

ALEX IZUKA ZANELATO

PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO EM BIOREATOR DE LEITO FIXO

São José do Rio Preto  
2011

ALEX IZUKA ZANELATO

PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO EM BIOREATOR DE LEITO FIXO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos. Área de concentração: Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. João Claudio Thoméo

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleni Gomes

São José do Rio Preto  
2011

Zanelato, Alex Izuka.

Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo / Alex Izuka Zanelato. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

116 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: João Claudio Thoméo

Co-orientador: Eleni Gomes

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Biorreatores. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Enzimas celulolíticas. I. Thoméo, João Claudio. II. Gomes, Eleni. III. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 663.15

Alex Izuka Zanelato

PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM  
ESTADO SÓLIDO EM BIOREATOR DE LEITO FIXO

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

Banca Examinadora

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

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

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre  
UNICAMP – Campinas

São José do Rio Preto  
23/Fevereiro/2011

À minha família e à Adriana,  
pelo apoio e dedicação  
em todos os momentos,  
dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por iluminar meus pensamentos e me conduzir ao bom caminho.

Ao Prof. Dr. João Claudio, pela atenção e orientação, durante todo esse tempo e pelos ensinamentos valiosos que contribuíram para a minha formação acadêmica.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Eleni Gomes, pela co-orientação, pela atenção e orientação.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pela atenção e esclarecimento de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi, pela atenção e por ceder o seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

Aos Técnicos Newton, Luiz, Jesuíno, Ginaldo e Alana, pela amizade e o apoio técnico no Laboratório.

À Dr<sup>a</sup> Lara Durães Sette, pela disposição na identificação do microrganismo utilizado na primeira etapa do trabalho.

Aos colegas de Laboratório Viviane, Marcelo, Cesar, Lina, Fernanda, Márcio, Yara e Tereza, pela ajuda e principalmente pela amizade.

Aos colegas de pós-graduação Paulo e Kelly pelos momentos de descontração durante o curso.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Aplicada: Dani, Márcia, Andréia, Natalia, Ana Lúcia, Fabiana pela ajuda e amizade.

A todos do Departamento de Engenharia de Alimentos, pela amizade, disponibilidade e atenção concedidas durante esse tempo.

Aos meus pais, Eliana e Alceu, que sempre me deram forças para enfrentar os obstáculos.

Aos meus irmãos Augusto e Aurélio, pelo companheirismo.

À Adriana, pelo carinho, atenção e cumplicidade de todos esses anos.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

Obrigado!

Para se chegar ao fim das coisas, o primeiro passo é julgá-las possíveis”.

(Luiz XIV)

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo produzir enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido (FES), em um bioreator de leito fixo, empregando-se o fungo termofílico *Myceliophthora sp.* e utilizando-se como substratos bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. Os testes foram realizados inicialmente em sacos de polipropileno apresentando uma boa produção de CMCase (550U/g) no período de 96 horas de fermentação. As variáveis controladas foram a temperatura de fermentação (40, 45 e 50°C), umidade inicial (75, 80 e 85% b.u.) e proporção do substrato de bagaço de cana e farelo de trigo (1:1, 3:7 e 1:9 peso). Os estimadores estatísticos não indicaram diferença significativa da produção de celulase com as variações da proporção de bagaço de cana e de farelo de trigo, com a temperatura e com a umidade inicial do substrato, contudo, os melhores resultados foram obtidos para a proporção de 70% de bagaço de cana e 30% de farelo de trigo, temperatura de 50°C e umidade inicial do substrato de 80%. Nos testes em escala de bioreator, foi empregado um leito fixo de 7cm de diâmetro e 50cm de comprimento, encamisado, operado nas condições experimentais de melhor resultados obtidos na escala de sacos, sendo a temperatura da camisa e vazão de ar as variáveis de interesse. O fungo apresentou um bom desenvolvimento no reator, tendo uma produtividade enzimática semelhante à encontrada em escala de saco. Foi observado um gradiente de umidade no interior do leito, sendo este crescente do fundo para o topo do bioreator, comportamento inverso ao da atividade enzimática. As vazões variaram entre 80 e 120 L/h e não afetaram estatisticamente a fermentação, possuindo pouca influência sobre as distribuições longitudinais de umidade e de atividade enzimática. Já os ensaios para as temperaturas de 45 e 50°C mostraram-se distintos, sendo a maior produção de enzimas após 96h de processo obtida a 50°C. Após 144h de fermentação, os resultados para 45°C foram iguais aos de 50°C obtidos em 96h. Foram observados picos de temperatura, sendo o maior pico notado após 18h de fermentação, cuja intensidade foi decrescente com o aumento da vazão do ar. O maior pico teve intensidade de 6°C acima da temperatura da camisa de refrigeração e do ar (45°C) e a 80L/h de vazão.

**Palavras chaves:** CMCase, *Myceliophthora*, Fermentação em estado sólido, Bagaço de cana, Leito fixo.

## ABSTRACT

This work aimed to produce cellulolytic enzymes through solid state fermentation in a fixed bed bioreactor, using the fungus *Myceliophthora* sp. and wheat bran and sugar cane bagasse as substrate. Initial tests were performed in polypropylene plastic bags, and satisfactory production of CMCase (550U/g.d.s.) was observed at 96h of fermentation. The controlled variables were the temperature (40, 45, and 50°C), the initial moisture content (75, 80, and 85%, w.b.), and wheat bran to sugar cane bagasse proportion (1:1, 3:7, and 1:9, weight). The experimental results did not differ statistically for any experimental condition adopted, even though the best results were obtained using the proportion 3:7 wheat bran/sugar cane bagasse 3:7, 50°C temperature, and 80% initial moisture content. A jacketed fixed bed bioreactor 7.62cm ID and 50cm long was used for scaling-up, and temperature, solid initial moisture content, and air flow rate were used as variables. The fungus adapted well to the bioreactor and to the experimental conditions, and the production of enzymes was similar to the tests performed in the plastic bags. It was observed a longitudinal gradient of moisture, increasing from the bottom to the top of the reactor, opposite effect observed for the enzyme production. The air flow rate was varied from 80 to 120L/h and did not affect neither the moisture nor the enzyme distributions. However, the experiments carried out at 45 and 50°C were statistically distinct, and the enzyme production at 50°C at 96h was larger than at 45°C. At 144h of fermentation, the results at 45°C were similar to those observed at 50°C and 96h. It was observed temperature peaks, the higher one at 18h of fermentation, which was 6°C above the temperature fixed through the jacket and the air at the entrance, for 45°C temperature and 80L/h air flow rate.

**Keywords:** CMCase, *Myceliophthora*, Solid state fermentation, Sugar cane bagasse, Fixed bed.

## SUMÁRIO

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1- INTRODUÇÃO                                                                   | 14 |
| 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                                                        | 18 |
| 2.1. Produção de etanol                                                         | 18 |
| 2.2. Enzimas Celulolíticas                                                      | 22 |
| 2.3. Material Lignocelulósico                                                   | 24 |
| 2.4. Fermentação em estado sólido                                               | 29 |
| 2.5. Biorreatores para FES                                                      | 33 |
| 2.6. Etapa para o aumento de escala                                             | 39 |
| 3- MATERIAIS E MÉTODOS                                                          | 44 |
| 3.1. Materiais                                                                  | 44 |
| 3.1.1. Fungos utilizados no cultivo                                             | 44 |
| 3.1.2. Ensaios de umidade do material sólido                                    | 44 |
| 3.1.3. Ensaios em escala de sacos de polipropileno                              | 46 |
| 3.1.4. Ensaios em fermentador de bancada                                        | 46 |
| 3.2. Método Experimental                                                        | 48 |
| 3.2.1. Método Experimental em sacos de polipropileno                            | 48 |
| 3.2.1.1. Ensaios de absorção de umidade                                         | 48 |
| 3.2.1.2. Análise da composição centesimal do bagaço de cana e farelo de trigo   | 49 |
| 3.2.1.2.1. Análise de cinzas matéria seca (MS)                                  | 49 |
| 3.2.1.2.2. Análise de proteína bruta (PB)                                       | 50 |
| 3.2.1.2.3. Análise de fibras em detergente neutro (FDN)                         | 50 |
| 3.2.1.2.4. Análise de fibras em detergente ácido (FDA)                          | 51 |
| 3.2.1.2.5. Análise de lignina                                                   | 51 |
| 3.2.1.3. Meio de cultivo                                                        | 52 |
| 3.2.1.4. Preparo dos substratos                                                 | 52 |
| 3.2.1.5. Preparo do pré-inóculo                                                 | 52 |
| 3.2.1.6. Ensaios fermentativos                                                  | 52 |
| 3.2.1.7. Efeito do solvente na extração das enzimas                             | 54 |
| 3.2.1.8. Estabilidade da enzima em função do período de armazenamnto do extrato | 54 |
| 3.2.1.9. Análise de repetibiliidade de produção enzimática                      | 54 |

