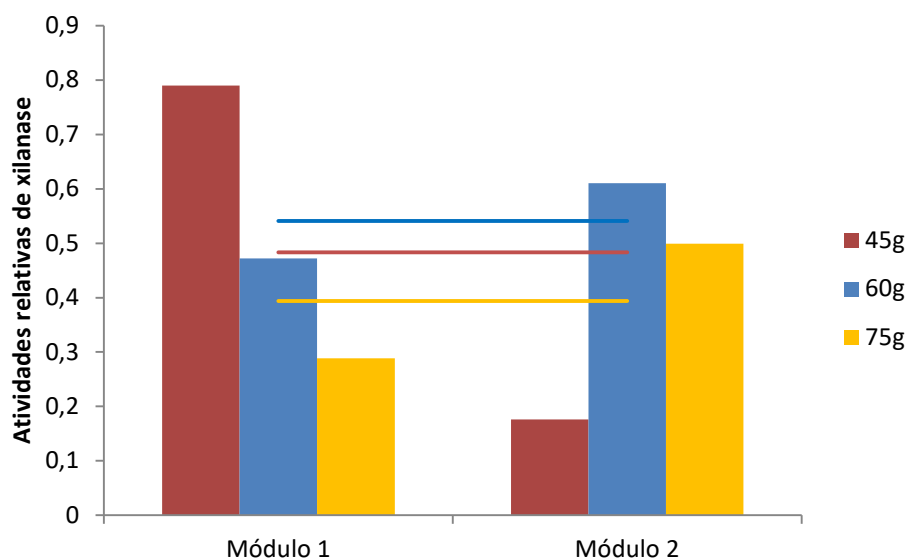
Analisando as atividades enzimáticas relativas de CMCase e xilanase do módulo 2, verifica-se uma mudança em relação ao módulo 1, onde as maiores atividades enzimáticas relativas são obtidas para o leito de densidade intermediária. Esse resultado é indicativo de um problema físico observado ao final dos ensaios, como citado anteriormente no item 5.2 sobre o estudo do efeito do tamanho das partículas de BC sobre a produção de atividades enzimáticas.

Nos ensaios aqui discutidos, o leito foi composto por dois módulos fermentativos, acrescidos do módulo de entrada e o de saída, não inoculados. Externamente, cada módulo é separado do adjacente por uma flange de nylon, porém, internamente, não existem barreiras físicas entre os módulos, sendo as separações dos mesmos feitas apenas com telas metálicas inseridas no momento da montagem do reator, como já citado. A base do fermentador é composta por esferas de vidro, sendo que não há espaço disponível para a expansão do substrato compactado do módulo 1. Acima dos dois módulos fermentativos, foi alocado um módulo recheado com partículas de bagaço de cana de fibras grossas e secas, para retenção da umidade excedente do ar, e, acima deste, foi instalado um módulo não recheado, para dar maior uniformidade térmica ao topo do biorreator, como discutido anteriormente e mostrado na Figura 5.3. Notou-se que, após as 96 horas de fermentação, no leito composto por 60 gramas de substrato, houve uma expansão do módulo 2 para a parte superior, alterando assim a densidade do leito, bem como sua porosidade, o que influenciou na elevada produção de CMCase e xilanase nesse ensaio.

Figura 5.18: Atividades enzimáticas relativas dos extratos produzidos por *M. thermophila* nos ensaios em biorreator de leito empacotado composto por dois módulos fermentativos, variando massa de substrato em cada módulo e vazão de ar: (a) CMCase e (b) Xilanase. As linhas horizontais representam a média de atividades enzimáticas referentes a cada ensaio.



(a)

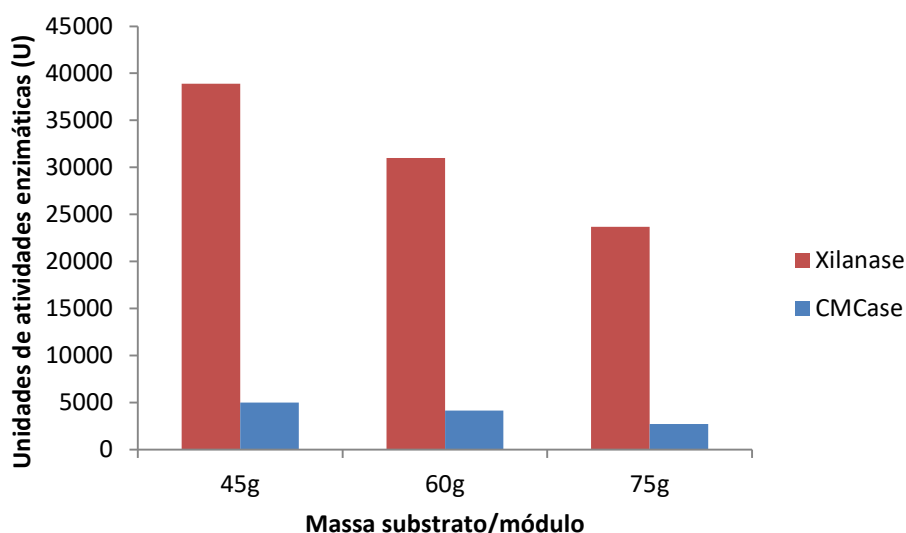


(b)

Dessa forma, destaca-se que, dos resultados de atividades enzimáticas relativas obtidos utilizando as distintas densidades de leito, apenas os resultados obtidos no módulo 1 são representativos neste estudo. Nesse contexto, sabendo que foram utilizadas diferentes massas de substrato em cada ensaio fermentativo, a representação dos resultados em

atividades enzimáticas relativas apresentada não é conclusiva. Para que se tenha uma percepção mais ampla da produção de enzimas em função da variação da densidade bulk do leito, a Figura 5.19 apresenta o total de unidades de atividades enzimáticas (U) resultantes de cada experimento, obtida multiplicando-se as atividades relativas pela média dos resultados em embalagens fermentativas (U/gss) e pela massa de substrato sólido seco inicial (gss).

Figura 5.19: Atividades enzimáticas totais (U) dos extratos produzidos por *M. thermophila* obtidos em biorreator de leito empacotado nos ensaios variando massa de substrato por módulo fermentativo.



