



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

Marianny Silva Canedo

**Propriedades estruturais em meios porosos para cultivo em estado
sólido**

São José do Rio Preto

2020

Marianny Silva Canedo

**Propriedades estruturais em meios porosos para cultivo em estado
sólido**

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

Financiadora: CAPES/DS

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto

2020

C221p Canedo, Marianny Silva
Propriedades estruturais em meios porosos para cultivo em estado sólido / Marianny Silva Canedo. -- São José do Rio Preto, 2020
112 f.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto
Orientador: João Cláudio Thoméo

1. Cultivo em estado sólido. 2. Biorreator de tambor rotativo. 3.
Reologia de sólidos. 4. Análise de perfil de textura. 5. Processamento
digital de imagem. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Marianny Silva Canedo

Propriedades estruturais em meios porosos para cultivo em estado sólido

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

Financiadora: CAPES/DS

Comissão examinadora

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

Prof. Dr. Javier Telis Romero
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profª. Dra. Raquel Guttierres Gomes
UEM – Câmpus Sede Maringá

Profª. Dra. Lina María Grajales Agudelo
UFT – Câmpus de Palmas

Prof. Dr. Tiago Carregari Polachini
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

04 de novembro de 2020

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter guiado meus passos todos os dias, pela proteção, força e sabedoria para a realização deste trabalho. Agradeço também a Nossa Senhora por receber minhas orações, pela intercessão, passar na frente e resolver aquilo que sou incapaz de resolver.

Aos meus pais, Ana Maria e Francisco, e toda minha família pelo apoio, por acreditarem e ajudarem a realizar os meus sonhos. Apesar da distância, se fizeram presentes em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, por me acolher, pelo apoio, orientação e confiança na realização deste trabalho.

À UNESP/IBILCE pela oportunidade de cursar o doutorado.

Aos membros da Comissão Examinadora do Exame Geral de Qualificação desta Tese, Prof.^a Dr.^a Vânia Regina Nicoletti e Prof. Dr. Gustavo Nakamura Alves Vieira, pelas sugestões para este trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Conti e Silva pela atenção e ensinamentos.

Aos membros desta banca, Prof. Dr. Javier Telis Romero, Prof.^a Dr.^a Raquel Guttierres Gomes, Prof.^a Dr.^a Lina Maria Grajales Agudelo e Prof. Dr. Tiago Carregari Polachini por aceitarem o convite em contribuir com este trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos por todo auxílio e esclarecimentos.

Aos meus colegas que passaram pelo Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores, em especial à Érika, Antéia, Priscila e João Paulo pela amizade e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho. As alunas de graduação Amanda Velone e Maria Fernanda pela colaboração nos experimentos.

Aos meus colegas de pós-graduação e às pessoas que tive a oportunidade de conhecer em São José do Rio Preto, pelo acolhimento, pelos ensinamentos, pela companhia e momentos de descontração.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas que, de certa forma, contribuíram na realização deste trabalho. Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Uma melhor compreensão das propriedades estruturais e reológicas dos substratos empregados no cultivo em estado sólido (CES) é fundamental para a simulação realista de processos de transferência de calor e massa em biorreatores. Nesta tese, foram realizadas quatro etapas com o objetivo de obter parâmetros estruturais de um meio composto por bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT), antes e após o cultivo pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, visando obter parâmetros que auxiliem na simulação de biorreatores durante o CES. Na primeira etapa, avaliou-se a influência do traçador colorido Rodamina B sobre o crescimento do fungo em misturas de BC:FT na proporção 7:3, estimado pela técnica de respiração e pela técnica de processamento digital de imagem (PDI) acoplada à fotografia. Realizou-se cultivos por 96 horas em meios com e sem traçador, medindo-se a produção de CO₂ em biorreator de leito empacotado e analisando-se amostras cultivadas em placas de Petri por PDI. Diante dos resultados apresentados pela técnica PDI, não se observou diferença no crescimento do micélio no substrato sem e com coloração por Rodamina B, porém as concentrações de CO₂ observadas indicam que o corante pode interferir na atividade metabólica do microrganismo. Em seguida, avaliou as propriedades reológicas de BC, FT e de misturas entre eles. Foram realizadas análises para determinar o perfil de textura (TPA) para amostras sem e com cultivo, empacotadas em tubos de PVC. Ensaios para a determinação da resistência à tração de uma mistura BC:FT ao longo do tempo de cultivo foram realizados utilizando-se caixas de acrílico, enquanto que a resistência à tração das hifas aéreas foi determinada cultivando-se o fungo em dois discos de farelo de trigo, separados por uma distância determinada. Nos ensaios de TPA foram realizados e parâmetros como dureza, coesão e elasticidade foram determinados, variando a umidade e proporção BC:FT antes e ao longo do cultivo. Os resultados de TPA mostraram que umedecer as amostras com muita antecedência do experimento produz amostras mais duras do que umidificando as amostras no momento do ensaio. Também se constatou que há uma tendência de diminuição da força de compressão com o aumento do tempo de cultivo, indicando degradação física do material sólido. A maior tensão de ruptura do micélio aéreo e do meio cultivado ocorreu às 24 horas de cultivo, coincidindo com a máxima atividade respirométrica do fungo. Na terceira etapa avaliou a movimentação dos substratos em ensaios sem e com cultivo microbiano por filmagem da tampa frontal de tambores rotativos de 9,4 e 30,0 cm de diâmetro, sem e com aletas internas. Nos ensaios sem cultivo, as variáveis foram os tipos de partículas (BC ou BC:FT), a umidade e o grau de enchimento. Nos ensaios com cultivo, a variável foi o tempo

de cultivo, utilizando como substrato a mistura BC:FT na proporção 7:3 a 75% de umidade inicial. No tambor de maior dimensão não foi observado diferença no padrão de movimentação das partículas para as umidades de 10% e 75% para leitos de BC ou com a adição de 30% de FT em 10% de umidade. No tambor de menor dimensão, em sistemas irreacionais, a movimentação ocorreu mais no centro do tambor, devido à ausência de defletores na parede, observando-se três blocos de tamanhos e periodicidade irregulares. Nos ensaios com cultivo, observou-se padrão de movimentação similar aos ensaios sem cultivo para tempos de cultivo inferiores a 9 horas. Após, o micélio ocupa os espaços intersticiais, não se observando nenhuma movimentação a partir de 12 horas de cultivo. Na quarta etapa, ainda por análise de imagens, foram determinados a porosidade, o tamanho dos poros e a distribuição de tamanho de poros em leitos empacotados antes e ao longo do CES. A técnica fotográfica 2D auxiliada por computador foi utilizada para avaliar as mudanças na porosidade em amostras sem cultivo, empacotada em tubos de PVC e imobilizadas com ágar, e amostras durante o CES, em biorreator de leito empacotado. As amostras foram fatiadas e a superfície das fatias fotografadas para a análise digital das imagens. A técnica de microtomografia computadorizada de raios-X (μ -CT) foi usada para avaliar a estrutura 3D de leitos sem cultivo. Os resultados de porosidade e tamanho de poro não apresentaram variação quanto à umidade e substrato utilizado. Uma complexa rede de vazios foi encontrada, em estrutura 3D, com uma porosidade média bastante próxima à obtida usando a análise de imagens 2D na superfície do leito. Ao longo do CES, a porosidade diminuiu em aproximadamente 50% do valor inicial após 48 h de cultivo. Os resultados aqui obtidos serão relevantes para a previsão da força necessária para girar um tambor ao longo do cultivo e a altura máxima permitida da coluna em biorreatores de leito compactado e para simulação realista de fenômenos de transferência de calor e massa.

Palavras-chaves: Cultivo em estado sólido. Crescimento fúngico. Biorreator de tambor rotativo. Reologia de sólidos. Análise de perfil de textura.

ABSTRACT

The realistic simulation of heat and mass transfer processes in solid-state cultivation (SSC) bioreactors requires a better understanding of the structural properties of the solid substrates. In this thesis was split in four steps in order to provide structural parameters of a medium composed by sugarcane bagasse (SCB) and wheat bran (WB) for the cultivation of the fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. In the first stage the influence of the dye Rhodamine B on the microbial growth was assessed in mixture SCB:WB using the weight proportion 7:3; the growth was determined by respirometry and by digital image processing (DIP) coupled with photography. The cultivation took place along 96 h in media with and without color tracer, measuring the outlet CO₂ concentration in a packed-bed bioreactor and taking pictures from the surface Petri dishes, following by DIP analysis. The image analysis did not show any influence of the color dye on the fungal growth, although the CO₂ concentration was remarkably influenced, demonstrating that the tracer modified the fungal metabolic activity. In the second stage, rheological properties of SCB, WB and mixtures of them were measured. The texture profile analysis (TPA) was applied to samples with and without cultivation, which were packed in a PVC tube. Experiments for the determination of the maximum strength of a mixture SCB:WB along the cultivation were carried out using Plexiglas boxes while the maximum strength of the aerial hyphae was determined cultivating the fungus in two discs of wheat bran separated by a specific void. From the experiments of TPA the parameters hardness, cohesiveness and springiness were determined as a function of the moisture content and the proportion SCB:WB before and along the cultivation. The results of the TPA experiments showed that moistening the samples well in advance of the experiment produced harder samples than moistening the samples at the moment of the assay; besides, the compression force decreased with the increase of the cultivation time, indicating the physical degradation of the medium. The maximum strength of the aerial mycelium was noticed at 24 h of cultivation, which was coincident with the maximum respirometric activity of the microbe. In the third stage, particle movement of a mixture SCB:WB prior and along the fungal growth was observed by filming the front lid of rotating drums of 9.4 and 30.0 cm diameter, with and without flyers. For experiments without cultivation, the variables were the nature of the particles (SCB or SCB:WB), the moisture content and the filling degree. For the experiments with fungal growth, the mixture SCB:WB 7:3 at 75% moisture content was used. In the larger drum, the pattern of particle movement was not influenced by the SCB moisture content (10% and 75%) or by the addition of WB (mixture SCB:WB 7:3) at 10% moisture

content. For the narrower drum, particle movement was concentrated at the drum core, since this drum did not have flyers, and three blocks of irregular shape and periodicity moved. For the experiments along the cultivation, the same pattern observed without cultivation as notice up to 9h, when the fungal mycelium visibly occupied the voids and no movement was observed if the drum was let still up to 12 h. In the fourth stage, the bed porosity and the pore size distribution were determined by DIP, prior and along the cultivation. Uncultivated samples were packed in PVC tubes and were immobilized with agar and inoculated samples were cultivated in a packed-bed bioreactor. The samples were sliced and the surface of the slices were photographed for further DIP. The X-ray microtomography technique (μ -CT) was used to provide 3D images of beds of SCB:WB without cultivation. The bed porosity and the pore size distribution were not affected by the initial moisture content of the solids. A complex network of voids was noticed by the 3D analysis, with average porosity very close to the one obtained with the 2D analysis. During the SSC, the bed porosity decreased 50% from its original value at 48 h of cultivation. The results obtained in this thesis will be of relevance to the forecast of the strength required to spin a drum during the cultivation and the maximum height allowed for packed columns, as well as for a more realistic simulation of heat and mass transfer processes in SSC.

Keywords: Solid-state cultivation. Fungal growth. Rotating drum bioreactor. Solid rheology. Texture profile analysis.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA	10
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS GERAIS.....	12
CAPÍTULO 3. REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1 Produção de etanol de segunda geração	13
3.2 Cultivo em estado sólido.....	14
3.3 Biorreatores para cultivo em estado sólido	16
3.4 Propriedades estruturais e reológicas de materiais sólidos	19
CAPÍTULO 4. INFLUÊNCIA DO USO DE TRAÇADOR COLORIDO NO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO EM MISTURA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE TRIGO	24
4.1 Introdução	25
4.2 Material e Métodos	26
4.2.1 Substrato	26
4.2.2 Cultivo em estado sólido	26
4.2.3 Determinação indireta do crescimento fúngico	27
4.2.3.1 Técnica de processamento digital de imagem.....	27
4.2.3.2 Produção de gás carbônico (CO ₂)	28
4.3 Resultados e Discussão	28
4.4 Conclusão.....	31
CAPÍTULO 5. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE MISTURAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE TRIGO DURANTE O CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO	32
5.1 Introdução	34
5.2 Análise de Perfil de Textura	35
5.3 Material e Métodos	37
5.3.1 Substratos.....	38
5.3.2 Microrganismo.....	38
5.3.3 Análise do perfil de textura.....	38
5.3.4 Resistência do substrato a resistência à tração	40
5.3.5 Resistência do micélio aéreo a resistência à tração	41
5.3.6 Estimativa da biomassa fúngica por respirometria.....	43
5.3.7 Análises estatísticas	44
5.4 Resultados e Discussão	45
5.4.1 Análise do perfil de textura.....	45
5.4.2 Resistência à tração dos substratos cultivados e do micélio aéreo	55
5.4.3 Estimativa da biomassa fúngica por respirometria.....	57
5.5 Conclusão.....	59

CAPÍTULO 6. MOVIMENTAÇÃO E MISTURA DE PARTÍCULAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DE FARELO DE TRIGO EM TAMBOR ROTATIVO DURANTE O CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO POR <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3B.....	60
6.1 Introdução	62
6.2 Material e Métodos	65
6.2.1 Partículas sólidas	65
6.2.2 Microrganismo.....	65
6.2.3 Movimentação radial do substrato em tambor rotativo sem cultivo.....	66
6.2.4 Movimentação radial do substrato em tambor rotativo com cultivo em estado sólido	67
6.2.5 Avaliação da geração de calor metabólico durante o cultivo em estado sólido	68
6.2.6 Determinação da atividade de endoglucanase	68
6.3 Resultados e Discussão	69
6.3.1 Movimentação radial do substrato em tambor rotativo sem cultivo.....	69
6.3.2 Movimentação radial do substrato em tambor rotativo com cultivo em estado sólido	76
6.3.3 Avaliação da geração de calor metabólico durante o cultivo em estado sólido	78
6.4 Conclusão.....	80
 CAPÍTULO 7. POROSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DOS POROS EM LEITOS EMPACOTADOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE TRIGO PARA CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO	 81
7.1 Introdução	82
7.2 Material e Métodos	86
7.2.1 Substratos.....	86
7.2.2 Microrganismo.....	86
7.2.3 Determinação da porosidade e do tamanho dos poros em leitos sem cultivo usando fotografia e PDI	86
7.2.4 Determinação da porosidade e do tamanho dos poros em leitos com cultivo usando fotografia e PDI	87
7.2.5 Determinação da porosidade por microtomografia computadorizada (μ -CT) em leitos sem cultivo.....	88
7.2.6 Análises estatísticas	89
7.3 Resultados e Discussão	90
7.3.1 Determinação da porosidade e tamanho dos poros por fotografia e PDI antes do cultivo	90
7.3.2 Determinação da porosidade e tamanho dos poros por fotografia e PDI após o cultivo..	94
7.3.3 Análise estrutural por tomografia micro computadorizada (μ -CT) sem cultivo	97
7.4 Conclusão.....	99
 CAPÍTULO 8. CONCLUSÃO GERAL	 100
 CAPÍTULO 9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	 102
 REFERÊNCIAS	 103

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO GERAL E JUSTIFICATIVA

O Brasil atualmente é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e, no setor sucroalcooleiro, o principal resíduo gerado é o bagaço de cana-de-açúcar, destinado principalmente como fonte de energia elétrica para o próprio setor. No entanto, devido à grande quantidade do resíduo produzido, esse pode ser utilizado para a produção de etanol de segunda geração (CASTRO; CASTRO, 2012). A produção de etanol de segunda geração é uma alternativa para aumentar o rendimento da produção de álcool combustível sem a necessidade de expansão da área cultivada. Porém, a viabilidade deste biocombustível ainda enfrenta vários desafios, como os altos custos de produção das enzimas empregadas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar a açúcares fermentescíveis (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017).

Resíduos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo; casca de laranja, dentre outros, são disponíveis em grandes quantidades e possuem grande potencial para o cultivo em estado sólido (CES) para a produção de enzimas de interesse da indústria de biocombustível (CASCIATORI; THOMÉO, 2018; FARINAS, 2015;). Para a produção industrial de enzimas microbianas alguns fatores influenciam o processo de CES e precisam ser considerados no desenvolvimento de biorreatores, como por exemplo, composição e propriedades físicas do substrato, transferência de oxigênio, temperatura e capacidade de retenção de água, assim como a morfologia do microrganismo utilizado (DURAND, 2003; FARINAS, 2015; GRAJALES, 2014; TADA et al., 2019).

Para o controle automático do processo e a ampliação de escala de biorreatores de CES, a simulação é uma ferramenta importante (CASCIATORI; THOMÉO, 2018). No entanto, as predições dos modelos só serão próximas à realidade se as propriedades físicas do meio de cultivo forem fornecidas. De um modo geral, os valores destas propriedades são escassos na literatura, principalmente quando há presença de micélio.

As propriedades físicas do substrato como resistência, dureza, plasticidade, elasticidade e viscosidade, assim como a porosidade, distribuição do tamanho dos poros e a permeabilidade, são fatores que influenciam as propriedades físicas, mecânicas, térmicas e elétricas de materiais porosos (KACZMAREK; GOUEYGOU, 2006). Durante o CES, tais propriedades se alteram em decorrência da decomposição do substrato e do aumento da concentração de biomassa microbiana, de modo a poder afetar as condições necessárias ao crescimento microbiano, os mecanismos de transferência de calor e massa, a resistência do meio ao escoamento do ar e as trocas gasosas (CASCIATORI et al., 2014). Dessa forma, uma

melhor compreensão dessas características do substrato é importante para aumentar a produtividade, devido a melhores condições de processo, e projetos de biorreatores para o aumento de escala industrial (OSADOLOR et al., 2018; ZHANG; WANG; CHEN, 2017).

Assim, esta tese se propôs a avaliar as propriedades reológicas e estruturais de meios de cultivo compostos por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo para o cultivo do fungo filamentoso *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, já empregado para a síntese de celulases pelo Grupo de Bioenergia do IBILCE/UNESP. O texto desta tese está estruturado em capítulos, onde os primeiros capítulos apresentam os objetivos gerais da tese e a revisão geral da literatura. Os quatro capítulos seguintes foram organizados na forma artigos e apresentam revisão, metodologia e resultados específicos.

No Capítulo 4 são apresentados os resultados dos ensaios preliminares, onde se avaliou a influência do uso do traçador colorido Rodamina B no crescimento do fungo *M. thermophila* I-1D3b. Este capítulo foi publicado como capítulo *Influência do uso de traçador colorido no cultivo em estado sólido* (CANEDO et al., 2019).

Em seguida, no Capítulo 5, são apresentados os resultados das propriedades reológicas de misturas dos substratos bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, antes e ao longo do cultivo do fungo *M. thermophila* I-1D3b. Este capítulo foi submetido à revista *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, com o título *Rheological properties of mixtures of sugarcane bagasse and wheat bran during solid-state cultivation*.

O Capítulo 6 apresenta os resultados de movimentação e mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo e o efeito do micélio fúngico ao longo do cultivo em tambores rotativos. O artigo está em fase final de preparação com o título *Movimentação e mistura de partículas de bagaço de cana-de-açúcar e de farelo de trigo em tambor rotativo durante o cultivo em estado sólido por Myceliophthora thermophila I-1D3b*.

Os resultados finais de porosidade e tamanho dos poros em leitos empacotados de misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo antes e ao longo do cultivo do fungo *M. thermophila* I-1D3b, empregando técnicas de processamento digital de imagens, bidimensional e tridimensional são apresentados no Capítulo 7. O artigo está em desenvolvimento. Logo após, são aprestados a Conclusão Geral dessa tese e recomendações para trabalhos futuros. As referências bibliográficas de todos os capítulos são apresentadas ao final da tese.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral determinar as propriedades estruturais e reológicas de substratos bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e de misturas entre ambos antes e ao longo do cultivo pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Avaliar a influência do uso de traçador colorido sobre o crescimento do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em substrato composto por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo;
- Estabelecer métodos experimentais para a determinação da resistência do meio de cultivo à compressão e à tração;
- Obter parâmetros reológicos relativos à compressão e tração para meios porosos sem cultivo, em função da proporção de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo e da umidade das partículas;
- Obter parâmetros reológicos relativos à compressão e tração para o meio poroso composto por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo ao longo do cultivo do fungo *M. thermophila* I-1D3b, em função da proporção de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, da umidade das partículas e do tempo de cultivo;
- Avaliar a mistura e a movimentação de partículas da mistura bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo em biorreator de tambor rotativo ao longo do cultivo;
- Determinar as propriedades estruturais porosidade, tamanho dos poros e distribuição de tamanho de poros em leitos empacotados de misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo antes e ao longo do cultivo do fungo *M. thermophila* I-1D3b.

CAPÍTULO 3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Produção de etanol de segunda geração

A cana-de-açúcar é uma das tradicionais plantas cultivadas no Brasil e é destinada principalmente à produção de etanol. Esse processo produz bagaço de cana-de-açúcar, que atualmente são queimados em caldeiras para gerar energia elétrica. No entanto, devido à sua alta disponibilidade, o bagaço pode ser empregado para o cultivo de microrganismos visando à produção de vários produtos de maior valor agregado, dentre os quais enzimas de interesse da indústria do etanol de segunda geração (AITA et al. 2019; CASCIATORI; THOMÉO, 2018; FARINAS, 2015; FRASSATTO et al., 2020; PANDEY et al., 2000).

O Grupo de Bioenergia do IBILCE/UNESP vem atuando no desenvolvimento de pesquisas em produção de enzimas celulolíticas a partir do cultivo em estado sólido de materiais lignocelulósicos e desenvolvimento de biorreatores, visando à produção de etanol de segunda geração (CASCIATORI et al., 2014; CASCIATORI, 2015; CASCIATORI; THOMÉO, 2018; GRAJALES, 2014; MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019; TADA et al., 2017b; ZANELATO et al. 2012).

As etapas principais para a produção de etanol de segunda geração são pré-tratamento, para tornar a celulose acessível; hidrólise, para liberar os açúcares fermentescíveis; fermentação, para converter açúcares em etanol; e destilação, para recuperação do produto. A hidrólise pode ser realizada pela adição de enzimas ou catalisador ácido, no entanto, a hidrólise ácida forma compostos que podem inibir o processo de fermentação, enquanto a hidrólise enzimática ocorre em condições de processo mais brandas, quando comparado com a hidrólise ácida, porém as enzimas possuem alto custo (RIVERA et al., 2010). Dentre os desafios para a produção de etanol de segunda geração de forma competitiva está a oferta de enzimas a baixo custo, uma vez que estas enzimas representam o terceiro item de maior custo na produção deste biocombustível (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017).

A produção de enzimas pelo cultivo submerso é preferível pela indústria, devido ao melhor controle dos parâmetros de processo. Porém, pode-se obter maior rendimento dessa produção no cultivo em estado sólido, quando se compara o mesmo microrganismo, sendo uma alternativa para redução do custo das enzimas, o que já tem se mostrado possível em escala de laboratório (CASCIATORI, 2015; HANSEN, et al., 2015; ZANELATO et al. 2012). Entretanto, há problemas relacionados à ampliação de escala para biorreatores industriais,

devido às limitações de transferência de calor e massa no interior do leito e a falta de dados cinéticos do crescimento microbiano (WANG; YANG, 2007).

3.2 Cultivo em estado sólido

O cultivo de estado sólido (CES) é definido como o processo de cultivo realizado em substrato sólido com umidade suficiente para sustentar o crescimento e atividade metabólica do microrganismo, mas sem exceder a capacidade de retenção de água do meio poroso. Nessas condições, a região intersticial entre as partículas sólidas é preenchida por uma fase gasosa contínua e um mínimo de água visível, que se deposita sobre as partículas como um filme delgado, sem bloquear os poros (CASCIATORI et al., 2013; MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Os fatores mais importantes a serem considerados durante o desenvolvimento do CES são a escolha do microrganismo e do substrato, o que depende do metabólito de interesse a ser produzido (SOCCOL et al., 2017; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Os fungos filamentosos são o grupo mais importante de microrganismos utilizados no CES, pois as condições de cultivo se assemelham ao seu habitat natural de crescimento, sendo o substrato sólido fonte de nutrientes ou um suporte inerte, impregnado pelos nutrientes adequados, que permite seu desenvolvimento (MIENDA; IDI; UMAR, 2011; SINGHANIA et al., 2009). As hifas dos fungos filamentosos proporcionam uma grande vantagem para a utilização de nutrientes disponíveis, pois se entremeiam entre os poros dos substratos sólidos durante a colonização, garantindo uma estrutura firme e sólida (MIENDA; IDI; UMAR, 2011).

O cultivo de fungos filamentosos por CES utilizando-se resíduo agroindustrial como substrato tem sido frequentemente citado na literatura, devido à abundância e baixo custo desses resíduos. Os fungos termofílicos, como o *M. thermophila* I-1D3b, apresentam grande potencial para aplicações biotecnológicas, como a produção de enzimas fibrolíticas (endoglucanases, beta-glucosidases, xilanases e outros) (CASCIATORI et al., 2014; MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017; ZANELATO et al., 2012). No entanto, na produção de enzimas por CES há problemas a ser enfrentados, tanto na escolha do substrato, devido às características heterogêneas dos resíduos agroindustriais, quanto para o uso de biorreatores para o aumento de escala industrial, devido as variáveis de processo pouco exploradas (SOCCOL et al., 2017; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013; WANG; YANG, 2007).

A Tabela 3.1 exemplifica as principais aplicações do uso de CES utilizando resíduos agroindustriais.

Tabela 3.1 – Principais aplicações do uso de cultivo em estado sólido utilizando resíduos agroindustriais.

Microrganismo	Resíduo	Biorreator	Aplicação	Referência
<i>Aspergillus awamori</i>	Bagaço de uva branca	Tambor rotativo	Produção de pectinases, xilanases e celulases	Díaz et al. (2009)
<i>Beauveria bassiana</i> e <i>Trichoderma harzianum</i>	Casca de arroz	Reatores de batelada em escala laboratorial	Produção de esporos para produção de biopesticidas	Sala et al. (2020)
<i>Gongronella butleri</i>	Bagaço de maçã	Colunas <i>Raimbault</i>	Enriquecimento proteico e adição como alimento para alevinos de tilápia	Vendruscolo et al. (2009)
<i>Monascus purpureus</i> KACC 42430	Espigas de milho em pó	Frasco <i>Erlenmeyer</i>	Produção de Pigmentos	Velmurugan et al. (2011)
<i>Myceliophthora sp.</i> I-1D3	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo	Embalagens plásticas e reator de leito empacotado	Produção de endoglucanase	Zanelato et al. (2012)
<i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1	Bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo	Frascos	Produção de celulases e xilanases	Camassola; Dillon (2010)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> e <i>Trichoderma reesei</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo	Embalagens plásticas	Produção de β -glucosidase	Frassatto et al. (2020)
<i>Trichoderma harzianum</i> T2008	Cachos de frutos vazios de óleo de palma	Frasco <i>Erlenmeyer</i> e reator de tambor rotativo	Produção de celulase	Alam et al. (2009)

Fonte: Elaborado pela autora.

A estimativa da biomassa é um parâmetro para determinar o crescimento microbiano, porém, a medida direta no substrato sólido não é possível, devido à dificuldade de separar o substrato do microrganismo, que permanece entremeado entre os poros e aderido às partículas. Dessa forma, o uso de métodos indiretos é necessário para os estudos cinéticos do

crescimento microbiano, dentre os quais pode-se destacar a estimativa de componentes da estrutura celular (N-acetil-glicosamina, ergosterol e proteínas, por exemplo), de metabólitos (enzimas), de gases de respiração (O_2 e CO_2) e quantificação visual do micélio (processamento digital de imagem – PDI) (COURI et al., 2006; RUTSATZ, 2006; SINGHANIA et al., 2009).

A técnica de PDI é vantajosa por fornecer resposta rápida, usar imagens originais, facilitando a seleção manual das cores, é necessário menos processamento (filtros) para utilização do *software* e a localização da câmera mantida no ponto central fornece informações confiáveis (KARALI et al., 2016). Porém, há problema em relacionar as imagens à biomassa, sendo a técnica também empregada para avaliar a movimentação de partículas em biorreatores de CES de leitos móveis. Para diferenciar partículas da biomassa fúngica nos ensaios de PDI em biorreator de tambor rotativo, é frequente o uso de corantes no material sólido, o qual permite a identificação de zonas de segregação, regimes de fluxo, características de movimentação e perfis de velocidade (TADA et al., 2017b). Os autores citaram o uso do corante Rodamina B como traçador colorido. Um produto solúvel em água, com estabilidade sob uma ampla faixa de pH. É aplicável como traçador para determinação de vazão e direção de fluxos de água, no tingimento de ágata, na indústria têxtil e em aplicações biotecnológicas, tais como a microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (LEÃO; KREBS, 2017; RICHARDSON; WILSON; RUSCH, 2004; RODRIGUES, 2015).

3.3 Biorreatores para cultivo em estado sólido

Os biorreatores aplicados frequentemente para o CES são os reatores de bandeja e reatores de leito fixo, que são classificados como biorreatores estáticos, e reatores de tambor rotativo, classificados como biorreatores de leito móvel, de agitação intermitente ou contínua. Para o uso do biorreator devem-se considerar as características do substrato, como composição, tamanho, porosidade e capacidade de retenção de água, tanto quanto a morfologia do microrganismo, em relação à presença de micélio sensível a tensão de cisalhamento, o que influenciará na escolha do tipo de agitação e aeração (FARINAS, 2015; SOCCOL et al., 2017; WANG et al., 2010).

Aspectos importantes de engenharia de processo ainda são grandes desafios que precisam ser desenvolvidos para otimizar a eficiência de biorreatores no CES em escala industrial, pois, além da dificuldade em proporcionar transferência de calor e massa adequada do leito e a heterogeneidade do sistema, é difícil monitorar *online* vários parâmetros do

processo. Uma alternativa para reduzir gradientes de temperatura e de concentração de água é a mistura das partículas, mas para tal, o fungo tem que ser tolerante ao cisalhamento. Ao longo do processo de CES também podem ocorrer alterações estruturais do meio poroso, como redução da porosidade, aglomeração das partículas e alterações da resistência do meio à movimentação (DURAND, 2003; KHANAHMADI et al., 2006; SOCCOL et al., 2017; ZHANG; WANG; CHEN, 2017), logo, o conhecimento das propriedades físicas e reológicas do substrato, antes e ao longo do cultivo, seria uma ferramenta útil para elucidar esses problemas.

Os biorreatores do tipo tambor rotativo (BTR) são caracterizados como um cilindro horizontal, onde a mistura é proporcionada pelo movimento de rotação do meio sólido, que pode ser auxiliada por defletores na parede interna do tambor ou agitadores de pá (DURAND, 2003; GRAJALES, 2014; WANG et al., 2010). O movimento de partículas sólidas em cilindros rotativos é dependente da velocidade de rotação e do nível de enchimento do tambor, os quais variam com o material utilizado. Regimes de fluxo que descrevem o movimento das partículas no tambor rotativo normalmente podem ser classificados em deslizamento, queda, rolamento, cascata, catarata e centrifugação (CHEN et al., 2017; MELLMANN, 2001). No entanto, para meios fibrosos esta classificação não se aplica devido à flexibilidade das partículas e à forte interação entre elas (TADA et al., 2017b).

O uso de BTR tem a vantagem em realizar praticamente todas as etapas de produção de enzimas por CES no próprio reator, tais como esterilização do substrato e do equipamento, aspersão de solução nutriente e suspensão de esporos ao meio, cultivo e aspersão de água para a extração das enzimas (GRAJALES, 2014).

Embora o BTR seja uma opção promissora para a produção de insumos para a indústria de etanol de segunda geração, o grande desafio no aumento de escala está principalmente em potencializar a produtividade com um número mínimo de rotação do leito para dissipar o calor gerado metabolicamente, evitando danificar o micélio e consumir menos energia (ARORA; RANI; GHOSH, 2018). A movimentação das partículas no tambor é fortemente influenciada pelas características da partícula (forma, rigidez, dimensão, umidade), das propriedades mecânicas do meio poroso (rigidez, elasticidade, módulos de compressão e de tração) e da presença do micélio, que pode alterar a composição do substrato, além de criar uma rede que interage com as partículas sólidas.

Tada et al. (2017b) avaliaram a velocidade de rotação, o grau de enchimento e a presença de um tubo interno disposto axialmente entre as partículas na mistura e movimentação de bagaço de cana-de-açúcar em um tambor rotativo com agitação

intermitente, utilizando PDI para determinar o número de rotações necessárias para obter homogeneidade radial e axial, que foram dependentes apenas do grau de enchimento. Este estudo, pioneiro no uso de partículas fibrosas, não considerou a presença de microrganismo.