|                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.1.10. Determinação da proporção ótima de bagaço de cana em diferentes temperaturas de fermentação                         | 55  |
| 3.2.1.11. Determinação da umidade inicial ótima de fermentação em diferentes temperaturas de fermentação                      | 55  |
| 3.2.1.12. Avaliação da atividade enzimática                                                                                   | 55  |
| 3.2.1.12.1. Avaliação da atividade de CMCase e Xilanase                                                                       | 55  |
| 3.2.1.12.2. Avaliação da atividade de FPase                                                                                   | 56  |
| 3.2.2. Método Experimental em escala de reator                                                                                | 57  |
| 3.3. Tratamento estatístico dos dados                                                                                         | 58  |
| 4- RESULTADOS                                                                                                                 | 59  |
| 4.1. Resultados obtidos em escala de frasco                                                                                   | 59  |
| 4.1.1. Seleção do microrganismo                                                                                               | 59  |
| 4.1.2. Identificação do fungo I-1D3                                                                                           | 63  |
| 4.1.3. Testes preliminares                                                                                                    | 66  |
| 4.1.3.1. Influência do substrato na produção de CMCase                                                                        | 66  |
| 4.1.3.2. Testes de absorção de umidade com material sólido                                                                    | 68  |
| 4.1.3.3. Testes de extração da enzima                                                                                         | 70  |
| 4.1.3.4. Estabilidade da enzima em função da temperatura e do tempo de armazenamento                                          | 71  |
| 4.1.3.5. Análise de repetibilidade                                                                                            | 72  |
| 4.1.4. Influência da composição do meio fermentativo, da temperatura e da proporção dos substratos sobre a produção de CMCase | 78  |
| 4.1.5. Influência da umidade inicial em diferentes temperaturas de fermentação                                                | 87  |
| 4.2. Experimentos em escala de bioreator de bancada                                                                           | 89  |
| 4.2.1. Testes preliminares                                                                                                    | 89  |
| 4.2.2. Influência da vazão do ar                                                                                              | 95  |
| 4.2.3. Análise térmica                                                                                                        | 100 |
| 5- CONCLUSÕES                                                                                                                 | 106 |
| 6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS                                                                                           | 107 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS                                                                                                    | 108 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 2.1.</b> Pedido de patentes no Brasil                                                                                                                                                 | 19 |
| <b>Figura 2.2.</b> Atuação do complexo celulolítico no material celulósico                                                                                                                      | 24 |
| <b>Figura 2.3.</b> Estrutura do material lignocelulósico                                                                                                                                        | 24 |
| <b>Figura 2.4.</b> Estrutura química da celulose                                                                                                                                                | 25 |
| <b>Figura 2.5.</b> a) Estrutura esquemática das duas regiões da celulose: região cristalina e região amorfa b) Disposição das hidroxilas na estrutura cristalina da celulose                    | 26 |
| <b>Figura 2.6.</b> Açúcares que compõem a hemicelulose                                                                                                                                          | 27 |
| <b>Figura 2.7.</b> Estrutura da lignina                                                                                                                                                         | 28 |
| <b>Figura 2.8.</b> Diagrama esquemático de reator em leito fixo                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Figura 2.9.</b> Crescimento do fungo sobre a superfície do material sólido                                                                                                                   | 35 |
| <b>Figura 2.10.</b> Mecanismo de remoção de calor em leito fixo                                                                                                                                 | 36 |
| <b>Figura 2.11.</b> Diagrama esquemático do bioreator tipo bandeja                                                                                                                              | 37 |
| <b>Figura 2.12.</b> Diagrama esquemático do bioreator de tambor rotativo                                                                                                                        | 38 |
| <b>Figura 2.13.</b> Diagrama esquemático do bioreator de leito fluidizado                                                                                                                       | 38 |
| <b>Figura 2.14.</b> Diagrama esquemático dos fenômenos macroscópicos e microscópicos em um bioreator                                                                                            | 40 |
| <b>Figura 2.15.</b> Perfil enzimático (pectinase) e de umidade do meio após a fermentação nas condições de temperatura do ar e da parede do reator em 50 °C e vazão de ar 120L/h                | 42 |
| <b>Figura 3.1.</b> Frasco com solução aquosa com material sólido em atmosfera controlada em câmara de DBO                                                                                       | 45 |
| <b>Figura 3.2.</b> Embalagem de polipropileno para FES                                                                                                                                          | 46 |
| <b>Figura 3.3.</b> Diagrama geral do equipamento para fermentação em estado sólido                                                                                                              | 47 |
| <b>Figura 3.4.</b> Fermentador em leito fixo para FES                                                                                                                                           | 48 |
| <b>Figura 3.5.</b> Separação do substrato em 10 porções no bioreator e utilização de bagaço de cana umedecido (BC) nos módulos inferior e superior                                              | 58 |
| <b>Figura 4.1.</b> Produção enzimática de xilanase e CMCase pelo fungo I-1D3                                                                                                                    | 63 |
| <b>Figura 4.2.</b> Aspecto do fungo <i>Myceliophthora sp.</i>                                                                                                                                   | 64 |
| <b>Figura 4.3.</b> Influência do farelo de trigo na produção de CMCase                                                                                                                          | 68 |
| <b>Figura 4.4.</b> Absorção de umidade do substrato de farelo de trigo e bagaço de cana                                                                                                         | 69 |
| <b>Figura 4.5.</b> Estabilidade dos extratos enzimáticos armazenados a 5°C em diferentes período, para diferentes volumes de extração com água                                                  | 71 |
| <b>Figura 4.6.</b> Cinética da produção de CMCase em ensaios de repetibilidade                                                                                                                  | 74 |
| <b>Figura 4.7.</b> Teste de hipótese para a igualdade de variâncias para a atividade enzimática                                                                                                 | 75 |
| <b>Figura 4.8.</b> Teste de normalidade dos resíduos dos testes de atividade enzimática                                                                                                         | 76 |
| <b>Figura 4.9.</b> Cinética de atividade enzimática em três diferentes proporções de bagaço de cana e temperaturas variadas                                                                     | 79 |
| <b>Figura 4.10.</b> Desenvolvimento do fungo <i>Myceliophthora sp</i> após 96 horas de fermentação, na temperatura de 50°C e 80% de umidade inicial, em diferentes proporções de bagaço de cana | 82 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 4.11.</b> Cinética de atividade enzimática em três diferentes temperatura e proporções de bagaço de cana variadas                                                                                                                                                                                                     | 84  |
| <b>Figura 4.12.</b> Fermentador em leito fixo para FES                                                                                                                                                                                                                                                                          | 91  |
| <b>Figura 4.13.</b> Aspecto do fungo ao fim do processo fermentativo em bioreator de leito fixo                                                                                                                                                                                                                                 | 91  |
| <b>Figura 4.14.</b> Separação do substrato em 10 porções de 15 gramas para o processo de fermentação em bioreator                                                                                                                                                                                                               | 92  |
| <b>Figura 4.15.</b> Atividade de CMCase em bioreator com vazão de ar de entrada de 80L/h, em temperatura de 45°C e 75% de umidade inicial após 144 horas de fermentação a) Influência da granulometria do bagaço de cana sobre a produção de CMCase; b) Com empacotamento por meio de pressão com um cilindro sobre o substrato | 93  |
| <b>Figura 4.16.</b> Distribuições longitudinais de umidade e de atividade enzimática em temperatura de 50°C em diferentes vazões de ar para 96h de fermentação                                                                                                                                                                  | 96  |
| <b>Figura 4.17.</b> Distribuição longitudinal de umidade e de atividade enzimática para fermentação a 50 °C, 75% de umidade a diferentes vazões de ar para 96h de fermentação                                                                                                                                                   | 97  |
| <b>Figura 4.18.</b> Distribuição longitudinal de umidade e de atividade enzimática para fermentação a 45°C, 75% de umidade inicial a diferentes vazões de ar para 96h de fermentação                                                                                                                                            | 98  |
| <b>Figura 4.19.</b> Atividade de celulase a diferentes vazões de ar, a temperatura de 45°C após 144h de fermentação                                                                                                                                                                                                             | 99  |
| <b>Figura 4.20.</b> Distribuição temporal de temperatura para temperatura da parede e de ar de entrada iguais a 50°C e diferentes vazões de ar                                                                                                                                                                                  | 102 |
| <b>Figura 4.21.</b> Distribuição temporal de temperatura para temperatura da parede e de ar de entrada iguais a 45°C, para vazão de ar 80 L/h                                                                                                                                                                                   | 102 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela 1.1.</b> Enzimas utilizadas em diversos seguimentos industriais e o faturamento anual global da indústria de enzimas                                      | 15  |
| <b>Tabela 2.1.</b> Aplicação de enzimas no processamento industrial                                                                                                 | 23  |
| <b>Tabela 2.2.</b> Comparação entre vários estudos com microrganismos produtores de celulase                                                                        | 33  |
| <b>Tabela 4.1.</b> Atividade enzimática de CMCase obtidos em embalagem de polipropileno na etapa de seleção do microrganismo                                        | 59  |
| <b>Tabela 4.2.</b> Atividade enzimática de Xilanase obtidos em embalagem de polipropileno na etapa de seleção do microrganismo                                      | 60  |
| <b>Tabela 4.3.</b> Máxima atividade enzimática de Xilanase e CMCase obtidos em embalagem de polipropileno na etapa de seleção do microrganismo                      | 60  |
| <b>Tabela 4.4.</b> Atividade de Xilanase por vários autores                                                                                                         | 62  |
| <b>Tabela 4.5.</b> Atividade de CMCase por vários autores                                                                                                           | 62  |
| <b>Tabela 4.6.</b> Produção de enzimas pelo fungo <i>Myceliophthora sp.</i> por outros autores                                                                      | 65  |
| <b>Tabela 4.7.</b> Análise decomposição centesimal do bagaço de cana e farelo de trigo                                                                              | 66  |
| <b>Tabela 4.8.</b> Extração de enzima CMCase com a utilização de diferentes solventes                                                                               | 70  |
| <b>Tabela 4.9.</b> Estatísticas descritivas da atividade enzimática em relação aos tratamentos                                                                      | 73  |
| <b>Tabela 4.10.</b> Intervalos de confiança para atividade enzimática em relação aos tratamentos avaliados                                                          | 77  |
| <b>Tabela 4.11.</b> Quantidade de celulose e proteína em cada proporção de bagaço de cana e farelo de trigo para 5g de meio                                         | 81  |
| <b>Tabela 4.12.</b> Produção de celulase na proporção de 70% de bagaço de cana                                                                                      | 83  |
| <b>Tabela 4.13.</b> Análise de variância da produção de celulase no período de 48 horas, tendo a temperatura e composição do substrato como variáveis independentes | 86  |
| <b>Tabela 4.14.</b> Atividade celulolítica em função da umidade inicial do meio fermentativo                                                                        | 88  |
| <b>Tabela 4.15.</b> Produção de CMCase (U/g) em ensaios de fermentação com bagaço de cana peneirado e triturado                                                     | 94  |
| <b>Tabela 4.16.</b> Atividade enzimática em ensaios para diferentes vazões de ar                                                                                    | 98  |
| <b>Tabela 4.17.</b> Atividade enzimática em ensaios para diferentes vazões de ar e tempos de fermentação a 45°C                                                     | 100 |
| <b>Tabela 4.18.</b> Aumento da temperatura durante a geração do calor metabólico                                                                                    | 101 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|       |                                         |
|-------|-----------------------------------------|
| BC    | bagaço de cana                          |
| Bu    | base úmida                              |
| CMC   | carboximetilcelulose                    |
| Cv    | cavalos-vapor                           |
| CV    | coeficiente de variação                 |
| DBO   | demanda biológica de oxigênio           |
| DNS   | ácido 3-5-dinitrosalicílico             |
| FES   | fermentação em estado sólido            |
| FSM   | fermentação submersa                    |
| FT    | farelo de trigo                         |
| FDA   | fibras em detergente ácido              |
| FDN   | fibras em detergente neutro             |
| GL    | grau de liberdade                       |
| Hz    | potência máxima (w)                     |
| L/h   | litros por hora                         |
| Lpm   | litros por minuto                       |
| Md    | desvio médio                            |
| Min   | Valor mínimo                            |
| mL    | mililitro                               |
| mL/g  | mililitro por grama                     |
| Nm    | comprimento de onda do espectro visível |
| QM    | quadrado médio                          |
| RPM   | revoluções por minuto                   |
| SM    | erro padrão da média                    |
| SQ    | Soma dos quadrados                      |
| T     | Termopar                                |
| Tween | Polyoxyethylene sorbitan monolaurate    |
| Ui    | umidade inicial                         |
| U/g   | Unidades por grama                      |
| U/mL  | Unidades por mililitro                  |
| W/mk  | watt por metro por kelvin               |
| μL    | microlitros                             |
| μM    | Milimolar                               |
| Mmol  | Micromol                                |

## 1- INTRODUÇÃO

A produção de enzimas possui grande importância no cenário industrial, visto que o seu uso facilita o beneficiamento de produtos de indústrias têxteis, de papéis, farmacêuticas, alimentícias, dentre outras. A produção de enzimas em escala industrial surgiu no início do século XX e atualmente sabe-se que mais de 500 tipos de enzimas garantem 50 aplicações biotecnológicas, em que seu uso proporciona: (i) na indústria biofarmacêutica, o aumento da especificidade e eficiência de processos, melhoramento da pureza de produtos e redução dos gastos com compostos químicos; (ii) na indústria alimentícia, elas melhoram as qualidades sensoriais do produto como: cor, sabor, textura e elevação de seu valor nutricional, além de participarem da transformação de suco de uva em vinho; (iii) na indústria química, as enzimas estão presentes em detergentes e são utilizadas no curtimento de couro, entre outros benefícios e em outros ramos industriais.