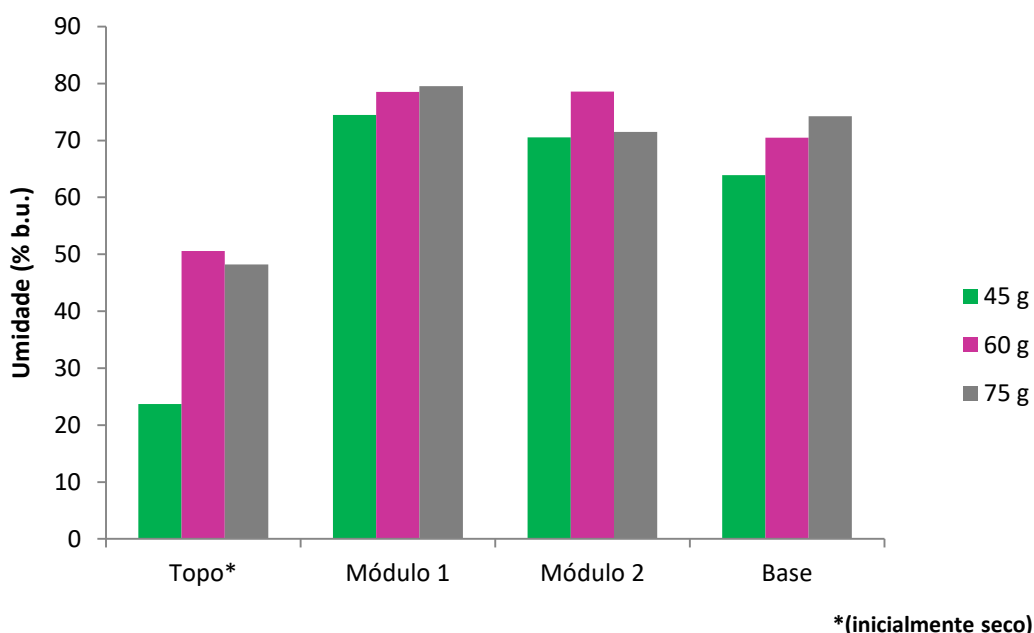
Com base na Figura 5.19, nota-se que a produção de unidades de atividades enzimáticas totais (U) é inversamente proporcional à massa de substrato em cada módulo fermentativo. O resultado indica que o aumento da massa de substrato não é uma maneira eficaz para aumentar a produção de atividades enzimáticas totais, uma vez que a menor massa de substrato foi capaz de produzir quantidades mais elevadas de unidades enzimáticas. Dessa forma, verifica-se que o aumento da densidade dos leitos fermentativos não consiste em uma estratégia para incrementar a produção enzimática.

De acordo com Farinas (2015), o meio gasoso na FES pode afetar significativamente o crescimento celular e a produção de enzimas, sendo que, para os módulos compostos por 60 e 75 gramas, o aumento da densidade bulk dos leitos resultou na redução das

porosidades dos mesmos, dificultando assim a percolação de ar pelo leito, bem como o transporte de oxigênio e dissipação de CO₂.

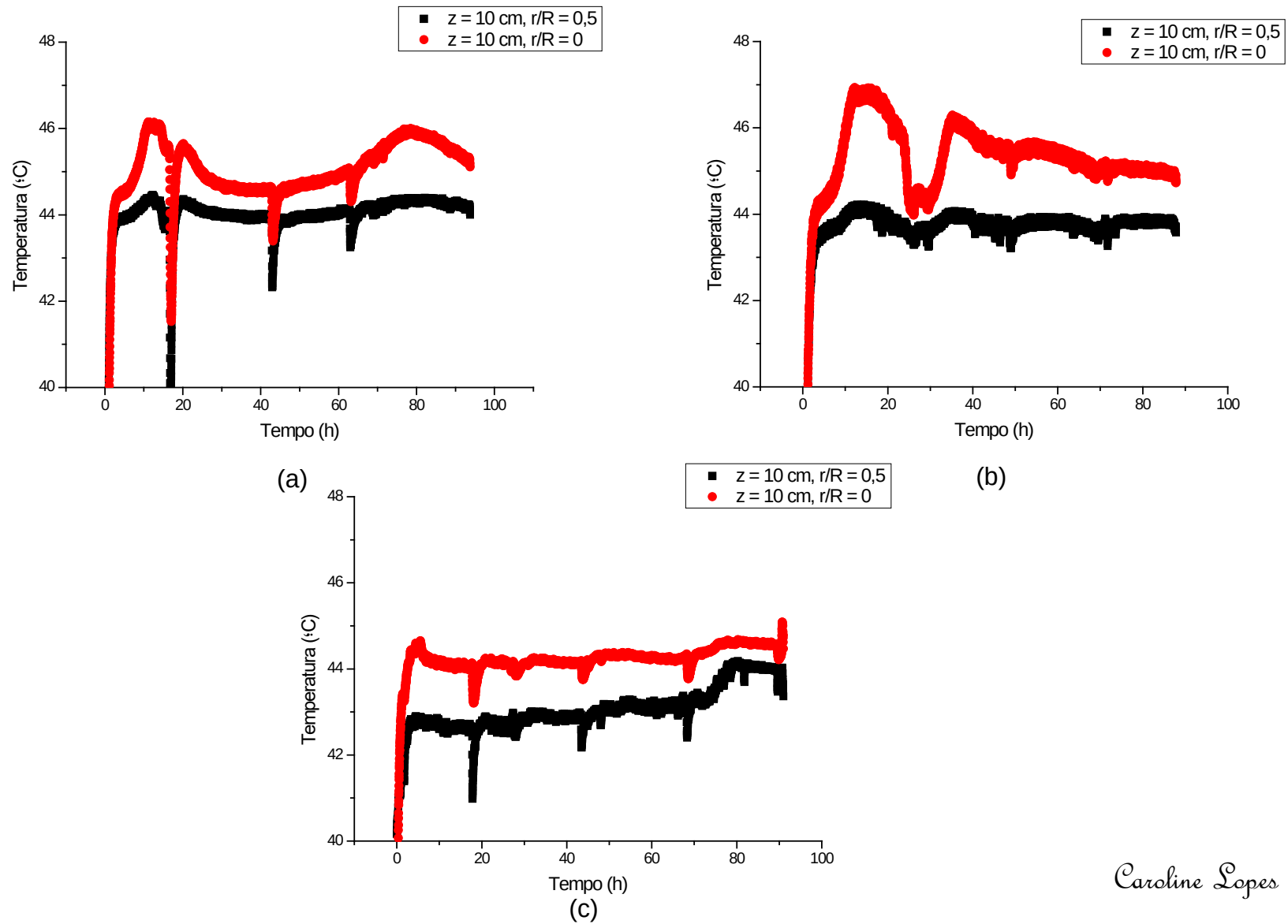
A Figura 5.20 apresenta as umidades finais do material fermentado para as três densidades de leito testadas, com suas respectivas vazões de ar. Nota-se que não houve secagem excessiva em nenhum dos dois módulos fermentativos para todos os leitos testados.

Figura 5.20: Umidade final do material fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator estreito com dois fermentativos, utilizando diferentes densidades *bulk* de empacotamento.



As Figuras 5.21a, 5.21b e 5.21c apresentam os perfis de temperatura em duas posições radiais distintas, entre os dois módulos fermentativos, para as três densidades *bulk* testadas. Nota-se que a temperatura máxima é atingida com cerca de 10 horas de fermentação para leitos compostos por 45 e 60 g substrato/módulo. No ensaio utilizando 75 g substrato/módulo, o perfil de temperatura permaneceu praticamente homogêneo ao longo das 96 horas de fermentação, indicando nesse caso, baixo metabolismo fúngico.