A simulação dos processos de CES resolvendo modelos matemáticos é considerada como uma ferramenta útil para projetar e controlar tais biorreatores (CASCIATORI; THOMÉO, 2018), pois os modelos matemáticos devem descrever os fenômenos de transferência de calor e massa do processo, sendo uma ferramenta considerável para prever pontos quentes e encontrar alternativas para evitá-los (CASCIATORI et al., 2013; MITCHELL; MEIEN; KRIEGER, 2003; SINGHANIA et al., 2009). Uma melhor compreensão desses aspectos pode reduzir significativamente o número de experimentos, o que, por sua vez, economizaria tempo, custos operacionais e investimentos (SINGHANIA et al., 2009).

A maioria das simulações foi desenvolvida para partículas aproximadamente esféricas e na ausência de microrganismos, porém muito dos substratos utilizados no CES não tem essa característica e a mistura pode diferir consideravelmente em um cultivo real (ARORA; RANI; GHOSH, 2018; WANG; YANG, 2007). Portanto, ainda são necessárias pesquisas visando correlações entre os dados experimentais e numéricos, que auxiliam na automação e controle dos parâmetros do cultivo, para obter produtividade e a qualidade dos produtos para aplicações biotecnológicas, pois o sistema deve ser validado para vários bioprocessos e apoiado por modelos adequados e estratégias de controle (ARORA; RANI; GHOSH, 2018).

Tada et al. (2017a) avaliaram um modelo de transferência de calor bidimensional de uma fase, proposto para prever os perfis de temperatura radial e axial ao longo do tempo em um tambor horizontal, parcialmente preenchido com esferas de vidro, sujeitas a rotação intermitente. Ao comparar a dados experimentais, observaram que o modelo proposto pode ser usado como uma referência básica para estudos adicionais de transferência de calor em biorreatores de tambor no CES e em outras aplicações.

Alguns fungos são tolerantes a agitação, como o *Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma harzianum*, *Myceliophthora thermophila* e *Aspergillus oryzae* (KALOGERIS et al. 2003; ALAM et al., 2009; GRAJALES, 2014; SCHUTYSER et al., 2003), enquanto *A. awamori* e *Metarhizium anisopliae*, apresentam melhores resultados em condições estáticas (DÍAZ et al., 2009; van BREUKELEN et al. 2011). Kalogeris et al. (2003) avaliaram a eficiência do biorreator de tambor rotativo com agitação intermitente para cultivo de *T. aurantiacus* em palha de trigo, tendo como variáveis temperatura, umidade e aeração. Atividades superiores de celulasas e hemicelulasas foram obtidas no cultivo em biorreator

quando comparado a frascos *Erlenmeyer*. Alam et al. (2009) cultivaram *T. harzianum* em cachos de frutos vazios de dendê em biorreator rotativo e observaram que a atividade da celulase e a biomassa produzida foram superiores às produzidas em *Erlenmeyer*. Grajales (2014) empregou *M. thermophila* em uma mistura composta por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo e realizou ensaios num tambor rotativo com graus de enchimento 0,4, 0,5 e 0,6, obtendo atividades de endoglucanase próximas às de ensaios em embalagens plásticas para os maiores graus de enchimento e inferior no menor grau, atribuindo esta redução à agitação intensa das partículas. Observou que as hifas contribuíam para a formação de aglomerados no leito. Schutyser et al. (2003) cultivaram *A. oryzae* em grãos de trigo para avaliar o momento ideal para a realização do primeiro evento de mistura. Seus resultados mostraram que a mistura é necessária para romper as ligações do micélio antes que seja necessário adicionar água para compensar as perdas por evaporação, evitando assim a presença de grandes agregados após o período de mistura.

Díaz et al. (2009) avaliaram a influência da aeração e dos regimes de intermitência de rotação sobre a produção de enzimas em uma mistura de bagaço de uva branca e cascas de laranja (proporção 1:1) cultivadas por *A. awamori*. As maiores atividades foram obtidas sem ou com pouca agitação, e pouca correlação entre agitação e taxa de aeração pôde ser observada. van Breukelen et al. (2011) cultivaram *M. anisopliae* em reator de tambor de parede raspada e em leito empacotado, utilizando fibras de cânhamo, farelo de trigo e farelo de arroz como substrato. Os experimentos mostraram que cultivo em leito empacotado é mais adequado para produção de esporos em larga escala, pois o fungo é muito sensível à agitação.

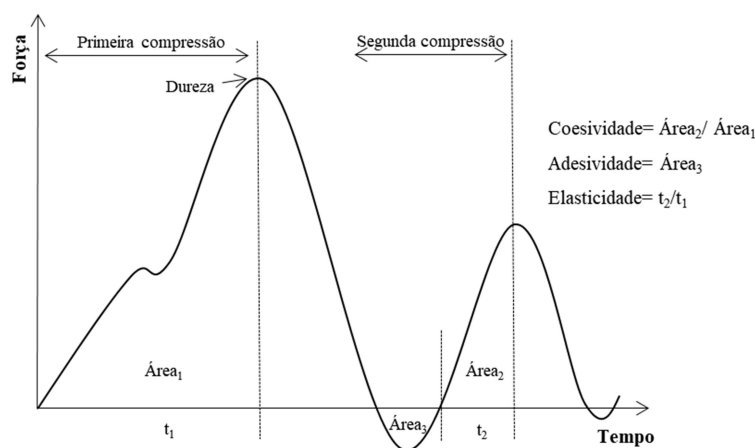
3.4 Propriedades estruturais e reológicas de materiais sólidos

No dimensionamento de equipamentos e previsão dos coeficientes de transferência de calor e massa, faz-se necessário entender as propriedades estruturais do meio poroso, como por exemplo, as mecânicas. A compreensão desse comportamento é complexa, pois depende de características intrínsecas do substrato (e.g., composição química, tamanho e forma das partículas, densidade das partículas e do leito, porosidade do leito e elasticidade) e das interações do microrganismo com o substrato. Esses fatores são geralmente heterogêneos, revertendo-se em grande dispersão de resultados experimentais, o que pode ser um desafio para determinação das propriedades reológicas da biomassa lignocelulósica por meio de técnicas tradicionais (DIAMANTE; UMEMOTO, 2015; KLINGENBERG et al., 2017; STICKEL et al., 2009; POLACHINI et al. 2016).

A reologia abrange as propriedades mecânicas de sólidos, semissólidos e líquidos, e tem sido definida como a ciência da deformação quando o material é submetido a uma força externa. A importância da avaliação dessas propriedades em substratos sólidos decorre da possibilidade de obter informações sobre aspectos estruturais dos materiais e em dimensionar e operar equipamentos para o manuseio de sólidos particulados (TELIS; TELIS-ROMERO; GABAS, 2005). As propriedades mecânicas do substrato (como resistência, dureza, plasticidade, elasticidade e viscosidade), assim como a porosidade do leito empacotado, têm sido consideradas como os principais fatores que influenciam a transferência de calor e massa no processo de CES (ZHANG; WANG; CHEN, 2017). Dessa forma, uma melhor compreensão dessas características do substrato para CES é importante para viabilizar a produtividade, devido a melhores condições de processo, e projetos de biorreatores para o aumento de escala industrial, pois durante o CES as propriedades do meio são alteradas com a decomposição do substrato e aumento da concentração de biomassa microbiana (OSADOLOR et al., 2018; ZHANG; WANG; CHEN, 2017).

Um dos testes mais simples para estimar propriedades relacionadas à textura de sólidos é o teste de compressão, que é realizado aplicando-se uma taxa de deformação constante e obtendo-se a força de compressão correspondente. A análise de perfil de textura (TPA, do inglês *Texture Profile Analysis*) é semelhante a esse teste, onde a amostra é submetida a dois ciclos consecutivos de compressão, o que resulta em uma curva de força-tempo (Figura 3.1), fornecendo vários parâmetros reológicos, incluindo dureza, coesividade, elasticidade e adesividade, que podem ser aplicados na caracterização de textura dos materiais sólidos (RAO; QUINTERO, 2014; TELIS; TELIS-ROMERO; GABAS, 2005).

Figura 3.1 – Curva típica (força-tempo) resultante de um teste de TPA.



Fonte: Elaborado pela autora.

A dureza (fornecida em newtons) é definida como a força máxima necessária para alcançar certa deformação e caso o material sofra ruptura significativa ao longo desta deformação, a dureza recebe o nome de fraturabilidade. A coesividade (adimensional) representa a intensidade das ligações internas do material que mantém sua estrutura, indicando quanto a amostra pode ser deformada antes de sua ruptura, e é representada pela resistência do material a uma segunda deformação em relação a como ele se comportou em um primeiro ciclo de deformação. A elasticidade (adimensional) é definida como a capacidade de uma amostra deformada retornar à sua condição inicial depois que a força de deformação é removida. A adesividade (joules) é definida como o trabalho necessário para superar a força de atração entre a amostra e uma superfície (CHEN; OPARA, 2013; GONZÁLEZ; MORELOS; CORREA, 2015; SZCZESNIAK, 2002).

Os experimentos com TPA são amplamente aplicados para caracterizar a textura de uma grande variedade de alimentos, como frutas, carnes, queijos e gomas, entre outros (GONZÁLEZ; MORELOS; CORREA, 2015). TPA é frequentemente usado em materiais fermentados para alimentos sólidos (NAYAK; PANDA; 2016; SCHOBER et al., 2005; SHAH; SHAH; MANDAWAR, 2006; TU et al., 2020), no entanto, de acordo com o nosso conhecimento, não há nenhum relatório na literatura que aplique TPA a materiais de fibras longas durante o CES. Devido à heterogeneidade dos subprodutos agroindustriais sólidos utilizados como substrato para o crescimento microbiano, os métodos usuais de TPA devem ser adaptados, buscando uma amostra uniforme e realizando um grande número de experimentos para produzir resultados confiáveis.

O conhecimento da movimentação de partículas em tambores rotativos é importante para os processos de transferência de calor e massa e é extremamente complexo e ainda não totalmente explicado, principalmente para partículas de geometria irregular ou fibrosa (CHEN et al., 2017; TADA, 2016). Portanto, seria importante investigar como a mistura de partículas e a presença de micélio no processo de CES em biorreator rotativo afetariam os parâmetros reológicos.

A porosidade, assim como a distribuição do tamanho dos poros e a permeabilidade, são fatores que influenciam as propriedades físicas, mecânicas, térmicas e elétricas de materiais porosos (KACZMAREK; GOUEYGOU, 2006). Durante o cultivo em estado sólido, tais propriedades são avaliadas para manter as condições necessárias ao crescimento microbiano em biorreatores, pois afetam a transferência de calor e massa, condutividade térmica e propriedades higroscópicas do meio (CASCIATORI et al., 2014), acessibilidade e eficiência enzimática do substrato (WANG; LIU; CHEN, 2018).

A porosidade não se mantém constante durante o CES, em razão do crescimento microbiano, variação da umidade do leito, degradação e alteração na forma e o volume do substrato, sendo necessário um equacionamento que considere essas mudanças e defina esse parâmetro como uma função do crescimento microbiano (KARIMI et al., 2014). Esses autores realizaram diferentes experimentos para determinar as alterações da porosidade do leito de farelo de trigo durante o CES de *Aspergillus niger* em biorreatores em escala laboratorial, com objetivo de derivar uma equação capaz de expressar o parâmetro em função das variáveis de estado (densidade de partículas, densidade do leito e umidade) a serem utilizadas na modelagem de biorreatores para CES, concluindo que os balanços de massa e energia em biorreatores de CES poderiam ser mais realistas utilizando uma equação onde há variação do parâmetro de porosidade.

A determinação das propriedades estruturais de meios porosos pode ser realizada usando métodos analíticos ou auxiliados por computador. Os métodos analíticos fornecem informações médias do meio poroso, até o nível de volume do elemento representativo, e são bem representados pela gravimetria (CASCIATORI et al., 2014; MANAN; WEBB, 2019), a porosimetria de mercúrio (GIESCHE, 2006) e a sorção de gás (CHEN; HE, 2012; WANG; LIU; CHEN, 2018). Essas técnicas fornecem informações médias dos leitos (*bulk*) e intrapartículas, como fração geral de vazios, tamanho médio dos poros e distribuição do tamanho dos poros, embora algumas delas exijam a proposição apriorística dos volumes de poros e modelos de adsorção de gás (FABER et al., 2003). Os métodos auxiliados por computador são acoplados a técnicas não intrusivas e não destrutivas, como microtomografia computadorizada de raios-X (μ -CT), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X e ressonância magnética e podem produzir informações microscópicas 3D médias e intrapartículas. (DADKHAH; PEGLOW; TSOTSAS, 2012; IRIE et al., 2018; LANDIS; KEANE, 2010).

Casciatori et al. (2014), correlacionaram as propriedades estruturais de leitos empacotados com bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, polpa e casca de laranja e mistura destes materiais com o teor de umidade e a técnica de empacotamento empregada. Experimentos de CES foram realizados utilizando o fungo *M. thermophila* I-1D3b para avaliar o efeito do crescimento fúngico nessas propriedades. Os autores concluíram que as propriedades testadas (densidade do leito, densidade de partícula e porosidade) foram fortemente afetadas pelo teor de umidade, propondo equações de determinação para cada propriedade em cada material individual e para misturas entre eles. No entanto, devido à

simplicidade da técnica gravimétrica adotada, não foram observadas variações destas propriedades com o tempo de cultivo.

O PDI pode ser aplicável aos processos de cultivo em estado sólido para caracterizar a macroestrutura média (tamanho de partícula, porosidade) ou o crescimento de micélio, sendo um método não destrutivo, rápido e simples para estimar indiretamente a biomassa produzida no cultivo, medindo a área ocupada pelo micélio na imagem adquirida. É uma análise não penetrante, fornecendo informações apenas da superfície ou de seções das amostras, no entanto, há dificuldade para separar os microrganismos ou distinguir os objetos de interesse do plano de fundo (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003; COURI et al., 2006). Devido a essas limitações, pode ser usado em experimentos preliminares, onde a avaliação das melhores condições para o crescimento do microrganismo é realizada, pois na superfície há oxigênio disponível (LÓPEZ-GÓMEZ; PÉREZ-RIVERO; WEBB, 2019).

A microtomografia de raio-X (μ -CT) é uma análise não destrutiva, onde as amostras são escaneadas, gerando imagens volumétricas sobre a microestrutura interna para reconstrução tridimensional, fornecendo informações para detecção das partículas, posição, raio de rotação, porosidade e distribuição do número e ângulo de coordenação (DADKHAH; PEGLOW; TSOTSAS, 2012; IRIE et al., 2018), além de caracterizar a distribuição do micélio no cultivo em estado sólido (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003) e fornecer dados sobre as modificações na orientação das fibras que ocorrem durante os testes mecânicos (MASSE; POQUILLON, 2013). Embora não seja aplicável a nanoestruturas, a técnica encontra espaço em meios porosos granulares e agregados porosos de partículas de maior escala (MORENO-ATANASIO; WILLIAMS; JIA, 2010). A metodologia tem aplicações em várias áreas, como odontologia, biologia, ciências ambientais, ciência dos materiais e nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos (IRIE et al., 2018; MEFTAH et al., 2019; PARKINSON et al., 2008; PIGNERET et al., 2016; SINKA et al., 2004; SCHOEMAN et al., 2016; VERMA et al., 2014).

CAPÍTULO 4. INFLUÊNCIA DO USO DE TRAÇADOR COLORIDO NO CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO EM MISTURA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE TRIGO

RESUMO

O cultivo em estado sólido (CES) vem sendo amplamente investigado devido à possibilidade em se usar resíduos sólidos agroindustriais como substrato, reduzindo o custo dos produtos obtidos. Uma dificuldade deste processo é a quantificação da biomassa microbiana, estimada pelo uso de métodos indiretos, como por exemplo, N-acetil-glicosamina, gases de respiração (CO_2 e O_2) e quantificação visual do micélio. Neste último caso, é comum empregar-se corantes para diferenciar biomassa vegetal e microbiana. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do uso de traçador colorido sobre o crescimento do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em substrato composto por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, estimado pela técnica de respiração e pela técnica de processamento digital de imagem (PDI). Para tanto, adicionou-se solução Rodamina B para corar o meio de cultivo, executando-se cultivos por 96 horas com e sem traçador, medindo-se a produção de CO_2 e analisando-se amostras por PDI. Diante dos resultados apresentados pela técnica PDI, não se observou diferença no crescimento do micélio no substrato sem e com coloração por Rodamina B, porém as concentrações de CO_2 observadas indicam que o corante pode interferir na atividade metabólica do microrganismo.

Palavras-chave: Cultivo em estado sólido. Processamento digital de imagem. Crescimento fúngico. *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. Rodamina B.

ABSTRACT

Solid-state cultivation (SSC) has been widely used due to the possibility of using agroindustrial solid wastes as substrate, reducing costs of the obtained products. One difficulty of this process is the quantification of biomass, usually estimated using indirect methods, such as N-acetyl-glucosamine, respiration gases (CO_2 and O_2) and visual quantification of the mycelium. The later method is often carried out with the aid of color tracers. Thus, the objective of this work was evaluate the influence of the use of colored tracer on the growth of the fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b in a substrate composed of

sugarcane bagasse and wheat bran, estimated by the respiration technique and the digital image processing (DIP) technique. Rhodamine B solution was used to dye the culture medium, since it was assumed that the tracer could affect microbial growth. Experiments with and without the use of Rhodamine B were evaluated by the production of CO₂ and DIP technique during 96 hours. The results from the DIP using the color tracer did not differ from the ones obtained without it, even though the concentrations of CO₂ indicated that the fungal metabolic activity has been affected by the tracer.

Keywords: Solid-state cultivation. Digital image processing. Fungal growth. *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. Rhodamine B.

4.1 Introdução

O cultivo em estado sólido (CES) é definido como o processo de fermentação realizado em substrato sólido com umidade suficiente para suportar o crescimento e atividade metabólica do microrganismo, mas sem exceder a capacidade de retenção de água do meio poroso (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Neste contexto, tem-se utilizado resíduos das agroindústrias como substratos, devido à sua alta disponibilidade e baixo custo, tornando este processo vantajoso quando comparado ao cultivo submerso (WANG; YANG, 2007; SOCCOL et al., 2017).

Os principais problemas a serem enfrentados no CES em escala industrial estão relacionados aos aspectos de engenharia, como falta de processos padronizados, reprodutibilidade limitada dos resultados experimentais, alta resistência às transferências de massa e energia, dificuldade em manusear sólidos em reatores e a quantificação de biomassa para a proposição da cinética de reações (WANG; YANG, 2007; SOCCOL et al., 2017).

A estimativa da biomassa é um parâmetro essencial para o controle dos processos, no entanto, a medida direta no substrato sólido não é possível, devido à dificuldade de separar o microrganismo do substrato, que permanece entremeado entre os poros e aderido às partículas. Dessa forma, o uso de métodos indiretos é necessário para os estudos cinéticos do crescimento microbiano, dentre os quais pode-se destacar, a estimativa de componentes da estrutura celular (N-acetil-glicosamina, ergosterol e proteínas, por exemplo), de metabólitos (enzimas), de gases de respiração (CO₂ e O₂) e quantificação visual do micélio (processamento digital de imagem - PDI) (COURI et al., 2006; RUTSATZ, 2006). Para diferenciar partículas em biomassa fúngica nos ensaios de PDI, é frequente o uso de corantes

do material sólido e uma das vantagens da técnica é sua rapidez e baixo custo. Em biorreatores de tambor rotativo, o PDI pode ser empregado para avaliar a movimentação das partículas (GRAJALES et al., 2012; TADA et al., 2017b) e potencialmente poderia ser aplicado para avaliação do crescimento microbiano e de sua influência sobre a movimentação do meio.

Diante da possibilidade de uso da técnica de PDI para avaliar o crescimento fúngico em biorreator de tambor rotativo, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do uso do traçador colorido Rodamina B no crescimento do fungo *M. thermophila* I-1D3b em substrato composto por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. O crescimento do fungo foi estimado pela produção de CO₂ e pela técnica de processamento digital de imagem.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Substrato

Foi utilizado como substrato bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. O bagaço foi doado pela Companhia Virgolino de Oliveira Açúcar e Álcool, de José Bonifácio – SP, sendo esse, seco em estufa com circulação de ar a 60°C até peso constante, peneirado para conferir maior uniformidade ao meio poroso, e padronizado como a fração retida entre peneiras com diâmetros 2 e 4 mm. O farelo de trigo foi adquirido no comércio local e seco em estufa com circulação de ar a 45°C até peso constante. Nesses substratos adicionou-se solução aquosa Rodamina B a 0,02% (p/v) até obterem coloração homogênea, após, foram secos novamente, nas mesmas condições especificadas. A concentração de Rodamina B utilizada foi determinada experimentalmente por Grajales (2014) e Tada et al. (2017b) para esses substratos. Em seguida os substratos foram armazenados em embalagens de polietileno de parede espessa em temperatura ambiente. Os cultivos sem e com coloração foram denominados como CN e CR, respectivamente.

4.2.2 Cultivo em estado sólido

O fungo *M. thermophila* I-1D3b, foi isolado pelo Grupo de Pesquisa em Bioenergia do IBILCE/UNESP a partir de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar. A manutenção do microrganismo foi realizada em tubos de ensaio contendo meio ágar batata dextrose (BDA) recoberto por um filme de óleo mineral. O inóculo foi preparado cultivando-se o fungo a 45°C

em estufa DBO por 96 horas, em frascos *Erlenmeyer* inclinados contendo meio BDA. Após o cultivo, foi adicionada solução nutriente aos frascos e a superfície do meio foi raspada para a suspensão dos esporos. A solução nutriente foi composta de 3,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 3,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g.L⁻¹ de CaCl₂ e 1,0 g.L⁻¹ de Tween 80, ajustada para pH 5,0 com solução de HCl. A concentração de esporos foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer em microscópio ótico.

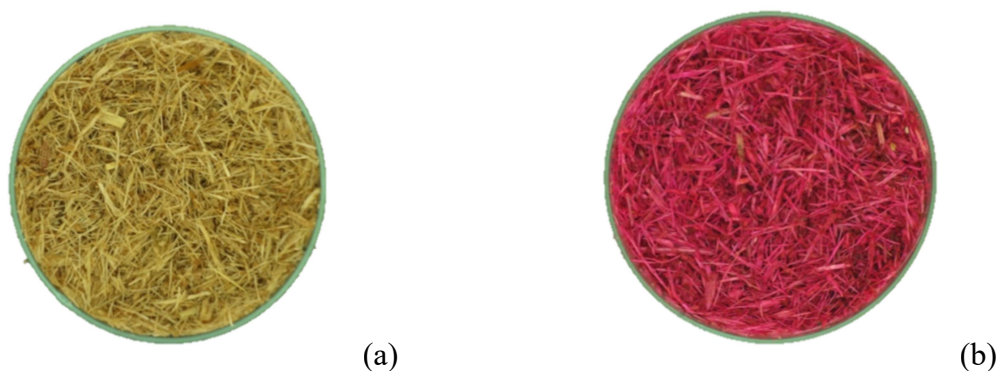
Nos ensaios de fermentação foram utilizadas as condições de cultivo otimizadas por Zanelato et al. (2012), empregando-se proporções de 7:3 (p/p) de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, respectivamente, autoclavados a 121°C por 20 min. Os substratos foram umidificados a 75% (b.u.) com suspensão de inóculo na concentração de 10⁷ esporos.g meio seco⁻¹, mantidos à temperatura de 45°C por 96 horas em câmara DOB ou em biorreator de leite empacotado.

4.2.3 Determinação indireta do crescimento fúngico

4.2.3.1 Técnica de processamento digital de imagem

Realizou-se cultivos em placas de Petri, sem e com a adição de Rodamina B, como mostra a Figura 4.1. A cada 24 horas, as placas foram fotografadas sob condições de iluminação controladas utilizando câmera digital DSC RX-100 (Sony Co., China). Em seguida as imagens foram digitalizadas e analisadas empregando-se o *software Image Pro Plus 6* (Media Cybernetics Inc., Rockville, EUA), onde a área de coloração reconhecida pelo programa correspondia ao substrato sem ocupação de hifas na superfície da placa (GRAJALES, 2014; TADA et al., 2017b).

Figura 4.1 – Imagem das placas de Petri utilizadas para o cultivo em estado sólido: a) sem coloração (CN); b) com coloração (CR).



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.3.2 Produção de gás carbônico (CO₂)

Os ensaios foram realizados em biorreator de leito empacotado, construído de forma modular em aço inox, composto por cinco módulos de diâmetro interno 7,26 cm e altura 10 cm, similar ao empregado por Perez; Casciadori e Thoméo (2019). O comprimento total do leito foi de 50 cm, a temperatura da camisa foi fixada em 45°C, por intermédio da circulação de água, e o ar úmido foi introduzido à vazão de 43 L.h⁻¹, a 45°C, por 96 horas. A massa de substrato empacotado foi de 45 gramas de sólido seco em cada módulo e a vazão de ar utilizada foi calculada com base no número modificado de Damköhler igual a 1, seguindo-se Perez; Casciadori e Thoméo (2019). Foram realizados experimentos simultâneos do substrato com e sem adição de solução Rodamina B em biorreatores independentes. Durante o cultivo foi feita a coleta dos gases em cada módulo e estes foram analisados para determinação da concentração de CO₂ por meio de um analisador de gases Tandem-Pró (Magellan Biotech, Hertfordshire, G. B.).

4.3 Resultados e Discussão

A Tabela 4.1 apresenta os resultados da técnica de PDI e a Figura 4.2 mostra como foi realizada a quantificação da área de crescimento do *M. thermophila* I-1D3b no cultivo em estado sólido. Observou-se que a partir de 24 horas de cultivo é possível acompanhar o crescimento do fungo, que ocupou quase toda a superfície do meio em 96 horas (Tabela 4.1), e esses resultados não diferiram significativamente quando comparado o meio de cultivo com e sem coloração com Rodamina B. Durante esse período, notou-se que a cor na superfície do substrato mudou durante o cultivo sólido, devido ao crescimento do fungo. Resultados semelhantes foram apresentados por Gomes (2015) ao monitorar a área de crescimento da biomassa do fungo *M. thermophila* M.7.7 ao longo do processo de cultivo em estado sólido por 120 horas no mesmo substrato, afirmando que em meios de cultivos onde existe um contraste eficiente entre o microrganismo e o meio, também é possível quantificar a taxa de crescimento microbiano por PDI.

Neste contexto, estão disponíveis na literatura trabalhos que empregaram a técnica de análise de imagens em sistemas particulados, alguns aplicados a tambores rotativos, como Tada et al. (2017b), que avaliaram a mistura e movimentação de partículas de bagaço de cana-de-açúcar em tambor rotativo, utilizando Rodamina B como marcador. O trabalho ressalta que a área reconhecida pelo *software* é muito próxima à concentração de traçador das amostras preparadas. Couri et al. (2006) utilizaram uma técnica de PDI com aplicação de operações

matemáticas, máscara binária e filtros (lineares e não lineares), adquirindo imagens em microscópio óptico, para uma melhor visão sobre o monitoramento do crescimento de *Aspergillus niger* 3T5B8 no cultivo em estado sólido, usando farelo de trigo como substrato, onde indicou que a técnica pode ser usada para estimativa indireta do crescimento microbiano. Ainda assim, poucas referências são encontradas utilizando a técnica de PDI para a avaliação do crescimento de fungos filamentosos em cultivo sólido.

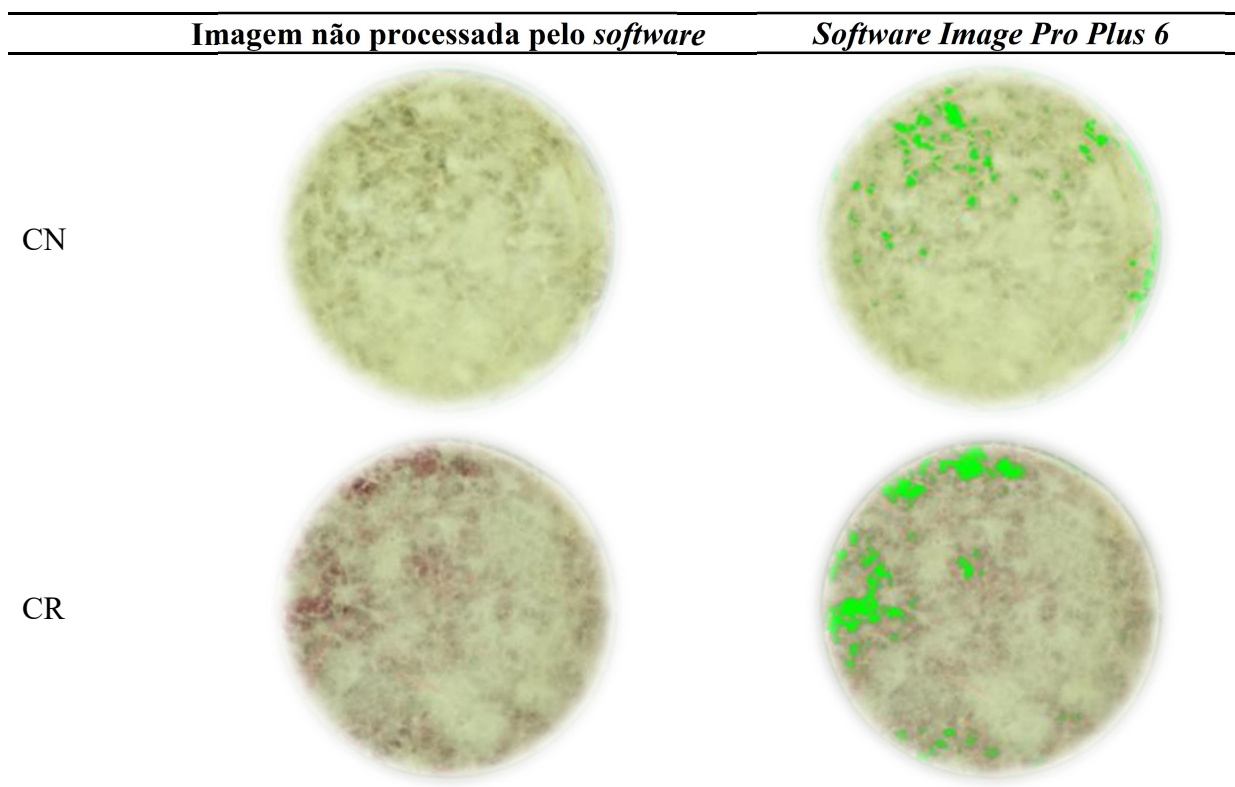
Tabela 4.1 – Resultados da área colorida identificada pelo *software Image Pro Plus 6* em relação à área total (em porcentagem), correspondente à área de substrato sem colonização.

Cultivo	Tempo (horas)			
	24	48	72	96
CN	73,55 ± 2,75 ^a	37,95 ± 9,00 ^a	21,24 ± 0,99 ^a	3,25 ± 0,12 ^a
CR	73,41 ± 1,15 ^a	37,98 ± 7,73 ^a	22,12 ± 4,49 ^a	3,65 ± 2,41 ^a

CN: cultivo sem coloração; CR: cultivo com coloração. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4.2 – Quantificação da área de crescimento do *M. thermophila* I-1D3b em cultivo no estado sólido em placas de Petri no tempo de 96 horas.



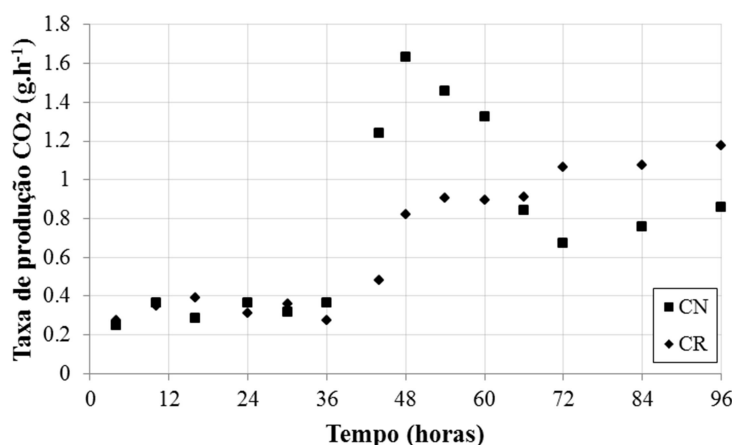
CN: cultivo sem coloração; CR: cultivo com coloração.

Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 4.3 apresenta a taxa de produção de gás carbônico por hora de cultivo em biorreator de leito empacotado, enquanto a Figura 4.4 apresenta o total acumulado, em porcentagem, no tempo de cultivo. Uma das vantagens da medida da concentração de CO₂ é não necessitar de amostragem do meio de cultivo, pré-tratamentos e análises químicas do fermentado, podendo ser realizadas medidas *online* (CASCIATORI, 2015). Nesse estudo não foi possível correlacionar os dados com a produção de biomassa do fungo, pois essa estimativa precisa ser calibrada por algum outro método de referência.