As enzimas podem ser de origem animal, provenientes de enzimas do pâncreas, fígado ou do estômago de animais como porcos, bois e vacas, também podem ser naturalmente derivados de plantas, como a papaína, uma enzima proteolítica derivada do látex do mamão, a bromelina, uma enzima proteolítica derivada do suco de abacaxi ou derivadas de microrganismos e são produzidas através da fermentação, no qual, incluem as amilases fúngicas e bacterianas, diástases, entre outras.

As enzimas obtidas de plantas e microrganismos são as mais utilizadas, por possuírem faixas mais amplas de pH, temperatura, especificidades de substrato e o menor custo de obtenção. As enzimas mais empregadas na indústria são pectinases, proteases (papaína, bromelina, renina e pepsina), amilases e glico-isomerases, outras menos frequentes, mas não menos importante como celulase, hemicelulase, xilanase, lipase, invertase, lactase e glicose oxidase, entre outras.

A produção de enzimas é um mercado promissor que vem crescendo a cada ano, estima-se que movimente cerca de US\$ 1.355 milhões por ano, conforme dados apresentados na Tabela 1. No entanto, o número de empresas que utilizam enzimas é muito superior ao número de produtores, demonstrando carência de competidores nesse mercado dominado por empresas dos Estados Unidos e parte oeste da Europa. Empresas como Novozymes com sede na Dinamarca; Gist Brocades, na Holanda; Amano, no Japão; Solvay, Pfizer e Genencor, nos Estados Unidos, são responsáveis por cerca de 90% da produção anual de enzimas.

**Tabela 1:** Enzimas utilizadas em diversos seguimentos industriais e o faturamento anual global da indústria de enzimas

| Setor                                                                           | Enzimas                                            | Milhões de dólares (US\$) |
|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------|
| Alimentos fermentados, cervejaria, edulcorantes, panificação, etanol de cereais | $\alpha$ -amilase, glucoamilase, glucose isomerase | 500                       |
| Detergentes                                                                     | Protease, lipase, amilase                          | 450                       |
| Têxteis                                                                         | Amilases                                           | 150                       |
| Tratamento de couro                                                             | Enzimas diversas                                   | 25                        |
| Têxteis, produtos alimentícios                                                  | Celulases                                          | 25                        |
| Produtos lácteos                                                                | Lactase                                            | 150                       |
| Alimentício, cervejaria, panificação, terapêutico                               | Papaína                                            | 25                        |
| Suco de frutas, vinícola                                                        | Pectinases, pectina-esterases                      | 30                        |
| Total                                                                           |                                                    | 1.355                     |

Fonte: (Castro, 2004)

Em particular, a produção de enzimas celulolíticas tem sido foco de grande interesse por parte dos pesquisadores brasileiros devido a sua utilização no processo de hidrólise enzimática de materiais celulósicos, para a produção do etanol de segunda geração.

Atualmente, o Brasil ocupa uma posição privilegiada no cenário global da produção de etanol e, mesmo assim, apresenta a possibilidade de aumentar essa produção, a partir da hidrólise do bagaço de cana. Esse fato seria um passo muito importante, visto que possibilita o reaproveitamento de um resíduo industrial de baixo valor agregado – bagaço de cana – em um produto industrial de alto valor agregado – etanol –, que passa a ser uma fonte industrial rentável. Além disso, outras vantagens relacionadas ao aproveitamento do resíduo bagaço de

cana referem-se: (i) à possibilidade da produção de etanol no período de entressafra e (ii) o aumento da produtividade do etanol, sem que seja necessário a ampliação da área plantada.

Para que o bioetanol se torne realidade foi criado em 2010, o Centro Paulista de Pesquisa em Bioenergia que se trata de parceria entre o Governo Estadual de São Paulo através da Secretaria de Ensino Superior, a FAPESP e universidades estaduais públicas, tais como: USP, UNICAMP e UNESP.

Pesquisas que visam a produção de enzimas celulolíticas e a redução dos custos de produção têm sido cada vez mais freqüentes na literatura. Os estudos buscam: (i) prospectar microrganismos com alta produtividade, (ii) determinar substratos adequados para o processo fermentativo que possuam baixo valor agregado, que estejam em grande quantidade e que sejam de fácil disponibilidade, (iii) determinar condições ótimas para o desenvolvimento do microrganismo (temperatura, substrato, umidade, pH, entre outros), (iv) produzir as enzimas em larga escala.

O uso do processo de fermentação em estado sólido (FES) tem se mostrado promissor quando comparado à fermentação submersa (FSM). Algumas pesquisas demonstram maior produtividade enzimática com o uso da FES, (MARTINS et al., 2007), pois esse processo é capaz de reproduzir o habitat natural de alguns microrganismos, como os fungos filamentosos, (PANDEY, 2003). Por meio da FES também há a possibilidade do uso de resíduos lignocelulósicos, como bagaço e palha de cana e sabugo de milho, entre outros.

O processo de hidrólise da biomassa para a produção de álcool pode ser feito pelo método ácido ou pelo método enzimático. A via química é eficiente e rápida, mas gera resíduos tóxicos que necessitam ser tratados, consumindo energia e tornando o processo pouco competitivo. A via enzimática é lenta e carece de enzimas fibrolíticas que possuem alto valor de custo, tornando o processo oneroso. Com isso, o desenvolvimento da produção

dessas enzimas em escala industrial, torna-se uma alternativa para a redução dos custos desse método.

Recentemente, a empresa DEDINI, fabricante de equipamentos sucro-alcooleiro, firmou acordo com a empresa dinamarquesa NOVOZYMES, líder mundial na produção de enzimas, para o fornecimento de enzimas para seus processos em desenvolvimento. Esse acordo demonstrou a necessidade do desenvolvimento de tecnologia nacional para a produção de enzimas fibrolíticas em larga escala. Uma alternativa eficiente para a produção destas enzimas em escala industrial é o desenvolvimento de bioreatores, particularmente os bioreatores para fermentação em estado sólido (FES), trata-se de uma estratégia crucial e que conta com poucos grupos atuantes.

Neste contexto, esta dissertação de mestrado teve por objetivo principal a produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido (FES) em reator de leito fixo, em escala de bancada, em quantidade passível de despertar interesse por aplicações industriais, empregando-se fungos termofílicos. Para tanto, utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos.

Os objetivos específicos a serem alcançados foram:

- Encontrar um fungo termofílico produtor de celulase;
- Realizar ensaios em frascos para avaliar a influência das variáveis proporção e umidade dos substratos (bagaço de cana e farelo de trigo) e temperatura de reação, bem como avaliar o tempo ótimo para a obtenção das enzimas;
- Realizar ensaios em reator de bancada para avaliar a variação de temperatura, segregação de umidade e heterogeneidade na produção de enzimas. As variáveis controladas foram a temperatura do ar de percolação e da camisa de refrigeração, bem como a vazão de ar.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Produção de bioetanol

Com a perspectiva de esgotamento das jazidas de petróleo e com as dificuldades de exploração de novas jazidas, tais como as do pré-sal no Brasil, a busca por fontes alternativas de combustível tem se intensificado. Além disso, o impacto da queima de combustíveis fósseis tem agravado o efeito estufa, de modo que a produção de combustíveis “limpos” tem ganhado espaço no cenário industrial.

Diante deste quadro, há perspectiva do etanol tornar-se uma *commodity* internacional, podendo alcançar até 10% do mercado global de combustíveis, o que deve ocorrer até 2018. Este é considerado o limite da capacidade de produção através das tecnologias tradicionais, o qual para ser superado, necessitará de métodos alternativos, tais como o de produção a partir de biomassa, (BERNARDES, 2010).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de etanol do mundo, o que se deve à abundância de matéria prima de alto rendimento (cana-de-áçúcar), ao desenvolvimento do processo de obtenção do produto, a partir do final da década de 70 até o final da década de 80, e ao crescente avanço tecnológico com desenvolvimento de microrganismos com maior poder de conversão do açúcar a etanol, (MAYERHOFF, 2006).

O elevado número de patentes depositados no Brasil demonstra o desenvolvimento e a auto-suficiência do Brasil nessa tecnologia. Na Figura 2.1. observa-se que após desaceleração no desenvolvimento da produção do álcool na década de 90, a partir de 2001 ocorreu ascensão na busca por novas tecnologias na produção do etanol, em grande parte ao desenvolvimento da produção de etanol a partir de biomassa, (MAYERHOFF, 2006).

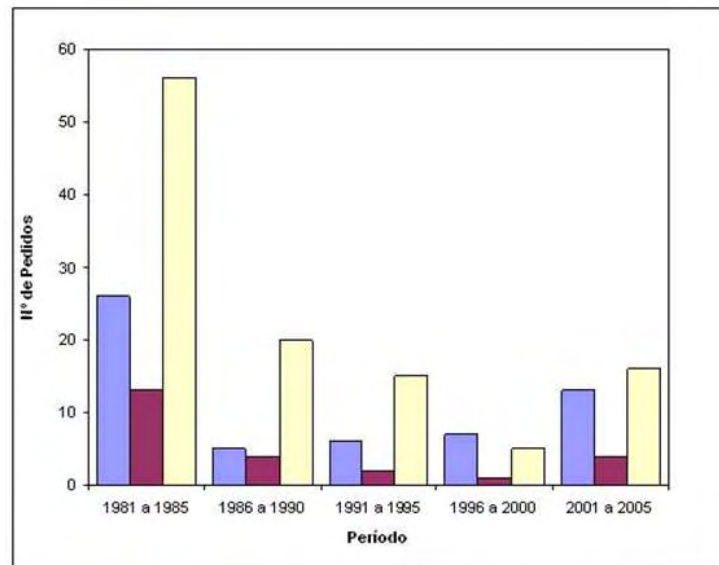


**Figura 2.1.** Pedidos de patentes depositados no Brasil (■ - Estados Unidos, ■ - Japão e ■ - Brasil), (extraída de MAYERHOFF, 2006).