Figura 5.21: Temperaturas ao longo da fermentação com *M. thermophila* em BC:FT 7:3 em diferentes posições do biorreator com 0,4 m de comprimento total: (a) 45 g substrato/módulo; (b) 60 g substrato/módulo e (c) 75 g substrato/módulo.



Os resultados obtidos para o leito mais denso, comparados com os resultados do item 5.2.1 indicam que, para sistemas com elevada densidade *bulk*, o cálculo da vazão com base no número da Damköhler não resulta em valores de vazão elevados o suficiente para permitir boas condições para o crescimento do microrganismo no meio, uma vez que o ar encontra caminhos preferenciais de escoamento próximo à parede do tubo, limitando sua disponibilidade nas regiões centrais do leito. Dessa forma, destaca-se que, para leitos com elevada densidade *bulk*, o uso do número de Damköhler modificado para estabelecimento da vazão ideal não é o método mais indicado.

O leito menos denso, $\rho_{bulk} = 0,395 \text{ g/cm}^3$, apresentou temperatura máxima de 46,5 °C e posteriormente, a temperatura média do leito manteve-se à 45 °C, indicando que a vazão de ar aplicada ao sistema, juntamente à porosidade do mesmo, permitiram a aeração eficiente do leito e remoção do calor metabólico gerado. Já o leito de densidade intermediária, $\rho_{bulk} = 0,526 \text{ g/cm}^3$, apresentou maior temperatura máxima, em torno de 47 °C, uma vez que nele houve maior produção de enzimas e, consequentemente, maior geração de calor metabólico. Além disso, a densidade intermediária dificulta a remoção de calor por convecção e advecção. Como mencionado anteriormente, o leito mais denso, $\rho_{bulk} = 0,658 \text{ g/cm}^3$, apesar da alta densidade, não resultou em maior elevação de temperatura, resultado do baixo crescimento e metabolismo fúngico.

De maneira geral, neste experimento o número de Damköhler modificado igual a 1 demonstrou melhores resultados em leitos mais porosos, de densidade *bulk* equivalente a $0,395 \text{ g/cm}^3$.

5.3 BIORREATOR LARGO

5.3.1 Efeito da distribuição de vazão de ar sobre a produção de enzimas em biorreator *largo*

No biorreator de 20 cm de diâmetro, aqui denominado *largo*, foram realizados ensaios com diferentes alternativas de inserção de ar na coluna: distribuindo-se em duas frações (uma na base e outra no meio da coluna através de um anel interno à flange) e através de um tubo perfurado inserido longitudinalmente no biorreator. Em todos os ensaios, foram empregados quatro módulos fermentativos, acrescidos do módulo de

entrada e do de saída, ambos não inoculados. Os módulos fermentativos foram empacotados com os substratos na densidade *bulk* igual a $0,395 \text{ g/cm}^3$. Foi empregado o número de Damköhler igual a 1 para estabelecer a vazão de escoamento a ser empregada, resultando em 690 L/h. Na Tabela 5.5 são apresentadas as diferentes alternativas de inserção do ar no biorreator.

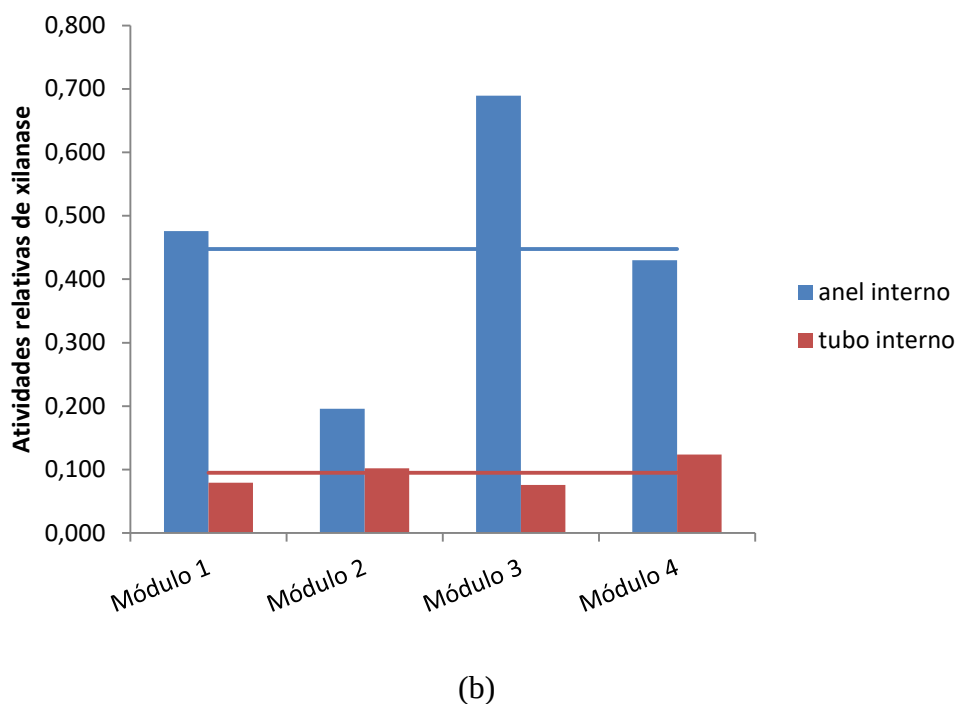
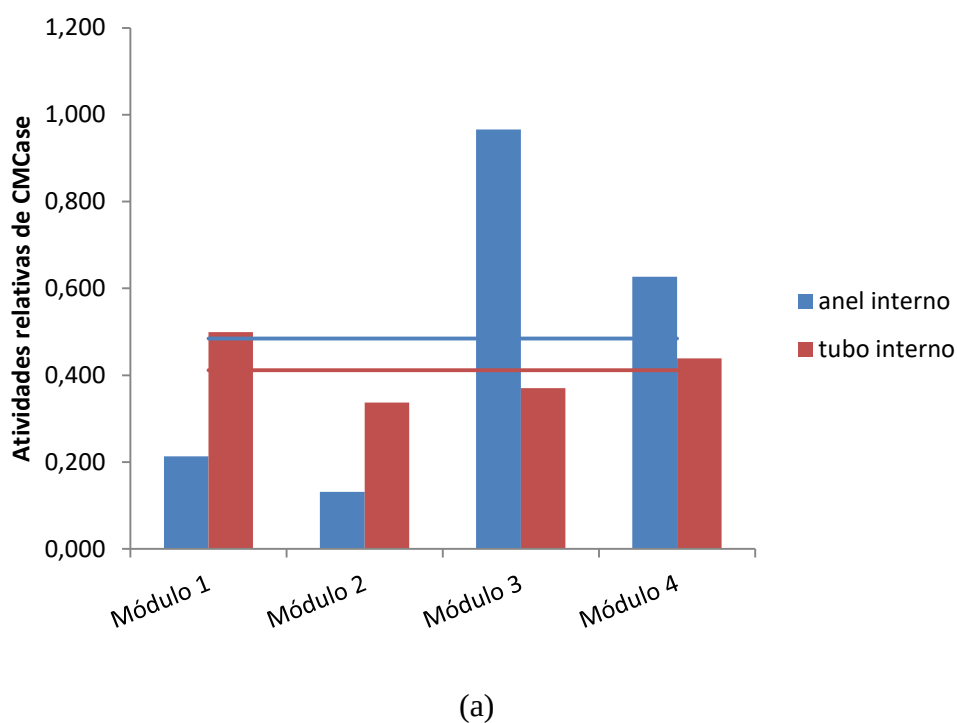
Nas Figuras 5.22a e 5.22b são apresentadas, respectivamente, as atividades enzimáticas relativas de CMCase e xilanase, dos extratos obtidos no biorreator largopara as alternativas de inserção de ar distribuída entre a base o o tmeio da coluna e através do tubo perfurado. Na Figura 5.22, as linhas horizontais referem-se às atividades relativas médias no biorreator.