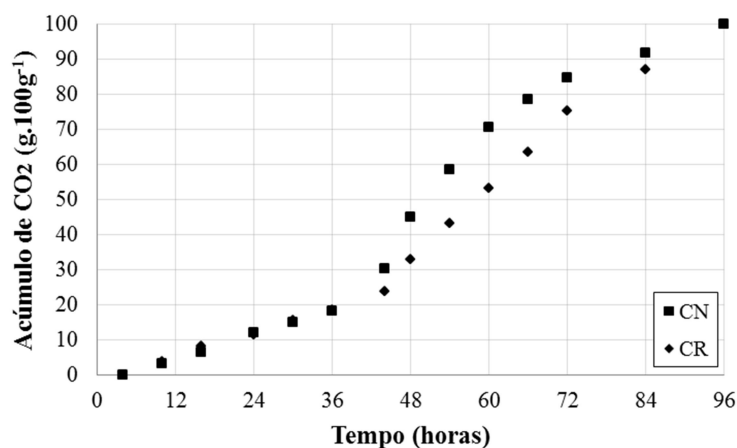
Comparando-se os resultados de CN e CR nas Figuras 4.3 e 4.4, observa-se que até 36 horas de cultivo as concentrações praticamente se sobrepõem. No entanto, para tempos posteriores, as concentrações de CO₂ obtidas nos cultivos com Rodamina B foram inferiores às obtidas sem o corante, indicando que o corante inibiu o crescimento microbiano. Como os resultados do PDI para os cultivos CN e CR pouco diferiram, acredita-se que o crescimento do fungo na superfície das placas de Petri expostas ao ar não foi afetado, mas que no interior do biorreator houve a geração de algum composto inibitório que não foi satisfatoriamente removido, afetando o metabolismo microbiano.

Figura 4.3 – Taxa de produção de CO₂ por hora de cultivo em estado sólido de *M. thermophila* I-1D3b em biorreator.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 4.4 – Total de CO₂ acumulado durante cultivo em estado sólido do *M. thermophila* I-1D3b em biorreator.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados da taxa de produção de CO₂ no cultivo CN seguiram o mesmo padrão apresentado por Rutsatz (2006), um rápido aumento inicial, atingindo o pico máximo próximo à metade da fase de crescimento, seguido de uma lenta redução. A produção total acumulada de CO₂ em 96 horas para CN foi de 246,61 kg_{CO2} e para CR foi de 207,14 kg_{CO2}.

O método frequentemente usado para a quantificação da biomassa em CES é pela determinação de N-acetil-glicosamina (COURI et al., 2006), porém essa determinação não é satisfatória quando o meio de cultivo CR foi empregado, pois a reação decorrente do método de determinação de N-acetil-glicosamina possui a mesma coloração rosa do traçador.

4.4 Conclusão

O processamento digital de imagens pode ser usado para estimativa indireta de biomassa em cultivo em estado sólido, porém quando se empregam traçadores coloridos, para aumentar o contraste entre as biomassas fúngica e vegetal, ensaios específicos devem ser realizados para avaliar se há inibição do crescimento microbiano devido ao traçador. No presente estudo, a técnica de processamento digital de imagens não constatou influência no crescimento do fungo no substrato sem e com coloração por Rodamina B, enquanto que as concentrações de CO₂ observadas indicam que o corante pode interferir na atividade metabólica do microrganismo.

CAPÍTULO 5. PROPRIEDADES REOLÓGICAS DE MISTURAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE TRIGO DURANTE O CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

RESUMO

As propriedades físicas dos sólidos utilizados como substratos no cultivo em estado sólido podem sofrer mudanças drásticas ao longo do cultivo, entre elas as propriedades reológicas. O entendimento dessas propriedades é fundamental para simulação e operação mais realista de biorreatores de leitos móveis e estáticos. Este trabalho teve como objetivo obter experimentalmente parâmetros reológicos de um meio composto por bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT) antes e durante o cultivo com o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b visando à produção de celulases. Uma análise do perfil de textura (TPA) e ensaios de resistência à tração foram realizados e parâmetros como dureza, coesão e elasticidade foram determinados. Para os experimentos de resistência à tração, o fungo foi cultivado em dois discos de FT separados por um vazio definido, que foi preenchido pelo micélio aéreo ao longo do cultivo e a força necessária para desmontar os dois discos foi medida em função do tempo de cultivo. Outro experimento de resistência à tração foi realizado em um bloco de BC e FT e a força necessária para romper o bloco foi medida ao longo do cultivo. Experimentos de dupla compressão antes do cultivo foram realizados umedecendo as amostras bem antes do experimento (15 dias) e imediatamente antes do experimento. Experimentos de dupla compressão durante o cultivo foram realizados com amostras de diferentes teores de umidade e tempos de cultivo, umedecendo as amostras imediatamente antes do experimento. Os resultados mostraram que umedecer as amostras com muita antecedência do experimento produzia amostras mais duras. Observou-se uma tendência de diminuição da força de compressão com o aumento do tempo de cultivo, indicando degradação física do material sólido. A força de tensão de ruptura do micélio aéreo e do meio cultivado ocorreu às 24 horas de cultivo, coincidindo com a atividade respirométrica máxima do fungo. Os resultados aqui obtidos são relevantes para a previsão da força necessária para girar um tambor ao longo do cultivo e a altura máxima permitida da coluna em biorreatores de leito compactado.

Palavras-chave: Cultivo em estado sólido. Reologia de sólidos. Análise de perfil de textura. Bagaço da cana-de-açúcar. Farelo de trigo. *Myceliophthora thermophila* I-1D3b.

ABSTRACT

The physical properties of the solids used as substrates in solid-state cultivation may undergo through dramatic changes along the cultivation, among them the rheological properties. The understanding of these properties is fundamental for more realistic simulation and operation of bioreactors of moving and static beds. This work aimed to obtain experimentally rheological parameters of a medium composed by sugarcane bagasse (SCB) and wheat bran (WB) before and during the cultivation with the fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. A texture profile analysis (TPA) was performed and assays of compression and tensile strength were carried out and parameters such as hardness, cohesiveness and springiness were determined. For the experiments of tensile strength, the fungus was cultivated in two discs of wheat bran separated by a definite void, which was filled by the aerial mycelium along the cultivation and the force required to take apart both discs was measured as a function of the cultivation time. Another tensile strength experiment was carried out in a block of sugarcane bagasse and wheat bran and the force required to disrupt the block was measured along the cultivation. Experiments of double compression before the cultivation were carried out moistening the samples well in advance of the experiment (15 days) and just before the experiment. Experiments of double compression during the cultivation were done with samples at different moisture contents and cultivation times, moistening the samples just before the experiment. The results showed that moistening the samples well before the experiment produced harder samples. A trend of decrease of the compression force was noticed with the increase of the cultivation time, indicating physical degradation of the solid material. The breaking stress force of the aerial hyphae and of the cultivated medium took place at 24 h of cultivation, which was coincident with the maximum respirometric activity of the fungus. The results here obtained will be of relevance to the forecast of the force required to rotate a drum along the cultivation and the maximum allowable column height in packed bed bioreactors.

Keywords: Solid-state cultivation. Solid rheology. Texture profile analysis. Sugarcane bagasse. Wheat bran. *Myceliophthora thermophila* I-1D3b.

5.1 Introdução

A cana-de-açúcar é uma das tradicionais plantas cultivadas no Brasil e é destinada principalmente à produção de etanol. Após o processamento, é produzido bagaço de cana-de-açúcar, que atualmente são queimados em caldeiras para gerar energia elétrica. No entanto, devido à sua alta disponibilidade, o bagaço pode ser empregado para o cultivo de microrganismos visando à produção de vários produtos de maior valor agregado, dentre os quais enzimas de interesse da indústria do etanol de segunda geração (AITA et al. 2019; CASCIATORI; THOMÉO, 2018; FARINAS, 2015; FRASSATTO et al., 2020; PANDEY et al., 2000).

Misturas de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT) foram empregadas com sucesso para a síntese de celulasas e hemicelulasas por cultivo em estado sólido (CES) (PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019; ZANELATO et al., 2012). O FT é frequentemente usado em misturas com materiais lignocelulósicos para CES como indutor do crescimento de fungos, uma vez que possui um equilíbrio favorável entre fontes de carbono facilmente disponíveis (amido) e proteínas (KATILEVICIUTE et al.; 2019).

Zanelato et al. (2012) cultivaram o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em misturas de BC e FT em embalagens plásticas e em biorreator de leito empacotado, produzindo elevada atividade de endoglucanases e xilanases. Pelas condições otimizadas obtidas por esses autores, Perez, Casciadori e Thoméo (2019) propuseram alguns critérios para aumentar os biorreatores de leito empacotado, alegando que é possível aumentar o tamanho dos leitos empacotados em escalas industriais. Frassatto et al. (2020) utilizaram esses substratos para produção de β -glicosidase pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus* e aplicaram o coquetel enzimático resultante para sacarificação do BC *in natura*, obtendo sacarificação eficaz. Camassola e Dillon (2010) produziram celulasas totais (papel de filtro), endoglucanase, β -glicosidase e xilanases ao cultivar *Penicillium echinulatum* em BC pré-tratado alcalinamente misturado a FT em diferentes proporções, obtendo elevadas atividades enzimáticas.

Algumas propriedades físicas das misturas de BC e FT foram relatadas na literatura, como porosidade e densidade do leito a granel (CASCIATORI et al., 2014), condutividade térmica efetiva (CASCIATORI et al., 2013) e propriedades higroscópicas (CASCIATORI et al., 2015). Por outro lado, não foi encontrado nenhum trabalho sobre as propriedades reológicas das misturas de BC e FT com ou sem cultivo. Para os biorreatores de leito móvel, a resistência à tração e as propriedades de compressão são importantes para evitar regiões de

baixa porosidade e permitir boas características de mistura das partículas. Portanto, o conhecimento das propriedades reológicas é importante para melhorar as condições operacionais do processo e para um melhor projeto dos biorreatores, considerando que as propriedades físicas do meio podem sofrer alterações consideráveis ao longo do cultivo devido ao aumento da biomassa microbiana e à degradação do substrato sólido (OSADOLOR et al., 2018; ZHANG; WANG; CHEN, 2017).

A aglomeração de partículas de grãos de trigo ao longo do cultivo por *Aspergillus oryzae* em um biorreator de tambor rotativo foi simulada por Schutyser et al. (2003) por meio do modelo de partículas discretas. Com base nas características físicas das partículas, o modelo foi capaz de prever as interações, movimentos, tamanhos e quantidade de agregados após o primeiro evento de rotação, e os autores recomendaram iniciar a agitação antes que o consumo máximo de oxigênio pudesse ser observado. O modelo exigiu a resistência do micélio aéreo fúngico às forças de resistência à tração, as quais foram determinadas experimentalmente.

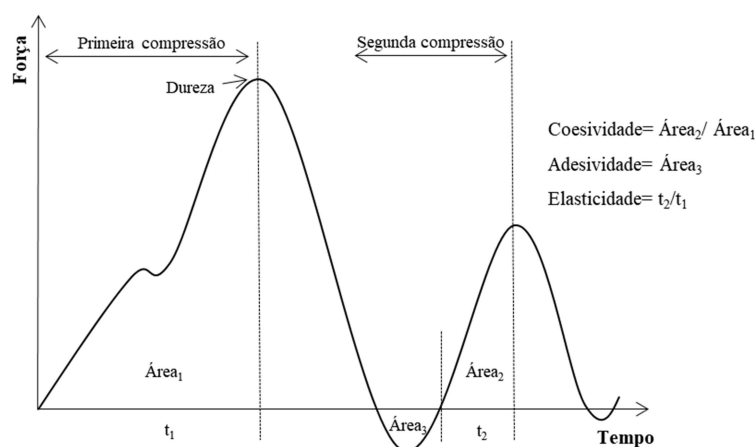
Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar experimentalmente as propriedades reológicas de misturas dos substratos BC e FT, antes e ao longo do cultivo do fungo *M. thermophila* I-1D3b. As propriedades relativas às forças de compressão e a resistência à tração foram determinadas em função da proporção BC:FT, da umidade e do tempo de cultivo. Algumas metodologias são inovadoras e foram desenvolvidas especificamente para este tipo de material. Este fungo e este meio de cultivo foram escolhidos devido ao grupo de pesquisa ter uma longa experiência neste cultivo, com publicações e informações sobre propriedades físicas do meio com e sem cultivo (CASCIATORI et al., 2013; CASCIATORI et al., 2014, CASCIATORI et al., 2015; CASCIATORI; THOMÉO, 2018; TADA et al.; 2017b; TADA et al., 2020) e em experimentos de ampliação de escala de biorreatores (PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019; ZANELATO et al., 2012). Portanto, o estudo das propriedades reológicas ajudará a entender alguns aspectos do projeto e operação de biorreatores de leito compactado e de tambor rotativo, embora a técnica aqui apresentada possa ser usada para outro sistema microbiano de CES.

5.2 Análise de Perfil de Textura

Um dos testes mais simples para estimar propriedades relacionadas à textura de alimentos sólidos é o teste de compressão, que é realizado aplicando-se uma taxa de deformação constante a amostra e obtendo-se a força de compressão correspondente. Durante

a análise de perfil de textura (TPA), a amostra é submetida a dois ciclos consecutivos de compressão, de modo a simular a mastigação de alimentos sólidos. O resultado de um experimento de TPA é um diagrama de força-tempo semelhante ao apresentado na Figura 5.1, que fornece parâmetros como dureza, coesão, elasticidade, adesividade, fraturabilidade, mastigação e gomosidade (BOURNE, 2002; RAO; QUINTERO, 2014).

Figura 5.1 – Resultado típico da análise de perfil de textura.



Fonte: Elaborado pela autora.

O parâmetro de dureza (fornecida em newtons) é definido como a força máxima necessária para produzir a deformação desejada do material. Geralmente, a distância percorrida pela sonda do analisador de textura para comprimir o material é fixa, bem como a velocidade da sonda. A coesividade (adimensional) representa a intensidade das ligações internas do material que mantém sua estrutura, indicando quanto à amostra pode ser deformada antes de sua ruptura, e é representada pela resistência do material a uma segunda deformação em relação a como ele se comportou em um primeiro ciclo de deformação. A elasticidade (adimensional) é definida como a capacidade de uma amostra deformada retornar à sua condição inicial depois que a força de deformação é removida. A adesividade (joules) é definida como o trabalho necessário para superar a força de atração entre a amostra e uma superfície (CHEN; OPARA, 2013; GONZÁLEZ; MORELOS; CORREA, 2015; SZCZESNIAK, 2002).

Os experimentos de TPA são amplamente utilizados na caracterização textural de uma grande variedade de alimentos sólidos, como frutas, carnes, queijos e gomas, entre outros (GONZÁLEZ; MORELOS; CORREA, 2015), matérias-primas e formulações de cosméticos e fármacos (TAI; BIANCHINI; JACHOWICZ, 2014). TPA é frequentemente usado em alimentos sólidos fermentados (NAYAK; PANDA, 2016; SCHOBBER et al., 2005; SHAH;

SHAH; MANDAWAR, 2006; TU et al., 2020), no entanto, de acordo com o nosso conhecimento, não há nenhum relatório na literatura que aplique TPA a materiais de fibras longas durante o CES. Devido à heterogeneidade dos subprodutos agroindustriais sólidos utilizados como substrato para o crescimento microbiano, os métodos usuais de TPA devem ser adaptados, buscando uma amostra uniforme e realizando um grande número de experimentos para produzir resultados confiáveis.

Schutyser et al. (2003) e Arora et al. (2017) estão entre os poucos trabalhos publicados sobre propriedades reológicas dos materiais durante o CES. Schutyser e colaboradores (2003) desenvolveram um método para estimar a resistência à força de ruptura do micélio aéreo de *Aspergillus oryzae* entre grãos de trigo, a fim de prever a força necessária para decompor aglomerados de grãos em um biorreator rotativo. No método desenvolvido, dois discos de substrato em placas de Petri, foram inoculados e colocados face a face, formando um sanduíche, separados por distâncias definidas, para permitir a troca gasosa e o desenvolvimento das hifas. Quando o micélio aéreo começou a ser percebido, a resistência à tração necessária para separar os discos foi medida usando um analisador de textura. Os resultados foram reprodutíveis e os autores afirmaram que a técnica foi capaz de produzir dados que poderiam ser usados para simular as forças ocorridas em um sistema de CES real composto por grãos de trigo. Arora et al. (2017) usaram um sistema semelhante para medir a resistência à tração das hifas aéreas de *Rhizopus oryzae* cultivadas em uma mistura de farelo de trigo e bolo de óleo de linhaça, a fim de prever eventos de mistura em um novo biorreator de leito móvel para CES.

5.3 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioenergia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas na Paulista Estado Universidade (IBILCE / UNESP), São José do Rio Preto, Brasil. As condições experimentais adotadas neste trabalho para o cultivo de *M. thermophila* I-1D3b em uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (proporção 7:3 BC:FT, temperatura 45°C, teor de umidade 75%, base úmida) foram as condições ótimas obtidas por Zanelato et al. (2012), exceto quando indicado de outra forma.

5.3.1 Substratos

Foram utilizados como substratos bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT). O BC foi doado pela Companhia Virgolino de Oliveira Açúcar e Álcool, de José Bonifácio – SP, sendo esse, seco em estufa com circulação de ar a 60°C até peso constante, peneirado para conferir maior uniformidade ao meio poroso, e padronizado como a fração retida entre peneiras com aberturas de 2 e 4 mm. O FT foi adquirido no comércio local e seco em estufa com circulação forçada de ar a 45°C até peso constante. Em seguida os substratos foram armazenados em embalagens de polietileno de parede espessa em temperatura ambiente.

5.3.2 Microrganismo

O fungo *M. thermophila* I-1D3b foi isolado pelo Grupo de Bioenergia do IBILCE/UNESP a partir de pilhas de BC. A manutenção do microrganismo foi realizada em tubos de ensaio contendo meio ágar sabouraud dextrose (ASD) inclinado, incubados em estufa DBO a 45°C por um período de 96 horas e posteriormente armazenados em refrigerador a 5°C, preservando-o com repiques periódicos.

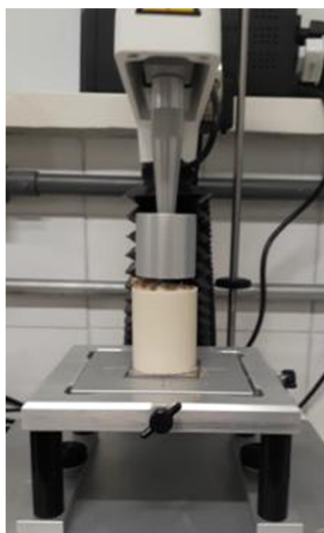
No preparo do inóculo, o microrganismo foi transferido para frascos *Erlenmeyer* contendo 50 mL de meio ASD, previamente autoclavados a 121°C por 20 min, e incubados a 45°C por 96 horas. Os esporos foram raspados da superfície da colônia com 50 mL de solução nutriente, previamente autoclavada, composta de 3,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 3,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g.L⁻¹ de CaCl₂ e 1,0 g.L⁻¹ de Tween 80, ajustada para pH 5,0 com solução de HCl. A concentração de esporos foi estimada pela contagem em microscópio óptico usando Câmara de Neubauer. A concentração de esporos utilizada em todos os ensaios foi de 10⁷ esporos.g sólido seco⁻¹.

5.3.3 Análise do perfil de textura

A análise do perfil de textura (TPA) foi realizada em texturômetro TA.TX Plus (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra), equipado com uma célula de carga de 50 kg e gerenciado pelo *software* Exponent 32 versão 5.1.1.0 (Stable Micro Systems, Inglaterra). O experimento de dupla compressão foi realizado utilizando o *probe* cilíndrico de alumínio com 36 mm de diâmetro (P/36R) para comprimir a amostra em 50% de sua altura original, a uma

velocidade de teste de $1,0 \text{ mm.s}^{-1}$ com tempo de recuperação de 5 segundos entre duas compressões consecutivas (Figura 5.2). A partir da curva força-tempo da TPA foram obtidos os parâmetros de dureza, coesividade e elasticidade.

Figura 5.2 – Texturômetro TA.TX Plus para o experimento de análise do perfil de textura, utilizando o *probe* cilíndrico de alumínio com 36 mm de diâmetro (P/36R).



Fonte: Elaborado pela autora.

As amostras de BC, FT e de misturas BC:FT foram acondicionadas em cilindros de cloreto de polivinila (PVC) de 38 mm de diâmetro e 50 mm de altura, padronizando-se o método de empacotamento dos moldes conforme descrito em Casciadori et al. (2014) para empacotamentos soltos. Os ensaios de TPA foram realizados antes e ao longo do cultivo. Para o CES, os moldes foram higienizados com solução clorada a 200 ppm por 30 minutos e, após serem empacotados com o meio de cultivo já inoculado, acondicionados em sacos de polipropileno, aos quais foram acoplados bocais de PVC. Dentro dos bocais foram inseridos tampões de algodão, a fim de garantir a troca de gases e assegurar que não houvesse contaminação exógena.

Para avaliar a influência do teor de umidade da amostra sobre os parâmetros do TPA, a altura total de cada amostra foi fixada em 50 mm, bem como o peso seco total do material em 4g BC, 15g FT e 5g BC:FT. Nos experimentos sem cultivo, o teor de umidade variou em 15, 30, 45, 60 e 75% (b.u., como as demais deste trabalho) para amostras de BC e FT e misturas BC:FT na proporção de peso 7:3. Estas amostras foram umidificadas e deixadas em repouso por 15 dias em refrigerador doméstico, para absorção da água. Alguns experimentos foram realizados umedecendo as amostras não inoculadas a 55, 65 e 75% imediatamente antes do experimento, como geralmente realizado em CES, e as proporções BC:FT utilizadas foram

fixadas em 1:1, 7:3 e 9:1. Para essas experiências, a massa de BC foi fixada e a massa de FT foi ajustada na proporção desejada.

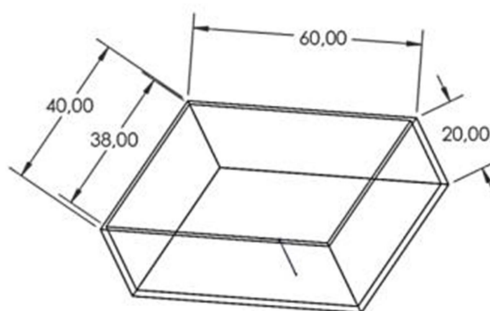
Para avaliar a influência do cultivo, os substratos (7:3 e 9:1, BC:FT) foram hidratados imediatamente antes das experiências e o meio foi inoculado com a suspensão de esporos e a solução nutriente até o teor de umidade desejado (65 e 75%). As amostras foram retiradas nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas de cultivo. A escolha das proporções e umidades empregadas nos ensaios baseou-se em estudos anteriores do grupo para a produção de celulasas (ZANELATO et al., 2012). Foram realizadas cinco repetições independentes para cada ensaio de TPA deste trabalho.

5.3.4 Resistência do substrato a resistência à tração

Como pouco se sabe na literatura sobre a força necessária para romper um meio poroso fibroso contendo micélio fúngico, foi necessário desenvolver o método descrito a seguir.

Os substratos foram cultivados nas caixas de acrílico apresentadas na Figura 5.3, onde uma grande superfície foi exposta ao ambiente para permitir trocas gasosas ao longo do cultivo. A análise de tração foi realizada no texturômetro, utilizando-se o *probe* Tensile Grips A/TG (Figura 5.4). O bloco cultivado foi retirado da caixa e colocado longitudinalmente entre as garras do *probe*, que seguravam o material fermentado pelas extremidades, com distância inicial entre as garras de 30 mm e separadas a velocidade de $1,0 \text{ mm.s}^{-1}$ até rompimento da amostra. A resistência à tração do bloco cultivado foi considerada como sendo a força máxima obtida durante a ruptura da amostra.

Figura 5.3 – Representação da caixa de acrílico usada nos experimentos de resistência à tração. A superfície superior foi aberta ao ambiente para permitir trocas gasosas.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5.4 – Texturômetro TA.TX Plus para o experimento de resistência do substrato a resistência à tração, utilizando *probe* Tensile Grips A/TG.



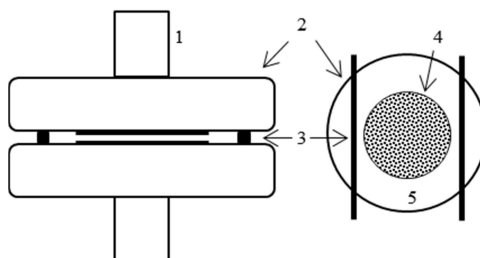
Fonte: Elaborado pela autora.

O substrato foi preparado na proporção 7:3 de BC:FT, inoculado com a suspensão de esporos e a solução nutritiva até atingir a umidade de 75% (b.u.). A partir de 18 horas de cultivo o bloco adquire sustentação para encaixar as garras do *probe*. Logo, foram feitos ensaios nos tempos de cultivo de 18, 24, 48, 72 e 96 horas e foram realizadas cinco repetições independentes para cada ensaio. Para o CES, as caixas foram higienizadas com solução de cloro e, depois de embaladas como descrito anteriormente (item 5.3.3), foram colocadas em sacos plásticos de polipropileno conforme mencionado anteriormente.

5.3.5 Resistência do micélio aéreo a resistência à tração

A resistência do micélio aéreo foi determinada seguindo Schutyser et al. (2003), com modificações. O FT foi umidificado até atingir 75% de umidade, moldado a um tubo de PVC (42 mm de diâmetro interno) para formar estrutura de discos e autoclavado a 121°C por 30 minutos. O FT foi removido do tubo, cortado em discos de 15 mm de espessura e colocados em placas de plástico de 75 mm de diâmetro, sobre um filme de ágar bacteriológico a 2% (p/v) líquido, aguardando-se a solidificação do ágar para procedimentos posteriores. Puxadores metálicos foram fixados às tampas para prender ao *probe* Tensile Grips A/TG utilizado, como é apresentado na Figura 5.5.

Figura 5.5 – Montagem experimental utilizada para determinar a resistência à tração do micélio aéreo de *M. thermophila* I-1D3b cultivado em farelo de trigo (1 – puxadores metálicos; 2 – placas de plástico; 3 – barras de alumínio; 4 – discos de farelo de trigo; 5 – ágar bacteriológico).

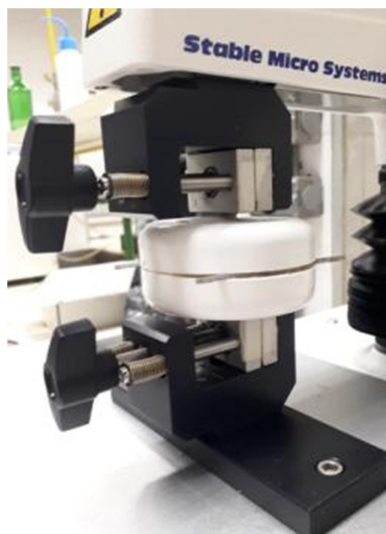


Fonte: Elaborado pela autora.

Os discos de FT foram inoculados com a suspensão de esporos de concentração 10^7 esporos.g sólido seco⁻¹, espalhando-a sobre a superfície. Dois discos de FT inoculados foram colocados face a face de forma similar a um sanduíche, separados por duas barras de alumínio, criando uma distância de 2 mm entre as placas, a fim de fornecer espaço suficiente para trocas gasosas e permitir o crescimento do micélio aéreo. Os sanduíches foram colocados em um recipiente fechado, no fundo do qual foi colocada água destilada estéril para criar um ambiente de cultivo saturado. O recipiente foi colocado em uma câmara DBO e a temperatura dos ensaios foi mantida em 45°C, sendo retiradas amostras nos tempos de cultivo de 12, 18, 24 e 30 horas. Foram realizadas cinco repetições independentes para cada tempo de cultivo.

O experimento de resistência à tração foi realizado em texturômetro TA.TX Plus (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) e a garra superior foi movida para cima a uma velocidade de 0,1 mm.s⁻¹ até rompimento da amostra (Figura 5.6). A força necessária ao rompimento do micélio aéreo foi considerada como a força máxima de tração. Para cada repetição foram obtidas duas forças consecutivas, com o intuito de verificar a força exercida pelo peso do sanduíche, sendo esta subtraída da força máxima obtida para a separação do micélio.

Figura 5.6 – Texturômetro TA.TX Plus para o experimento de resistência do micélio a resistência à tração, utilizando *probe* Tensile Grips A/TG.

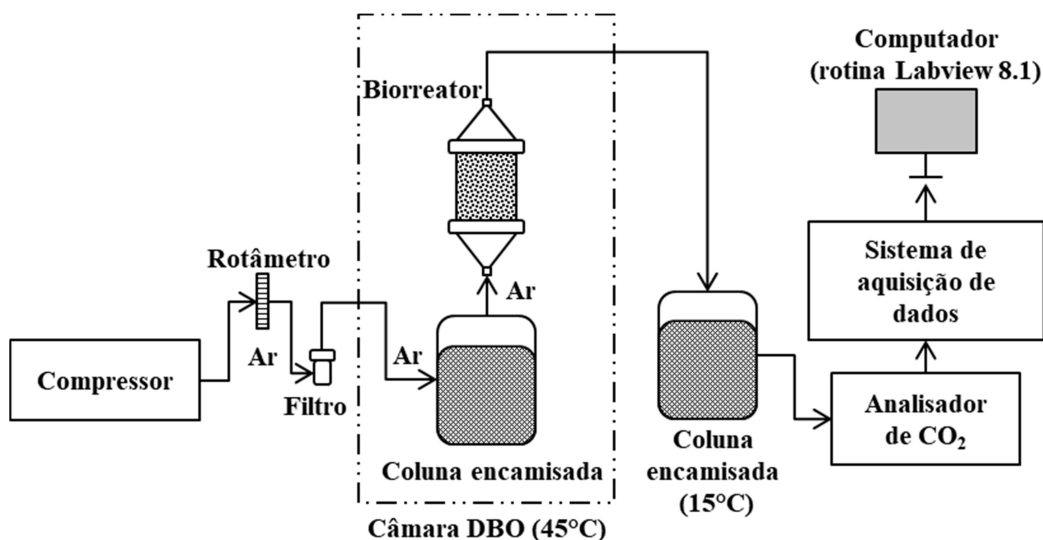


Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.6 Estimativa da biomassa fúngica por respirometria

Para estimar o crescimento microbiano nos diferentes ensaios, um experimento de cultivo em um leito empacotado com percolação transversal de ar saturado foi realizado, como pode ser visto no arranjo experimental apresentado na Figura 5.7. Entende-se que este sistema não é similar aos outros cultivos, no entanto, acredita-se que, embora a biomassa total possa ser afetada, o padrão da cinética de crescimento permanece inalterado. Portanto, não era o objetivo dessas experiências respirométricas determinar parâmetros cinéticos ou a concentração real de biomassa.

Figura 5.7 – Arranjo experimental para determinação da atividade metabólica por respirometria para o cultivo de *M. thermophila* I-1D3b em uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. O cultivo foi realizado em um leito empacotado.



Fonte: Elaborado pela autora.

O biorreator é constituído de um tubo de aço inoxidável com 6 cm de diâmetro interno e 12,5 cm de comprimento, empacotado com misturas de BC e FT nas proporções 7:3 e 9:1 com 75% de umidade. O biorreator foi mantido em câmara DBO a 45°C. A vazão do ar saturado foi medida por um medidor de vazão mássica (Cole-Parmer Instrument Co, Vernon Hills, EUA) e fixada em 15 L.h⁻¹, a uma temperatura de 45°C. Mais detalhes da configuração experimental podem ser encontrados em outros artigos (PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019; ZANELATO et al. 2012). A corrente de ar na saída do leito foi conduzida a uma coluna recheada com esferas de vidro e mantida a 15°C com água corrente por toda a camisa, a fim de reduzir a umidade do ar. O ar a baixa umidade foi introduzido no analisador de CO₂ equipado com um sensor de infravermelho NDIR (Alphasense Ltd, Great Notley, Reino Unido). O analisador de gases foi conectado a um sistema de aquisição de dados COMPACTDAQ (National Instruments, Austin, EUA) gerenciado pela rotina Labview 8.1 (National Instruments, Austin, EUA).

5.3.7 Análises estatísticas

Aos resultados foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias dos diferentes tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, por meio do *software Minitab 18* (Minitab Inc., State College, EUA).