Apesar de ser um combustível menos poluente e de ser proveniente de matéria prima renovável, o crescente aumento da produção de etanol tem proporcionado diversas discussões entre vários grupos sociais devido à possibilidade de diminuição na produção de alimentos e consequente aumento do preço destes, ocasionado pelo aumento de terras agriculturáveis destinadas ao cultivo de vegetais utilizados como matéria prima na produção do combustível. Esse problema tem sido observado nos EUA e no Brasil, com o aumento das áreas plantadas em milho e de cana-de-açúcar, respectivamente, para produção de etanol.

Uma alternativa para suprir a necessidade do aumento de produção desse combustível, sem que seja necessária a criação de novas áreas de plantio, é o avanço da tecnologia para a produção de etanol a partir de fontes vegetais não-alimentares (bioetanol), tecnologia essa que está se desenvolvendo rapidamente, (GOLDENBERG & LUCON 2007).

O bioetanol também conhecido como etanol celulósico ou etanol de lignocelulose, apresenta-se como uma tecnologia que busca sua matéria prima (açúcares), a partir da quebra das cadeias da celulose e hemicelulose, presentes na parte fibrosa de plantas, sendo diferente da forma tradicional que se utiliza de açúcares simples contidos no caldo da cana-de-açúcar.

Por meio de reações químicas ou bioquímicas, esses polímeros, que constituem a estrutura fibrosa dos vegetais, são convertidos a açúcares fermentecíveis.

Uma das principais matérias-primas usadas para a produção do etanol celulósico é a biomassa composta pelos rejeitos e resíduos das colheitas e do processamento de vegetais como bagaço de cana, cascas de arroz, cavacos de eucalipto, pinus, folhas de árvores descartadas após a produção de papel, colheita do café e outras culturas, que não são reaproveitadas para alimentação humana e animal. Estes rejeitos normalmente são descartados em aterros ou incinerados representando problema ambiental, de modo que a transformação desses resíduos em produtos de maior valor agregado, torna-se muito vantajosa.

A produção brasileira de cana-de-açúcar foi de 671,3 milhões de toneladas na safra 2008/2009, (IBGE, 2009), da qual cerca de 25%, 167,8 milhões de toneladas é de bagaço, demonstrando o potencial de biomassa conversível à açúcar para posteriormente ser utilizado na fermentação etanólica.

Atualmente, a plantação de cana no Brasil ocupa cerca de 2% da área agrícola do país (GOES, 2009) e a produção tem crescido a cada ano. Em 2006, a quantidade produzida atingiu 420 milhões de toneladas, passando a 470 milhões em 2007/2008 e atingindo produção recorde de 671,3 milhões de toneladas na safra 2008/2009 (IBGE, 2009). Estima-se que a cada ano sobrem de 12 a 15 milhões de toneladas de bagaço de cana; quantidade que tende a aumentar com o avanço da produção de cana de açúcar e de seu processamento.

O bagaço de cana tem sido aplicado para a geração de energia com a sua queima e também na produção de ração animal. Porém, o seu uso como matéria prima no processo de fermentação para a produção de enzimas, antibióticos e ácidos, tende a valorizar esses resíduos sólidos.

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica envolve: (i) pré-tratamento do bagaço, em que ocorre a deslignificação do material; (ii) hidrólise dos carboidratos, em

que ocorre a liberação dos açúcares fermentecíveis; (iii) fermentação etanólica e (iv) destilação.

Na etapa de pré-tratamento ocorre o rompimento da estrutura lignocelulósica, quebrando o elo da lignina com a celulose e hemicelulose. Com isso, aumenta-se a digestibilidade da biomassa e os carboidratos tornam-se mais acessíveis ao ataque enzimático ou químico (RABELO, 2007). O pré-tratamento pode ocorrer por: (i) métodos físicos, como explosão a vapor, moagem, radiação ionizante, entre outros; (ii) métodos químicos, com adição de hidróxido de sódio ou amônia ou ácido clorídrico, entre outros; (iii) métodos biológicos, com a utilização de microrganismos e/ou enzimas; (iv) combinação dos métodos, como a moagem com a adição de hidróxido de sódio, o uso de amônia com radiação, entre outros.

Na etapa de hidrólise ocorre a quebra da estrutura molecular da celulose e da hemicelulose transformando-a em açúcares mais simples. Esse processo pode ser feito de duas maneiras: (i) por hidrólise química, que utiliza ácido ou base (concentrada ou diluída), que é uma tecnologia já desenvolvida mas que possui a desvantagem da geração de resíduos agressivos; (ii) por hidrólise enzimática, que utiliza enzimas hidrolíticas, tornando o processo livre de resíduos perigosos e, assim, eliminando a etapa de tratamento dos resíduos, (MISHIMA et al., 2006).

No entanto, o processo enzimático apesar de ser mais eficiente que o processo ácido, ainda é pouco viável, devido ao alto custo das enzimas comerciais, sendo assim, um dos principais obstáculos dessa etapa. Recentemente, foi firmado um acordo entre a empresa brasileira Dedini e a empresa dinamarquesa Novozymes, líder no mercado mundial de enzimas, para a produção do etanol de 2º geração (DEDINI, 2010), dando mostras da desconfiança da Dedini na capacidade de pesquisadores brasileiros em oferecer enzimas com qualidade e na quantidade necessária.

Para que a redução no custo das enzimas seja alcançada são necessárias pesquisas que busquem encontrar microrganismos que possuam taxa elevada de produção da enzima, bem como conhecer as suas características físico-químicas. Neste contexto, o uso de resíduos lignocelulósicos para a fermentação em estado sólido (FES) tem recebido muita atenção da literatura, na tentativa de redução de custos para a produção dessas enzimas, (MISHIMA et al., 2006; SILVA et al., 2005; GAO et al., 2008).

## **2.2. Enzimas Celulolíticas**

Os processos biotecnológicos têm conquistado lugar de destaque no desenvolvimento tecnológico mundial, exibindo características econômicas e operacionais que conferem vantagens em relação aos processos químicos convencionais. Os processos convencionais requerem a utilização de produtos químicos que geram resíduos de difícil tratamento, de modo que o uso de enzimas como substitutivo destes produtos tem recebido atenção das indústrias, para a simplificação e redução de custos. A Tabela 2.1 (BORZANI, 2001) apresenta diversos processos de fabricação de alimentos que se utilizam de enzimas.

A celulase é uma enzima utilizada na degradação da celulose e que possui vasto potencial de aplicações, dentre as quais: (i) agente no branqueamento de papel e celulose e (ii) aditivo alimentar e de bebida, como por exemplo na farinha de trigo, a fim de melhorar as propriedades da massa e da qualidade dos produtos assados.

**Tabela 2.1:** Aplicação de enzimas no processamento industrial

| PROCESSAMENTO  | ENZIMAS                                 | ATUAÇÃO                                                                         |
|----------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Panificação    | $\alpha$ -amilase, Protease             | Hidrólise parcial do amido, elasticidade e textura aumentando o volume da massa |
| Laticínios     | Lactase ( $\beta$ - galactosidase)      | Quebra da lactose                                                               |
| Queijos        | Lipase de <i>Penicillium Roqueforti</i> | Produção do queijo Roquefort                                                    |
|                | Lipases e Proteases                     | Maduração do queijo                                                             |
| Carnes         | Proteases                               | Preparo de carnes curadas, conservas, embutidos, refugos de carnes,             |
|                | Lipases                                 | Desengorduramento de ossos (gelatina)                                           |
| Peixes         | Proteases e Lipases                     | Controle gosto amargo, elimina gosto e odor desagradáveis                       |
| Frutas e Sucos | Pectinases, Celulases, Proteases        | Facilita extração, clarificação e melhora a cor                                 |

Fonte: Borzani 2001

A celulase é um complexo enzimático constituído por endoglucanases (EG), exoglucanases (EXG) ou celobiohidrolase (CBH), e  $\beta$ -glucosidase. As endoglucanase atuam na quebra da molécula de celulose na região amorfa, liberando celo-oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização. A exoglucanase quebra os celo-oligossacarídeos em regiões sequenciais da segunda ligação glicosídica a partir da região não redutora da molécula de celulose, liberando celobiose, que é hidrolisada pela  $\beta$ -glucosidase liberando moléculas de glicose, como apresentado na Figura 2.2.

Os fungos e as bactérias são considerados bons produtores de celulase. No entanto, em alguns casos, essa produção é heterogênea uma vez que as enzimas exoglucanase, endoglucanase e  $\beta$ -glucosidase podem individualmente apresentar quantidades diferentes ou mesmo haver carência de alguma dessas enzimas específicas, prejudicando, assim, a hidrólise da celulose (PEIXOTO, 2006).

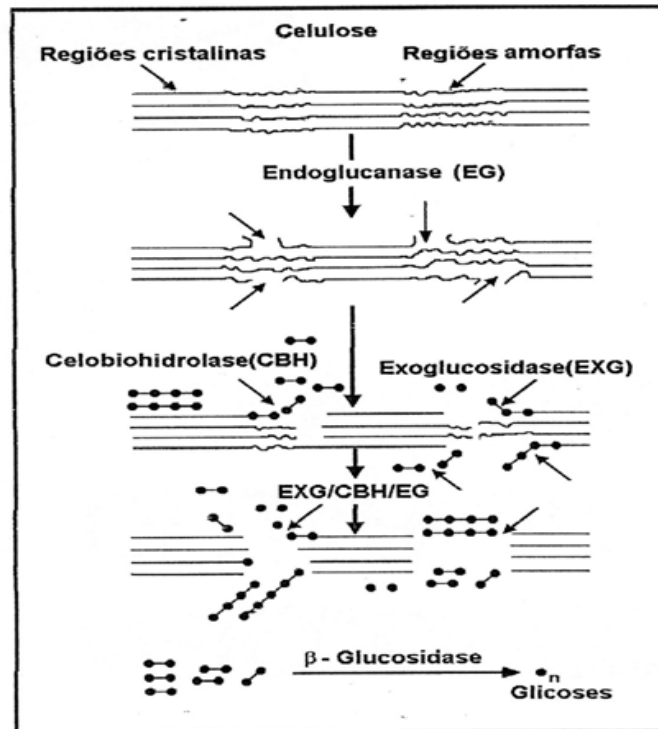


**Figura 2.2.** Atuação do complexo celulolítico no material celulósico (extraída de EVELEIGH, 1987)

### 2.3. Material lignocelulósico

O bagaço de cana assim como a palha de milho, a palha de arroz e o bagaço de laranja entre outros materiais estão dentro de uma classe de materiais conhecidos como *lignocelulósicos*, que possuem em sua composição basicamente celulose, lignina e hemicelulose, cuja estrutura básica é apresentada na Figura 2.3.