Tabela 5.5: Tipo de aeração e distribuição da vazão de ar utilizados.

Tipo de aeração	Inserção na base e no centro do leito (anel interno)		Tubo central longitudinal
Local de inserção de ar	<i>Inferior do leito</i>	<i>Centro do leito</i>	4 orifícios de 2 mm cada em cada módulo fermentativo
Vazão de ar em cada ponto	345 L/h	345 L/h	43,125 L/h (cada orifício)
Vazão total (Q)	690 L/h		690 L/h

As atividades relativas obtidas a partir do ensaio utilizando como forma de aeração o tubo interno não variaram de maneira expressiva ao longo do leito, indicando uma alternativa para produção de enzimas de maneira homogênea ao longo de um leito fermentativo. Já nos resultados referentes às atividades relativas obtidas fracionando-se a vazão de ar em duas correntes, uma inserida na base e outra no meio da coluna, houve grande heterogeneidade, observando-se comportamento similar ao observado para o biorreator estreito, vide Figura 5.11. Nota-se que o terceiro módulo, logo em seguida à inserção de ar através do anel interno, foi o local onde ocorreu a maior produção de ambas as enzimas. Os valores de atividades enzimáticas para os módulos após a inserção de ar pelo centro do leito foram de modo geral mais elevadas tanto no biorreator *estrito*, como no *largo*.

Figura 5.22: Atividades enzimáticas relativas obtidas em cada módulo fermentativo do biorreator largo com quatro módulos fermentativos e $Q = 690$ L/h, correspondente a $Da_m = 1,0$, com alimentação distribuída de ar e através de um tubo perfurado (tubo interno) e inserida na base e no centro do leito (anel interno): (a) CMCase; (b) xilanase. As linhas horizontais representam a média das atividades enzimáticas entre os módulos referentes às formas de inserção do ar na coluna.



Em relação às atividades relativas médias, foram superiores para a alternativa de inserção distribuída de ar (anel interno) em relação à inserção de ar através do tubo central longitudinal. No entanto, em vista dos resultados não homogêneos obtidos para a distribuição de ar em duas frações (anel interno), mais estudos a respeito da porção da vazão total a ser inserida nas posições central e inferior do leito devem ser feitos, ansiando encontrar valores que permitam a produção de enzimas de maneira mais homogênea e elevada ao longo de todo o leito.

Os dados aqui apresentados, entretanto, não são representativos do sistema proposto para o estudo, uma vez que, conforme foram adicionados módulos fermentativos um sobre o outro, a elevada quantidade de substrato úmido (75 % b.u.) compactou o leito, modificando a densidade *bulk* inicial do sistema. Além de interferir no cálculo da vazão, a mudança de porosidade do leito interfere na fluidodinâmica do sistema e também nas propriedades de transferência de calor e massa, como permeabilidade do leito, condutividade térmica e difusividade mássica (TSOTSAS, 2010). A Figura 5.23 mostra o aspecto do quarto módulo fermentativo, o último de baixo para cima, revelando que boa parte do leito pertencente a essa seção foi compactada juntamente aos módulos inferiores.

Figura 5.23: Aspecto do quarto e último módulo fermentativo no momento de desmontagem do biorreator largo.



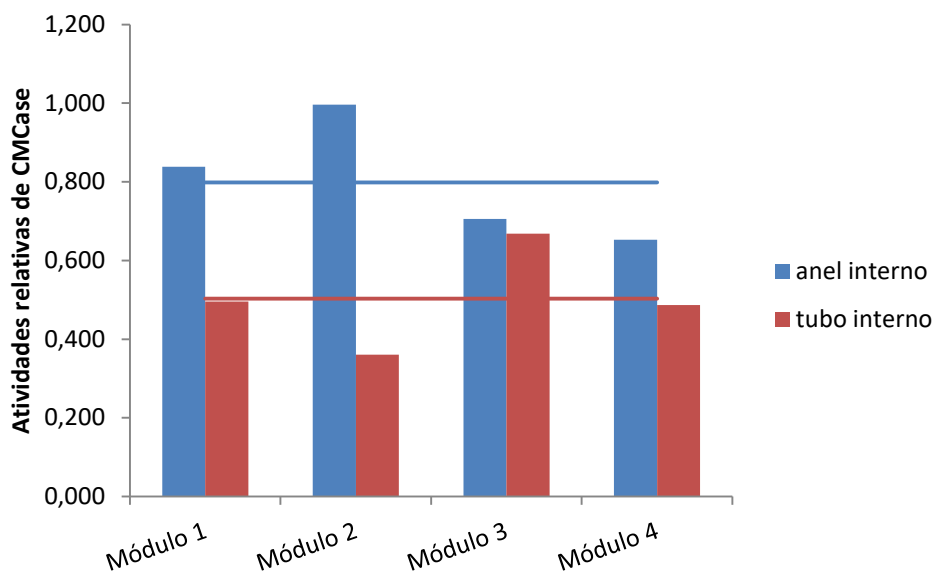
Casciatori (2015) também realizou ensaios fermentativos no mesmo biorreator, composto por módulos de 20 cm de diâmetro e com 4,5 módulos fermentativos utilizando o mesmo fungo *M. thermophila*, tendo como substrato a mistura BC:FT na proporção 7:3 (m/m), e o fungo *Trichoderma reesei* QM9414, tendo como substrato a mistura BC:FT na proporção 9:1 (m/m), porém não reportou a compactação do leito. Para contornar esse problema operacional, foram utilizadas telas de metal devidamente esterilizadas, inseridas na intersecção de cada módulo fermentativo, conforme mostra a Figura 5.24. As telas foram utilizadas tanto no para os experimentos utilizando o anel interno de alimentação de ar, como o tubo interno.

Figura 5.24: Tela metálica utilizada na intersecção de cada um dos módulos durante os ensaios fermentativos no biorreator largo.