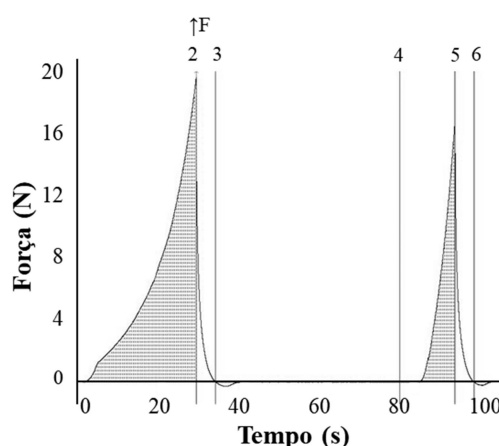
5.4 Resultados e Discussão

As propriedades reológicas do bagaço de cana (BC), farelo de trigo (FT) e misturas BC:FT foram obtidas experimentalmente neste trabalho. Os experimentos foram realizados antes e durante o cultivo com o fungo *M. thermophila* I-1D3b, tendo o teor de umidade, a proporção BC:FT e o tempo de cultivo como variáveis controladas.

5.4.1 Análise do perfil de textura

Um diagrama de força-tempo típico para o teste de dupla compressão de um substrato cultivado, obtido experimentalmente, é apresentado na Figura 5.8. Observe que a área sob as curvas é relativamente estreita, representando uma compressão rápida, uma indicação da baixa resistência da amostra à deformação. Considerando a alta porosidade das misturas BC:FT nas proporções aqui aplicadas (CASCIATORI et al., 2014) e a alta flexibilidade das fibras BC, era esperada essa baixa resistência. A área abaixo da linha de base na Figura 5.8 (A_3 na Figura 5.1) é desprezível, indicando pouca adesividade das amostras.

Figura 5.8 – Gráfico de força-tempo típico de um experimento de dupla compressão para uma mistura BC:FT na proporção de peso 7:3 após 96 h de cultivo em estado sólido por *M. thermophila* I-1D3b. Parcelas semelhantes foram obtidas para materiais porosos não cultivados.



Fonte: Elaborado pela autora.

Inicialmente, o TPA foi realizado em substratos não cultivados e umidificados previamente ao teste de compressão (15 dias). A Tabela 5.1 apresenta os parâmetros dureza,

coesão e elasticidade para BC, FT e para uma mistura de BC:FT na proporção de 7:3. A maioria dos coeficientes de variação (CV) foram inferiores a 10%, mostrando baixa variabilidade dos resultados. Como a precisão do equipamento para este teste é de 0,5% da leitura, a maior parte dessa variabilidade se deve às características da amostra. Alguns resultados publicados na literatura para alimentos muito distintos apresentam coeficientes de variação semelhantes, como para os músculos lombares de novilhas e touros (CV = 12,9% para dureza; CV = 16,1% para elasticidade) (HUIDOBRO et al., 2005), barras de cereais à base de trigo e soja (CV de 11 a 24% para dureza) (ARAMOUNIA; ABU-GHOUSH, 2011) e pão de sorgo sem glúten (CV de 7 a 22% para dureza) (SCHOBER et al., 2005). Em produtos da indústria de cosméticos, considerados sólidos elásticos e viscoelásticos, os coeficientes de variação são menores para dureza, como em condicionador (CV = 2,2%), shampoo (CV = 2,5) e creme antiinflamatório (CV = 4,6) (TAI; BIANCHINI; JACHOWICZ, 2014). Considerando que as fibras do BC são bastante irregulares e que o procedimento de empacotamento é manual e depende das habilidades do profissional, os coeficientes de variação aqui obtidos podem ser considerados satisfatórios. Os coeficientes de variação para FT são menores quando comparados aos BC e misturas BC:FT, uma vez que o empacotamento de fibras tende a ser menos uniforme que o empacotamento de material granular de pequeno diâmetro.

Tabela 5.1 – Parâmetros de TPA para bagaço de cana-de-açúcar (BC), farelo de trigo (FT) e mistura BC:FT na proporção de 7: 3 (peso) para uma condição de não cultivo. As amostras foram umidificadas 15 dias antes do experimento.

	Umidade (%)	BC			FT			BC:FT (7:3)		
		Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
Dureza (N)	15	85,94 ^A	7,21	8,38	338,93 ^B	6,68	1,97	81,05 ^A	4,17	5,14
	30	76,40 ^{AB}	9,40	12,31	158,66 ^D	2,61	1,65	69,21 ^B	2,36	3,41
	45	76,79 ^{AB}	8,94	11,64	206,63 ^C	11,12	5,38	59,42 ^C	2,89	4,86
	60	62,42 ^B	12,20	19,55	620,66 ^A	0,00	0,00	58,55 ^C	4,10	7,01
	75	68,25 ^B	4,38	6,42	nd	nd	nd	53,58 ^C	6,16	11,49
Coesividade	15	0,45 ^A	0,02	5,51	0,46 ^B	0,01	1,73	0,44 ^A	0,05	10,90
	30	0,40 ^{BC}	0,02	6,27	0,47 ^{AB}	0,02	4,73	0,40 ^A	0,02	5,85
	45	0,44 ^{AB}	0,03	5,84	0,49 ^A	0,02	3,85	0,42 ^A	0,01	2,14
	60	0,42 ^{AB}	0,03	7,38	nd	nd	nd	0,45 ^A	0,05	11,41
	75	0,35 ^C	0,03	8,61	nd	nd	nd	0,42 ^A	0,03	7,15
Elasticidade	15	0,53 ^A	0,03	6,17	0,40 ^B	0,02	4,70	0,46 ^A	0,05	11,61
	30	0,44 ^B	0,08	17,32	0,44 ^A	0,02	5,60	0,45 ^A	0,08	17,86
	45	0,49 ^{AB}	0,01	2,23	0,47 ^A	0,02	3,20	0,50 ^A	0,05	10,37
	60	0,47 ^{AB}	0,04	7,65	nd	nd	nd	0,52 ^A	0,04	7,50
	75	0,43 ^B	0,02	4,52	nd	nd	nd	0,53 ^A	0,09	16,16

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação ($CV = DP/Média$); nd: não determinado. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey no intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para BC e para a mistura BC:FT o parâmetro dureza foi afetado pela umidade, enquanto os parâmetros coesividade e elasticidade não. Para FT, nenhum parâmetro teve tendência definida com a umidade. Observa-se uma tendência de diminuição da dureza do BC e na mistura BC:FT com o aumento da umidade. Como esses materiais foram umidificados e deixados em repouso por 15 dias, acredita-se que a água tenha sido transferida para o interior das células das fibras, preenchendo seu volume, conforme apresentado por Casciatori et al. (2014), que mostraram que o volume celular era proporcional ao teor de umidade das fibras. Assim, acredita-se que a água absorvida proporcione maior flexibilidade da fibra, diminuindo, portanto, sua dureza. Por outro lado, o FT com o aumento da umidade adquiriu um aspecto mais denso, compacto e pastoso à medida que o teor de umidade aumentava, resultando no aumento de sua dureza. Deve ser destacado que a massa de sólidos secos empacotados nas células de medidas foi mantida constante, independente da umidade final do material e também que a altura inicial do teste era a mesma em todos os ensaios. Portanto, para um maior teor de umidade, os materiais foram levemente pressionados para dentro da célula de medição. Embora o procedimento tenha sido adequado para BC e para a mistura BC:FT, devido à alta porosidade desses meios, para o FT o meio era altamente compacto, resultando em um alto valor de dureza com 60% de umidade e não sendo possível realizar a determinação para a umidade de 75%. Para 60% de umidade, apenas o primeiro ciclo de compressão foi concluído, pois as amostras aderiram quase inteiramente na sonda durante a descompressão e em 75% a primeira compressão fez com que a amostra excedesse o volume da célula de medição.

A dureza foi reduzida de 5,6 para 2,6% quando o FT foi adicionado ao BC, dependendo do teor de umidade. Coesão e elasticidade foram pouco afetadas pela presença de FT. Em aplicações práticas de CES usando biorreatores de coluna empacotada, certa compactação ocorrerá no fundo de colunas de grande diâmetro, para leitos de BC e misturas de BC:FT com alto teor de umidade, devido à redução da dureza. Essa compactação implica na redução da porosidade do leito e consequente deficiente aeração, prejudicando o metabolismo microbiano.

Os parâmetros coesividade e elasticidade devem ser inferiores a 1, portanto, os valores aqui obtidos indicam que o meio poroso é razoavelmente elástico e coeso. Esses parâmetros pouco variaram com a umidade e são bastante semelhantes para BC e para a mistura BC:FT. Em termos de movimentação das partículas em biorreatores de tambor rotativo, essa elasticidade moderada implica que nem toda energia aplicada pela parede do tambor será transferida para o movimento das partículas, sendo parte gasta para flexionar as fibras. A

coesão é mais difícil de entender no contexto de um meio poroso, uma vez que na literatura da ciência de alimentos a coesão representa que os limites internos do material sólido foram superados. Como BC e FT são meios altamente porosos e o procedimento experimental adotado aqui comprimiu a amostra até 50% de sua altura inicial, a força de compressão dificilmente foi suficiente para superar os limites internos das fibras. Portanto, as discussões a seguir serão baseadas mais em termos de dureza.

Tada et al. (2017b) avaliaram o movimento de partículas de BC com um teor de umidade de 75% em um tambor rotativo e alegaram que o emaranhamento e a flexibilidade das partículas podem ser apontados como responsáveis pelo desvio do movimento tradicional de partículas relatado na literatura até agora (ver Mellmann, 2001), já que a maioria dos estudos foram realizados com partículas inelásticas e regulares. Para as fibras, houve uma maior resistência à mistura, uma vez que parte da energia da parede era usada para deformar as partículas em vez de movê-las. Uma das experiências relatadas por Tada e colaboradores (2017b) possuía um tubo interno, axialmente posicionado entre as partículas, e notou-se que houve aglomeração das partículas em torno desse tubo. Nessa região estagnada, a porosidade do leito era variável e o leito se tornava mais denso ao redor do tubo, o que poderia estar relacionado aos resultados de compressão apresentados anteriormente.

Resultados dos parâmetros de TPA na mistura BC:FT em diferentes proporções e umidades para amostras umidificadas pouco antes da realização dos ensaios são apresentadas na Tabela 5.2. Neste trabalho, as amostras foram umidificadas usando dois procedimentos diferentes, a fim de permitir tempo suficiente para a água atingir o volume interno das células ou para a água formar um filme líquido sobre as partículas. De acordo com Casciotori et al. (2015), partindo-se de BC e FT com umidade de 5%, são necessários cerca de 12 dias para que ambos absorvam o máximo de água possível (80% para FT e 75% para BC), de modo que se acredita que logo após a umidificação, pouca água tenha penetrado nas partículas. Deve-se ressaltar que é habitual a umidificação das partículas imediatamente antes dos processos de CES. No entanto, quando o BC é armazenado em usinas de cana-de-açúcar, seu teor de umidade é de cerca de 50% e é improvável que, para aplicações industriais, o material seja seco para ser umidificado posteriormente.

Tabela 5.2 – Parâmetros de TPA para misturas BC:FT em diferentes proporções e umidades para uma condição de não cultivo. As amostras foram umidificadas imediatamente antes do experimento.

Umidade (%)		Proporção BC:FT								
		9:1			7:3			1:1		
		Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
Dureza (N)	55	31,15 ^A	1,34	4,38	37,59 ^A	4,19	11,15	61,49 ^A	2,46	4,0
	65	36,96 ^A	6,48	18,02	34,89 ^A	2,96	8,49	56,91 ^A	2,26	3,96
	75	38,63 ^A	6,58	17,05	42,02 ^A	4,79	11,39	57,56 ^A	2,67	4,65
Coesividade	55	0,44 ^A	0,01	3,00	0,39 ^A	0,03	7,23	0,40 ^A	0,02	5,09
	65	0,43 ^A	0,02	3,62	0,43 ^A	0,03	6,67	0,42 ^A	0,02	5,51
	75	0,42 ^A	0,03	7,56	0,39 ^A	0,02	4,22	0,43 ^A	0,01	3,12
Elasticidade	55	0,50 ^A	0,04	8,43	0,47 ^A	0,04	8,63	0,42 ^A	0,02	5,22
	65	0,49 ^A	0,04	7,61	0,46 ^A	0,05	11,11	0,44 ^A	0,02	5,43
	75	0,45 ^A	0,03	6,07	0,45 ^A	0,03	7,72	0,46 ^A	0,03	5,81

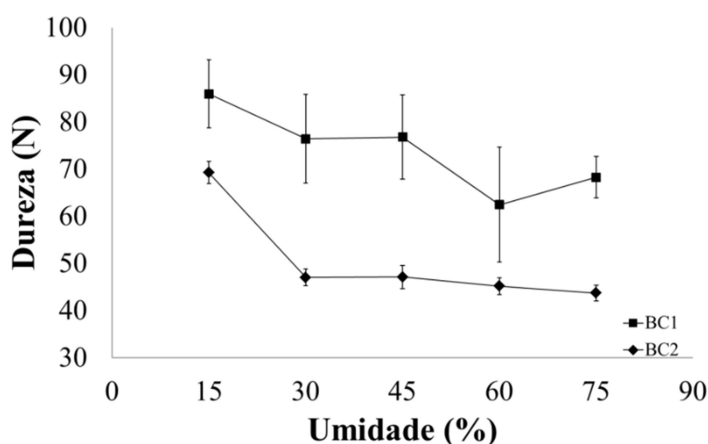
DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação (CV = DP/Média); BC: bagaço de cana-de-açúcar; FT: farelo de trigo. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey no intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaborado pela autora.

A dureza do parâmetro diminui quando o meio é umidificado pouco antes do experimento, como pode ser observado comparando os resultados das Tabelas 5.1e 5.2 para a mistura BC:FT na proporção 7:3. Não foi observada uma tendência definida do parâmetro de dureza com o aumento do teor de umidade para amostras de umidificação pouco antes do experimento, logo, supõe-se que a camada crescente de filme líquido sobre a superfície da partícula com o aumento do teor de umidade não contribua para esse parâmetro. Percebeu-se o aumento da dureza com o aumento do FT na mistura BC:FT, uma vez que o FT é mais duro que o BC, como pode ser observado na Tabela 5.1. A elasticidade foi pouco afetada pela variação do teor de umidade.

Diante desses resultados, realizou-se um experimento adicional com o BC para avaliar a influência do modo de umidificação no parâmetro de dureza em uma faixa mais ampla de conteúdo de umidade e os resultados são apresentados na Figura 5.9. Os erros observados para a umidificação com antecedência são consideravelmente maiores que os erros para a outra alternativa. Pode-se notar uma tendência de diminuição da dureza com o aumento do teor de umidade para a técnica de umidificação com antecedência, enquanto que a dureza na umidificação pouco antes do experimento diminui rapidamente para um valor assintótico. Este resultado confirma que a espessura da camada de filme líquido sobre a superfície da fibra pouco contribui para a compressão média e que a difusão da água no volume da célula é bastante complexa e instável, resultando em erros mais altos de uma propriedade relacionada.

Figura 5.9 – Dureza do bagaço de cana-de-açúcar de acordo com duas técnicas: umidificado e deixado em repouso por 15 dias (BC1) e umidificado imediatamente antes do experimento (BC2).

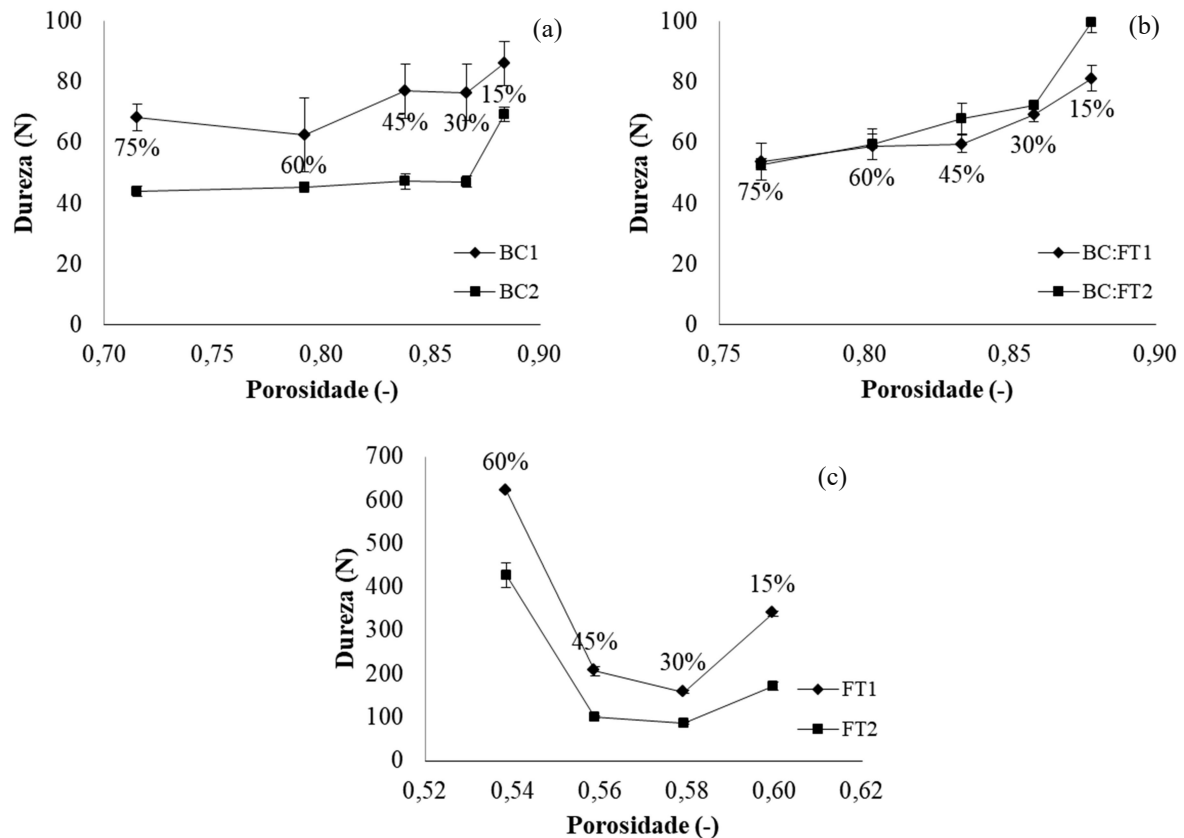


Fonte: Elaborado pela autora.

A porosidade dos leitos de BC, FT e de uma mistura BC:FT na proporção 7:3 foi calculada usando as equações fornecidas por Casciadori et al. (2014), e a dureza foi correlacionada a essa propriedade, conforme apresentado nas Figura 5.10. A dureza do BC e a mistura BC:FT aumentaram com o aumento da porosidade nas duas alternativas de umidificação. De acordo com Casciadori et al. (2014), a porosidade do leito de BC e da mistura BC:FT na proporção 7:3 diminui com o aumento do teor de umidade. Portanto, a tendência de dureza se move na direção oposta à esperada para um meio poroso, pois é de se esperar que um meio mais poroso seja menos resistente à compressão devido à maior proporção de ar. No entanto, o aumento da dureza com a queda do teor de umidade, como mostrado nas Tabelas 5.1 e 5.2, parece produzir um efeito mais forte sobre esse parâmetro textural. Para FT, Figura 5.10c, o comportamento da dureza com a porosidade não mostra nenhuma tendência específica, embora a presença desse material na mistura BC:FT tenha produzido efeitos relevantes.

Os resultados dos parâmetros TPA para os experimentos com CES de misturas de BC:FT por *M. thermophila* I-1D3b são apresentados nas Tabelas 5.3 e 5.4. Os coeficientes de variação são semelhantes aos obtidos nas condições sem cultivo para os parâmetros dureza, mas um aumento significativo pode ser notado no parâmetro de elasticidade. A dureza foi influenciada pelo crescimento de fungos, enquanto a elasticidade difere estatisticamente apenas no teor de umidade de 75%. Há uma tendência de diminuição dos parâmetros com o aumento do tempo de CES, uma vez que o material sólido é empobrecido e o micélio é formado e se espalha nos vazios originalmente ocupados pelo ar. Embora nenhum experimento de TPA tenha sido realizado apenas com o micélio, espera-se que esse sólido seja mais macio que os outros sólidos, diminuindo a dureza do meio cultivado com o aumento do crescimento de fungos. Seguindo os mesmos raciocínios, espera-se que o micélio seja menos flexível que o ar, diminuindo a elasticidade com o aumento do tempo de cultivo. A partir dos dois parâmetros, a dureza parece estar intimamente relacionada à estrutura sólida e sua diminuição ao longo do cultivo é uma indicação da modificação da estrutura do substrato.

Figura 5.10 – Influência da porosidade do leito no parâmetro de dureza para (a) bagaço de cana-de-açúcar umidificado e deixado em repouso por 15 dias (BC1) e umidificados imediatamente antes do experimento (BC2); (b) mistura de BC:FT na proporção 7:3 umidificada previamente (BC:FT1) e imediatamente antes (BC:FT2) e (c) farelo de trigo umidificado previamente (FT1) e umidificados imediatamente antes (FT2). As porosidades foram estimadas usando as equações de Casciadori et al. (2014).



Fonte: Elaborado pela autora.

A influência da proporção BC:FT nos parâmetros não é tão evidente. Parece que a dureza e a elasticidade no final do cultivo são menores na proporção 7:3 para ambos os teores de umidade testados, mas não há diferença estatística entre esses valores. Esperava-se que a dureza para a proporção 9:1 fosse maior que para 7:3, uma vez que a condição ideal de cultivo de *M. thermophila* I-1D3b em BC:FT é a proporção 7:3 com 75% de umidade (ZANELATO et al., 2012). Como será visto nos resultados respirométricos, a concentração de biomassa fúngica é maior em 7:3; portanto, pode-se esperar um maior consumo do substrato para a condição ideal. Experimentos mais detalhados devem ser feitos sobre a influência da proporção BC:FT no crescimento de fungos para confirmar essa hipótese.

Tabela 5.3 – Dureza para misturas de BC:FT ao longo do cultivo em estado sólido por *M. thermophila* I-1D3b, com amostras umidificadas imediatamente antes do cultivo.

Proporção BC:FT	Tempo de cultivo (horas)	Umidade (%)					
		65			75		
		Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
7:3	0	34,89 ^B	2,96	8,49	42,02 ^A	4,79	11,39
	24	44,84 ^A	2,23	4,98	39,83 ^A	1,97	4,94
	48	30,21 ^{CD}	1,40	4,63	35,92 ^{AB}	1,51	4,19
	72	33,10 ^{BC}	2,60	7,86	29,95 ^{BC}	2,27	7,57
	96	26,81 ^D	0,76	2,82	24,01 ^{CD}	5,05	21,02
	120	18,80 ^E	1,39	7,38	18,16 ^D	4,90	26,97
9:1	0	35,96 ^A	6,48	18,02	38,63 ^A	6,59	17,05
	24	31,32 ^{AB}	1,86	5,94	33,44 ^{AB}	3,04	9,11
	48	25,97 ^{AB}	3,82	14,69	29,58 ^B	2,30	7,78
	72	29,79 ^{AB}	5,09	17,08	26,89 ^{BC}	2,01	7,48
	96	36,08 ^A	5,92	16,40	28,59 ^B	2,10	7,35
	120	20,82 ^B	3,61	17,35	20,53 ^C	1,45	7,07

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação ($CV = DP/Média$); BC: bagaço de cana-de-açúcar; FT: farelo de trigo. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey no intervalo de confiança de 95%.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5.4 – Elasticidade para misturas de BC:FT ao longo do cultivo em estado sólido por *M. thermophila* I-1D3b, com amostras umidificadas imediatamente antes do cultivo.

Proporção BC:FT	Tempo de cultivo (horas)	Umidade (%)					
		65			75		
		Média	DP	CV (%)	Média	DP	CV (%)
7:3	0	0,46 ^A	0,05	11,11	0,47 ^{AB}	0,04	8,63
	24	0,40 ^A	0,08	20,94	0,46 ^A	0,07	16,07
	48	0,36 ^A	0,05	13,13	0,36 ^{ABC}	0,06	15,47
	72	0,32 ^A	0,04	12,20	0,33 ^{BC}	0,05	14,68
	96	0,42 ^A	0,18	41,69	0,39 ^{ABC}	0,03	6,73
	120	0,30 ^A	0,04	14,74	0,30 ^C	0,06	19,93
9:1	0	0,49 ^A	0,04	7,61	0,45 ^A	0,03	6,07
	24	0,39 ^A	0,08	19,45	0,38 ^{AB}	0,03	8,39
	48	0,37 ^A	0,05	13,32	0,37 ^B	0,01	1,85
	72	0,50 ^A	0,29	57,30	0,33 ^B	0,06	18,75
	96	0,37 ^A	0,06	16,83	0,39 ^{AB}	0,01	3,00
	120	0,29 ^A	0,03	12,02	0,35 ^{AB}	0,02	4,80

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação ($CV = DP/Média$); BC: bagaço de cana-de-açúcar; FT: farelo de trigo. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey no intervalo de confiança de 95%.

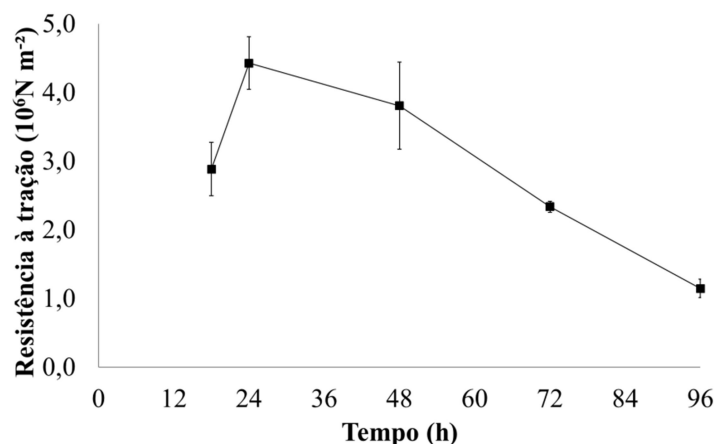
Fonte: Elaborado pela autora.

Casciatori et al. (2014) observaram que a porosidade do leito era quase constante ao longo do cultivo de *M. thermophila* I-1D3b em uma mistura de BC:FT na proporção de 7:3 com 75% de umidade. Os autores afirmaram que estava prevista uma redução da porosidade do leito com o aumento do tempo de cultivo, uma vez que o micélio ocupa visualmente os espaços vazios, sem nenhuma modificação no volume total do leito. Portanto, a técnica de TPA utilizada no presente trabalho mostrou-se adequada para avaliar estas pequenas alterações.

5.4.2 Resistência à tração dos substratos cultivados e do micélio aéreo

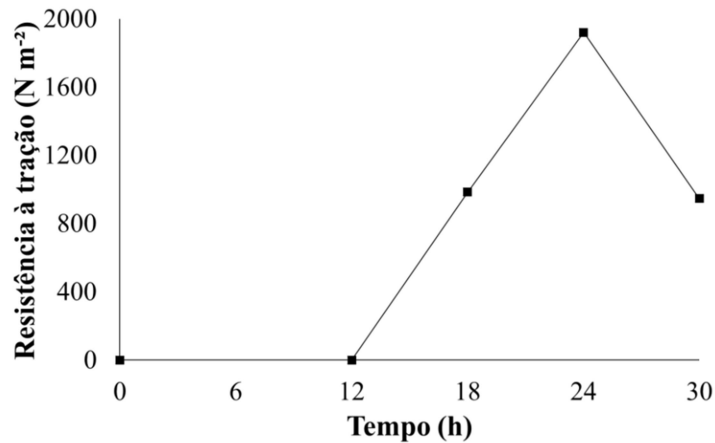
A resistência à tração dos blocos cultivados e do micélio aéreo é apresentada nas Figuras 5.11 e 5.12. Nenhum resultado perceptível foi obtido sob 12 horas de cultivo e nenhuma evidência visual do micélio também foi observada. A resistência à tração máxima foi obtida para 24 horas de cultivo, quando o substrato também apresenta maior dureza. Similarmente aos resultados dos experimentos de compressão, há uma tendência decrescente da resistência à tração com o aumento do tempo de cultivo, devido ao crescimento do micélio que desestrutura as fibras. Não foram realizadas medidas de resistência à tração do micélio aéreo por períodos superiores a 30 horas. Os erros observados nessas experiências são consideravelmente maiores que os obtidos nas experiências com TPA.

Figura 5.11 – Resistência à tração dos blocos de BC:FT colonizados por *Myceliophthora thermophila* I-1D3b na proporção 7:3 e com 75% de umidade. Os substratos foram hidratados imediatamente antes do cultivo.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5.12 – Resistência à tração do micélio aéreo de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b cultivado em farelo de trigo com 75% de umidade. O substrato foi hidratado um pouco antes do cultivo



Fonte: Elaborado pela autora.

Schutyser et al. (2003) desenvolveram o método experimental aqui reproduzido com modificações, a fim de prever a resistência à tração do micélio fúngico em uma mistura de partículas. Assim como o observado nesse experimento, a resistência à tração aumentou com o tempo de cultivo devido ao alongamento das hifas, alcançou um valor máximo quando há rompimento da maioria das hifas e diminui posteriormente. Os autores usaram as informações obtidas desses sanduíches para prever as forças dos grãos de trigo adjacentes ligados por meio do micélio de *Aspergillus oryzae*. A resistência à tração máxima obtida por Schutyser e colaboradores (2003) ocorreu às 25 horas de cultivo e eles notaram que algum tempo após esse máximo a força do micélio superou a força do ágar que colava as massas de trigo nas placas de Petri. O mesmo fenômeno ocorreu no experimento aqui relatado. A resistência à tração obtida pelos autores foi correlacionada ao consumo de oxigênio, a fim de orientar o primeiro evento de rotação do tambor. A resistência à tração máxima relatada por Schutyser et al. (2003) foi de 900 N.m⁻², enquanto neste trabalho o valor máximo foi expressivamente superior, cerca de 1950 N.m⁻², indicando a dificuldade de mover e misturar as partículas de BC e FT em um biorreator de tambor rotativo quando *M. thermophila* I-1D3b é cultivado.

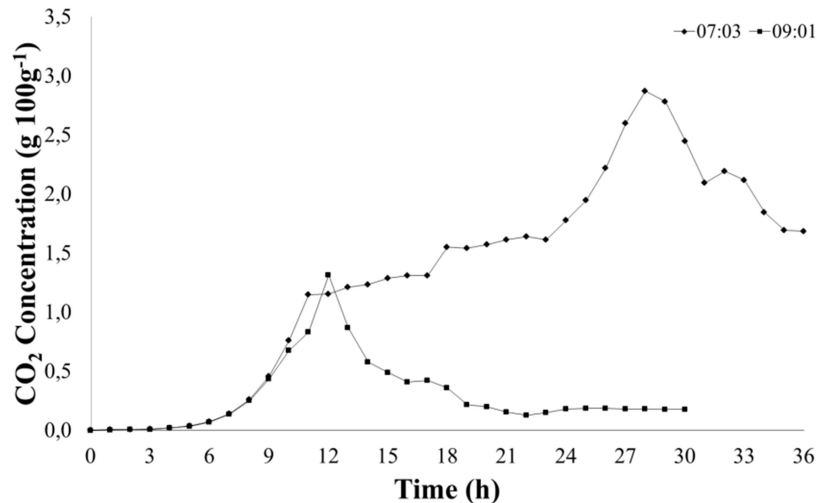
Arora et al. (2017) utilizaram um método semelhante ao desenvolvido por Schutyser et al. (2003) para medir a resistência à tração do micélio de *Rhizopus oryzae* quando cultivado em uma mistura de farelo de trigo e torta de óleo de linhaça. Os autores observaram um rápido aumento da resistência à tração entre 14 para 18 horas, atingindo um máximo de 555,64 N.m⁻², diminuindo expressivamente posteriormente devido à secagem da amostra e ao superaquecimento, segundo os autores. Eles também cultivaram o microrganismo em um leito

empacotado e em um leito agitado mecanicamente, e observaram um aumento acentuado de temperatura no leito empacotado, de quase 10°C acima da temperatura ideal de cultivo, e que a captação máxima de oxigênio ocorreu às 18 horas de cultivo. Cabe ressaltar que em um biorreator de leito empacotado como o utilizado neste trabalho para obter a concentração de CO₂, o aumento da temperatura é desprezível ao longo do cultivo de *M. thermophila*I-1D3b em BC e FT, conforme relatado por Zanelato et al. (2012) para um leito empacotado de maior diâmetro. Portanto, os problemas de secagem e superaquecimento comentados por Arora et al. (2017) não são preocupações sérias.

5.4.3 Estimativa da biomassa fúngica por respirometria

Como mencionado anteriormente, a concentração de biomassa fúngica pode afetar a estrutura do meio poroso e, consequentemente, os parâmetros de TPA obtidos. Segundo Rodriguez-Leon et al. (2008), a concentração de CO₂ no sistema é diretamente proporcional à biomassa microbiana. Portanto, neste trabalho, algumas experiências foram realizadas em um biorreator de leito empacotado para as proporções de BC:FT em 7:3 e 9:1 e a produção de CO₂ foi medida ao longo do cultivo, a fim de estimar a diferença de biomassa entre as duas proporções adotadas, como pode ser visto na Figura 5.13. Como já apontado anteriormente, entende-se que o cultivo realizado no leito empacotado não é equivalente ao realizado com as amostras utilizadas nos experimentos reológicos. No entanto, assumimos, como Arora et al. (2017) assumiram, também, que é possível inferir o crescimento fúngico de um sistema de cultivo a partir dos resultados da concentração de gases obtidos no outro.