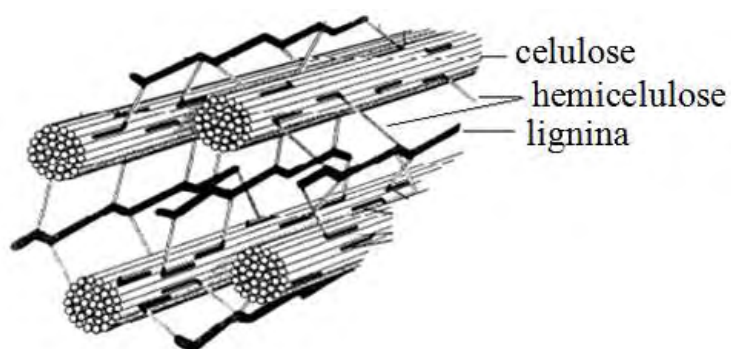


**Figura 2.3.** Estrutura do material lignocelulósico (extraída de GRAMINHA, 2008)

Muitos resíduos sólidos agro-industriais são considerados materiais lignocelulósicos com grande potencial para a produção de etanol. Em geral, estes materiais têm emprego limitado, sendo a maioria das vezes queimado em caldeiras para a geração de vapor, de modo que o excedente converte-se em problema ambiental devido à grande quantidade de resíduos produzidos pelo agro-negócio. Assim, a produção de etanol de 2ª geração resolveria este problema ambiental e concomitantemente aumentaria a produção de álcool sem a necessidade de aumento da área plantada de cana (RABELO, 2007).

A celulose é um composto orgânico produzido pelas plantas superiores terrestres e é considerado o principal polissacarídeo estrutural da parede celular de vegetais, sendo encontrado em folhas, galhos, nas paredes de todas as células, estando associada à hemicelulose e à lignina. Trata-se de polissacarídeo linear, insolúvel em água e de estrutura com duas regiões, uma cristalina e outra amorfa, composto por unidades de glicose como apresentado nas Figuras 2.4 e 2.5.

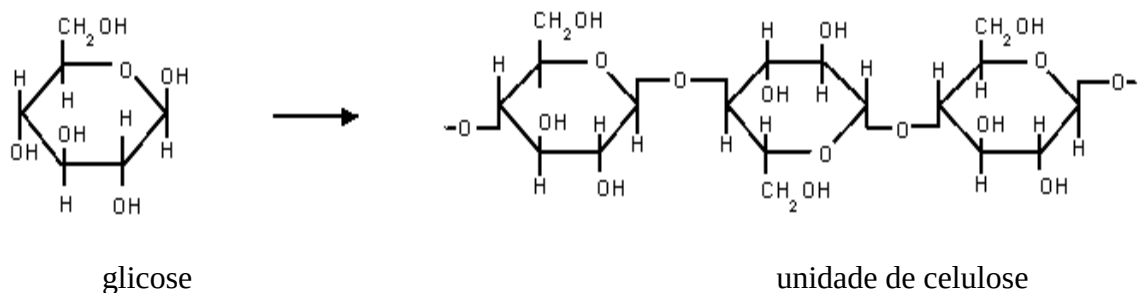


**Figura 2.4.** Estrutura química da celulose

A disposição das hidroxilas nas moléculas de celulose gera interações intermoleculares por pontes de hidrogênio entre as unidades de glicose, moldando uma estrutura com alto grau de organização chamada de região cristalina que dificulta bastante o processo de hidrólise. Uma outra região completamente desorganizada, chamada de amorfa, como apresentado na

Figura 2.5. Cada tipo de celulase acaba atacando preferencialmente uma região específica da celulose (RABELO, 2007).

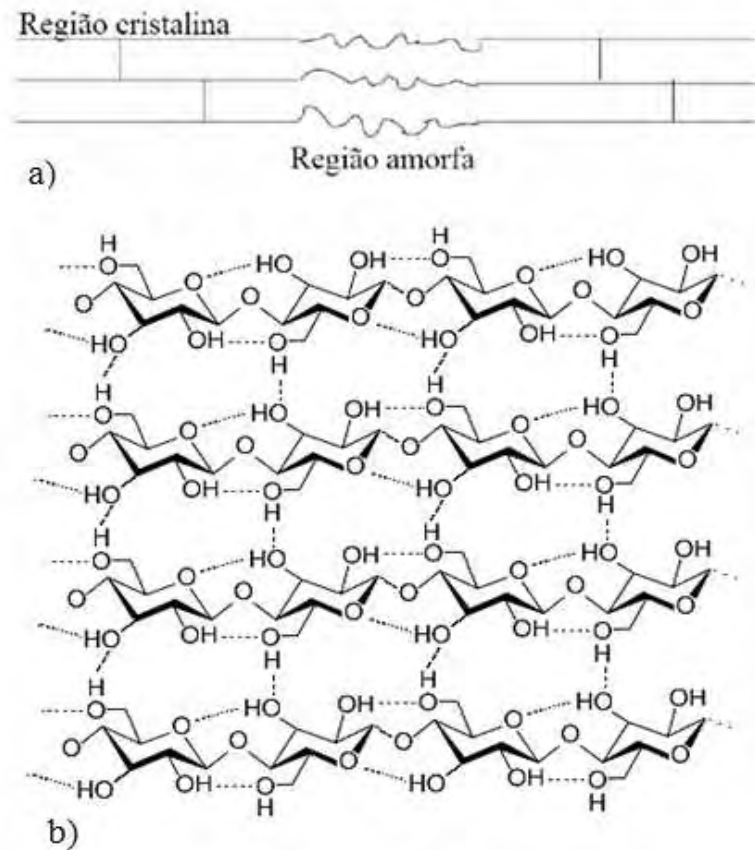


**Figura 2.5.** a) Estrutura esquemática das duas regiões da celulose: região cristalina e região amorfa; b) Disposição das hidroxilas na estrutura cristalina da celulose (extraída de RABELO, 2007)

A celulose é higroscópica e esta presente em 45% da composição do bagaço de cana (PEIXOTO, 2006). A hemicelulose é um polissacarídeo associado à celulose nas paredes celulares, que possui em sua composição açúcares de hexoses como glicose, manose e galactose e pentoses como xilose, arabinose, ácidos hexurônicos (ligados a algumas pentoses) e deoxiexoses, como apresentado na Figura 2.6. A hemicelulose apresenta composição variada nos diferentes tipos de vegetais. No bagaço de cana de açúcar as hemicelulose estão presente na proporção de 25 a 27% e têm como principal açúcar a xilose. No processo de

hidrólise ácida a hemicelulose é decomposta em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural (PATURAU, 1989).

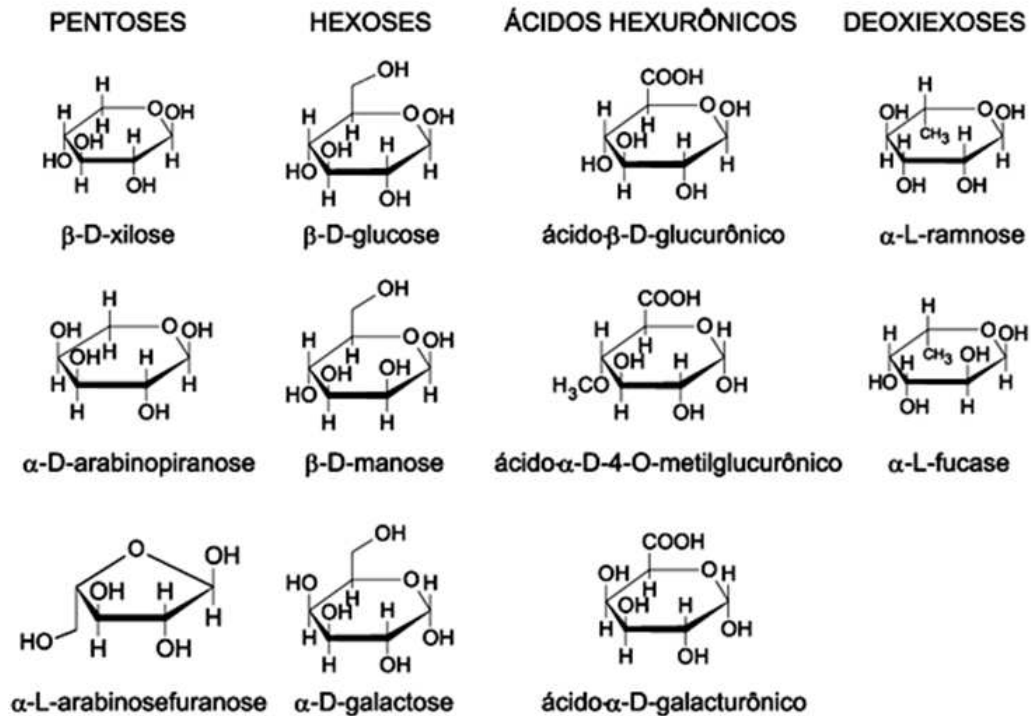


**Figura 2.6.** Açúcares que compõem a hemicelulose

A lignina é o segundo polímero natural mais abundante entre os materiais lignocelulósicos, sendo uma molécula complexa responsável por manter unidas as fibras desses materiais. É um heteropolímero constituído por unidades de fenilpropano, possui estrutura tridimensional amorfa sem repetição na composição estrutural dos blocos monômeros. Possui ligações carbono-oxigênio-carbono que unem pequenas cadeias de hidrocarbonos, como apresentado na Figura 2.7 (RABELO, 2007).

Com isso, cria-se uma proteção física que protege a planta da ação de enzimas liberadas pelos microrganismos. Dessa forma, a presença da lignina na parede celular dificulta a hidrólise enzimática dos carboidratos. A quebra da lignina dá-se pela ruptura das ligações C-O-C, liberando os hidrocarbonos menores, que podem, ser tratados para a produção de álcool

(RABELO, 2007). Uma das dificuldades encontradas na bioconversão do material lignocelulósico tem sido a baixa eficiência da população microbiana celulolítica na quebra da estrutura lignocelulósica (RABELO, 2007).