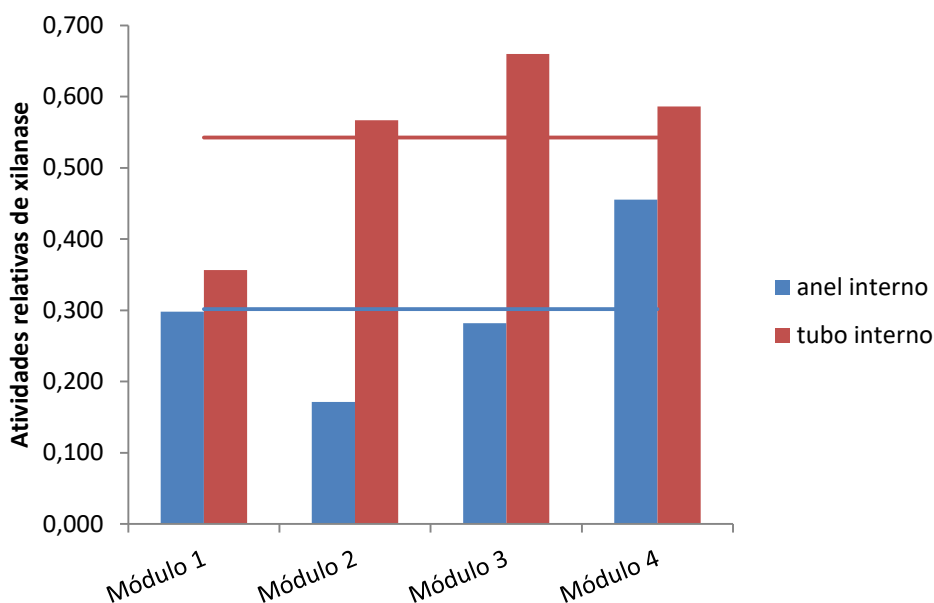


Na Figura 5.25, são mostrados os resultados de atividades enzimáticas relativas de CMCase e xilanase dos extratos obtidos ao se utilizar as telas de separação entre cada módulo do biorreator largo. Note-se que a média de atividades relativas de CMCase foi mais elevada para o ensaio fermentativo utilizando o anel interno entre os módulos 2 e 3 do biorreator. Por outro lado, a média de atividades relativas de xilanase foi mais elevada para o ensaio utilizando tubo interno para distribuição de ar.

Figura 5.25: Atividades enzimáticas relativas obtidas em cada módulo fermentativo do biorreator largo com quatro módulos fermentativos para $Q = 670$ L/h, correspondente a D_{am} igual a 1,0, com alimentação distribuída de ar e através do tubo interno: (a) CMCase; (b) xilanase. As linhas horizontais representam a média das atividades enzimáticas entre os módulos referentes às formas de inserção do ar na coluna.



(a)



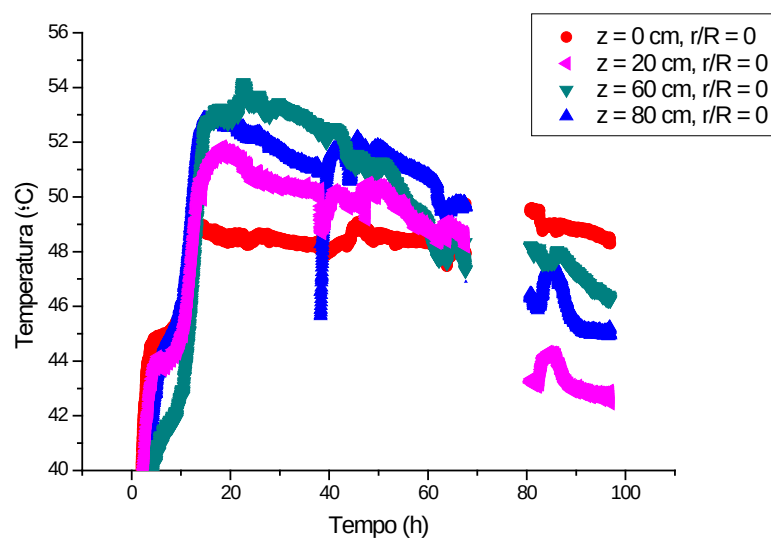
(b)

Comparando-se as atividades médias atingidas nos reatores com 7,62 e 20 cm de diâmetro interno, utilizando o anel interno para alimentação de ar, observa-se que a ampliação de escala não prejudicou significativamente o rendimento em CMCase, embora as atividades relativas de xilanase tenham reduzido. No reator estreito, foram obtidas atividades relativas de CMCase e xilanase médias de 0,85 e 0,54 sob taxa de aeração 70 L/h ($Q_{\text{inferior}} = 35 \text{ L/h}$ e $Q_{\text{centro}} = 35 \text{ L/h}$), respectivamente, e no biorreator largo, essas atividades foram 0,80 e 0,30 sob taxa de aeração 690 L/h ($Q_{\text{inferior}} = 345 \text{ L/h}$ e $Q_{\text{centro}} = 345 \text{ L/h}$).

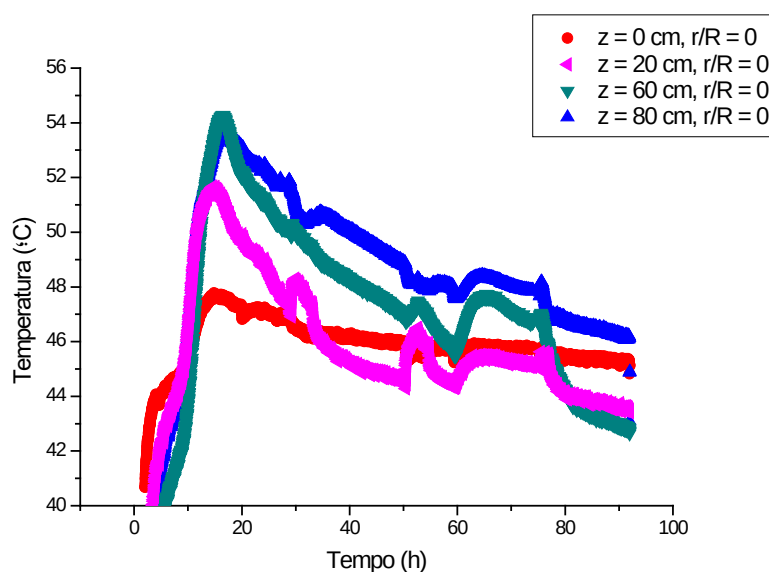
Casciatori (2015), empregando o mesmo biorreator, fungo e substrato, observou a mesma tendência no biorreator estreito (7,62 cm de diâmetro interno), utilizando taxa de aeração equivalente a 120 L/h, e no biorreator largo (20 cm de diâmetro interno), sob taxa de aeração de 900L/h, onde a ampliação de escala não prejudicou significativamente o rendimento em CMCase, embora a atividade xilanase também tenha sido reduzida.

Nas Figuras 5.26a e 5.26b é possível observar os perfis temporais de temperatura no centro do leito em diferentes posições axiais dos ensaios utilizando anel interno entre os módulos fermentativos 3 e 4 (a) e tubo central (b), como formas de alimentação de ar auxiliar.