Figura 5.13 – Concentração de CO₂ ao longo do cultivo em estado sólido por *M. thermophila* I-1D3b em um biorreator de leito empacotado com aeração forçada em diferentes proporções de BC:FT.



Fonte: Elaborado pela autora.

Quando a condição ideal de cultivo foi utilizada, BC:FT na proporção 7:3, a concentração máxima de CO₂ foi maior que na proporção 9:1, e o tempo para atingir esse máximo foi de 26 horas para 7:3 e 12 horas para 9:1, devido ao rápido esgotamento do FT em 9:1, a fonte degradável mais fácil de nutrientes neste meio composto (GOMES, 2015). A concentração máxima de CO₂ para 7:3 é quase o dobro da obtida para 9:1, refletindo em maior concentração de biomassa fúngica e consequente maior desestruturação dos substratos sólidos. Portanto, os substratos cultivados a 9:1 apresentam dureza maior, como pode ser visto na Tabela 5.3. Ambas as concentrações de CO₂ são semelhantes até 12 horas de cultivo, quando o CO₂ máximo ocorreu para 9:1 e ainda aumentou a uma taxa alta para 7:3. Schutyser et al. (2003) recomendam que o primeiro evento de agitação seja realizado antes que a biomassa fúngica atinja seu máximo, quando o micélio promove uma forte interação com as partículas e torna-se difícil quebrar os aglomerados. Para o atual sistema de CES, o tempo para promover a primeira agitação depende da proporção BC:FT, e é recomendável girar o tambor antes das 12 e 26 horas, para as proporções 9:1 e 7:3, respectivamente. No entanto, esses tempos são apenas uma referência, uma vez que a resistência à tração aqui observada é muito superior à obtida por Schutyser et al. (2003) e Arora et al. (2017), e provavelmente o tambor deve ser girado algum tempo antes.

5.5 Conclusão

Métodos de análise do perfil de textura (TPA) e de resistência à tração foram desenvolvidos para misturas de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT) para o cultivo do fungo *M. thermophila* I-1D3b. Foram realizados experimentos de dupla compressão para os materiais sólidos, com e sem cultivo, para materiais individuais e misturas entre eles. Para meios porosos não cultivados, o BC e as misturas BC:FT exigiram forças de compressão menores que o FT, devido à menor porosidade dos leitos do FT. As amostras úmidas de BC apresentaram dureza menor do que as secas e, quando o BC é umidificado bem antes do experimento de TPA (15 dias), sua dureza é maior do que quando este material foi umidificado imediatamente antes do experimento, devido à difusão de água no volume celular para a alternativa com bastante antecedência. Dureza das misturas BC:FT sem cultivo mostrou-se semelhante à BC, sendo que a dureza dessas misturas diminuiu com o aumento do tempo de cultivo devido à desestruturação dos substratos. A dureza proporcionou resultados mais pronunciados a serem relacionados com as variáveis estudadas em comparação com a coesão e elasticidade. No entanto, os valores de elasticidade indicaram que essas misturas são elásticas e isso terá impacto no movimento de partículas nos tambores em rotação. A resistência à tração máxima do substrato cultivado e do micélio aéreo foi observada às 24 horas de cultivo. A resistência máxima à tração foi coincidente com a biomassa máxima no sistema, obtida indiretamente pela medição da concentração de CO₂ na saída de um biorreator de leito empacotado. As forças de tração aqui obtidas foram significativamente maiores que as observadas na literatura e prevê-se grande dificuldade em agitar leitos desses materiais ao longo do cultivo. A partir dos resultados da TPA, modificações macroscópicas da estrutura dos substratos podem ser inferidas como consequência da atividade microbiana, e a dureza é um parâmetro a ser considerado nessa inferência. A partir dos resultados da resistência à tração, foi determinado um tempo de referência para o primeiro evento de agitação em biorreatores. Os métodos aqui desenvolvidos podem ser usados para outros sistemas de cultivo em estado sólido e podem melhorar o entendimento das modificações de substrato sólido ao longo do cultivo.

CAPÍTULO 6. MOVIMENTAÇÃO E MISTURA DE PARTÍCULAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DE FARELO DE TRIGO EM TAMBOR ROTATIVO DURANTE O CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO POR *MYCELIOPHTHORA THERMOPHILA* I-1D3B

RESUMO

O uso de biorreatores rotativos para o cultivo de estado sólido ainda apresenta desafios que precisam ser superados para otimizar seu uso em escala industrial, dentre os quais a movimentação das partículas e a tolerância do fungo ao cisalhamento. Diante disso, o presente trabalho teve por finalidade avaliar o efeito do micélio do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b sobre as características de movimentação de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT) ao longo do tempo de cultivo, de modo a definir o momento adequado para que se execute o primeiro evento de agitação, evitando assim a formação de aglomerados de partículas. Foram realizados ensaios sem e com cultivo microbiano em dois tambores de 9,4 e 30,0 cm de diâmetro, com rotação da parede, com e sem aletas internas. Nos ensaios sem cultivo as variáveis foram os tipos de partículas, BC e uma mistura BC:FT; a umidade, 10 e 75%; e o grau de enchimento, 0,4 e 0,5. Nos ensaios com cultivo, a variável foi o tempo de cultivo, utilizando como substrato a mistura BC:FT na proporção 7:3 e umidade de 75%. A avaliação da movimentação foi feita por análise de imagens. No tambor de maior dimensão não foi observado diferença no padrão de movimentação das partículas para as umidades de 10% e 75% para leitos de BC ou com a adição de 30% de FT em 10% de umidade. No tambor menor a movimentação ocorreu mais no centro do tambor devido à ausência de defletores na parede e a movimentação das partículas ocorreu em três blocos de tamanhos e periodicidade irregulares. Nos ensaios com cultivo, observou-se o mesmo padrão de movimentação descrito para o meio não reacional para tempos inferiores a 9 horas de cultivo, quando certa resistência foi observada apenas nos 30 segundos iniciais de rotação. Após as 9 horas iniciais, o fungo ocupa os espaços vazios do leito sem causar alteração do volume total, e devido à resistência do micélio, o substrato se fixa na parede, não observando nenhuma movimentação a partir de 12 horas de cultivo.

Palavras-chave: Movimentação de partículas. Tambor rotativo. Tensão de cisalhamento.

ABSTRACT

Rotating drums are a promising class of bioreactor for solid-state cultivation due to its flexible operational mode and to the variable alternatives of process control. Nevertheless, such bioreactors still need to be improved to overcome some drawbacks, such as the microbial tolerance to the shear stress and the particle movement during fungal growth. Therefore, this work aims to evaluate the effect of the mycelium of the fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b on the movement of a mixture between sugarcane bagasse (SCB) and wheat bran (WB) in rotating drums along the cultivation to avoid the formation of aggregates of particles. Experiments were carried out prior and along the microbial growth in drums of 9.4 and 30.0 cm diameter. The movement of particles was promoted by the drum wall, with and without internal flights. For the experiments without cultivation, the variables were nature of the particles (SCB and a mixture SCB:WB), the initial moisture content (10 and 75%), and the filling degree (0.4 and 0.5). In experiments with cultivation, the variable was the cultivation time, using the mixture SCB:WB as substrate in the proportion 7: 3 (w/w) at 75% moisture content. The evaluation of the movement was made by image analysis by filming the transversal area of the drum with a digital camera. In the larger drum filled with SCB, the same pattern of movement was noticed for the moisture contents of 10% and 75%, which were similar to the pattern of movement observed for the mixture SCB:WB at 10% moisture content. In the narrower drum, the movement took place preferably at the center of the drum due to the absence of flights on the drum-wall and the movement of particles occurred in three blocks of irregular sizes and periodicity. For the cultivation experiments, the pattern previously described was also observed for cultivation times under 9 hours, when a certain resistance started to be noticed only in the initial 30 seconds of rotation. After 9 hours of cultivation, the mycelium occupies the void spaces among the particles, resulting in a change of the total volume. Due to the resistance of the mycelium, the substrate attached to the drum-wall, and the movement was halted after 12 hours of cultivation.

Keywords: Particle movement. Rotating drum. Shear stress.

6.1 Introdução

O cultivo em estado sólido (CES) é considerado um processo eficiente na bioconversão de resíduos sólidos agroindustriais a produtos de alto valor agregado, tais como enzimas, álcoois orgânicos e pigmentos. No entanto, esta técnica de cultivo ainda não é uma realidade industrial devido à falta de biorreatores comerciais (CASCIATORI; THOMÉO, 2018; FARINAS, 2015). Aspectos importantes de engenharia de processo ainda são grandes desafios que precisam ser superados para tornar a técnica confiável, principalmente devido às dificuldades de transferência de calor e massa e à heterogeneidade do sistema (DURAND, 2003; KHANAHMADI et al., 2006; SOCCOL et al., 2017; ZHANG; WANG; CHEN, 2017).

Dentre as várias configurações de biorreatores para CES (ver p. ex., Mitchell; Krieger; Berovic, 2006), o de tambor rotativo é o que fornece mais alternativas de controle das variáveis de processo, notadamente da temperatura e atividade de água. Tambores rotativos, de um modo geral, promovem altas taxas de transferência de calor e massa, sendo intensamente utilizados em processos das indústrias alimentícia, química, bioquímica e farmacêutica, entre outras (BOATENG, 2008; TADA et al., 2017b). Os biorreatores de tambor rotativo são caracterizados como um cilindro horizontal, onde a mistura das partículas é proporcionada pelo movimento da parede com defletores do tambor ou por um eixo interno dotado de pás giratórias.

A rotação pode ser intermitente ou contínua, a depender das características do substrato, como composição, tamanho das partículas, porosidade, capacidade de retenção de água, tanto quanto da morfologia do microrganismo e tolerância à tensão de cisalhamento, o que influenciará na escolha da forma de agitação, regime de intermitência e aeração. Na maioria das aplicações, o tambor permanece estacionário na maior parte do cultivo, sendo o meio movimentado apenas quando é necessária homogeneização para reduzir gradientes de temperatura e de umidade e para repor água no sistema por aspersão, se necessário (DURAND, 2003; FARINAS, 2015; SOCCOL et al., 2017; TADA et al., 2017b; WANG et al., 2010).

O padrão de movimentação de partículas sólidas em cilindros rotativos é dependente da velocidade de rotação, do grau de enchimento do tambor, da presença de elementos internos que favoreçam transmissão do movimento da parede às partículas (aletas retas, em formato de L, helicoidais, etc.) e de características físicas das partículas, como forma tamanho, flexibilidade e adesividade. Regimes de escoamento que descrevem o movimento de partículas regulares em tambor rotativo normalmente foram classificados na literatura (CHEN

et al., 2017; MELLMANN, 2001), embora tais regimes não se apliquem a meios fibrosos, devido à flexibilidade das partículas e à forte interação entre elas (TADA et al., 2017b). Tada e colaboradores (2017b) avaliaram a movimentação e mistura de bagaço de cana-de-açúcar por processamento digital de imagens (PDI) em função da velocidade de rotação, do grau de enchimento e da presença de um tubo interno em um tambor de parede giratória que continha defletores. Os autores observaram que a movimentação das partículas na camada ativa ocorreu em blocos irregulares, não observando movimentação do núcleo central.

Santos et al. (2016) avaliaram experimentalmente por PDI o efeito da forma das partículas (esfera de vidro e grãos de arroz) e condições de operação e geometria do tambor na movimentação das partículas e comparou os resultados com simulações numéricas realizadas pelo Método dos Elementos Discretos. Os autores observaram que o ângulo dinâmico de repouso para partículas irregulares diminuiu com o aumento do grau de enchimento e com a velocidade de rotação, e foi afetado pelo coeficiente de atrito, obtendo valores mais altos para partículas de formato irregular (grãos de arroz), devido à maior área de contato. Benedito et al. (2018) demonstraram que a modelagem da movimentação de partículas irregulares em tambores rotativos depende fortemente da movimentação da parede, da geometria do tambor, do contato parede-partícula e da interação entre partículas.

Qiang et al. (2020) utilizaram a técnica de velocimetria de filtragem espacial para medir as velocidades das partículas na superfície da camada ativa em diferentes velocidades de rotação, tamanho do tambor e para partículas de areia e esferas de vidro. Mostrando que para partículas irregulares há diferença na distribuição da velocidade de superfície livre, tanto na direção do fluxo como na direção axial, onde a velocidade central diminui devido ao acúmulo de partículas no meio da superfície livre, a qual não se observa em forma de S em alta velocidade de rotação.

Diante disso, poucos trabalhos avaliaram experimentalmente a movimentação de partículas ao longo do CES. Devido às características variadas das partículas empregadas como substrato (p. ex. grãos, grânulos, fibras), às características morfológicas das hifas fúngicas e à interação entre micélio e partículas, não é possível propor-se um comportamento geral para a movimentação de meios cultivados em tambores rotativos. Um dos aspectos iniciais a serem abordados neste tipo de pesquisa é a tolerância do microrganismo à agitação, pois alguns fungos são tolerantes, como *Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma harzianum*, *Myceliophthora thermophila* e *Aspergillus oryzae* (KALOGERIS et al. 2003; ALAM et al., 2009; GRAJALES, 2014; SCHUTYSER et al., 2003), enquanto *A. awamori* e *Metarhizium*

anisopliae, apresentam melhores resultados em condições estáticas (DÍAZ et al., 2009; van BREUKELLEN et al., 2011).

Kalogeris et al. (2003) avaliaram a eficiência do biorreator de tambor rotativo com agitação intermitente para cultivo de *T. aurantiacus* em palha de trigo, tendo como variáveis temperatura, umidade e aeração. Atividades superiores de celulasas e hemicelulasas foram obtidas no cultivo em biorreator quando comparado a frascos *Erlenmeyer*. Alam et al. (2009) cultivaram *T. harzianum* em cachos de frutos vazios de dendê em biorreator rotativo e observaram que a atividade da celulase e a biomassa produzida foram superiores às produzidas em *Erlenmeyer*. Grajales (2014) empregou *M. thermophila* em uma mistura composta por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo e realizou ensaios num tambor rotativo com graus de enchimento 0,4, 0,5 e 0,6, obtendo atividades de endoglucanase próximas às de ensaios em embalagens plásticas para os maiores graus de enchimento e inferior no menor grau, atribuindo esta redução à agitação intensa das partículas. Foi observado também que as hifas contribuíam para a formação de aglomerados no leito. Schutyser et al. (2003) cultivaram *A. oryzae* em grãos de trigo para avaliar o momento ideal para a realização do primeiro evento de mistura. Seus resultados mostraram que a mistura é necessária para romper as ligações do micélio antes que seja necessário adicionar água para compensar as perdas por evaporação, evitando assim a presença de grandes agregados após o período de mistura.

Díaz et al. (2009) avaliaram a influência da aeração e dos regimes de intermitência de rotação sobre a produção de enzimas em uma mistura de bagaço de uva branca e cascas de laranja (proporção 1:1) cultivada por *A. awamori*. As maiores atividades foram obtidas sem ou com pouca agitação e pouca correlação entre agitação e taxa de aeração pôde ser observada. van Breukelen et al. (2011) cultivaram *M. anisopliae* em reator de tambor de parede raspada e em leito empacotado, utilizando fibras de cânhamo, farelo de trigo e farelo de arroz como substrato. Os experimentos mostraram que cultivo em leito empacotado é mais adequado para produção de esporos em larga escala, pois o fungo é muito sensível à agitação.

O presente trabalho teve por finalidade avaliar o efeito do micélio do fungo *M. thermophila* I-1D3b sobre as características de movimentação de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo ao longo do cultivo, de modo a definir o momento adequado para que se execute o primeiro evento de agitação, evitando assim a formação de aglomerados de partículas. As análises da movimentação foram feitas por PDI e os resultados foram comparados com aqueles de leitos sem cultivo. Para a interpretação dos resultados foram empregados parâmetros reológicos obtidos para este sistema com e sem cultivo. Os resultados

aqui apresentados servirão para a operação e o controle automático de biorreatores de tambor rotativo para CES que empregam materiais fibrosos como substrato.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Partículas sólidas

Foram utilizados como substratos bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT). O bagaço de cana-de-açúcar foi doado pela Companhia Virgolino de Oliveira Açúcar e Álcool, de José Bonifácio – SP, sendo esse, seco em estufa com circulação de ar a 60°C até peso constante. O BC foi peneirado para conferir maior uniformidade ao meio poroso, e padronizado como a fração retida entre peneiras com aberturas de 2 e 4 mm. O FT foi adquirido no comércio local e seco em estufa com circulação forçada de ar a 45°C até peso constante. Em seguida os substratos foram armazenados em embalagens de polietileno de parede espessa em temperatura ambiente até o momento do uso. Os substratos foram umidificados com água destilada ou solução nutriente, no caso de CES, até atingir a umidade desejada.

6.2.2 Microrganismo

O fungo *M. thermophila* I-1D3b foi isolado pelo Grupo de Bioenergia do IBILCE/UNESP a partir de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar. No preparo do inóculo, o microrganismo foi transferido para frascos *Erlenmeyer* contendo 50 mL de meio ágar sabouraud dextrose (ASD) e incubado a 45°C por 96 horas. Os esporos foram raspados da superfície da colônia com 50 mL de solução nutriente, composta de 3,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 3,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g.L⁻¹ de CaCl₂ e 1,0 g.L⁻¹ de Tween 80, ajustada para pH 5,0 com solução de HCl. A concentração de esporos foi estimada pela contagem em microscópio óptico usando Câmara de Neubauer. A concentração de esporos em todos os ensaios foi de 10⁷ esporos.g sólido seco⁻¹.

O CES foi realizado em tambor construído em alumínio, com 9,4 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, sem defletores internos, empregando misturas de substrato na proporção 7:3 de BC:FT a 45°C e com umidade de 75%, condição ótima determinada por Zanelato et al. (2012) para o crescimento do fungo *M. thermophila* I-1D3b. Para a determinação do grau de enchimento volumétrico do leito, ou seja, o volume de meio poroso dividido pelo volume

total, calculou-se a quantidade de material adicionado no biorreator rotativo por equações descritas em Casciadori et al. (2014) para empacotamentos soltos.

6.2.3 Movimentação radial do substrato em tambor rotativo sem cultivo

Experimentos de movimentação foram realizados em dois tambores para avaliar a influência do substrato, umidade e cultivo sobre a movimentação das partículas. O primeiro, de maior dimensão, foi construído em acrílico, com 30 cm de diâmetro e 60 cm de comprimento, com quatro defletores internos de 3 cm de largura, num ângulo de 45° em relação à parede do tambor, e o segundo, de menor dimensão, construído em alumínio, com 9,4 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, sem defletores internos. Os tambores foram sustentados por uma estrutura metálica, que incluía dois roletes para movimentação através de um motor elétrico de velocidade variável. Para o tambor pequeno a velocidade de rotação foi fixada em 8 rpm, enquanto para o grande foi uma variável controlada.

No tambor grande (Figura 6.1) foram realizados ensaios sem cultivo, empregando-se BC e uma mistura de BC:FT na proporção 7:3, com umidades iniciais de 10 e 75% (base úmida, assim como as demais deste trabalho), variando o grau de enchimento em 0,4 e 0,5. As velocidades de rotação nestes ensaios foram controladas em 1, 4 e 8 rpm, de acordo com o avaliado anteriormente em Grajales (2014) e Tada et al. (2017b).

Figura 6.1 – Estrutura do tambor de acrílico utilizado nos ensaios sem cultivo em estado sólido.

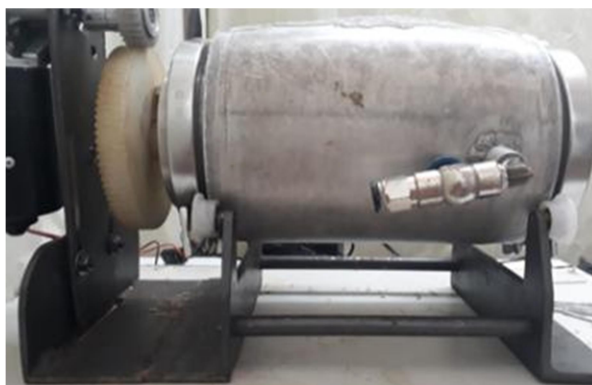


Fonte: Elaborado pela autora.

O tambor pequeno (Figura 6.2) era encamisado e nele foram feitos ensaios sem e com cultivo. Nos ensaios sem cultivo, avaliou-se a influência do substrato, umidade e grau de enchimento, como descrito anteriormente para o tambor grande, em velocidade de rotação de

8 rpm. A velocidade de rotação nesse tambor é fixa, devido às condições do equipamento. Cada carga foi colocada individualmente dentro do tambor, que foi girado até que a movimentação fosse estável. Pela parte frontal dos tambores, os leitos de partículas foram filmados com uma câmera digital DCR-DVD408 (Sony, Tóquio, Japão) até se observar movimentação estável, o que levou, em média, 5 minutos. Os vídeos produzidos foram analisados usando-se o *software Picture Motion Browser* (Sony, Tóquio, Japão), de acordo com a metodologia descrita em Grajales (2014).

Figura 6.2 – Estrutura do tambor de alumínio utilizado nos ensaios sem e com cultivo em estado sólido por *M. thermophila* I-1D3b.



Fonte: Elaborado pela autora.

Posteriormente, foram acoplados defletores ao tambor de menor dimensão para investigar sua influência na movimentação. No entanto, os defletores restringiram a área de movimentação, de modo que o espaço frontal, através do qual as imagens foram capturadas, foi limitado e observou-se maior aglomeração das fibras e formação de um bloco central. Desta forma, o uso do defletor no tambor pequeno não pode ser comparado ao que se observou no tambor de maior dimensão devido a esta restrição na área de movimentação.

6.2.4 Movimentação radial do substrato em tambor rotativo com cultivo em estado sólido

Os ensaios com cultivo foram realizados em uma mistura de BC:FT na proporção de 7:3, com umidade inicial de 75%, como descrito anteriormente. Na camisa escoava água a 45°C mantida constante por um banho termostático. O ar de entrada foi fornecido por um compressor a uma vazão de 5 L.min⁻¹, passando por medidor de vazão mássico (Cole-Parmer Instrument Co, Vernon Hills, EUA) e filtro de algodão, para, em seguida, ser umidificado e aquecido a 45°C em coluna recheada com esferas de vidro e água destilada. Assim, o ar

entrou no biorreator saturado e com temperatura e vazão controladas. Foram realizados experimentos avaliando o cultivo em condições totalmente estáticas e com agitação inicial por 1 minuto, para a uniformização do leito, seguido pelo cultivo estático. A rotação do tambor foi fixada em 8 rpm, devido as condições do equipamento. O CES foi finalizado após 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas de cultivo, com agitação do tambor. Após esse evento de agitação, o experimento foi descartado. A tampa frontal do tambor menor era de acrílico para possibilitar a visualização da movimentação das partículas.

6.2.5 Avaliação da geração de calor metabólico durante o cultivo em estado sólido

Um CES foi realizado no biorreator de menor dimensão em condições de cultivo descritas anteriormente, empregando misturas de substrato na proporção 7:3 de BC:FT a 45°C, com umidade de 75% e grau de enchimento 0,5, para obter o indicativo do crescimento microbiano por meio da geração de calor metabólico, com o intuito de estabelecer o momento adequado para realizar a movimentação e homogeneização do leito. Para tanto, um termopar do tipo T foi posicionado de modo que a sua ponta ficasse em meio ao substrato, na posição central do tambor. O termopar foi conectado a um sistema de aquisição de dados COMPACT-DAQ[®] (National Instruments, Austin, EUA), gerenciado pela rotina LabView[®]. Diante desse resultado, determinou-se o momento em que o tambor seria movimentado.

Para avaliar a influência da movimentação na síntese das enzimas, foram realizados cultivos independentes. No primeiro momento o substrato foi acondicionado no tambor para coleta dos dados de temperatura e não foi movimentado, enquanto no segundo momento, o tambor foi movimentado por 1 minuto antes do início do cultivo, com velocidade de rotação de 8 rpm, e em tempos determinados pelos resultados do experimento de movimentação radial com cultivo em estado sólido (9 e 18 horas). Os dois cultivos continuaram até o tempo de 96 horas, determinado por Zanelato et al. (2012) como sendo o tempo de produção máxima de atividade enzimática. Ao final do CES, foi realizada extração das enzimas e a determinação da atividade de endoglucanases.

6.2.6 Determinação da atividade de endoglucanase

A extração das enzimas e a determinação da atividade de endoglucanases foram realizadas como descrito em Zanelato et al. (2012). A extração foi realizada pela adição de 20 mL de água destilada por grama de sólido seco, seguida de agitação à temperatura

ambiente em agitador de movimento recíproco por 30 minutos. O extrato foi filtrado em tecido sintético fino e centrifugado a 10000 g por 15 minutos a 5°C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

A atividade da endoglucanase (ou CMCase) foi determinada pelo método descrito em Ghose (1987), que se baseia na determinação de açúcares redutores totais, expressos em glicose, liberados pela ação enzimática. No ensaio, 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 mL de solução 4% de carboximetilcelulose (CMC) em solução tampão de acetato de sódio são feitas reagir por 10 minutos a 60°C. A determinação dos açúcares redutores totais foi realizada pelo método de DNS (ácido 3-5-dinitrosalicílico) de Miller (1959) e a quantificação foi realizada por espectrofotometria a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcar redutor do substrato por minuto. Os resultados da atividade de endoglucanase foram convertidos para serem expressos em unidade por grama de substrato sólido (U.gss^{-1}). A análise foi realizada em triplicata.

6.3 Resultados e Discussão

Neste trabalho, foram determinadas as características de movimentação de uma mistura de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT), ao longo do tempo de cultivo por *M. thermophila* I-1D3b. Os ensaios foram realizados em tambores de duas dimensões, descrevendo-se padrões de movimentação antes e após o cultivo, bem como o momento ideal de realizar a rotação. Ensaios para a avaliação da geração de calor metabólico e a produção de celulasas no meio estático e com agitação foram realizados durante o cultivo.

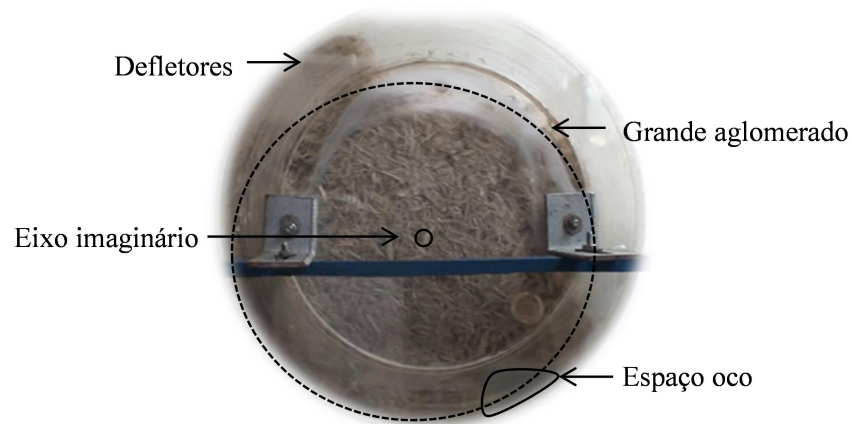
6.3.1 Movimentação radial do substrato em tambor rotativo sem cultivo

Em tambores com rotação moderadas da parede do tambor, o leito de partículas é composto por uma camada passiva, próxima à parede do cilindro, que se move como um corpo sólido, e uma camada ativa, onde as partículas se movem de forma descendente, importante para a mistura e desempenho geral do leito, devido às altas taxas de transferência de calor e massa (DING et al., 2002). Nos vídeos analisados para o tambor de maior dimensão, onde as variáveis foram o grau de enchimento, velocidade de rotação, umidade das partículas e a composição do leito, não foram observadas diferenças expressivas no padrão de movimentação radial das partículas para as umidades de 10% e 75% para leitos de bagaço de cana-de-açúcar, reproduzindo-se movimentações similares às reportadas por Tada et al.

(2017). De acordo com estes autores, as fibras se movimentam em blocos de tamanhos e periodicidade irregulares, devido ao entrelaçamento das fibras, que foram carregadas em quantidade expressiva pelos defletores. Esses blocos se desprenderam dos defletores ao atingirem posições angulares acima de 90° da circunferência, quando eram lançadas contra a camada ativa em posições definidas. Simultaneamente, porções de partículas entre dois defletores adjacentes adquiriam energia potencial suficiente para se mover no plano descendente, não como partículas isoladas, mas em blocos de tamanhos irregulares. Desta forma, os regimes de movimentação sugeridos por Mellmann (2001) não foram considerados aplicáveis a leitos de fibras flexíveis, entrelaçadas e irregulares.

A Figura 6.3 representa a movimentação observada para o grau de enchimento 0,4 e 0,5 para leitos de bagaço de cana-de-açúcar no tambor de 30 cm de diâmetro, onde partículas eram elevadas pelos defletores, deixando em seu lugar um espaço oco não preenchido na porção inferior do tambor. Esse espaço vazio diminuiu com o aumento da velocidade de rotação, e não foi observado apenas nos experimentos com a mistura BC:FT a 75% de umidade realizados neste tambor. Não foi possível caracterizar uma camada ativa típica de movimentação de meios porosos neste tipo de leito. Para iniciar a caracterização do movimento, as partículas foram niveladas no leito, e com o tempo de movimentação formou-se um grande aglomerado que girava em torno de um eixo imaginário (indicado na Figura 6.3), coincidente com o eixo axial do tambor. Esse aglomerado permaneceu íntegro durante todo o tempo de movimentação avaliado. Desta forma, a ação da parede de arremessar partículas para a camada ativa não se verificou, sendo a mistura provocada unicamente pelos defletores. Para o grau de enchimento 0,4, as porções de partículas elevadas pelos defletores eram menores do que as observadas para grau de enchimento 0,5, e tais porções eram arremessadas contra este grande bloco central, unindo-se apenas na porção inferior da circunferência. Tada et al. (2017b) relatam que, para grau de enchimento maior que 0,5 em tambor de igual diâmetro, o bloco cai em tamanhos menores e não cai de uma só vez, e que ainda, para velocidades de rotação mais altas, a movimentação se torna mais irregular e difícil de caracterizar.

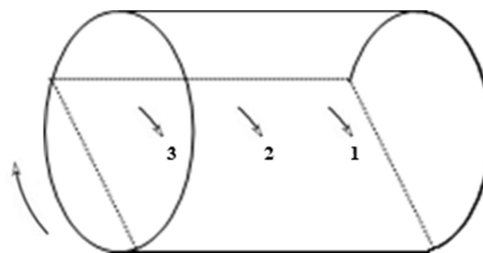
Figura 6.3 – Representação da movimentação de bagaço de cana-de-açúcar com 10% de umidade em tambor de maior dimensão com grau de enchimento 0,5 a 8 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para leitos de BC com 75% de umidade, observou-se deslocamento axial das fibras em direção à tampa frontal do tambor, que permaneceu estacionária durante todos os experimentos de movimentação para o tambor de maior dimensão. Inicialmente, a movimentação radial era similar à anteriormente descrita para 10% de umidade, mas gradualmente as partículas foram se aglomerando contra a tampa frontal e deixaram de se mover isoladamente e passaram a se mover como um corpo sólido com velocidade angular igual à da parede do tambor. A Figura 6.4 representa essa movimentação, onde a numeração corresponde a ordem na qual ocorre movimentação das partículas, que se elevam mais em função da parede do tambor do que por presença dos defletores, sendo a posição 3 mais próxima a tampa frontal do tambor.

Figura 6.4 – Representação da movimentação de bagaço de cana-de-açúcar com 75% de umidade em tambor de maior dimensão com grau de enchimento 0,5. Vista lateral do biorreator. Movimento axial de partículas se dá de 1 para 3.



Fonte: Elaborado pela autora.