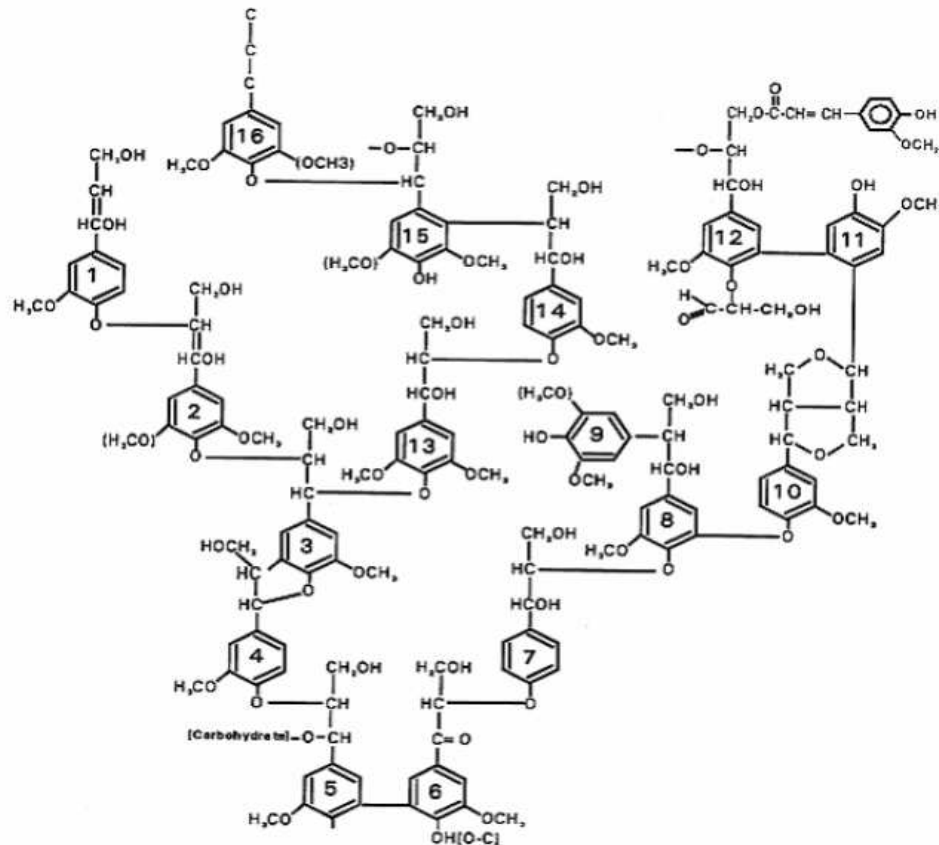


**Figura 2.7.** Estrutura da lignina (extraída de RABELO 2007)

A quebra da celulose gera unidades de glicose que são facilmente fermentadas pelo método da fermentação alcoólica atual. Já a hidrólise da hemicelulose também produz hexoses facilmente fermentecíveis; contudo, produz pentoses, que são de difícil fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. Dessa forma, pesquisas que buscam tecnologia de fermentação de pentoses estão sendo conduzidas para aumentar a eficiência da bioconversão. Recentemente, um grupo de pesquisadores da universidade de Illinois modificou geneticamente *S. cerevisiae* para a fermentação de pentoses (SUK-JIN et al., 2010), mas não há informações sobre sua aplicação industrial.

## 2.4. Fermentação em estado sólido

A fermentação pode ser basicamente de dois tipos: (i) com fase aquosa abundante, conhecida como fermentação submersa (FSM) e (ii) com fase não-aquosa predominante, conhecida como fermentação em estado sólido (FES).

A fermentação em estado sólido pode ser definida como processo no qual um material sólido poroso é posto em contato com uma cultura de microrganismos, com presença de água suficiente para garantir o crescimento e as atividades metabólicas das células, sem que no entanto, a capacidade de retenção de água pela matriz porosa seja excedida (PANDEY et al., 2000).

A FES, comparada com a FSM, é preferida devido às vantagens que oferece, tais como: fácil manejo e manutenção, menor custo de operação, maior concentração de produtos formados, facilidade na extração do produto com a utilização de solventes apropriados (geralmente água) e espaço físico reduzido.

A FES deve ter a capacidade de proporcionar ambiente com umidade adequada ao crescimento microbiano, sendo, portanto, a condição natural de fungos filamentosos, que produzem várias enzimas extracelulares em altas concentrações para hidrolisar os nutrientes da fase sólida (DALSENTER et al., 2005).

Martin et al. (2007), em seu estudo de produção da enzima pectinase pelo fungo *Thermomucor indicae seudaticae* N31 em FES, observaram menor produção enzimática em FSM, e Silva et al. (2002) mostraram que a produção de poligalacturonase por *P. viridica* RFC3 foi menor em FSM do que em FES.

Devido às suas características, a FES tem se desenvolvido em várias áreas industriais, tais como de alimentos, farmacêuticas, de cosméticos e de pigmentos. Dentre os produtos economicamente valiosos, destacam-se enzimas, alcoóis, polissacarídeos e ácidos orgânicos, entre outros.

Outra vantagem da FES é a possibilidade de se usar resíduos agroindustriais como bagaços de cana-de-açúcar e de laranja, cascas de fruta, farelos de trigo e de mandioca, entre outros como substratos para obtenção de produtos com alto valor agregado. Com isso a utilização desses resíduos na FES tem se tornado um método alternativo, visto que esses substratos são de baixo custo, existem em abundância e podem representar um problema ambiental, se forem descartados de forma não adequada.

A escolha do tipo de substrato a ser utilizado na fermentação está relacionada às condições de adequação do microrganismo ao seu ambiente, pois cada substrato possui características próprias de retenção de umidade e disponibilidade de nutrientes. Esses materiais sólidos são, geralmente, fragmentados e de natureza granular ou fibrosa, que permitem a retenção de água por higroscopicidade ou capilaridade. Além disso, os substratos sólidos úmidos possuem característica polimérica e de baixa solubilidade em água, e agem como fonte de carbono, nitrogênio, minerais, água e outros nutrientes.

O uso de substratos que contenham macromoléculas é importante como fonte de nutrientes, pois tais macromoléculas podem ser hidrolisadas por enzimas hidrolíticas que são secretadas pelos microorganismos, liberando pequenas moléculas solúveis que podem ser utilizadas para o crescimento desse microrganismo (LAURENTINO, 2007). Em geral, tais enzimas são alvo de interesse industrial. Dessa forma, encontrar substrato que reproduza as condições do habitat natural dos microrganismos de alta atividade de água, alta transferência de oxigênio e boa fonte de nutrientes é alvo de análise em diversas pesquisas.

Gutiérrez-Rojas et al. (1996) observaram a ocorrência de dois tipos de crescimento micelial durante a fase vegetativa, uma envolvendo e outra penetrando o substrato. O formato e o tamanho estrutural do substrato podem influenciar no ataque microbiano e na liberação de exo-enzimas. Partículas muito pequenas podem propiciar o empacotamento do meio,

prejudicando a aeração e remoção de calor, enquanto que partículas muito grandes podem limitar o ataque microbiano (KAR et al., 1999).

O substrato pode variar em composição e concentração de carboidratos, proteínas e fibras. Com isso, durante o processo hidrolítico, o microrganismo pode liberar varias enzimas extracelulares como pectinases, celulasas, hemicelulasas, proteases, amilases e ligninases, entre outras. Essa produção é regulada por mecanismos fisiológicos, como o processo de repressão catabólica pela glicose.

Observa-se que há diversos tipos de resíduos agrícolas ou sub-produtos de agroindústrias que podem ser empregados como os substratos sólidos na FES, tais como: arroz e seus derivados (ALVES & PEREIRA, 1998), bagaço de cana-de-açúcar (MILAGRES et al., 2004; SENTHIL & DAS, 2004), bagaço de laranja (MARTIN et al., 2004), palha de trigo (KALOGERIS et al., 2003), sementes de uva (COUTO et al., 2006) e farelo de mandioca (ASAGBRA et al., 2005), bagaço de cana e farelo de trigo (MORETTI, 2010), entre outros.

Estudos que utilizam misturas de dois ou mais substratos podem possuir balanço de porcentagem de componentes – como o indutor da enzima e fontes de carbono e nitrogênio – dependentes da proporção de cada material. Martin et al. (2007) e Umsza-Guez, (2009) observaram que, além do uso do bagaço de laranja que atuou como indutor da enzima pectinase, foi necessário o uso de outro composto, com grandes quantidades de nutrientes necessários para o desenvolvimento do fungo nos estágios iniciais (farelo de trigo) e também o uso de material fibroso (bagaço de cana), capaz de proporcionar boa estrutura física ao meio fermentativo, favorecendo a aeração.

Como forma de aumentar a produtividade, a seleção de cepas é importante para encontrar microrganismos que se adaptem ao ambiente da fermentação e possuam alto rendimento de produção de enzimas. Após esta seleção, estudos devem ser realizados acerca

das variáveis de cultivo que forneçam a produção ótima de enzimas, tais como: temperatura, tempo de fermentação, composição e umidade inicial do substrato e pH, entre outras.

A umidade do meio é uma variável importante para o desenvolvimento do fungo, tendo como função o transporte e disponibilização de nutrientes e de metabólitos em sua forma dissolvida, bem como a manutenção do volume celular, devido ao fato da água ligar-se a moléculas como polióis, açúcares ou enzimas (CROWE et al., 1982).

A baixa atividade de água tende a aumentar a fase lag de crescimento, interferindo na quantidade de biomassa produzida (ORIOLE *et al.*, 1988). Os fungos crescem em uma faixa de atividade de água entre 0,6 e 0,8.

A esporulação, a disponibilidade de nutrientes, a inibição de enzimas, a permeabilidade da membrana celular podem ser afetadas pela alteração da atividade de água, podendo prejudicar o metabolismo do fungo (CHARLAN & HAROWITZ, 1974). Dessa forma, o controle da atividade de água é de grande interesse para otimizar a produção de metabólitos como aromas, antibióticos e enzimas. No entanto, na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, a umidade do meio sólido encontra-se acima da umidade de equilíbrio na temperatura de operação, de modo que a atividade de água nestes sistemas é elevada, aproximando-se do ar saturado.

Vários estudos demonstram a existência de vários microrganismos produtores de celulase em diversos substratos, como apresentado na Tabela 2.2.

Encontra-se na literatura vários trabalhos com fungos mesofílicos, embora o uso de fungos termofílicos para a produção de metabólitos por FES tenha crescido recentemente. Isso se deve ao fato desses fungos trabalharem em temperaturas mais elevadas, reduzindo o risco de contaminação por microorganismos mesofílicos, e produzindo enzimas termoestáveis, fatores estes interessantes industrialmente. (GOMES et al., 2007).