Figura 5.26: Temperaturas medidas na posição radial central, em várias posições longitudinais, ao longo da fermentação com *M. thermophila*, para o biorreator largo composto por quatro módulos fermentativos, para $Q = 670 \text{ L/h}$, correspondente a Da_m igual a 1,0: (a) com alimentação distribuída de ar e (b) através do tubo interno.



(a)



(b)

Diferentemente dos ensaios em biorreator de 7,62 cm de diâmetro, onde não houve aquecimento significativo do leito, nos ensaios em biorreator largo verificou-se aumento substancial da temperatura no centro do leito, ao longo de todo seu comprimento. Em ambos os ensaios a temperatura máxima atingida foi em torno de 54,5 °C, com cerca de 20 horas de fermentação. Depois desse tempo, as temperaturas diminuíram em todas as posições longitudinais, ficando entre 45 e 52 °C.

Na Figura 5.27, são apresentadas as umidades finais do material fermentado em função do comprimento do biorreator para ambos os ensaios fermentativos. Verificou-se que, independentemente do tipo de aeração utilizado no sistema, as umidades de cada módulo permaneceram dentro da faixa ideal, de 75% (b.u.).

Além das umidades satisfatórias, foi observado intensa colonização do fungo ao longo dos leitos. Nos ensaios utilizando anel interno entre os módulos 3 e 4, foi observado crescimento fúngico mais expressivo nas bordas do leito, como mostra a Figura 5.28, onde o ar formou caminhos preferenciais para escoamento, fato esse também observado por Casciatori (2015), utilizando apenas aeração inserida na parte inferior do leito. A Figura 5.29 representa o aspecto final do leito utilizando tubo interno para distribuição do ar. Como é possível verificar na figura, o crescimento fúngico foi mais homogêneo, resultado da aeração proveniente do centro do leito, que favoreceu a dispersão uniforme do ar por todo o meio fermentativo, minimizando a ocorrência de caminhos preferenciais.

Figura 5.27: Umidade final do material fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator largo com quatro módulos fermentativos, $Q = 670$ L/h, correspondente a $Da_m = 1,0$, utilizando anel interno e tubo interno para distribuição da vazão de ar no sistema.

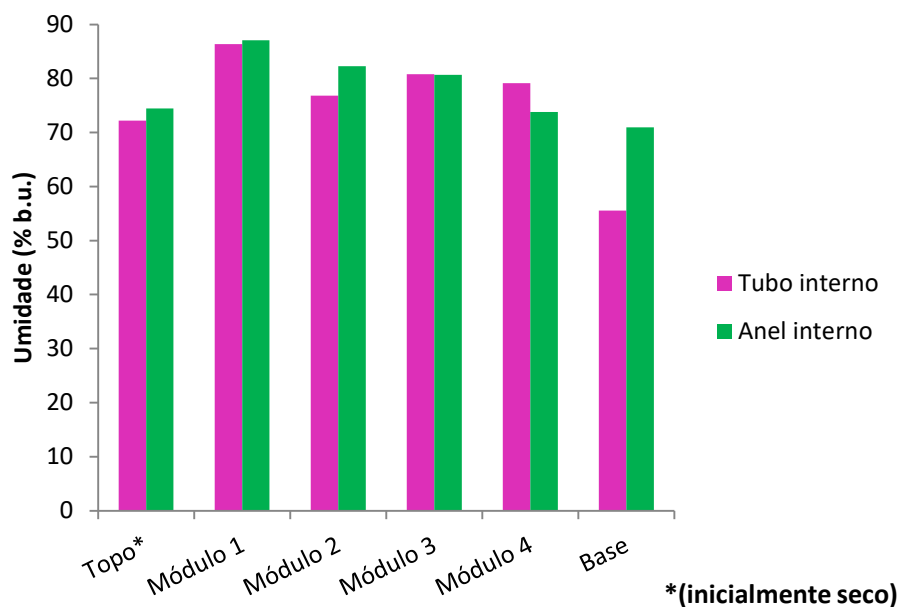


Figura 5.28: Aspecto do leito fermentativo após 96 horas de fermentação utilizando anel interno no módulo central para inserção de ar.



Figura 5.29: Aspecto do leito fermentativo após 96 horas de fermentação utilizando tubo interno longitudinal para inserção de ar.



6. Conclusões

-De maneira geral, observou-se que a ampliação de escala de biorreatores de leito empacotado é viável tecnicamente e tem potencial para aplicações industriais futuras;

-Substrato como bagaço de cana de açúcar proveniente do território brasileiro pode apresentar distintas composições, decorrente do ambiente de crescimento, da genética vegetal e das condições de processamento, podendo ocasionar em valores distintos de produção enzimática por FES mesmo que sob as mesmas condições de processo;

-Quando utilizada vazão de ar elevada em um leito fermentativo de alta densidade, partículas de substrato de tamanhos reduzidos produzem melhores resultados em produção de atividades enzimáticas devido à maior superfície de contato com o agente fermentativo e com a fase gasosa do sistema, enquanto que partículas maiores favorecem a canalização do ar, limitando a disponibilidade de oxigênio no leito, prejudicando assim o metabolismo fúngico;

-O número de Damköhler modificado igual a 1,5 representa um valor de vazão de ar que limita a produção de atividades enzimáticas por FES, enquanto que valores de Damköhler iguais a 1 e 0,5 permitem a obtenção de melhores resultados em leitos com quatro módulos fermentativos;

-Em biorreatores compostos por oito módulos fermentativos e taxas de aeração correspondentes a $Da_m = 1$ e 0,5, a aeração empregada foi eficiente para manter a temperatura dentro de valores aceitáveis para o processo fermentativo, enquanto que as atividades enzimáticas foram fortemente afetadas pela vazão de escoamento, chegando a variar expressivamente em cada um dos módulos fermentativos. Assim, o número de Damköhler mostra-se limitado como critério para estabelecimento da vazão ideal de ar, devendo-se criar um novo critério baseado também na atividade respiratória;

-A vazão distribuída de ar, da maneira como foi empregada no biorreator estreito, composto por oito módulos fermentativos, não favoreceu a produção enzimática, de forma que novos testes devem ser feitos inserindo uma fração maior de ar na base do leito e a

Caroline Lopes Perez

Conclusões

outra menor no centro do mesmo, na tentativa de aumentar as atividades enzimáticas dos módulos centrais, e possibilitar a maior produção de atividades enzimáticas totais;

-Quando da utilização do numero de Damköhler modificado igual a 1 para determinação da vazão de ar em leitos de distintas densidades *bulk*, melhores resultados em produção de atividades enzimáticas foram obtidos para leitos menos densos, de $\rho_{bulk} = 0,395 \text{ g/cm}^3$;

-No biorreator de leito empacotado com 20 cm de diâmetro interno, ocorrem variações radiais intensas de temperatura e considerável sobreaquecimento no centro do leito quando utilizadas ambas as estratégias de distribuição da vazão de ar: anel interno central e tubo interno longitudinal, devido ao afastamento das camisas resfriadas, indicando a necessidade de aprimoramento de ambos os sistemas;