A adição de 30% de farelo de trigo ao bagaço de cana-de-açúcar seguiu padrão de movimentação similar ao descrito anteriormente, com algumas modificações. A Figura 6.5

descreve a movimentação, no tambor de maior dimensão, comparando a formação de aglomerados de partículas na presença de farelo de trigo. Nota-se que quantidade expressiva do material era elevado pelos defletores e se desprendiam ao atingirem o topo da circunferência, quando eram lançados contra a superfície do leito. Na ausência de FT, ao ser lançado na superfície do leito, o grande bloco se fragmentava em blocos menores, enquanto na presença de farelo de trigo esses blocos maiores não desestruturaram, rolando sobre a camada passiva. O regime de movimentação não muda pela característica do bagaço de cana-de-açúcar, mas pela adição de farelo de trigo ocorre alteração na resistência do meio. O regime pode ser caracterizado como bloco rolante. Quando se emprega a mistura BC:FT com 75% de umidade, as partículas se movimentam de forma contínua, em blocos maiores e de tamanhos irregulares, de modo que se pode afirmar que os grãos de farelo ocupam a área de contato entre as fibras de bagaço, diminuindo o entrelaçamento e a resistência ao movimento. Ressalte-se que nesta umidade, as características de adesividade dos grãos de farelo de trigo não eram visivelmente pronunciadas. Caso esta adesividade fosse intensa, representaria uma resistência adicional ao movimento que compensaria a perda de resistência ocasionada pelo efeito estérico provocado pelo farelo.

Figura 6.5 – Representação da movimentação da mistura BC:FT com 10% de umidade no tambor de maior diâmetro, com grau de enchimento 0,4 a 8 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora.

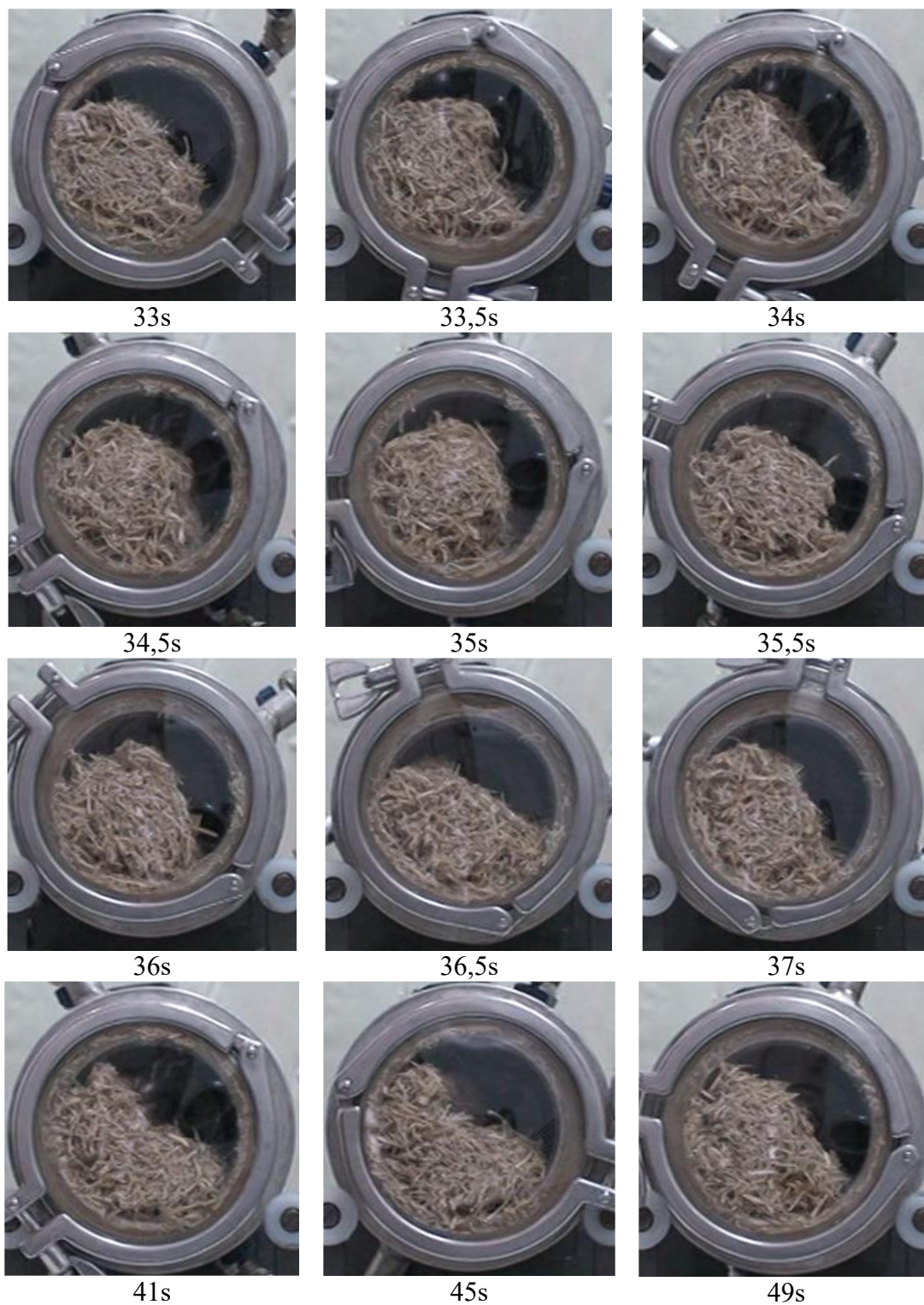
O tambor de menor dimensão não possuía defletores na parede, logo, nos vídeos analisados, sem cultivo, para bagaço de cana-de-açúcar e mistura BC:FT, não há elevação do material e queda de blocos e a movimentação ocorre mais no centro do tambor, isto é, as partículas se separam em porções de aglomerados que se deslocam e misturam pela força rotacional.

A Figura 6.6 representa a movimentação para bagaço de cana-de-açúcar a 10% de umidade, sem cultivo, em tambor de menor dimensão com grau de enchimento 0,4 e velocidade de rotação de 8 rpm, onde o padrão de movimentação observado anteriormente é pouco modificado. Inicialmente, as partículas se comportam como um corpo sólido, do qual pequenos aglomerados se desprendem por ação da parede e que rolam por sobre este corpo até a parte baixa do tambor. Com a continuidade das rotações, este grande aglomerado se quebra, formando três aglomerados que se sucedem na queda. A mistura das partículas é visivelmente pobre. Para essa configuração do tambor e com partículas a 10% de umidade não há influência do grau de enchimento sobre o padrão de movimentação. Na Figura 6.6 observa-se que no início do ensaio a superfície do leito é plana, formando-se a seguir grandes aglomerados, que se desfazem rapidamente, recuperando a superfície plana em tempos muito curtos, sendo que, esse ciclo se repete a cada 4 segundos.

Enquanto que para 75% de umidade, observou-se influência do grau de enchimento sobre o padrão de movimentação. Para o grau de enchimento 0,4 as partículas iniciam o movimento com certa resistência, visível apenas nos 45 segundos iniciais, após o que a movimentação é semelhante ao descrito para 10% de umidade, com repetição do ciclo de movimentação a cada 5 segundos. Já para o grau de enchimento 0,5, as partículas se comportam como um bloco inteiro movimentando-se no centro do tambor, com poucas partículas dispersas, semelhante ao observado na Figura 6.3 para o tambor de maior dimensão. Não foi possível definir o ciclo de repetição da movimentação para o grau de enchimento 0,5 em ambas as umidades.

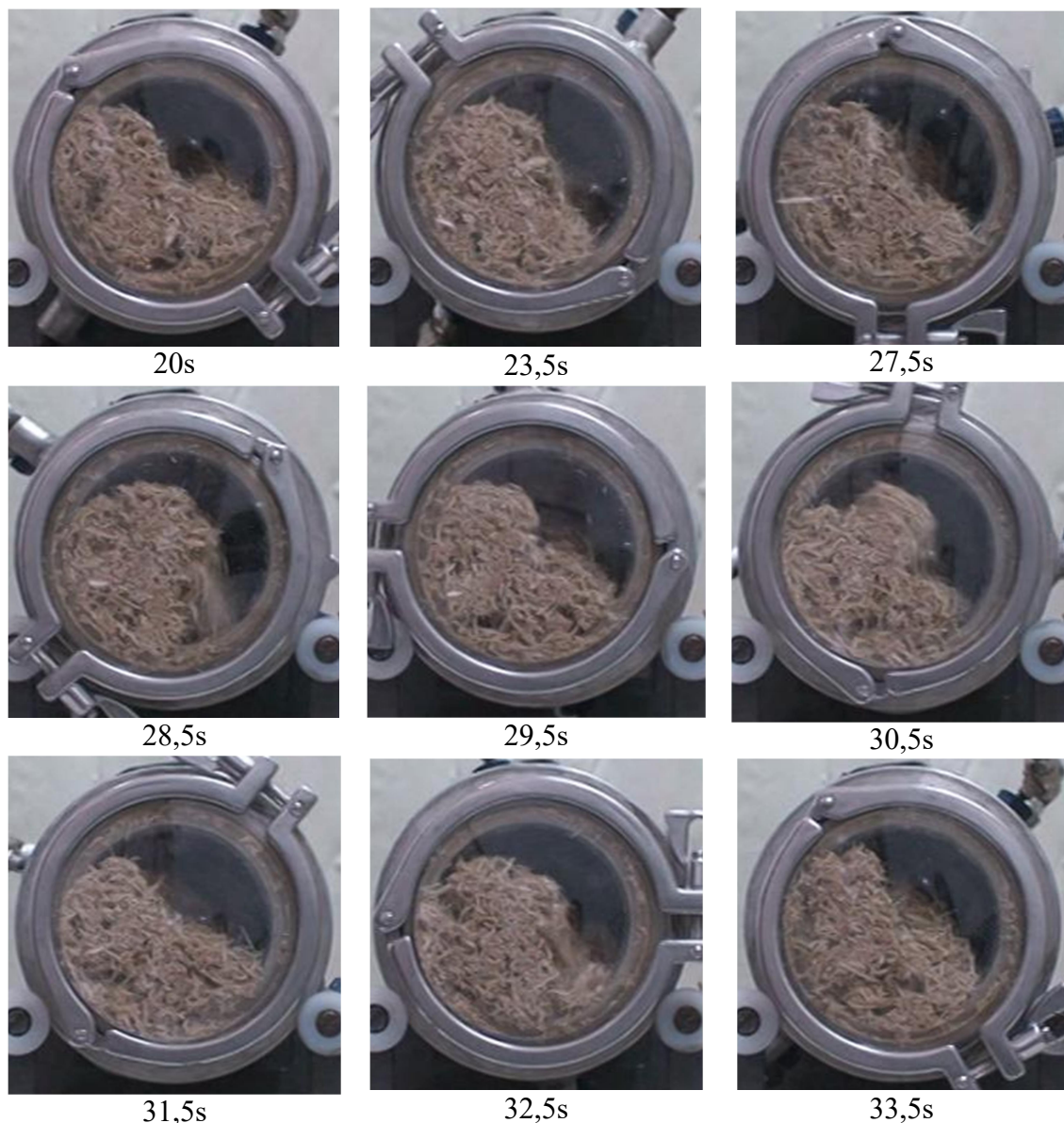
Quando se adiciona 30% de farelo de trigo ao bagaço na umidade de 10% e grau de enchimento 0,4, a movimentação é irregular e não se observa um movimento cíclico, como se pode constatar na Figura 6.7, sendo o mesmo comportamento observado para grau de enchimento 0,5 e para 75% de umidade.

Figura 6.6 – Movimentação do bagaço de cana-de-açúcar, em tambor de menor dimensão, a 10% de umidade, grau de enchimento 0,4 e velocidade de rotação 8 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6.7 – Movimentação da mistura BC:FT na proporção 7:3, em tambor de menor dimensão, a 10% de umidade e grau de enchimento 0,4.



Fonte: Elaborado pela autora.

Visto que a capacidade de retenção de água do farelo de trigo é maior do que a do bagaço de cana-de-açúcar (CASCIA TORI et al., 2015), a adição de farelo ao bagaço causou uma redução na resistência à movimentação em umidades mais elevadas. Casciadori et al. (2014) avaliaram microscopicamente a expansão do bagaço de cana-de-açúcar com o aumento da umidade, e observaram que para partículas com 4% de umidade existe um grande espaço intersticial entre as células, que não são vistas para 75% de umidade, onde os espaços intracelulares parecem ser túrgidos, sendo possível notar que o diâmetro celular das fibras de bagaço aumenta linearmente com a umidade, diminuindo a porosidade.

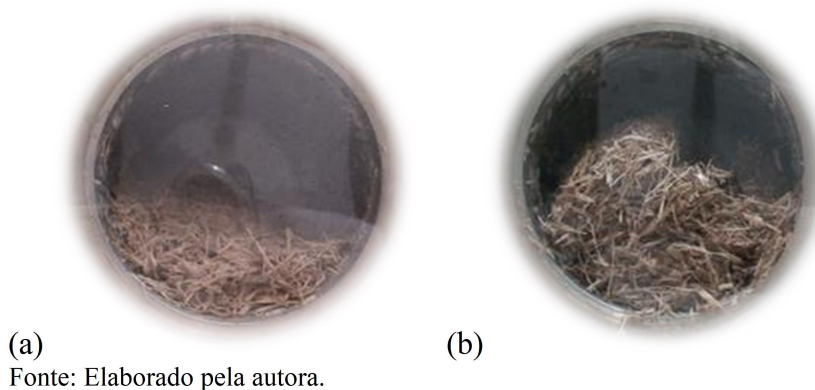
Propriedades como elasticidade, dureza e plasticidade, afetam a movimentação de partículas em biorreatores de leito móvel de CES. Em resultados do Capítulo 5 observou diminuição do parâmetro dureza do bagaço de cana-de-açúcar e da mistura BC:FT com o aumento da umidade, enquanto os parâmetros coesividade e elasticidade não foram afetados, indicando que as fibras são razoavelmente elásticas e têm razoável coesão. Esses parâmetros pouco variaram com a umidade e com adição de farelo de trigo. Em termos de movimentação das partículas em biorreatores de tambor rotativo, essa elasticidade moderada faz com que nem toda energia aplicada às partículas resulte em movimento, sendo parte empregada para deformar as fibras (TADA et al. 2017b). Como os valores de coesividade e elasticidade são próximos para as condições experimentais adotadas, a movimentação das partículas tende a não ser afetada pela presença de farelo de trigo junto ao bagaço de cana-de-açúcar, o que foi comprovado experimentalmente.

6.3.2 Movimentação radial do substrato em tambor rotativo com cultivo em estado sólido

O CES foi realizado no biorreator de alumínio de 9,4 cm de diâmetro, utilizando a proporção 7:3 de BC:FT, e após 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas de cultivo, ocorreram os eventos de agitação. Os cultivos foram independentes e descartados após o evento de agitação. Nos tempos iniciais de cultivo observou-se o mesmo padrão de movimentação descrito anteriormente para o meio não reacional e para 9 horas de cultivo observou-se alguma resistência apenas nos 30 segundos iniciais de rotação, quando o bloco inicialmente inteiro começa a se fragmentar, ocorrendo então a movimentação e a mistura. Ao longo do tempo de cultivo, visualmente o fungo *M. thermophila* I-1D3b ocupa os espaços vazios do leito sem causar alteração do volume total. Ao crescer nos vestígios de substrato presentes na parede do tambor e devido à resistência do micélio, o material se fixa à parede, não se observando nenhuma movimentação a partir de 12 horas de cultivo. Nesse tempo de cultivo a dureza do material começa a aumentar, atingindo o máximo em 18 horas (Capítulo 5). Esse momento, entre 12 e 15 horas, pode ser considerado como crítico para movimentar o biorreator durante o cultivo, pois coincide com o início dos processos metabólicos mais intensos, resultando num aumento na taxa de respiração. Esse efeito da interação do micélio com a parede foi de grande intensidade devido ao diâmetro reduzido do tambor e espera-se que para tambores de grande diâmetro os efeitos da região central do leito predominem e que seja possível rotacionar o tambor para tempos de cultivo superiores.

Normalmente, para os ensaios com e sem cultivo, as partículas eram acomodadas dentro do tambor, a superfície era nivelada e a superfície livre alinhada com o plano horizontal para que, posteriormente, a parede do tambor fosse rotacionada. No entanto, ao girar o tambor as partículas adquirem um posicionamento distinto, formando grandes aglomerados e suspeitou-se que esta característica pudesse afetar o cultivo. Assim, para verificar esta influência no movimento do meio de cultivo o biorreator de alumínio de 9,4 cm de diâmetro foi rotacionado durante 1 minuto antes de cada cultivo e após 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas. Quando há movimentação das fibras antes do CES as partículas se reorganizam no interior do tambor, aumentando o espaço entre as partículas. A Figura 6.8 representa a diferença do posicionamento das fibras no momento inicial do CES por *M. thermophila* I-1D3b utilizando a proporção 7:3 de BC:FT.

Figura 6.8 – Representação do posicionamento das fibras no momento inicial do CES por *Myceliophthora thermophila* I-1D3b utilizando a proporção 7:3 de BC:FT, umidade de 75%, grau de enchimento de 0,5, no tambor de 9,4 cm de diâmetro. (a) cultivo sem movimentação inicial; (b) cultivo com movimentação inicial a velocidade de rotação de 8 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Realizando o CES após a rotação inicial de 1 minuto, observou-se que o padrão de movimentação descrito anteriormente para o meio não reacional apresentou alteração a partir de 12 horas de cultivo, onde as fibras possuíram resistência para movimentação nos 60 segundos iniciais de rotação e após esse tempo a movimentação foi similar ao substrato sem cultivo. A partir de 15 horas de cultivo as fibras formam um bloco único, movimentando-se como um corpo sólido, sem apresentar movimentação de partículas isoladas. O bloco cultivado não permanece fixado à parede do tambor como observado nas condições de cultivo que não foram movimentadas previamente. A disposição das fibras no interior do tambor rotacionado antes do CES aumenta o espaço vazio entre as partículas, o que pode ter atrasado o entrelaçamento das hifas, formando um aglomerado único em tempo superior, como visto

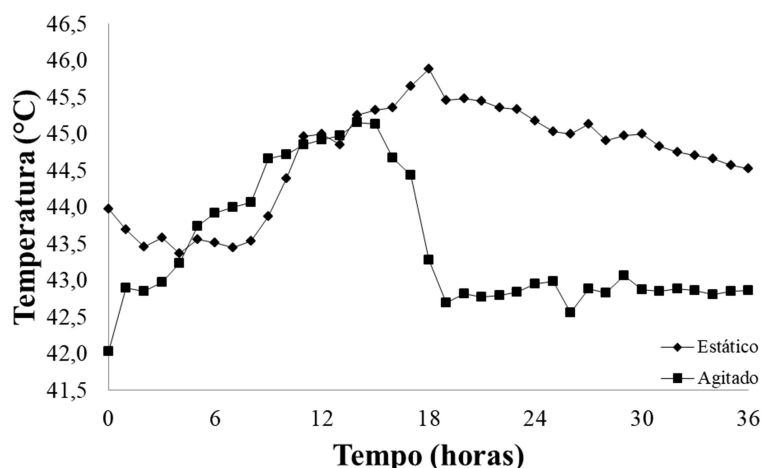
na situação descrita anteriormente para leitos que não foram rotacionados previamente. Em ensaios para medir a resistência à tração das hifas aéreas de *M. thermophila* I-1D3b cultivado em discos de farelo de trigo (Capítulo 5), observou que até 12 horas de cultivo, nenhuma força pôde ser medida, pois não há entrelaçamento das hifas entre os discos de farelo de trigo para que tal força possa ser mensurada e a força máxima foi obtida em 24 horas de cultivo.

Grajales (2014) realizou ensaios de CES utilizando as mesmas condições apresentadas nesse trabalho para avaliar, pela quantificação da atividade de endoglucanase, a tolerância à agitação mecânica do fungo *M. thermophila* I-1D3b, variando a carga de partículas e a intermitência de rotação do tambor ao longo do cultivo. A autora relatou que o fungo é tolerante a agitações moderadas e que o grau de enchimento de 0,4 ou 0,5 não provocou efeito prejudicial à síntese de enzimas, havendo ligeiro aumento da atividade enzimática, quando o tambor foi rotacionado a cada 12 e 24 horas de cultivo.

6.3.3 Avaliação da geração de calor metabólico durante o cultivo em estado sólido

A partir dos dados de movimentação do substrato durante o CES, realizaram-se experimentos de controle de temperatura em sistemas sem movimentação e com movimentação. Esses resultados são mostrados na Figura 6.9. Observa-se que ao deixar o sistema estático, a temperatura fica próxima a ideal para o CES, atingindo valor máximo com 18 horas de cultivo. Resultados semelhantes de temperatura foram encontrados por Perez; Casciadori e Thoméo (2019) e Zanelato et al. (2012) em biorreator de leite empacotado para o CES por *M. thermophila* I-1D3b em mistura de BC:FT na proporção 7:3. O aumento de temperatura é devido aos resultados das atividades metabólicas do fungo, e em biorreator de leite empacotado, esse aumento foi de aproximadamente 6°C, porém os autores destacam que, apesar da temperatura máxima exceder o limite de segurança, não prejudicou o metabolismo fúngico.

Figura 6.9 – Controle de temperatura do cultivo em estado sólido, realizado em tambor rotativo, por *M. thermophila* I-1D3b em mistura de BC:FT na proporção 7:3 com 75% de umidade e grau de enchimento 0,5. São caracterizados experimentos estático e agitado a velocidade de rotação de 8 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Anteriormente, ao avaliar a rotação do substrato cultivado, observou que em 9 horas de cultivo não ocorreu resistência à movimentação, logo, esse tempo de cultivo e 18 horas, quando ocorreu o pico de temperatura, foram escolhidos para rotacionar o tambor, a fim de comparar o controle de temperatura e a produção de enzimas após 96 horas de cultivo. Quando o tambor foi agitado, o valor máximo de temperatura foi atingido com cerca de 15 horas de cultivo, diminuindo a temperatura média do cultivo em aproximadamente 3°C.

A atividade de endoglucanase para o cultivo estático foi de $149,4 \pm 24,3 \text{ U.gss}^{-1}$ e ao rotacionar o tambor, diminuiu para $117,2 \pm 10,0 \text{ U.gss}^{-1}$. Perez; Casciadori e Thoméo (2019) realizaram experimentos a fim de encontrar a melhor alternativa para expansão de biorreator de leito empacotado, obtendo para o biorreator em escala de bancada, a atividade de endoglucanase máxima de 148 U.gss^{-1} e em biorreator de escala piloto, a atividade enzimática foi de 80 U.gss^{-1} . Zanelato et al. (2012) avaliaram a produção de endoglucanase no CES, em biorreator de leito empacotado, obtendo, em 96 horas, atividade enzimática de 669 U.gss^{-1} . Apesar do fungo *M. thermophila* I-1D3b ter tolerância à agitação, valores menores para a atividade enzimática podem ter ocorrido porque ao misturar partículas de tamanhos diferentes em um tambor rotativo, as partículas menores segregam na parte inferior do leito após várias agitações (HUANG; KUO, 2018), modificando a composição do meio. Outro aspecto que pode ter ocasionado esta redução é a danificação das hifas devido ao movimento do meio. De todo modo, a atividade relativa para a condição de movimentação foi igual a 0,8, similar aos

resultados obtidos por Grajales (2014). Para tambores de grandes dimensões, espera-se que a elevação de temperatura seja mais expressiva do que a observada nos presentes ensaios e que os efeitos positivos da rotação possam ser melhor observados.

Neste cultivo, o farelo de trigo tem o papel de indutor de crescimento por ter fontes de carbono e nitrogênio mais facilmente assimiláveis. Assim, nos primeiros estágios de cultivo, o fungo consome mais intensamente o farelo e somente em estágios posteriores o bagaço de cana-de-açúcar (GOMES et al., 2020). Desta forma, quando o meio é segregado há menor concentração de farelo de trigo na parte superior, o que pode não fornecer quantidades suficientes de nutrientes.

6.4 Conclusão

Por meio de análise visual pôde-se descrever a movimentação de partículas de bagaço de cana-de-açúcar e de misturas de bagaço de cana-de-açúcar e de farelo de trigo em tambores rotativos, com e sem cultivo pelo fungo *M. thermophila* I-1D3b. Para sistemas não reacionais em tambor de 30 cm de diâmetro, não foi observado diferença no padrão de movimentação das partículas para as umidades de 10% e 75% para leitos de bagaço de cana-de-açúcar para um mesmo grau de enchimento (0,4 ou 0,5). Esse mesmo padrão de movimentação foi observado com a adição de 30% de farelo de trigo ao bagaço. As partículas eram elevadas pelos defletores e arremessadas contra um grande aglomerado que girava em torno de um eixo imaginário, coincidente com o eixo axial do tambor. No entanto, quando utilizou a umidade de 75%, observou-se mais espaço vazio entre as partículas do leito, e a movimentação das partículas ocorreu de forma gradual no tambor. Para o tambor de 9,4 cm de diâmetro, a ausência de defletores nas paredes faz com que a movimentação ocorra mais ao centro do tambor. As fibras formam um aglomerado no centro, movimentando em três blocos de tamanhos e periodicidade irregulares.

Nos cultivos realizados no biorreator de menor dimensão, observou-se o mesmo padrão de movimentação descrito para o meio não reacional em até 9 horas de cultivo, quando constatou-se ligeira resistência inicial à movimentação. Após 12 horas de cultivo, forma-se um bloco de partículas entremeadas por hifas que não pôde ser fragmentado. No entanto, se o tambor for girado antes do início do cultivo, a rotação pode ser realizada com até 15 horas de cultivo. Mais experimentos deverão ser realizados para determinar o momento de rotação do tambor aumentando a produção de enzimas.

CAPÍTULO 7. POROSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DOS POROS EM LEITOS EMPACOTADOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE TRIGO PARA CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

RESUMO

A porosidade e a distribuição do tamanho dos poros são fatores que influenciam várias propriedades físicas dos meios porosos. Para o cultivo em estado sólido (CES), dentre outras coisas, esta informação estrutural também é importante para determinar o espaço livre disponível para o crescimento microbiano. O objetivo deste trabalho foi determinar a porosidade e a distribuição de tamanhos de poros em leitos empacotados de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e misturas de BC com farelo de trigo (FT) com e sem cultivo pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. A técnica fotográfica 2D auxiliada por computador foi utilizada para avaliar as mudanças na porosidade de um leito empacotado devido ao crescimento do fungo em uma mistura BC:FT com proporção em peso 7:3, a 75% de umidade após 48 horas de cultivo e os resultados mostraram uma redução acentuada de mais de 50% da porosidade devido ao micélio fúngico. Notou-se um perfil de porosidade longitudinal do leito, cuja seção média apresentou colonização deficiente devido ao impedimento estérico. Para leitos não cultivados, nenhuma alteração da porosidade foi encontrada. Uma ampla distribuição de tamanho de poros foi observada para meios não cultivados, com a maioria dos vazios sendo muito estreitos para um crescimento fúngico adequado e poucos vazios de grandes dimensões que garantiam espaço suficiente para as hifas aéreas. A microtomografia computadorizada de raios-X (μ -CT) foi usada para avaliar a estrutura 3D do leito e uma complexa rede de vazios foi encontrada com uma porosidade média bastante próxima à obtida usando a análise de imagens 2D na superfície do leito. Os resultados aqui obtidos serão úteis para que modelos mais realistas sejam propostos considerando a variação da porosidade e a distribuição do tamanho dos poros para este sistema CES.

Palavras-chaves: Cultivo em estado sólido. Bagaço de cana-de-açúcar. Farelo de trigo. Determinação de porosidade. Distribuição de tamanho de poro. Análise de imagem digital.

ABSTRACT

Porosity and pore size distribution are factors that influence several physical properties of porous media. For solid-state cultivation (SSC), this structural information is also important to determine the free space available for the microbial growth. The aim of this work was to determine the porosity and the pore size distribution of packed beds of sugarcane bagasse (SCB) and mixtures of SCB with wheat bran (WB) with and without cultivation with fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. The computer-aided 2D photographic technique was used to evaluate the changes of the bed porosity due to the fungal growth in a mixture SCB:WB with weight proportion 7:3 at 75% moisture content after 48h of cultivation and the results showed a steep reduction of more than 50% of the porosity due to the fungal mycelium. A longitudinal porosity profile was noticed and the midsection of the bed was poorly colonized due to the steric hindrance. For uncultivated beds, no change of the porosity was found. A wide pore size distribution was observed for uncultivated media, with the majority of the voids being too narrow for an adequate fungal growth and quite few, but very large, voids which ensured enough space for the aerial hyphae. Micro computed X-ray tomography (μ -CT) was used to assess the 3D structure of the bed and a complex network of voids was found with an average porosity quite close to the one obtained using the 2D image analysis from the top surface of the bed. The results obtained here will be of help for more realistic models to be proposed considering porosity variation and pore size distribution for this SSC system.

Keywords: Solid-state cultivation. Sugarcane bagasse. Wheat bran. Porosity determination. Pore size distribution. Digital image analysis.

7.1 Introdução

O cultivo em estado sólido (CES) é um processo microbiano de síntese de biomoléculas de alto valor agregado a partir de resíduos sólidos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, palha de arroz e polpa e casca de laranja, entre muitos outros (CASCIATORI et al., 2014; CASCIATORI; THOMÉO, 2018). Essa técnica tem sido aplicada à produção de uma variedade de compostos e produtos, como enzimas, pigmentos, ração animal e esporos de fungos para o controle biológico de pragas agrícolas (CUNHA et

al., 2020; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019; SALA et al., 2020; VELMURUGAN et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2009; ZANELATO et al., 2012). Fungos filamentosos são frequentemente aplicados em processos de CES, uma vez que são bem adaptados a meios de atividade de água moderada, ao contrário de bactérias que requerem ambientes de alta atividade de água (MANAN; WEBB, 2019; WANG; LIU; CHEN, 2018).

Os materiais sólidos usados para CES podem ser definidos seguindo-se BARGMANN et al. (2018), que classificou os materiais porosos em três grupos principais: tecidos, aglomerados e agregados. Nesta definição, agregados são materiais não consolidados e não rígidos, compostos por partículas individuais e fracamente compactadas, envoltas por uma rede de vazios. Materiais granulares, como solo, areia, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, pertencem aos agregados. Os agregados não resistem à tração, exceto quando ocorre coesão entre as partículas (BARGMANN et al., 2018). Em CES, não apenas as partículas sólidas devem ser levadas em consideração ao estimar as propriedades físicas de um meio, mas também o micélio fúngico, que pode alterar significativamente a estrutura do leito e pode intensificar a coesão entre as partículas.

Porosidade, distribuição de tamanho de poro, tortuosidade, número de coordenação e posição relativa, entre outras propriedades estruturais, afetam diretamente as propriedades físicas de um leito poroso compactado (KACZMAREK; GOUEYGOU, 2006), como condutividade térmica, difusividade de massa, coeficientes convectivos de transferência de calor e massa e higroscopicidade. Estas propriedades são cruciais para a modelagem de transferência de calor e massa de processos CES, por exemplo, visando o projeto e operação de biorreatores (CASCIATORI et al., 2014). No entanto, como o material sólido é frequentemente o substrato para o crescimento do fungo que é consumido para gerar biomassa microbiana, não apenas as propriedades estruturais iniciais devem ser investigadas, mas também sua modificação ao longo do cultivo (WANG; LIU; CHEN, 2018).

A determinação das propriedades estruturais de meios porosos pode ser realizada usando métodos analíticos ou auxiliados por computador. Os métodos analíticos fornecem informações médias do meio poroso, até o nível de volume do elemento representativo, e são bem representados pela gravimetria (CASCIATORI et al., 2014; MANAN; WEBB, 2019), a porosimetria de mercúrio (GIESCHE, 2006) e a sorção de gás (CHEN; HE, 2012; WANG; LIU; CHEN, 2018). Essas técnicas fornecem informações médias dos leitos (*bulk*) e intrapartículas, como fração geral de vazios, tamanho médio dos poros e distribuição do tamanho dos poros, embora algumas delas exijam a proposição apriorística do volumes de poros e modelos de adsorção de gás (FABER et al., 2003). Os métodos auxiliados por

computador são acoplados a técnicas não intrusivas e não destrutivas, como microtomografia computadorizada de raios-X (μ -CT), espectroscopia de energia dispersiva de raios-X e ressonância magnética e podem produzir informações microscópicas 3D médias e intrapartículas. Essas técnicas, aliadas ao processamento digital de imagem (PDI), podem fornecer características simples da amostra, como fração de fases, fração de vazios e conectividade, bem como informações 3D detalhadas, como orientação de fases, raio de rotação de giro, número e ângulo de coordenação, entre outros (DADKHAH; PEGLOW; TSOTSAS, 2012; IRIE et al., 2018; LANDIS; KEANE, 2010). Bargmann e colaboradores (2018) apresentaram uma revisão sobre os métodos de geração de distribuição espacial 3D de meios porosos, mostrando que a escolha de um método experimental específico depende das características intrínsecas do material sólido e da informação micro estrutural desejada.