**Tabela 2.2:** Comparação entre vários estudos com microrganismos produtores de celulase

| <b>Microrganismo</b>                       | <b>Substrato</b>                               | <b>Referência</b>      |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> 3T5B8             | Farelo de trigo                                | Couri et al. (2000)    |
| <i>Aspergillus niger</i> MTCC 7956         | Farelo de trigo                                | Sukumaran et al (2008) |
| <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864        | Silagem de sorgo                               | Castilho (1994)        |
| <i>Bacillus</i> SP                         | Farelo de trigo                                | Gessesse & Mamo (1999) |
| <i>Trichoderma citrinoviride</i>           | Resíduos de citronela                          | Chandra et al (2009)   |
| <i>Aspergillus terreus</i> M 11            | Palha de milho                                 | Gao et al (2008)       |
| <i>Thermoascus aurantiacus miehe</i>       | Bagaço de cana                                 | Silva et al. (2005)    |
| <i>Thermoascus aurantiacus miehe</i>       | Farelo de trigo                                | Silva et al. (2005)    |
| <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N 31 | Bagaços de cana e de laranja e farelo de trigo | Umsza-Guez (2009)      |
| <i>Trichoderma longibrachiatum</i>         | Farelo de trigo                                | Ridder et al. (1999)   |
| <i>Trichoderma</i> spp.                    | Resíduos de citronela                          | Chandra et al (2009)   |
| <i>Trichoderma reesei</i> RUT C30          | Farelo de trigo                                | Sukumaran et al (2008) |
| <i>Trichoderma reesei</i> LM-1             | Silagem de sorgo                               | Castilho (1994)        |

## 2.5. Bioreatores para FES

Bioreator também conhecido como fermentador, reator biológico ou reator bioquímico, é um recipiente que busca simular as condições do habitat natural de um microrganismo para que nele se realize a produção do material desejado (MITCHELL et al., 2003). Nesse equipamento ocorrem reações de transformação dos substratos em produtos de interesse industrial, através da ação de microrganismos. O bioreator pode variar em forma e tamanho, dependendo de sua aplicação (SCHMIDELL, 2001a).

Fermentadores de FES podem ser de leito fixo, de bandeja, de tambor rotativo e de leito fluidizado gás-sólido, entre outros. O bioreator de leito fixo é operado com aeração forçada e é composto por uma seção de entrada, uma seção térmica e a seção de saída, como apresentado na Figura 2.8. A seção de entrada é constituída de um tubo com ou sem camisa de aquecimento, podendo ser do mesmo diâmetro e material constituinte da seção térmica, ele também pode ser recheado pelo mesmo material da seção térmica, essa seção tem como

função principal a homogeneização do fluido antes da sua entrada na seção térmica. Já, a seção de térmica é revestida com camisa de resfriamento responsável por manter a temperatura desejada no leito. A seção de saída contém dispositivos que evitem a contaminação do bioreator por microrganismos do ambiente e que esporos e metabólitos sejam dispersos para o ambiente.

Esse tipo de bioreator caracteriza-se por um projeto simples e de baixo custo, de fácil manuseio e baixo requisito operacional. Sua característica de leito estático o torna ideal para alguns microrganismos sensíveis às tensões de cisalhamento, como o caso de alguns fungos filamentosos que podem ter suas hifas rompidas com a movimentação e, assim, prejudicar o seu desenvolvimento. Esses fungos crescem sobre a superfície do material sólido e penetram através das partículas, aprofundando-se no leito (PANDEY, 2003), como apresentado na Figura 2.9.

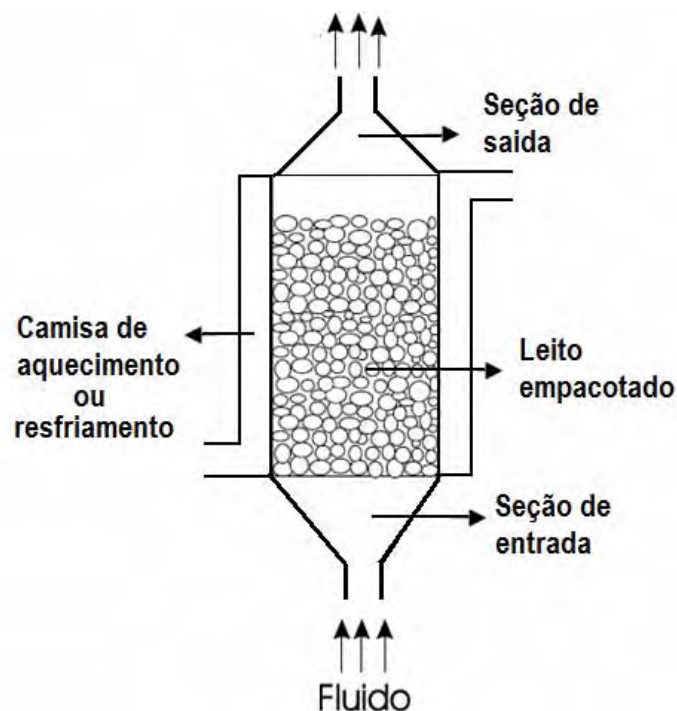


**Figura 2.8.** Diagrama esquemático de reator em leito fixo

A dinâmica do processo fermentativo no reator é dependente de fenômenos de transferência de energia e massa. A Figura 2.10 apresenta os mecanismos de transporte de calor num fermentador de leito empacotado. A remoção do calor nesse tipo de reator, dá-se pelos seguintes mecanismos: (i) condutivo: vertical, horizontal e pela parede do reator e (ii) convectivo: por meio da aeração forçada. A remoção de calor, através do ar percolante, pode ocorrer de duas formas: por meio do calor latente de evaporação da água do meio sólido e através da variação do calor sensível do ar (LAURENTINO 2007; UMSZA-GUEZ 2009; MITCHELL et al., 2010).

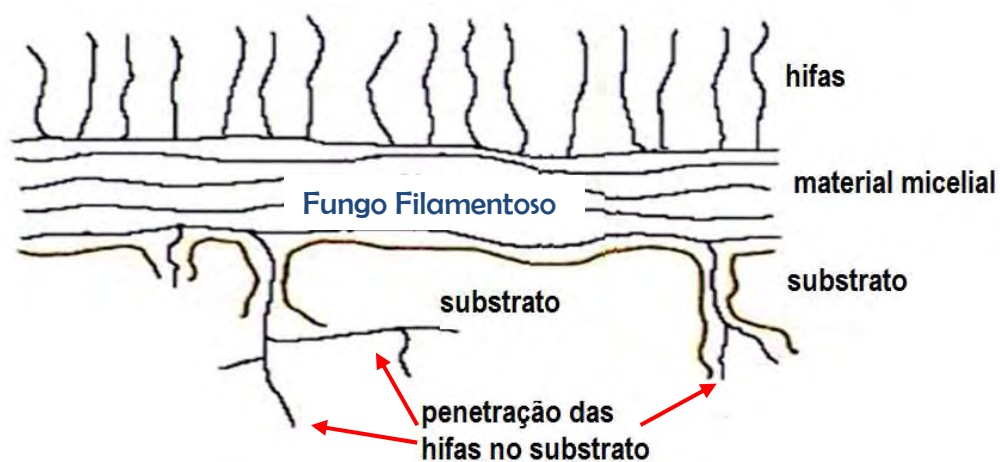


**Figura 2.9.** Crescimento do fungo sobre a superfície do material sólido, (extraída de MADIGAN, 2004)

Durante o processo fermentativo ocorre o aumento da temperatura devido à geração de calor do metabolismo pelo fungo. A utilização de substratos com baixa difusividade térmica, como os materiais lignocelulósicos, podem dificultar a remoção deste calor por condução. Assim, a melhor opção é a aplicação do mecanismo convectivo, para que haja o controle da temperatura. A remoção do calor, por meio do calor latente de evaporação da água do meio sólido, é mais eficiente, contudo gera o problema de segregação de umidade e conseqüente não uniformidade do meio de cultivo. Por outro lado, a variação do calor sensível do ar é limitada pela baixa capacidade calorífica do ar úmido (LAURENTINO, 2007; UMSZA-GUEZ, 2009; MITCHELL et al., 2010).

Com isso, a desvantagem do sistema estático consiste na não homogeneidade térmica apresentada nesse processo. O aquecimento do leito pode comprometer a cinética de crescimento e até mesmo provocar a morte do microrganismo (MITCHELL et al., 2000b). Dessa forma, a remoção do calor é importante para manter a temperatura ideal para o metabolismo microbiano, de modo a favorecer a formação do produto desejado.

Alguns trabalhos buscam maior eficiência na remoção de calor por meio de confecção de novos modelos de bioreator de leito fixo. Mitchell et al.(2010) dividiram o material empacotado em camadas no reator de leito fixo vertical, com fluxo de ar ascendente unidirecional. A posição dessas camadas era alterada em intervalos de uma hora, em um sistema de rotatividade entre essas camadas, de forma que as camadas da parte inferior do reator eram deslocadas na direção ascendente. Eles observaram que o aumento da temperatura referente ao calor metabólico ocorriam em períodos diferentes, com isso, a temperatura máxima nesse leito foi inferior ao observado no método tradicional.

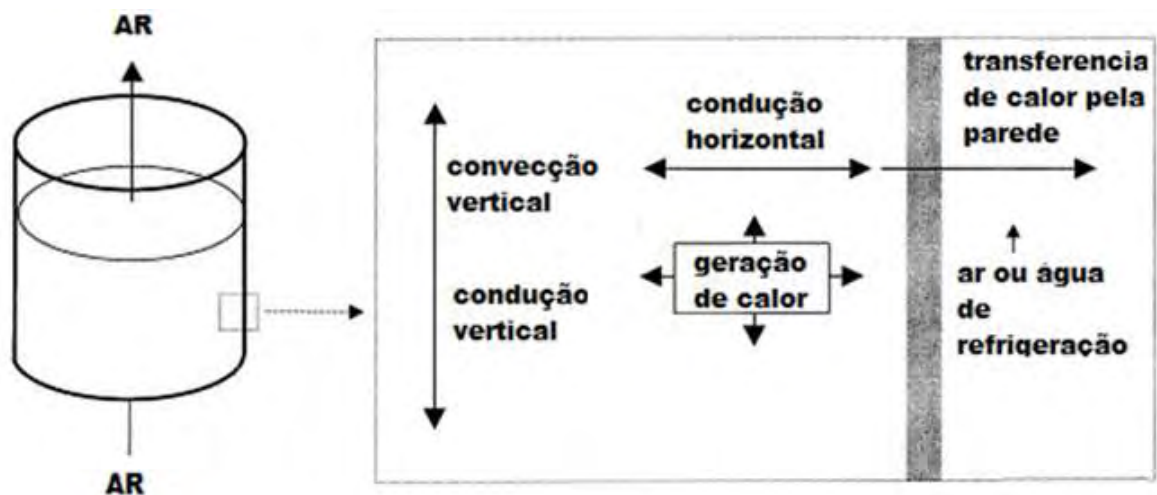


**Figura 2.10.** Mecanismo de remoção de calor em leito fixo, (adaptado de MITCHELL et al., 2000b).

O bioreator de bandeja é composto por leito estático com aeração forçada. Nesse modelo de reator, o substrato inoculado é colocado em bandejas que podem ser de madeira,

plástico ou aço-inox, como apresentado na Figura 2.11, que são dispostas em câmara, sendo o ar percolado paralelamente à superfície do leito. Trata-se de um processo simples que, no entanto, possui como desvantagem alto custo operacional devido à necessidade de grande área e de elevada mão de obra na preparação das bandejas (MITCHELL et. al., 2000b).