-Dos processos aqui apresentados, foram obtidos bons rendimentos de atividades enzimáticas (celulase e xilanase). Considerando a carência de uma estratégia para a ampliação de escala, o numero de Damköhler é uma alternativa interessante, e ajustes que incorporem o conceito de atividade respiratória do microrganismo empregado no sistema devem ser desenvolvidos para otimizar os resultados aqui apresentados.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Como sugestões para futuros trabalhos na área, propõe-se:

- Melhorar a instrumentação do equipamento com analisadores de gases, a fim de entender o mecanismo de atividade respiratória e incorporá-lo a modelos que permitam o cálculo da vazão de ar ideal a ser utilizada em sistemas para FES;
- Utilizar a modelagem matemática, bem como parâmetros do processo, para que possam ser determinadas as melhores condições de operação dos sistemas;
- Pesquisar em alternativas para distribuição da vazão e ar em sistemas em escala industrial;
- Desenvolver estratégias para operacionalizar as etapas de preparo e inoculação do substrato e de extração das enzimas ao final do processo.

Referências Bibliográficas

ALI, H. K. Q.; ZULKALI, M. M. D. Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 25, p. 255–66, 2011.

ASHLEY, V. M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical engineering Journal**, v. 3, n2, p.141-150, 1999.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S., KAUR, J., SAINI, H. S., BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504–510, 2007.

BALASUBRAMANIAM, A. K.; NAGARAJAN, K. V.; PARAMASAMY, G. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 36, p. 1241-1247, 2001.

BARRIOS-GONZALEZ, J. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process biochemistry**, v. 47, p. 175–85, 2012.

BEESEON, W. T.; IAVARONE, A. T.; HAUSMANN, C. D.; CATE, J. H.; MARLETTA, M. A. Extracellular aldonolactonase from *Myceliophthora thermophila*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, p. 650 –656, 2010.

BEHERAA, S. S.; RAMESH C. RAY, R. C. - Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656–669, 2016.

BERKA, R. M.; SCHNEIDER, P.; GOLIGHTLY, E. J.; BROWN, S. H.; MADDEN, M.; BROWN, K. M.; HALKIER, T.; MONDORF, K.; XU, F. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3151–3157, 1997.

BHAT, K. M.; MAHESHWARI, R. *Sporotrichum thermophile* Growth, Cellulose Degradation, and Cellulase Activity. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2175–2182, 1987.

BIZ, A.; A. T. J. F; PITOL, L. O.; MEDINA, B. S; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation of a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 111, v. 15, p. 54–62, 2016.

- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction, **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 2, p. 199–204, 2009.
- BUCK, A.; CASCIATORI, F. P.; THOMEO, J. C.; TSOTSAS, E. Model-based control of enzyme yield in solid-state fermentation, **Procedia Engineering**, v. 102, p. 362–371, 2015.
- BULTER, T.; ALCALDE, M.; SIEBER, V.; MEINHOLD, P.; SCHLACHTBAUER, C.; ARNOLD, F. H. Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 987–995, 2003.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2196–2204, 2007.
- CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. M., A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1467–1475, 2011.
- CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.
- CASCIATORI, F. P. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leito fixo**. 190f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.
- CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Cellulase production in packed bed bioreactor by solid-state fermentation. In: **European Biomass Conference and Exhibition Proceedings**, p. 1539–1546, 2013.
- CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; TABOGA, S. R.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid byproducts applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 255, p. 214–224, 2014.
- CERDA, A.; EL-BAKRY, M.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Long term enhanced solid-state fermentation: Inoculation strategies for amylase production from soy and bread wastes by *Thermomyces sp.* in a sequential batch operation, **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, p. 2394–2401, 2016.
- CHEN, H. Z.; HE, Q. Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 1619–25, 2012.

Referências Bibliográficas

CHEN, H. Z.; XU, J.; LI, Z.H. Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 117–122, 2005.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SIRINOPHAKUN, P. **Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates**. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 83, p. 1012–1018, 2008.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291–302, 2006.

da SILVA, A. S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON E. P. S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation, **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402–7409, 2010.

DASHTBAN, M.; MAKI, M.; LEUNG, K. T.; MAO, C.; QIN, W. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 302–309, 2010.

DEL BIANCHI, V. L.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHMIDELL, W; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., (Coord.). **Biociologia Industrial**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, v. 2, p.247-270, 2001.

DUBEY, R.; JAKEER, S.; GAUR, N. A. Screening of natural yeast isolates under the effects of stresses associated with second-generation biofuel production, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, p. 509–516, 2016.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113–25, 2003.

E. TSOTSAS, in: Verein Deutscher Ingenieure, VDI (Ed.), Heat atlas, Springer Verlag, Berlin, 2010.

EL-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SANCHEZ, A. From wastes to high value added products: novel aspects of SSF in the production of enzymes, **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, p. 1999–2042, 2015.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

GHILDYAL, N. P.; GOWTHAMAN, M. K.; RAGHAVA RAO, K. S. M. S.; KARANTH, N. G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, p. 253-257, 1994.

Referências Bibliográficas

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities – Part I: Xylanases. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 1739-1751, 1987.

GOMES E., MORETTI M. M. S., BIOCCHINI-MARTINS D. A. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi and production of cellulases and xylanase by solid state fermentation. **Journal of Biotechnology**, p.150, 2010.

GUTIERRES-ROJAS, M.; TORRES, E. F. **Curso de Fermentaciones em Medio Sólido – Biotecnología para el aprovechamiento de residuos Agroindustriales y Municipales**. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. México, 1992

HIMMELBLAU, D. M. **Basic principles e calculations in chemical engineering**, 5 th edition. Englewood cliffs: Prentice Hall, 1982.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solidstate fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.64, p.175–86, 2004.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases. Engineering, production and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1219–27, 2012.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1099-1104, 2003.

KARATAS, H.; UYAR, F.; TOLAN, V.; BAYSAL, Z. **Optimization and enhanced production of α -amylase and protease by a newly isolated *Bacillus licheniformis* ZB-05 under solid-state fermentation**, *Annals of Microbiology*, v. 63, p. 45–52, 2013.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current trends in research and application of microbial cellulases. **Research in Microbiology Journal**, v. 6, p. 41–53, 2011.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J., JR.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002.

LEITE, P; SALGADO, J. M.; VENÂNCIO, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; BELO, I. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 737-746, 2016.

LIANG, J. D.; HAN, Y. F.; ZHANG, J. W. ; DU, W.; LIANG, Z. Q. ; LI, Z. Z. Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. **Applied Environmental Microbiology**, v. 110, p. 9-17, 2011.