As propriedades estruturais dos meios porosos utilizados em CES foram obtidas por técnicas gravimétricas e por PDI. A porosidade do farelo e casca de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo frequentemente foi determinada pelo deslocamento de volume líquido (BASTOS; MOTTA; SANTANA, 2014; DORTA; ARCAS, 1998; MEMBRILLO et al., 2011). Especificamente para BC, FT e mistura entre ambos, Casciatori et al. (2014) determinaram a densidade de partícula, a densidade do leito e a porosidade em função do teor de umidade e da técnica de empacotamento. Esses autores também investigaram a influência do micélio fúngico de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e *Trichoderma reesei* QM9414 na porosidade do leito e afirmaram que o crescimento dos fungos não afetou essa propriedade. Por outro lado, Karimi et al. (2014) mostraram aumento acentuado da porosidade de um leito compactado aerado ao longo do tempo de cultivo de *Aspergillus niger* PTCC 5010 em farelo de trigo, que foi refletido pelo aumento da queda de pressão do ar ao longo do leito, observada usando picnometria de gás. Os autores também mostraram uma alta dependência da porosidade com o teor de umidade ao longo do processo.

O PDI também tem sido utilizado em CES para avaliação da porosidade do leito quando acoplado à fotografia digital 2D de superfície, antes e durante o crescimento microbiano. Entretanto, algumas dificuldades em discriminar as partículas e o micélio e até mesmo em diferenciar a camada superficial das camadas inferiores são relatadas na literatura (BELLON-MAUREL; ORLIAC; CHRISTEN, 2003; COURI et al., 2006). Devido a esses inconvenientes, recomenda-se o uso do PDI apenas em experimentos preliminares para identificar as condições ótimas de cultivo, visto que na camada superficial não há limitação para o consumo de oxigênio (LÓPEZ-GÓMEZ; PÉREZ-RIVERO; WEBB, 2019).

Em contraste com isso, a técnica μ -CT tem sido usada para uma variedade de materiais de interesse em vários campos de pesquisa, como alimentos, odontologia, biologia, ciência ambiental, ciência de materiais, geologia, engenharia química e farmácia (DADKHAH; PEGLOW; TSOTSAS, 2012; IRIE et al., 2018; MEFTAH et al., 2019; SINKA et al., 2004; PARKINSON et al., 2008; PIGNERET et al., 2016; SCHOEMAN et al., 2016; VERMA et al., 2014). No entanto, poucas tentativas ainda foram feitas para fornecer a estrutura dos materiais de interesse dos processos de CES. Bellon-Maurel; Orliac e Christen (2003) comentaram que o μ -CT poderia ser usado para avaliar o crescimento de micélio em colunas de CES em escala de laboratório, mas nenhuma pesquisa usou essa abordagem até agora. Na verdade, μ -CT não é adequado para nanoestruturas, mas encontrou algum espaço para agregados e aglomerados na faixa do micrômetro (BARGMANN et al., 2018; MORENO-ATANASIO; WILLIAMS; JIA, 2010).

De acordo com Madej et al. (2018), imagens 2D podem resultar em interpretação imprecisa da microestrutura geométrica de um meio poroso, enquanto uma imagem renderizada em 3D pode fornecer informações mais complexas sobre a morfologia da amostra. Giuseppe et al. (2016) compararam os resultados de tamanho e distribuição de tamanho de poro de fibras lignocelulósicas em compósitos de fibra-polímero usando μ -CT, foto-varredura 2D e analisador automático de fibra (baseado na captura de imagem digital) e concluíram que não há um método absoluto para esta análise e que as ferramentas são complementares. Hamidi et al. (2015) também mediram propriedades relacionadas ao tamanho de três materiais lignocelulósicos usando μ -CT e varredura de fotos 2D e destacaram os pontos fortes e as desvantagens de cada técnica, mostrando que, dependendo do parâmetro desejado, os resultados podem ser consideravelmente diferentes. Os autores concluíram que a escolha de um método específico depende da fibra a ser analisada e do objetivo do estudo.

Diante disso, este trabalho tem como objetivo determinar a porosidade e o tamanho dos poros de misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo antes e durante o CES de *M. thermophila* I-1D3b utilizando fotografia digital e μ -CT para obtenção de estruturas 2D e 3D, respectivamente, ambas acopladas com processamento digital de imagem. Os resultados aqui obtidos são valiosos para a modelagem de transferência de calor e massa de biorreatores CES.

7.2 Material e Métodos

7.2.1 Substratos

Foram utilizados como substratos bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT). O bagaço de cana-de-açúcar foi doado pela Companhia Virgolino de Oliveira Açúcar e Álcool, de José Bonifácio – SP, sendo esse, seco em estufa com circulação de ar a 60°C até peso constante. O BC foi peneirado para conferir maior uniformidade ao meio poroso, e padronizado como a fração retida entre peneiras com aberturas de 2 e 4 mm. O farelo de trigo foi adquirido no comércio local e seco em estufa com circulação forçada de ar a 45°C até peso constante. Em seguida os substratos foram armazenados em embalagens de polietileno de parede espessa em temperatura ambiente até o momento do uso. Experimentos com e sem cultivo de fungos foram realizados.

7.2.2 Microrganismo

O fungo *M. thermophila* I-1D3b foi isolado pelo Grupo de Bioenergia do IBILCE/UNESP a partir de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar. No preparo do inóculo, o microrganismo foi transferido para frascos *Erlenmeyer* contendo 50 mL de meio ágar sabouraud dextrose (ASD) e incubados a 45°C por 96 horas. Os esporos foram raspados da superfície da colônia com 50 mL de solução nutriente, composta de 3,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 3,0 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,5 g.L⁻¹ de CaCl₂ e 1,0 g.L⁻¹ de Tween 80, ajustada para pH 5,0 com solução de HCl. A concentração de esporos foi estimada pela contagem em microscópio óptico usando Câmara de Neubauer. A concentração de esporos em todos os ensaios foi de 10⁷ esporos.g sólido seco⁻¹.

7.2.3 Determinação da porosidade e do tamanho dos poros em leitos sem cultivo usando fotografia e PDI

A fim de proporcionar um contraste adequado ao PDI, os materiais sólidos foram corados com uma solução aquosa de Rodamina B 0,02% (p/v) por 2 horas, seguida de secagem conforme mencionado na seção 7.2.1. As amostras de BC e de misturas BC:FT na proporção 7:3 foram acondicionadas em cilindros de PVC de 42 mm de diâmetro e 50 mm de

altura, com fundo em placa de Plexiglass, seguindo a técnica de embalagem solta descrita por Casciadori et al. (2014).

Esta proporção da mistura BC:FT foi escolhida de acordo com Zanelato et al. (2012) e já utilizado em trabalhos anteriores do nosso grupo. O teor de umidade das amostras foi fixado em 15% e 75% (b.u.), umedecendo as partículas um pouco antes do início dos experimentos, como é usual em cultivo em estado sólido. A quantidade necessária de água foi adicionada aos sólidos secos, que foram bem misturados manualmente. O teor de umidade final foi determinado a partir de três amostras retiradas dos sólidos úmidos em um Analisador de Umidade MB-45 (Ohaus, Parsipanny, EUA). Oito repetições independentes foram realizadas para cada condição experimental.

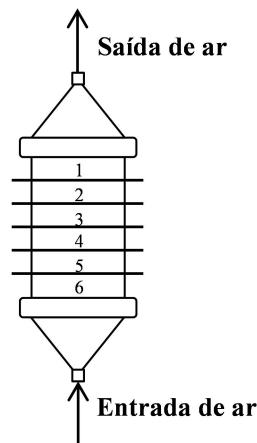
Uma solução de gel carragena 3% (p/v) foi corada com uma solução de azul de metileno 0,1% (v/v) e vertida dentro dos tubos de PVC, empacotados com o substrato, para aumentar o contraste de cor para o PDI. Os moldes foram mantidos em freezer doméstico até a solidificação. As amostras foram retiradas dos moldes e fatias de 5 mm de espessura foram preparadas em cortador de carne. As superfícies das amostras foram fotografadas sob condições controladas em uma caixa de luz (LUZURIAGA; BALABAN; YERALAN, 1997) usando uma câmera digital DSC RX-100 (Sony Co, Tóquio, Japão) com número efetivo de pixels de 22,2 Mpixels. As imagens digitais foram analisadas por um *software Image Pro Plus* v.6 (Media Cybernetics Inc., Rockville, EUA), onde a área de vazios foi discriminada pelo *software*. Os filtros *LowPass* e *Erode* foram aplicados para a segmentação da imagem. Várias áreas foram escolhidas na superfície e a porosidade dos leitos compactados foi calculada assumindo isotropia e equivalência da porosidade superficial e da porosidade volumétrica. Logo após, o tamanho do poro foi determinado no *software*, pelo recurso de diâmetro médio.

7.2.4 Determinação da porosidade e do tamanho dos poros em leitos com cultivo usando fotografia e PDI

Os ensaios foram realizados utilizando a mistura BC:FT 7:3 com 75% de umidade, onde as partículas sólidas não foram coradas com Rodamina B, como nos experimentos sem cultivo. O cultivo ocorreu em tubos de aço inoxidável com 6 cm de diâmetro e 12,5 cm de altura, com as amostras inoculadas e empacotadas conforme descrito anteriormente. O ar foi fornecido por um compressor a uma vazão de 15 L.h⁻¹, passando por medidor de vazão mássico (Cole-Parmer Instrument Co, Vernon Hills, EUA) e filtro de algodão, para, em

seguida, ser umidificado e aquecido a 45°C em coluna recheada com esferas de vidro e água destilada. O sistema foi mantido à temperatura de 45°C em câmara DBO. Assim, o ar entrou no biorreator saturado e com temperatura e vazão controladas. Após 48 horas de cultivo, as amostras foram retiradas do tubo e fatias de 10 mm de espessura foram obtidas usando uma lâmina afiada muito fina. A posição das fatias em relação ao cultivo no biorreator está representada na Figura 7.1. A superfície dos discos obtidos foi fotografada e as imagens analisadas como descrito anteriormente e a distribuição da porosidade ao longo da altura do leito foi determinada em conformidade. Esse experimento não teve repetição

Figura 7.1 – Representação da posição das fatias para análise de porosidade em relação ao biorreator de leito empacotado utilizado para o cultivo de *M. thermophila* I-1D3b em mistura BC:FT 7:3 a 75% de umidade. A posição 1 refere-se à saída de ar e 6 à entrada.



Fonte: Elaborado pela autora.

7.2.5 Determinação da porosidade por microtomografia computadorizada (μ -CT) em leitos sem cultivo

As análises de microtomografia computadorizada (μ -CT) foram realizadas no Institute of Process Engineering, Otto-von-Guericke-University Magdeburg, em Magdeburg, Alemanha. O método proposto por Dadkhah; Peglow e Tsotsas (2012) foi utilizado para a análise μ -CT usando tomógrafo CT Alpha (Procon X-Ray GmbH, Garbsen, Alemanha) com tensão de 60 kV e corrente de 80 μ A. A mistura BC:FT 7:3 foi colocada em um suporte cilíndrico de 9 mm de diâmetro e 10 mm de altura, conforme apresentado na Figura 7.2. Em contraste com os estudos nas seções anteriores, o teor de umidade não foi definido neste estudo. A amostra foi colocada a 500 mm do detector e o porta-amostras foi girado 360° durante a tomografia. Foram obtidas três imagens de cada ângulo de rotação, com tempo de

exposição de 1,6 s e o tempo total de aquisição foi de 2 h. Cada voxel do volume reconstruído tem uma resolução nominal de 18,5 μm e cada imagem volumétrica consistia em 1200 imagens únicas bidimensionais. Após a digitalização, as imagens 3D foram reconstruídas a partir da pilha de imagens 2D.

Figura 7.2 – Suporte de amostras para a determinação do μ -CT.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para o PDI foi utilizado o software *Modular Algorithms for Volume Images* (MAVI), do Fraunhofer Institute for Technical and Industrial Mathematics (ITWM, Kaiserslautern, Alemanha). Inicialmente, um cubo com comprimento de borda de 300 voxels foi extraído como a região de interesse, seguido por binarização com limiar otsu para atribuir um inteiro de 1 como estrutura e 0 como espaço vazio. Para não levar em conta a porosidade interna das fibras de bagaço de cana-de-açúcar, um filtro de objeto foi usado para preencher esses espaços vazios. Contando os voxels de seu rótulo dedicado e a resolução nominal, o volume vazio e, portanto, a porosidade total foi calculada.

7.2.6 Análises estatísticas

As comparações entre as médias dos ensaios foram realizadas empregando-se o teste de Tukey a 95% de intervalo de confiança, por meio do *software* Minitab 18.0. (Minitab Inc., State College, USA).

7.3 Resultados e Discussão

Neste trabalho, o tamanho dos poros e a porosidade de misturas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo foram determinados por fotografia. Além disso, a análise estrutural foi realizada por μ -CT. Ambas as técnicas de imagem foram acopladas ao processamento digital de imagens. Os experimentos foram realizados com e sem cultivo pelo o fungo *M. thermophila* I-1D3b.

7.3.1 Determinação da porosidade e tamanho dos poros por fotografia e PDI antes do cultivo

Para um melhor resultado do PDI, a imagem deve passar por alguns pré-tratamentos, começando pela aplicação de filtros, que têm a função de suavizar ou realçar alguns recursos da imagem original e minimizar os efeitos de ruído. A Figura 7.3 apresenta um exemplo desse processo de filtragem, onde a Figura 7.3a apresenta a imagem original de uma amostra de BC. Na Figura 7.3b, o filtro *LowPass* foi aplicado para suavizar a imagem, atenuando as altas frequências responsáveis por transições nítidas e minimizando ruídos. O filtro *Erode* foi aplicado para destacar as áreas escuras que representam a solução de gel carragena corada com azul de metileno. Após a filtração, as imagens foram segmentadas (Figura 7.3c) baseadas no histograma, detectando a frequência de pixel escuro, distinguindo os poros da camada superior dos presentes nas camadas inferiores.

Figura 7.3 – Processamento digital de imagem de uma fotografia tirada de um meio de bagaço de cana-de-açúcar corado com Rodamina B e preenchido com solução de gel carragena corada com azul de metileno: a) original; b) após os filtros *LowPass* e *Erode*; c) segmentado para destacar os vazios (verde).



Fonte: Elaborado pela autora.

De cada molde de PVC foram produzidas três fatias de 5 mm de espessura, denominadas de topo, centro e fundo na Tabela 7.1, conforme a posição em que a fatia pertencia ao molde. Como as duas superfícies de cada corte foram fotografadas, cada resultado da Tabela 7.1 representa a média de 16 fotos. Os coeficientes de variação obtidos foram inferiores a 8%, valor aceitável considerando a heterogeneidade das fibras do bagaço e as demais fontes de variabilidade, como os procedimentos de empacotamento e fatiamento e os filtros digitais aplicados. Um modelo estatístico linear generalizado foi aplicado aos resultados, tendo o teor de umidade e a posição como variáveis preditoras. A comparação entre as médias foi realizada por meio do teste de Tukey e mostrou que ambas as variáveis foram significativas para BC e que a posição da fatia no molde foi significativa para a mistura BC:FT. De acordo com Casciatori et al. (2014), a porosidade diminui com o aumento do teor de umidade para BC e mistura BC:FT 7:3. Usando as equações de Casciatori e colaboradores para estimar a porosidade, os valores estimados variam de 0,88 a 0,73 para BC e de 0,88 a 0,76 para a mistura BC:FT, para teor de umidade variando de 15 a 75%, respectivamente.

Tabela 7.1 – Porosidade de BC e misturas de BC:FT (7:3, p/p) obtida a partir da técnica de imagem 2D em diferentes teores de umidade e altura do leito.

Posição no molde	Umidade (%b.u.)	BC			BC:FT (7:3)		
		Média(a)	DP	CV(%)	Média(a)	DP	CV(%)
Topo	15	0,76 ^{bA}	0,06	7,64	0,75 ^{aA}	0,04	5,96
	75	0,77 ^{aA}	0,03	4,03	0,78 ^{aA}	0,04	4,64
Centro	15	0,72 ^{bAB}	0,05	7,50	0,69 ^{aB}	0,04	5,13
	75	0,75 ^{aAB}	0,03	4,38	0,70 ^{aB}	0,05	6,67
Fundo	15	0,70 ^{bB}	0,03	4,29	0,69 ^{aB}	0,02	3,14
	75	0,73 ^{aB}	0,03	4,12	0,70 ^{aB}	0,06	7,88
Média(b)	15	0,73			0,71		
	75	0,75			0,73		

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação ($CV = DP/Média$); BC: Bagaço de cana-de-açúcar; FT: Farelo de trigo. Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas e diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes, para o teor de umidade e a posição no molde, respectivamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%. Média (a): entre os valores de 8 repetições. Média (b): entre os valores de três posições.

Fonte: Elaborado pela autora.

Neste trabalho, a porosidade aumentou com o aumento do teor de umidade para o BC, ao contrário do que foi mostrado por Casciatori et al. (2014) e não dependeu do teor de umidade para a mistura BC:FT. Uma possível causa dessas discrepâncias é a absorção de água pelas fibras quando a solução de gel carragena foi adicionada às amostras mais secas. Portanto, considerando apenas os resultados para 75% de umidade aqui obtidos, a porosidade

foi de 0,75 para BC e 0,73 para a mistura BC:FT, que se aproximam dos valores estimados pelo método de Casciatori et al. (2014). As diferenças entre os valores previstos e medidos ficaram abaixo de 5,5%, diferença menor do que o coeficiente de variação de 8% discutido anteriormente. Considerando que a técnica gravimétrica empregada por esses autores é consideravelmente mais trabalhosa do que o PDI aqui apresentado, o PDI ainda poderia ser usado como uma primeira estimativa da porosidade. As diferenças entre os dois métodos estão certamente associadas aos limites do PDI, onde apenas regiões distintas da amostra são investigadas, enquanto as técnicas de medição integral capturam toda a informação da amostra.

As altas porosidades apresentadas na Tabela 7.1 são vantajosas para o CES, pois permite as trocas gasosas e melhora a remoção por convecção do calor gerado metabolicamente. Outro aspecto positivo é o espaço livre para o crescimento das hifas fúngicas aéreas. Por outro lado, pode-se considerar que a produtividade volumétrica é baixa, pois menos biomassa está presente no biorreator ao longo do cultivo, resultando em baixa concentração de produtos. Perez (2017) realizou alguns experimentos reduzindo o tamanho das fibras BC a fim de aumentar a densidade aparente de um biorreator de leite fixo, mantendo a proporção BC:FT constante (7:3). Os resultados mostraram que o aumento da densidade do leite, e consequente diminuição da porosidade, não aumentou a atividade total da endoglucanase produzida por *M. thermophila* I-1D3b, uma vez que as trocas gasosas e a remoção de calor foram afetadas negativamente, resultando em crescimento do fungo mais concentrado na região da parede do tubo. Portanto, o equilíbrio entre a porosidade do leite e a produtividade volumétrica é um fator que deve ser avaliado experimentalmente.

Deve-se observar na Tabela 7.1 que a porosidade diminui do topo para o fundo dos moldes. A diminuição foi mais intensa para a mistura de BC:FT e parece que o fluxo viscoso da solução de gel carragena arrastou partículas do farelo de trigo para o fundo do molde, diminuindo a porosidade. Para BC, a diminuição não foi tão intensa e foi mais significativa para o teor de umidade de 15%, portanto, a absorção de líquido pelas fibras secas pode ser responsável por esse efeito, conforme discutido anteriormente. Deve-se ressaltar que, visualmente, a distribuição do gel carragena foi uniforme nos moldes.

Bastos; Motta e Santana (2014) avaliaram por micrografias a espessura do filme líquido na superfície das partículas de farelo de trigo sob diferentes teores de umidade, observando que com o aumento da umidade de 25 para 45%, a espessura do filme aumenta de 8,6 para 10 μm , chegando a aproximadamente 12 μm em amostras saturadas com água, o que ocasionou o aumento do tamanho médio das partículas e diminuição da porosidade do leite de

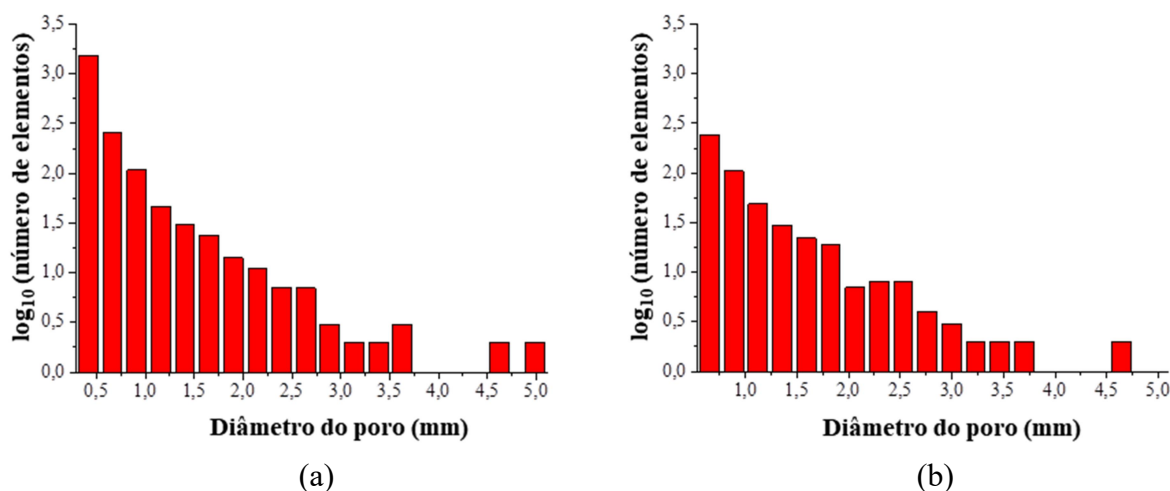
0,54 para 0,47, afetando a transferência de oxigênio durante o cultivo de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. Membrillo et al. (2011) observaram que a densidade das partículas de bagaço de cana-de-açúcar de tamanhos diferentes apresentam capacidade de retenção de água semelhante, embora ocorra variação da densidade do leito para cada tamanho de partícula.

Para a determinação do tamanho dos poros, uma calibração do software foi necessária. Um paquímetro, com abertura de 1 mm, foi fotografado nas mesmas condições das amostras e o software converteu essa distância em pixels. A partir das amostras fotografadas, os pixels relativos aos poros foram convertidos em milímetros. A partir da fotografia original das amostras antes do cultivo com 75% de umidade, foram identificados 2.041 poros, sendo o menor 0,04 mm e o maior 4,99 mm. Este intervalo foi dividido em 20 classes e a distribuição do tamanho dos poros foi obtida, conforme apresentado pelo histograma na Figura 7.4a com escala logarítmica no eixo y para facilitar a visualização. A partir desta distribuição, pode-se notar que cerca de 74% de todos os poros têm o diâmetro mínimo de 0,04 mm, que parece ser o limite inferior de estimativa de tamanho deste método nas condições em que foi empregado. Considerando todos os poros, o diâmetro médio ponderado foi de 0,58 mm. Em experimentos anteriores (dados não mostrados), a espessura de hifas individuais de *M. thermophila* I-1D3b cultivadas em uma mistura BC:FT foi observada por microscopia eletrônica de varredura (aumento de 4000x) e a ordem da espessura foi de 1 µm. Portanto, um tamanho de poro de 0,04 mm dá pouco espaço para a formação de micélio, prejudicando o crescimento microbiano. Levando-se isso em consideração, poros maiores que 0,04 mm foram selecionados como viáveis para o cultivo, e a distribuição apresentada na Figura 7.4b resultaram em 240 elementos com diâmetro médio de 1,04 mm.

Schutyser et al. (2003) desenvolveram um modelo para prever o momento ideal para agitar um leito de grãos de trigo quando cultivado por *Aspergillus oryzae* em tambor rotativo. Os autores testaram a resistência à tração das hifas aéreas do fungo e descobriram experimentalmente que o espaço de 1 mm entre duas partículas individuais resulta na resistência máxima do micélio. Nos experimentos de Schutyser et al. (2003), dois discos de uma massa de trigo foram separados por espaços definidos e o microrganismo foi cultivado na superfície dos discos. Os discos foram colocados em um texturômetro e a resistência à tração foi medida de acordo com o tempo de cultivo e os autores presumiram que os resultados obtidos com estes discos seriam válidos para o cultivo em grãos de trigo. Deve-se ressaltar que as partículas do grão de trigo são muito mais regulares em tamanho e forma do que as fibras do bagaço de cana-de-açúcar misturadas ao farelo de trigo e que nenhum espaçamento

específico entre as partículas pode ser facilmente definido para tal mistura devido ao tamanho individual das partículas, o distribuição relativa das fibras e a ampla distribuição do tamanho dos poros aqui observada.

Figura 7.4 – Distribuição do tamanho dos poros de uma mistura de BC:FT 7:3 sem cultivo. a- todos os elementos; b- elementos maiores que 0,4 mm.

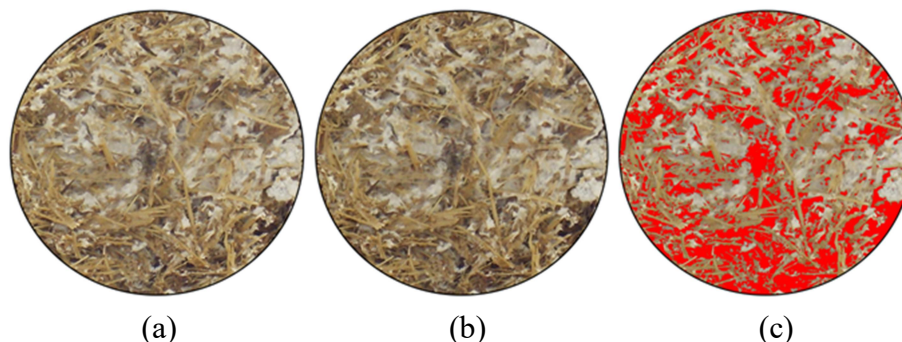


Fonte: Elaborado pela autora.

7.3.2 Determinação da porosidade e tamanho dos poros por fotografia e PDI após o cultivo

A Figura 7.5 mostra a imagem original e a sequência de processamento digital, conforme descrito anteriormente, para identificar os vazios da mistura BC:FT colonizado pelo microrganismo após 48 h de cultivo. Na Figura 7.5c, os vazios são destacados em vermelho e pode-se perceber que a área branca, correspondente ao micélio fúngico, foi pouco afetada pela segmentação. A partir do cultivo em leito empacotado, foram obtidas fatias de 10 mm de espessura e os resultados da porosidade são apresentados na Tabela 7.2, onde a Posição 1 refere-se à posição mais próxima à saída de ar e 6 à entrada de ar. Em comparação com o meio não cultivado, houve uma diminuição acentuada da porosidade após 48 h de colonização, embora o volume total do leito permanecesse inalterado ao final do cultivo. O encolhimento do leito é comum no CES em biorreatores de leito fixo (FOONG et al. 2009; KARIMI et al., 2014; van BREUKELLEN et al., 2011), devido ao consumo de substrato, secagem e compressão, mas para diâmetros de leito semelhantes ao empregado aqui e para os materiais porosos aplicados, o encolhimento não foi relatado em trabalhos anteriores (ver, por exemplo, Perez; Casciadori e Thoméo, 2019; Zanelato et al., 2012).

Figura 7.5 – Processamento digital da imagem de uma fotografia tirada de uma mistura de BC:FT 7:3 colonizado por *M. thermophila* I-1D3b após 48h de cultivo (a- original; b- após os filtros LowPass e Erode; c- segmentado para destacar os poros).



Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 7.2 – Distribuição longitudinal de porosidade em um leito empacotado de uma mistura BC:FT 7:3, cultivado por *M. thermophila* I-1D3 após 48 horas. A posição 1 refere-se a saída do leito e a posição 6 à entrada.

	Posição	Porosidade (-)	Diâmetro do poro (mm)
Saída de ar	1 – superior	0,25	
	1 – inferior	0,30	
	1 – média	0,28	1,08
	2	0,30	1,01
	3	0,43	1,07
	4	0,41	1,03
Entrada de ar	5	0,38	1,03
	6 – superior	0,41	
	6 – inferior	0,28	
	6 – média	0,34	1,06
	Média	0,36	1,05
	DP	0,06	0,03
	CV (%)	17,2	2,6

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação ($CV = DP/Média$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Observou-se uma diminuição de 52% da porosidade do leito do meio não cultivado para o colonizado. A distribuição axial da porosidade apresentada na Tabela 7.2 destaca a não uniformidade do crescimento do fungo, uma vez que a porosidade diminui da posição axial média em direção às bordas do leito. Algumas causas podem ser levantadas sobre essa

tendência: aumento de temperatura devido ao calor metabólico gerado pelo microrganismo, trocas gasosas deficientes e impedimento estérico. Zanelato et al. (2012), Casciatori et al. (2016) e Perez; Casciatori e Thoméo (2019) operaram um sistema de cultivo semelhante ao aqui aplicado (microrganismo, substrato e tipo e tamanho do biorreator) e não relataram elevação significativo da temperatura, nem redução do teor de umidade. Portanto, o impedimento estérico parece ser a causa mais provável, uma vez que nas bordas do leito o microrganismo apresenta espaços vazios para liberar as hifas aéreas sem restrições, em contraste com a seção mediana do leito onde a maioria dos vazios são relativamente estreitos, mesmo que a porosidade global seja alta. Tal constatação é reforçada pela medição da porosidade individual das faces ascendente superior e inferior dos cortes 1 e 6, conforme apresentado na Tabela 7.2, visto que as faces voltadas para os vazios (1 – superior e 6 – inferior) apresentaram porosidades menores. Perez; Casciatori e Thoméo (2019) mostraram que as atividades de endoglucanase e xilanase foram menores na seção média de um biorreator de leito fixo com 7,62 cm de diâmetro e 80 cm de altura, o que foi atribuído a algum problema microbiológico ou bioquímico indeterminado. Considerando que a síntese de enzimas extracelulares é uma medida indireta da atividade metabólica fúngica, a redução das atividades enzimáticas provavelmente está relacionada à menor concentração de biomassa fúngica na seção média da coluna. Mesmo com essa distribuição não uniforme de biomassa, o coeficiente de variação da média entre as porosidades está abaixo de 18%, o que pode ser considerado um baixo CV para um processo biológico em um biorreator. O tamanho dos poros medido para o meio cultivado foi pouco afetado pelo micélio fúngico, como pode ser visto na Tabela 7.2, o que pode ser considerado um resultado duvidoso, uma vez que o microrganismo colonizou visualmente os grandes vazios e isso não se refletiu no tamanho médio dos poros. Portanto, mais esforços devem ser feitos para aprimorar esta análise pela técnica fotográfica 2D auxiliada por computador, a fim de produzir resultados mais confiáveis para sistemas cultivados.

Casciatori et al. (2014) determinaram a porosidade de leitos compostos pelas misturas BC:FT 7:3 com e sem o cultivo de *M. thermophila* I-1D3b pelo método gravimétrico e não encontraram variação significativa da porosidade do leito. Gomes et al. (2020) verificaram que o micélio de *M. thermophila* M.7.7 cultivado nesta mesma mistura sólida era altamente poroso usando microscopia eletrônica de varredura. A biomassa máxima (X_{max}) obtida por Gomes e colaboradores foi de 55 mg por grama de substrato inicial seco às 48 horas de experimento, 45°C e 75% de umidade inicial, ou seja, apenas 5% dos sólidos totais no sistema, com base na fração sólida inicial total. Portanto, assumindo que este valor de X_{max} é

semelhante para *M. thermophila* I-1D3b, a variação da porosidade devido ao micélio fúngico está abaixo da incerteza do método gravimétrico utilizado por Casciatori et al. (2014). Outro aspecto não levado em consideração por nenhum método experimental até o momento é o consumo de substrato, o que certamente afeta em alguma medida a porosidade do leito. Esta questão pode ser respondida mais claramente se as propriedades geométricas forem estimadas com uma técnica de medição espacialmente resolvida, como a μ -CT, por exemplo. Tal incerteza pode comprometer a previsão fornecida pela simulação de um biorreator real, uma vez que na literatura a porosidade do leito é frequentemente considerada constante ao longo do cultivo (ver, por exemplo, Ashley, Mitchell e Howes, 1999; Casciatori et al., 2016; Weber; Tramper e Rinzema, 1999).