Referências Bibliográficas

- MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006
- MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.
- MATSUMURA, Y.; SUDO, K.; SHIMIZU, K. Enzymatic hydrolysis of Wood II. Effect of grinding and alkali treatment on hydrolysis of woods by *Trichoderma viride* cellulase, **Mokuzai Gakkaishi**, p. 562–570, 1977.
- MEDIE, F. M.; DAVIES, G. J., DRANCOURT M.; HENRISSAT, B. Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, p. 227–234, 2012.
- MELIKOGLU, M., LIN, C. S. K., WEBB, C. Solid state fermentation of waste bread pieces by *Aspergillus awamori*: Analysing the effects of airflow rate on enzyme production in packed bed bioreactors. **Food and Bioproducts Processing**, v.95, p.63-75, 2015.
- MENON, V.; RAO, M. **Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept.** *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 38, p. 522-550, 2012.
- MILAGRES, A. M. F; ROBERTO, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I. C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1387-1391, 2004.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; NOPHARATANA, M.; KRIEGER, N. The Bioreactor Step of SSF: A Complex Interaction of Phenomena. In: **Solid-state Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. New York: Springer Berlin Heidelberg. p.13, 2006a.
- MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; VON MEIEN, O. F.; LUZ JR., L. F. L. The Scale up challenge for SSF Bioreactors. In: **Solid-state Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. New York: Springer Berlin Heidelberg. p.57, 2006b.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p.1211–1225, 2000.
- MITCHELL, D.A.; PANDEY, A.; SANGSURASAK, P.; KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation, **Process Biochemistry**, v. 35, p. 167–178, 1999.

Referências Bibliográficas

- MO, H.T.; ZHANG, X.Y.; LI, Z.H. Control of gas phase for enhanced cellulase production by *Penicillium decumbens* in solid-state cultura. *Process Biochemistry*, v.39, p.1293-1297, 2004.
- MONTON, S.; UNREAN, P.; PIMSAMARN, J.; KITSUBUN, P.; TONGTA, A. **Fuzzy logic control of rotating drum bioreactor for improved production of amylase and protease enzymes by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation.** *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 335–342, 2013.
- MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 165–178, 2008.
- NAGEL, F.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology Bioengineering**, v. 72, p. 219–30, 2001.
- NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K. ; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 578-597, 2010.
- NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Solid state fermentation for l-glutamic acid production using *Brevibacterium* sp., **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 199–204, 1996.
- NOVELLI, P. M.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food Chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016
- PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido.** 2003. 169f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations, **Process Biochemistry**, v. 26, p. 355–361, 1991a.
- PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation, **Process Biochemistry**, v. 27, n.2, p. 109–117, 1992.
- PANDEY, A., Effect of particle size of the substrate on enzyme production in solid state fermentation. **Bioresource Technology**, p. 169–172, v. 37,1991b.
- PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v. 77, p. 149-162, 1999.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 74, n. 2, p. 69, 2000.

Referências Bibliográficas

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D.A., New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products, **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000.

PIROTA, R.; TONELOTTO, M; DELABONA, P.D.; FONSECA, R.F.; PAIXAO D.A.A.; BALEEIRO, F.C.F. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p465–71, 2013.

PITARELO, A. P. **Evaluation of susceptibility of sugarcane bagasse and straw on the bioconversion by steamexplosion and enzymatic hydrolysis.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brazil, 2007.

PITOL, L. O.; BIZ, A.; MALLMANN, E.; KRIEGER N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 1009-1018, 2016.

RABELO, S. C.; CARRERE, H.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept, **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7887–7895, 2011.

RAGHAVARAO, K; RANGANATHAN, T; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127-135, 2003.

RAIMBAULT, R. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 3–45, 1998.

ROCHA, G.J.M.; MARTIN, C.; SOARES, I.B.; SOUTOMAIOR, A.M ; BAUDEL, H. M.; de ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production, **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663–670, 2011.

ROCKY-SALIMI, K.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 61–6, 2010.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F.; COURI, S.; NETO, V. B., CRESTANA, S.; FARINAS, C. S. Integrated strategies to enhance cellulolytic enzyme production using an instrumented bioreactor for solid-state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioenergy Research**, v. 6, p. 142–52, 2013.

ROY, S. K.; DEY, S. K.; RAHA, S. K.; CHAKRABARTY, S. L. Purification and properties of an extracellular endoglucanase from *Myceliophthora thermophila* D-14 (ATCC 48104). **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 1967–1971, 1990.

SADHUKHAN, R.; ROY, S. K.; RAHA, S. K.; MANNA, S.; CHAKRABARTY, S. L. Induction and regulation of alpha-amylase synthesis in a cellulolytic thermophilic fungus

Referências Bibliográficas

- Myceliophthora thermophila D14 (ATCC 48104). **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 30, p. 482–486, 1992.
- SAHA, B. C. - α -L-Arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 403–423, 2000.
- SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A.. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99 , p. 5270–5295, 2008.
- SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. **Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes**. Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 89, p. 246-291, 2005.
- SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Incorporation of death kinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 64, p. 253-260, 1995.
- SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D.A. Validation of a model describing two dimensional dynamic heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biotechnology, Bioengineering**. V.60, p. 739–749, 1998.
- SANTOS, E. A. O.; REIS, A. A.; FRACHIA, C. L.; CERESINI, P. C.; PRADO, H. F. A. Produção de xilanase e celulase pelo patógeno Rizoctonia solani AG1-IA em cultura de soja. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB**, Jaboticabal, v. 6, 2014.
- SANTOS, F. A.; de QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potential of sugarcane straw for etanol production. **Química Nova**, v. 35, p. 1004-1010, 2012
- SARANRAJ, P.; STELLA, D.; REETHA, D. Microbial cellulases and its applications: a review. **International Journal of Biochemistry and Biotech Science**, v. 1, p. 1–12, 2012.
- SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; BACQUET, G.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 802-808, 1990.
- SCHEUFELE, F. B.; BUTZKE, A. S.; MARRA, I. F.; HASAN, S. D. M.; FIORESE, M. L. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar. **Engvista**, v.14, n. 3. P.310-321, 2012.
- SHUANGQI, T.; ZHENYU, W.; ZILUAN, F.; LILI, Z.; JICHANG, W. Determination methods of cellulase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 7122–7125, 2011.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 541–549, 2010.

Referências Bibliográficas

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205–218, 2003.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v.34, p.421–424, 2009.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 169–179, 2003.

TSOTSAS, E. Heat and mass transfer in packed beds with fluid flow. In: **VDI Heat Atlas**, Abschnitt M7, 2. Auflage. Springer Verlag: Berlin, 201

UMSZA-GUEZ, M. A. **Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e bioreator de leito fixo.** 2009. 106f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

UNICA. Relatório final da safra 2015/2016. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em: 13 de Abril de 2016

VITCOSQUE, G.L.; FONSECA, R.F.; RODRÍGUEZ-ZUNIGA, U.F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Production of biomass-degrading multienzyme complexes under solid-state fermentation of soybean meal using a bioreactor. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 2012-2021, 2012.

ZANELATO, A. I. **Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo.** 2011. 116f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; THOMÉO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1536-1544, 2012.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura do autor

Caroline Lopes Perez