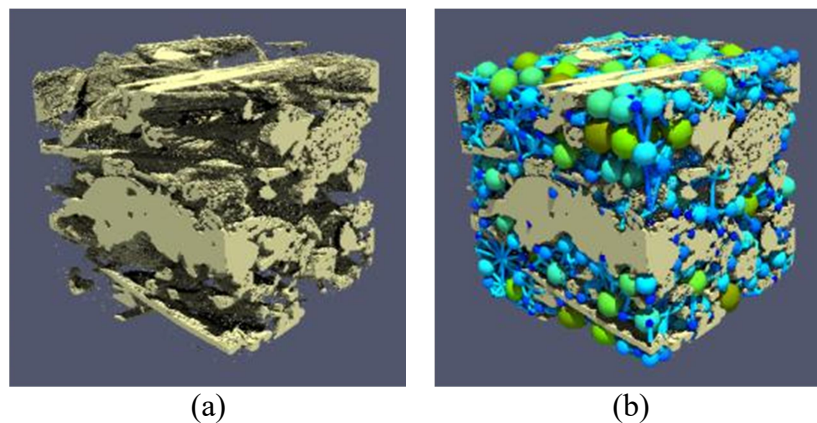
Os fungos filamentosos adaptam-se aos meios de cultivo e apresentam morfologias diferentes ao longo do seu crescimento. Du e Perré (2020) desenvolveram um modelo 3D para CES, descrevendo as principais fases do desenvolvimento das hifas (alongamento, ramificação, anastomose e tropismo), a fim de simular a rede micelial 3D de forma mais realista do que a modelagem 2D, uma vez que a análise 3D pode considerar não homogeneidades ambientais que o 2D não poderia. Os autores apontaram que poucos modelos 2D foram convenientemente validados e nenhum conseguiu gerar a morfologia micelial e o crescimento fúngico simultaneamente, o que foi alcançado com a abordagem 3D.

7.3.3 Análise estrutural por tomografia micro computadorizada (μ -CT) sem cultivo

A Figura 7.6 apresenta a estrutura tridimensional do BC e de uma mistura BC:FT 7:3 obtida por μ -CT. A porosidade total, que engloba a porosidade interpartícula e os vazios intrapartículas maiores que aproximadamente 100 μ m, devido à resolução nominal, foi de 0,8 para BC e 0,75 para a mistura BC:FT. Se apenas a porosidade interpartícula for considerada, a porosidade para a mistura BC:FT foi de 0,68. Embora o tamanho da amostra de (5,55 mm³) seja bem menor do que o empregado nas análises fotográficas nos moldes de PVC (6.930 mm³), o valor é muito próximo ao obtido pela análise de imagens e ao determinado por Casciatori et al (2014) pela técnica gravimétrica. A maioria das fibras está alinhada horizontalmente, provavelmente uma consequência da técnica de empacotamento. Esta é uma característica importante, uma vez que os parâmetros locais de transferência de calor e massa da partícula para fluido aplicados a modelos a duas fases são geralmente calculados assumindo as fibras como cilindros infinitos e a posição relativa do sólido em relação ao fluxo de fluido é, portanto, necessária para a estimativa. Casciatori et al. (2016) supõe que 70% dos

cilindros estão voltados para o ar ascendente em fluxo cruzado e 30% em fluxo paralelo. Portanto, em trabalhos futuros essa proporção terá que ser determinada por estudos mais intensos usando imagens μ -CT e técnicas de processamento digital de imagens.

Figura 7.6 – Imagens 3D obtidas por μ -CT de amostras de (a) mistura BC:FT 7:3 e (b) BC:FT 7:3 analisadas com *OpenPNM* e *PoreSpy*. Os cubos representados têm um comprimento de borda de 300 voxels.



Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, nenhum trabalho foi publicado sobre a estrutura 3D de leitos compostos por bagaço de cana-de-açúcar utilizando μ -CT. Alguns estudos têm sido publicados sobre a estrutura interna das fibras do bagaço da cana-de-açúcar, com e sem pré-tratamentos para desestruturar as fibras a fim de tornar a fração de celulose facilmente disponível para hidrólise enzimática ou química, apresentando uma estrutura intrapartícula complexa de até 78% de porosidade (ISAAC et al., 2013; YANCY-CABALLERO et al., 2019). Em comparação com a análise das propriedades intrapartículas, as varreduras de leitos compactados requerem uma resolução mais baixa e são, portanto, capazes de representar amostras maiores com tempo de medição viável. Assim, uma investigação da orientação da fibra e distribuição do tamanho dos poros é possível no futuro. Um exemplo da análise do espaço poroso do bagaço de cana-de-açúcar usando *OpenPNM* e *PoreSpy* é mostrado na Figura 7.6b. A informação apropriada pelo algoritmo de bacia hidrográfica baseado em marcadores é utilizada para caracterizar a rede de poros, uma descrição completa é fornecida por Gostick (2017).

7.4 Conclusão

Este trabalho avaliou a estrutura de leitos compactados compostos por fibras de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e por misturas de BC e farelo de trigo (FT) na proporção 7:3. As propriedades estruturais foram determinadas com e sem cultivo pelo fungo *M. thermophila* I-1D3b por cultivo em estado sólido.

A porosidade e a distribuição do tamanho dos poros foram avaliadas usando um método fotográfico 2D assistido por computador onde foi possível identificar a segregação FT devido à técnica de empacotamento empregada para empacotar uma mistura BC:FT em um tubo PVC. A técnica 2D não foi capaz de avaliar variações da porosidade em função do teor de umidade inicial das amostras de BC e BC:FT. Para os experimentos com cultivo em mistura BC:FT, a técnica 2D foi capaz de identificar a variação axial da porosidade de um leito aerado com 48 h de cultivo, mostrando que o impedimento estérico dificulta o crescimento do fungo na parte média do leito. A porosidade inicial foi reduzida em mais de 50% do seu valor inicial devido ao crescimento microbiano. A distribuição do tamanho dos poros era muito ampla e a grande maioria dos poros era muito estreita para o desenvolvimento adequado do fungo, enquanto poucos poros eram grandes o suficiente para permitir que as hifas aéreas se desenvolvessem convenientemente. A estrutura de leitos não cultivados de BC:FT também foi observada por 3D μ -CT e uma complexa rede de poros pôde ser vista. A porosidade média determinada pelo μ -CT foi similar à obtida pela técnica fotográfica 2D.

Os resultados serão úteis para o desenvolvimento de modelos mais realistas de transferência de calor e massa em leitos empacotados aerados para CES, uma vez que atualmente a porosidade do leito dos modelos propostos é frequentemente assumida como constante e poucas informações estão disponíveis sobre o tamanho e distribuição dos poros em um sistema tão complexo.

CAPÍTULO 8. CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho foram desenvolvidas técnicas experimentais inovadoras para a determinação das propriedades estruturais de meio de cultivo em estado sólido. Propriedades como distribuição do tamanho de poros, compressibilidade e resistência à tração foram obtidas para leitos de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e para misturas de bagaço e farelo de trigo (BC:FT), misturas estas sem e com cultivo pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. Os resultados obtidos serão valiosos para que a operação de biorreatores de tambor rotativo possam ser feitas com maior eficiência e para que problemas de compactação em biorreatores colunas de leito empacotado possam ser evitados.

A técnica de processamento digital de imagens não constatou influência no crescimento do fungo no substrato sem e com coloração por Rodamina B, enquanto que as concentrações de CO₂ observadas indicam que o corante pode interferir na atividade metabólica do microrganismo.

Propriedades estruturais e reológicas foram determinadas experimentalmente para bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo (FT) e para misturas entre ambos, antes e ao longo do cultivo pelo fungo *M. thermophila* I-1D3b. Para a determinação dos parâmetros reológicos, foram desenvolvidos métodos de análise do perfil de textura (TPA) e de resistência à tração, inéditos para misturas BC e FT. Foram determinados os parâmetros dureza, coesividade e elasticidade, por meio de ensaios de TPA, e o parâmetro tensão de ruptura por meio de ensaios de tração. Para meios porosos não cultivados, BC e misturas BC:FT exigiram forças de compressão menores do que FT, devido à menor porosidade dos leitos de farelo. As amostras úmidas de BC apresentaram dureza menor do que as secas e, quando o BC foi umidificado com 15 dias de antecedência ao experimento de TPA, sua dureza foi maior do que quando este material foi umidificado imediatamente antes do experimento, devido à difusão de água no volume celular para a alternativa com antecedência. A dureza das misturas BC:FT sem cultivo mostrou-se similar à de BC, enquanto a dureza dessas misturas diminuiu com o aumento do tempo de cultivo devido à degradação dos substratos. A resistência à tração máxima do substrato cultivado e do micélio aéreo foram observadas às 24 horas de cultivo. A resistência máxima à tração foi coincidente com a biomassa máxima no sistema, obtida indiretamente pela medição da concentração de CO₂.

A movimentação de partículas de misturas BC:FT foram avaliadas qualitativamente em tambores rotativos, com e sem cultivo microbiano. A análise de imagens não indicaram diferenças no padrão de movimentação das partículas em função da umidade para leitos de

BC. Com a introdução de 30% de farelo, a variação da umidade passou a ser uma variável significativa para a movimentação. O tamanho do tambor influenciou os padrões de movimentação da mistura BC:FT. Para o tambor de maior diâmetro (30 cm) o material era elevado pelos defletores e se desprendiam ao atingirem o topo da circunferência, quando eram lançados contra a superfície do leito. Na ausência de FT, ao ser lançado na superfície do leito, o grande bloco se fragmentava em blocos menores, enquanto na presença de FT esses blocos maiores não desestruturaram, rolando sobre a camada passiva. Para o tambor de menor diâmetro (9,4 cm) a movimentação ocorre ao centro do tambor e as fibras formam três aglomerados de tamanhos e periodicidade irregulares. Esse mesmo padrão de movimentação foi observado no CES com até 9 horas de cultivo. Ao longo do tempo de cultivo, visualmente o fungo *M. thermophila* I-1D3b ocupa os espaços vazios do leito sem causar alteração do volume total, e devido à resistência do micélio, o material se fixa na parede, não se observando nenhuma movimentação a partir de 12 horas de cultivo.

Quanto às propriedades estruturais das misturas BC:FT, analisadas por processamento digital de imagens, não se observou diferença da porosidade e do tamanho do poro, quanto à variação de umidade e substrato. Ao avaliar o crescimento do fungo no substrato, a porosidade diminuiu em aproximadamente 50% do valor inicial.

CAPÍTULO 9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a mistura e movimentação no tambor rotativo utilizando outras proporções de substrato.
- Realizar ensaios para acompanhar o crescimento do micélio, modificação da porosidade e tamanho dos poros ao longo do cultivo.
- Realizar ensaios de tomografia micro computadorizada utilizando outras proporções de substrato e com cultivo de *M. thermophila* I-1D3b.

REFERÊNCIAS

- AITA, B. C.; SPANNEMBERG, S. S.; SCHMALTZ, S.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V.; KUHN, R. C.; MAZUTTI, M. A. Production of cell-wall degrading enzymes by solid-state fermentation using agroindustrial residues as substrates. **Journal Environmental Chemical Engineering**, Amsterdam, v. 7, p. 103193, 2019.
- ALAM, M. Z.; MAMUN, A. A.; QUDSIEHA, I. Y.; MUYIBI, S. A.; SALLEHA, H. M.; OMARA, N. M. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 46, p. 61-64, 2009.
- ARAMOUNIA, F. M.; ABU-GHOUSH, M. H. Physicochemical and sensory characteristics of no-bake wheat-soy snack bars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, n.1, p. 44-51, 2011.
- ARORA, S.; DUBEY, M.; SINGH, P.; RANI, R.; GHOSH, S. Effect of mixing events on the production of a thermo-tolerant and acidstable phytase in a novel solid-state fermentation bioreactor. **Process Biochemistry**, Barking, v. 61, p. 12-23, 2017.
- ARORA, S.; RANI, R.; GHOSH, S. Bioreactors in solid state fermentation technology: Design, applications and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 269, p. 16-34, 2018.
- 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**, Amsterdam, v. 3, p. 141-150, 1999.
- BARGMANN, S.; KLUSEMANN, B.; MARKMANN, J.; SCHNABEL, J. E.; SCHNEIDER, K.; SOYARSLAN, C.; WILMERS, J. Generation of 3D representative volume elements for heterogeneous materials: a review. **Progress in Materials Science**, Oxford, v. 96, p. 322-384, 2018.
- BASTOS, R. G.; MOTTA, F. L.; SANTANA, M. H. A. Oxygen transfer in solid-state cultivation under controlled moisture conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 174, p. 708-718, 2014.
- BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, Barking, v. 38, p. 881-896, 2003.
- BENEDITO, W. M.; DUARTE, C. R.; BARROZO, M. A. S.; SANTOS, D. A. An investigation of CFD simulations capability in treating non-spherical particle dynamics in a rotary drum. **Powder Technology**, Lausanne, v. 332, n. 1, p. 171-177, 2018.
- BOATENG, A. A. Rotary kilns: transport phenomena and transport processes. Burlington: Butterworth-Heinemann, 2008.
- BOURNE, M. **Food texture and viscosity**. 2nd ed. San Diego: Associated Press, 2002.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Cellulases and xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown on sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, p. 1889-1900, 2010.

CANEDO, M. S.; CUNHA, L. P.; HENRIQUE, J. P.; THOMÉO, J. C. Influência do uso de traçador colorido no cultivo em estado sólido. *In: As engenharias frente à sociedade, a economia e o meio ambiente*. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. v. 4.

CASCIATORI, F. P. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leito fixo**. 2015. 190 f. 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.; BÜCK, A.; THOMÉO, J. C.; TSOTSAS, E. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 287, p. 103-116, 2016.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; LOPES, K. C. M.; SOUZA, A. G.; THOMÉO, J. C. Stagnant effective thermal conductivity of agro-industrial residues for solid-state fermentation. **International Journal of Food Properties**, New York, v. 16, p. 1578-1593, 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 by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 255, p. 214-224, 2014.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; ZANELATO, A. I.; THOMÉO, J. C. Hygroscopic properties of solid agro-industrial by-products used in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 64, p. 114-123, 2015.

CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Heat transfer in packed-beds of agricultural waste with low rates of air flow applicable to solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, London, v. 188, p. 97-111, 2018.

CASTRO, S. M.; CASTRO, A. M. Assessment of the Brazilian potential for the production of enzymes for biofuels from agroindustrial materials. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Berlin, v. 2, p. 87-107, 2012.

CHEN, H.; XIAO, Y. G.; LIU, Y. L.; SHI, Y. S. Effect of Young's modulus on DEM results regarding transverse mixing of particles within a rotating drum. **Powder Technology**, Lausanne, v. 318, p. 507-517, 2017.

CHEN, H.-Z.; HE, Q. Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 87, p. 1619-1625, 2012.

CHEN, L.; OPARA, U. L. Approaches to analysis and modeling texture in fresh and processed foods – A review. **Journal of Food Engineering**, London, v. 119, p. 497-507, 2013.

COURI, S.; MERCÊS, E. P.; NEVES, B. C.; SENNA, L. F. Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 224, p. 290-297, 2006.

CUNHA, L. P.; CASCIATORI, F. P.; VICENTE, I. V.; GARCIA, R. L.; THOMÉO, J. C. *Metarhizium anisopliae* conidia production in packed-bed bioreactor using rice as substrate in successive cultivations. **Process Biochemistry**, Barking, v. 97, p. 104-111, 2020.

DADKHAH, M.; PEGLOW, M.; TSOTSAS, E. Characterization of the internal morphology of agglomerates produced in a spray fluidized bed by X-ray tomography. **Powder Technology**, Lausanne, v. 228, p. 349-358, 2012.

DIAMANTE, L.; UMEMOTO, M. Rheological properties of fruits and vegetables: a review. **International Journal of Food Properties**, New York, v. 18, p. 1191-1210, 2015.

DÍAZ, A. B.; ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 17, p. 1041-1046, 2009.

DING, Y. L.; FORSTER, R.; SEVILLE, J. P. K.; PARKER, D. J. Segregation of granular flow in the transverse plane of a rolling mode rotating drum. **International Journal of Multiphase Flow**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 635-663, 2002.

DORTA, B.; ARCAS, J. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 23, p. 501-505, 1998.

DU, H.; PERRÉ, P. A novel lattice-based model for investigating three-dimensional fungal growth on solid media. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**, Amsterdam, v. 541, n. 1, p. 123536, 2020.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 113-125, 2003.

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

FOONG, C. W.; JANAUN, J.; KRISHNAIAH, K.; PRABHAKAR, A. Effect of superficial air velocity on solid state fermentation of palm kernel cake in a lab scale fermenter using locally isolated fungal strain. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 114-118, 2009.

FRASSATTO, P. A. C.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; SILVA, R. β -Glucosidase production by *Trichoderma reesei* and *Thermoascus aurantiacus* by solid state cultivation and application of enzymatic cocktail for saccharification of sugarcane bagasse. **Biomass Conversion and Biorefinery**, Berlin, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00608-1>.

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

GIESCHE, H. Mercury porosimetry: a general (practical) overview. **Particle & Particle Systems Characterization**, Weinheim, v. 23, n. 1, p. 9-19, 2006.

GIUSEPPE, E.; CASTELLANI, R.; DOBOSZ, S.; MALVESTIO, J.; BERZIN, F.; BEAUGRAND, J.; DELISÉE, C.; VERGNES, B.; BUDTOVA, T. Reliability evaluation of automated analysis, 2D scanner, and micro-tomography methods for measuring fiber dimensions in polymer-lignocellulosic fiber composites. **Composites: Part A**, Oxford, v. 90, p. 320-329, 2016.

GOMES, A. C. S. **Cinética de crescimento do fungo termófilo *Myceliophthora thermophila* M. 7.7 em cultivo no estado sólido**. 2015. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2015.

GOMES, A. C. S.; CASCIATORI, F. P.; GOMES, E.; NUNES, C. C. C.; MORETTI, M. M. S.; THOMÉO, J. C. Growth kinetics of *Myceliophthora thermophila* M.7·7 in solid-state cultivation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14774>.

GONZÁLEZ, J. D. T.; MORELOS, K. J. G.; CORREA, D. A. Análisis del perfil de textura en frutas, productos cárnicos y quesos. **Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos**, Colômbia, v. 14, n. 2, p. 63-75, 2015.

GOSTICK, J. Versatile and efficient pore network extraction method sing markerbased watershed segmentation. **Physical Review E**, Ridge, v. 96, n. 2, p. 023307, 2017.

GRAJALES, L. M. **Desenvolvimento de um biorreator rotativo para produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido**. 2014. 148 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2014.

GRAJALES, L. M.; XAVIER, N. M.; HENRIQUE, J. P.; THOMÉO, J. C. Mixing and motion of rice particles in a rotating drum. **Powder Technology**, Lausanne, v. 222, p. 167-175, 2012.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, Barking, v. 50, p. 1327-1341, 2015.

HUANG, A-N.; KUO, H-P. CFD simulation of particle segregation in a rotating drum. Part II: Effects of specularidade coeficiente. **Advanced Powder Technology**, Utrecht, v. 29, p. 3368-3374, 2018.

HUIDOBRO, F. R.; MIGUEL, E.; BLAZQUEZ, B.; ONEGA, E. A comparison between two methods (Warner–Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. **Meat Science**, Oxford, v. 69, p. 527-536, 2005.

IRIE, M. S.; RABELO, G. D.; SPIN-NETO, R.; DECHICHI, P.; BORGES, J. S.; SOARES, P. B. F. Use of micro-computed tomography for bone evaluation in dentistry. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 3, p. 227-238, 2018.

ISAAC, A.; SKET, F.; DRIEMEIER, C.; ROCHA, G. J. M. 3D imaging of sugarcane bagasse using X-ray microtomography. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 49, p. 790-793, 2013.

KACZMAREK, M.; GOUEYGOU, M. Dependence of elastic properties of materials on their porosity: review of models. **Journal of Porous Media**, Monticello, v. 9, n. 4, p. 335-355, 2006.

KALOGERIS, E.; INIOTAKI, F.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, Barking, v. 86, n. 3, p. 207-213, 2003.

KARALI, M. A.; HERZ, F.; SPECHT, E.; MALLMANN, J. Comparison of image analysis methods to determine the optimum loading of flighted rotary drums. **Powder Technology**, Lausanne, v. 291, p. 147-153, 2016.

KARIMI, A.; SHOJAOSADATI, S. A.; HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; HASHEMI, M. Porosity changes during packed bed solid-state fermentation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Amsterdam, v. 20, p. 4022-4027, 2014.

KATILEVICIUTE, A.; PLAKYS, G.; BUDREVICIUTE, A.; ONDER, K.; DAMIATI, S.; KODZIUS, R. A sight to wheat bran: high value-added products. **Biomolecules**, Basel, v. 9, n. 12, p. 887, 2019.

KHANAHMADI, M.; MITCHELL, D. A.; BEHESHTI, M.; ROOSTAAZAD, R.; SÁNCHEZ, L. R. Continuous solid-state fermentation as affected by substrate flowpattern. **Chemical Engineering Science**, London, v. 61, p. 2675-2687, 2006.

KLINGENBERG, D. J.; ROOT, T. W.; BURLAWAR, S.; SCOTT, C. T.; BOURNE, K. J.; GLEISNER, R.; HOUTMAN, C.; SUBRAMANIAM, V. Rheometry of coarse biomass at high temperature and pressure. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 99, p. 69-78, 2017.

LANDIS, E. N.; KEANE, D. T. X-ray microtomography. **Materials Characterization**, New York, v. 61, p. 1305-1316, 2010.

LEÃO, M. I.; KREBS, A. S. J. Uso de traçador para estudo de interação entre águas subterrâneas e superficiais na região carbonífera de Santa Catarina, Brasil. **Águas Subterrâneas**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 130-142, 2017.

LÓPEZ-GÓMEZ, J. P.; PÉREZ-RIVERO, C.; WEBB, C. Investigating a non-destructive alternative for a preliminary evaluation of fungal growth in solid state fermentations. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 160, p. 60-67, 2019.

LUZURIAGA, D.; BALABAN, M. O.; YERALAN, S. Analysis of visual quality attributes of white shrimp by machine vision. **Journal of Food Science**, Malden, v. 62, p. 1-7, 1997.

MADEJ, L.; LEGWAND, A.; MOJZESZKO, M.; CHRAPONSKI, J.; ROSKOSZ, S.; CWAJNA, J. Experimental and numerical two- and three-dimensional investigation of porosity morphology of the sintered metallic material. **Archives of Civil and Mechanical Engineering**, Wroclaw, v. 18, n. 4, p. 1520-1534, 2018.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Insights into physical characterization of solid state fermentation: from preliminary knowledge to practical application. **Journal of Biotech Research**, Edmond, v. 10, p. 271-282, 2019.

MASSE, J.-P.; POQUILLON, D. Mechanical behavior of entangled materials with or without cross-linked fibers. **Scripta Materialia**, Tarrytown, v. 68, p. 39-43, 2013.

MEFTAH, R.; BERGER, S.; JACQUS, G.; LALUET, J.-Y.; CNUDE, V. Multiscale characterization of glass wools using X-ray micro-CT. **Materials Characterization**, New York, v. 156, 109852, 2019.

MELLMANN, J. The transverse motion of solids in rotating cylinders - forms of motion and transition behavior. **Powder Technology**, Lausanne, v. 118, p. 251-270, 2001.

MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 2, p. 1581-1586, 2011.

MENDES, F. B.; ATALA, D. I. P.; THOMÉO, J. C. Is cellulase production by solid-state fermentation economically attractive for the second generation ethanol production? **Renewable Energy**, Oxford, v. 114, p. 525-533, 2017.

MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological features of solid state fermentation and its applications - an overview. **Research in Biotechnology**, Vellore, v. 2, n. 6, p. 21-26, 2011.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals, design and operation**, Berlin: Springer-Verlag, 2006.

MITCHELL, D. A.; MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 137-147, 2003.

MORENO-ATANASIO, R.; WILLIAMS, R. A.; JIA, X. Combining X-ray microtomography with computer simulation for analysis of granular and porous materials. **Particuology**, New York, v. 8, n. 2, p. 81-99, 2010.

NAYAK, B.; PANDA, B. P. Modelling and optimization of texture profile of fermented soybean using response surface methodology. **AIMS Agriculture and Food**, Springfield, v. 1, n. 4, p. 409-418, 2016.

OSADOLOR, O. A.; JABBARI, M.; NAIR, R. B.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Effect of media rheology and bioreactor hydrodynamics on filamentous fungi fermentation of lignocellulosic and starch-based substrates under pseudoplastic flow conditions. **Bioresource Technology**, Barking, v. 263, p. 250-257, 2018.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Barking, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARKINSON, D. Y.; MCDERMOTT, G.; ETKIN, L. D.; GROS, M. A. L.; LARABELL, C. A. Quantitative 3-D imaging of eukaryotic cells using soft X-ray tomography. **Journal of Structural Biology**, San Diego, v. 162, p. 380-386, 2008.

PEREZ, C. L. **Avaliação da viabilidade técnica da ampliação de escala da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por FES em biorreatores de leito**. 2017. 98 f. Dissertação (Mestrado 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, 2017.

PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Strategies for scaling-up packed-bed bioreactors for solid-state fermentation: the case of cellulolytic enzymes production by a thermophilic fungus. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 361, p. 1142-1151, 2019.

PIGNERET, M.; MERMILLOD-BLONDIN, F.; VOLATIER, L.; ROMESTAING, C.; MAIRE, E.; ADRIEN, J.; GUILLARD, L.; ROUSSEL, D.; HERVANT, F. Urban pollution of sediments: Impact on the physiology and burrowing activity of tubificid worms and consequences on biogeochemical processes. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 568, p. 196-207, 2016.

POLACHINI, T. C.; SATO, A. C. K.; CUNHA, R. L.; TELIS-ROMERO, J. Density and rheology of acid suspensions of peanut waste in different conditions: An engineering basis for bioethanol production. **Powder Technology**, Lausanne, v. 294, p. 168-176, 2016.

QIANG, Z. D.; WANG, B. D.; LI, R.; CHEN, Q.; ZHENG, G.; ZIVKOVIC, V.; YANG, H. The surface structure and the active layer depth of the irregular sand particles in a continuously avalanching flow. **Powder Technology**, Lausanne, v. 360, n. 15, p. 1037-1046, 2020.

RAO, V. N. M.; QUINTERO, X. Rheological Properties of Solid Foods. In: RAO, M. A., RIZVI, S. S. H., DATTA, A. K.; AHMED, J. **Engineering Properties of Food**. New York: CRC Press, 2014. p. 179-222.

RICHARDSON, S. D.; WILSON, C. S.; RUSCH, K. A. Use of rhodamine water tracer in the marshland upwelling system. **Ground Water**, Malden, v. 42, n. 5, p. 678-688, 2004.

RIVERA, E. C.; RABELO, S. C.; GARCIA, D. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 85, p. 983-992, 2010.

RODRIGUES, A. C. **Tratamento de efluente do tingimento de ágatas por processo oxidativo avançado – técnica Fenton para degradação de Rodamina B**. 2015. 43 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; RODRIGUEZ, D. E. Kinetics in Solid-state Fermentation. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. New York: Springer Science, 2008. cap. 4, p. 48-73.

RUTSATZ, M. D. **Cultivo em estado sólido**: modelagem e quantificação de biomassa em biorreator cilíndrico horizontal agitado. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SALA, A.; ARTOLA, A.; SANCHEZ, A.; BARRENA, R. Rice husk as a source for fungal biopesticide production by solid-state fermentation using *B. bassiana* and *T. harzianum*. **Bioresource Technology**, Barking, v. 296, p. 122322, 2020.

SANTOS, D. A.; BARROZO, M. A. S.; DUARTE, C. R.; WEIGLER, F.; MELLMANN, J. Investigation of particle dynamics in a rotary drum by means of experiments and numerical simulations using DEM. **Advanced Powder Technology**, Utrecht, v. 27, n. 2, p. 692-703, 2016.

SCHOBBER, T. J.; MESSERSCHMIDT, M.; BEAN, S. R.; PARK, S-H.; ARENDT, E. K. Gluten-free bread from sorghum: quality differences among hybrids. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 82, n. 4, p. 394-404, 2005.

SCHOEMAN, L.; WILLIAMS, P.; PLESSIS, A.; MANLEY, M. X-ray micro-computed tomography (μ -CT) for non-destructive characterisation of food microstructure. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 47, p. 10-24, 2016.

SCHUTYSER, M. A. I.; PAGTER, P.; WEBER, F. J.; BRIELS, W. J.; BOOM, R. M.; RINZEMA, A. Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*: experiments and modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 83, n. 5, 2003.

SHAH, A. R.; SHAH, R. K.; MANDAWAR, D. Improvement of the quality of whole wheat bread by supplementation of xylanase from *Aspergillus foetidus*. **Bioresource Technology**, Barking, v. 97, n. 16, p. 2047-2053, 2006.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINKA, I. C.; BURCH, S. F.; TWEED, J. H.; CUNNINGHAM, J. C. Measurement of density variations in tablets using X-ray computed tomography. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 271, p. 215-224, 2004.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 52-71, 2017.

STICKEL, J. J.; KNUTSEN, J. S.; LIBERATORE, M. W.; LUU, W.; BOUSFIELD, D. W.; KLINGENBERG, D. J.; SCOTT, C. T.; ROOT, T. W.; EHRHARDT, M. R.; MONZ, T. O. Rheology measurements of a biomass slurry: an inter-laboratory study. **Rheologica Acta**, Heidelberg, v. 48, p. 1005-1015, 2009.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Quality and Preference**, Harlow, v. 13, n. 4, p. 215-225, 2002.

TADA, E. F. R. **Modelagem e simulação de transferência de calor em leito de partículas estacionárias sujeitas a agitação intermitente**. 2016. 115f. Dissertação (Mestrado 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, 2016.

TADA, E. F. R.; AGUDELO, L. M. G.; THOMÉO, J. C. Water holding capacity and heat transfer aspects of a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in a partially filled rotating drum. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 1131-1141, 2019.

TADA, E. F. R.; BÜCK, A. CASCIATORI, F. P.; TSOTSAS, E.; THOMÉO, J. C. Investigation of heat transfer in partially filled horizontal drums. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 316, p. 988-1003, 2017a.

TADA, E. F. R.; BÜCK, A.; TSOTSAS, E.; THOMÉO, J. C. Mass transport in a partially filled horizontal drum: modelling and experiments. **Chemical Engineering Science**, London, v. 214, 115448, 2020.

TADA, E. F. R.; GRAJALES, L. M.; LEMOS, Y. P.; THOMÉO, J. C. Mixture and motion of sugar cane bagasse in a rotating drum. **Powder Technology**, Lausanne, v. 317, p. 301-309, 2017b.

TAI, A.; BIANCHINI, R.; JACHOWICZ, J. Texture analysis of cosmetic/pharmaceutical raw materials and formulations. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 291-304, 2014.

TELIS, V. R. N.; TELIS-ROMERO, J.; GABAS, A. L. Solids rheology for dehydrated food and biological materials. **Drying Technology**, Philadelphia, v. 23, n. 4, p. 759-780, 2005.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 81, p. 146-161, 2013.

TU, J.; ZHAO, J.; LIU, G.; TANG, C.; HAN, Y.; CAO, X.; JIA, J.; JI, G.; XIAO, H. Solid state fermentation by *Fomitopsis pinicola* improves physicochemical and functional properties of wheat bran and the bran-containing products. **Food Chemistry**, Barking, v. 328, 127046, 2020.

van BREUKELLEN, F. R.; HAEMERS, S.; WIJFFELS, R. H.; RINZEMA, A. Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, Barking, v. 46, p. 751-757, 2011.

VELMURUGAN, P.; HUR, H.; BALACHANDAR, V.; KAMALA-KANNAN, S.; LEE, K.-J.; LEE, S.-M.; CHAE, J.-C.; OH, B.-T. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 112, n. 6, p. 590-594, 2011.

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C. S.; ESPOSITO, E.; NINOW, J. L. Protein enrichment of apple pomace and use in feed for Nile tilapia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 152, p. 74-87, 2009.

VERMA, V.; PADDING, J. T.; DEEN, N. G.; KUIPERS, J. A. M.; BARTHEL, F.; BIEBERLE, M.; WAGNER, M.; HAMPE, U. Bubble dynamics in a 3-D gas–solid fluidized bed using ultrafast electron beam x-ray tomography and two-fluid model. **AIChE Journal**, New York, v. 60, 1632-1644, 2014.

WANG, E-Q.; LI, S-Z.; TAO, L.; GENG, X.; LI, T-C. Modeling of rotating drum bioreactor for anaerobic solid-state fermentation. **Applied Energy**, Barking, v. 87, p. 2839-2845, 2010.

WANG, L.; LIU, Y.; CHEN, H.-Z. Chapter 2 - Advances in porous characteristics of the solid matrix in solid-state fermentation. *In*: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R. (ed.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Amsterdam: Elsevier, 2018.

WANG, L.; YANG, S-T. Solid state fermentation and its applications. *In*: YANG, S-T. **Bioprocessing for value-added products from renewable resources**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 465-489.

WEBER, F. J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 65, p. 447-458, 1999.

YANCY-CABALLERO, D.; ING, L. Y.; FUJITA, A.; FERREIRA, J. E.; DRIEMEIER, C. Intraparticle connectivity in sugarcane bagasse unveiled by pore network modeling. **BioEnergy Research**, New York, v. 12, p. 546-557, 2019.

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

ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, H. Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, London, v. 165, p. 65-73, 2017.