No bioreator de bandeja, a temperatura da câmara controla a temperatura do sistema e, pelo fato de nesse processo a aeração forçada, o ar está em contato apenas com a superfície do substrato e não através do meio poroso, as trocas térmicas ocorrem prioritariamente por meio do mecanismo de condução de calor. Assim, tem-se a necessidade de o substrato ser disposto em camadas finas.

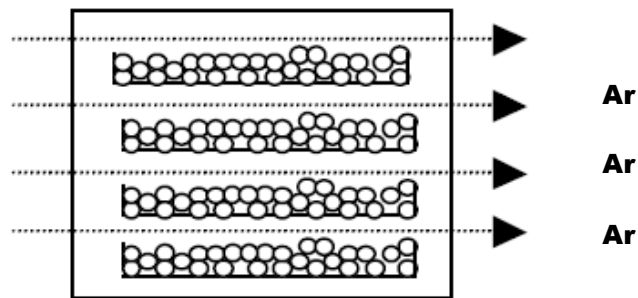


**Figura 2.11.** Diagrama esquemático do bioreator tipo bandeja, (extraída de MITCHELL et al., 2000a)

O bioreator de tambor rotativo é formado por um cilindro horizontal que possui aeração forçada em uma de suas extremidades e sua movimentação se dá em torno do seu eixo, como apresentado na Figura 2.12. Trata-se de um leito móvel que favorece a homogeneização do substrato, facilitando a remoção do calor metabólico do microrganismo. A grande vantagem desse processo consiste na possibilidade de aspergir água sobre o meio fermentativo que associado à percolação de ar com umidade moderada, promove elevadas taxas de trocas térmicas. No entanto, sua aplicabilidade é dependente de microrganismos resistentes a tensões de cisalhamento. O desenho destes fermentadores são mais complexos, levando a custos iniciais e de manutenção mais elevadas do que os de fermentadores de leito fixo.

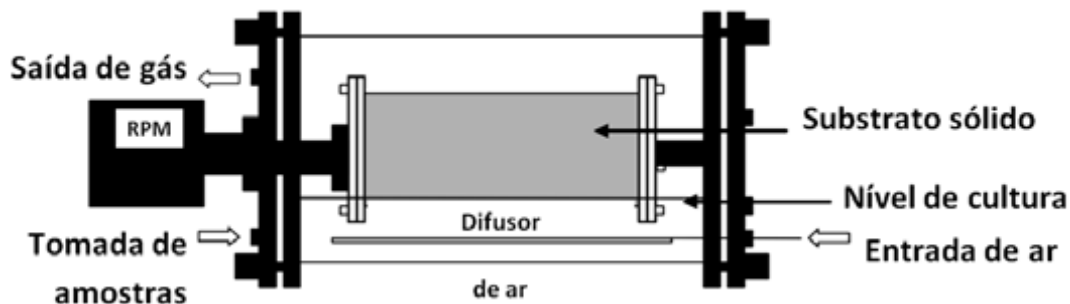


**Figura 2.12.** Diagrama esquemático de um bioreator de tambor rotativo (extraída de DOMINGUEZ et al, 2001).

O bioreator de leito fluidizado é formado por um cilindro vertical com aeração forçada em sua extremidade inferior e apresenta velocidade capaz de suspender as partículas de substrato, provocando sua movimentação como apresentado na Figura 2.13. Com isso, sua aplicabilidade é dependente da tolerância do microrganismo à tensão de cisalhamento, (MITCHELL et al., 2000a). A grande vantagem desse processo consiste na elevada taxa de trocas térmicas ocorrida pelo alto fluxo de ar através das partículas. Por outro lado, é grande a possibilidade de heterogeneidade de umidade.

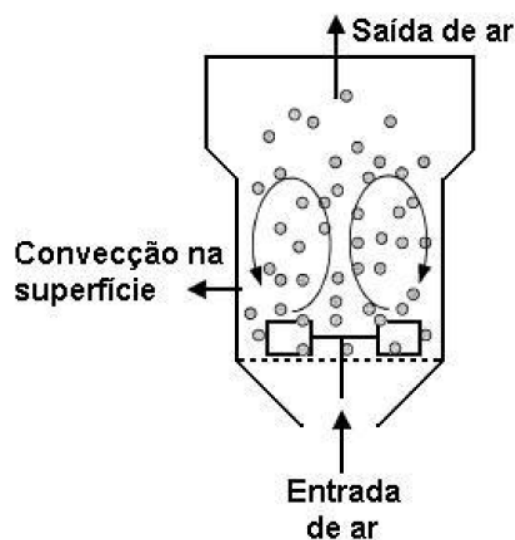


**Figura 2.13.** Diagrama esquemático de biorreator de leito fluidizado (extraída de MITCHELL et al., 2000b).

A escolha do tipo de reator a ser utilizado irá depender de vários fatores, tais como as características do microrganismo utilizado no processo; sua capacidade em suportar a movimentação do substrato; grau de aeração e características do empacotamento. Fatores operacionais também influenciam na escolha do fermentador, como custo de operação, monitoramento e processos de carga e recarga, entre outros.

Os bioretores de leito fixo, tambor rotativo e leito fluidizado por possuírem recipientes fechados são capazes de reter o substrato e impedir a liberação do microorganismo para o meio externo, minimizando, assim, a entrada de contaminantes, fator que não ocorre com o bioreator de bandeja, em que o substrato é colocado em recipiente aberto ao ambiente climatizado.

O biorreator de leito fixo possui algumas vantagens frente aos demais reatores. Ele possui capacidade superior de preenchimento do leito, pois o bioreator de tambor rotativo e o de leito fluidizado não podem ter os seus leitos totalmente preenchidos, por causa da necessidade de movimentação do substrato. Já o bioreator de bandeja não pode possuir camada muito espessa, por não possuir um sistema eficiente de trocas gasosas.

## **2.6. Etapas para o aumento de escala**

Em geral, o aumento da escala em sistemas de FES ocorre na seguinte seqüência (BADINO JR, 2001):

Frascos ou sacos de polipropileno: 100-1000 mL

Bioreatores de bancada : 1 L – 100 L

Bioreatores piloto: 100 – 1000 L

Bioreatores industriais : acima de 1000 L

Para que ocorra o aumento de escala é necessário conhecer as interações entre os vários fenômenos envolvidos durante o processo fermentativo. Esses fenômenos podem ser

divididos em duas visões: fenômenos macroscópicos que estão relacionados a escala em bioreator e fenômenos microscópicos que estão relacionados a escala de frasco (MITCHELL et al., 2003), como apresentado na Figura 2.14.

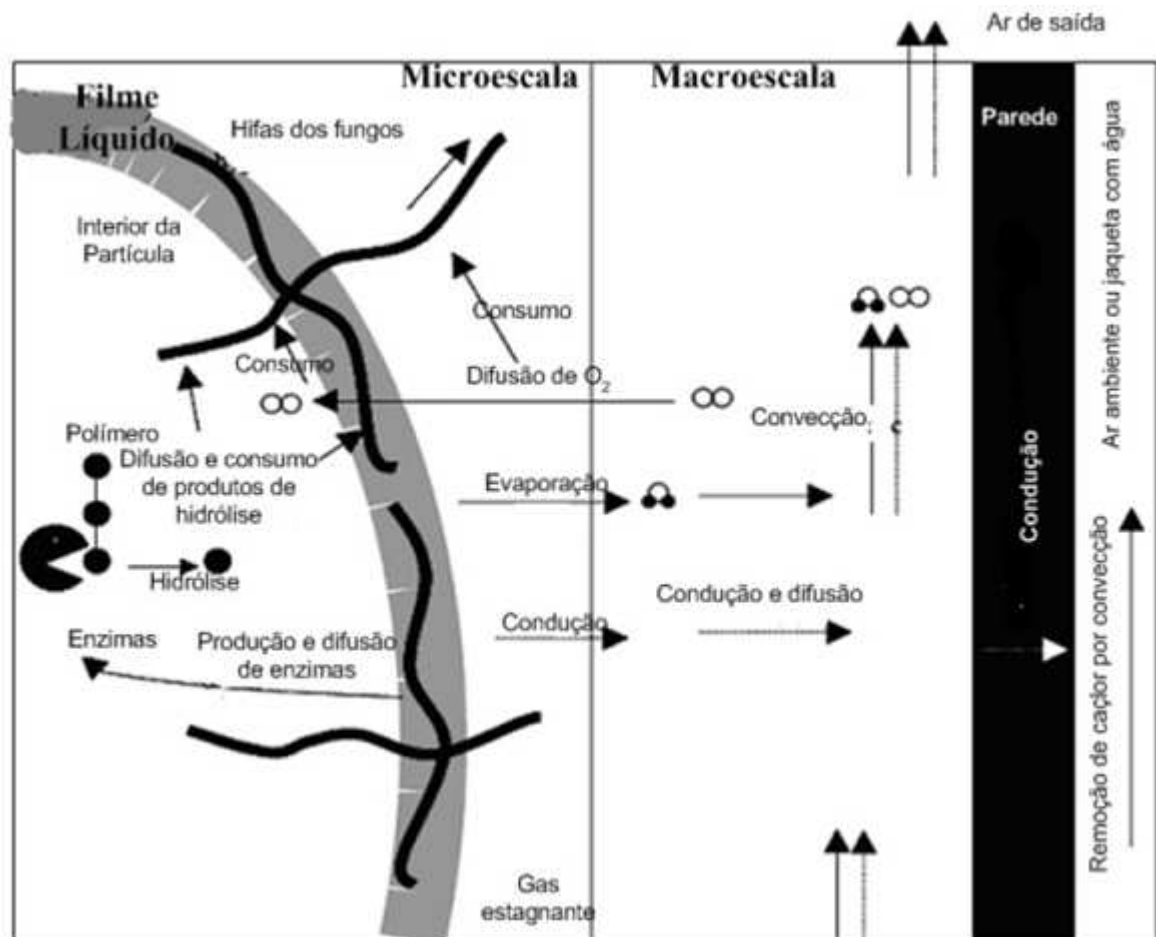


**Figura 2.14.** Diagrama esquemático dos fenômenos macroscópicos e microscópicos em um bioreator, (extraída de VICCINI et al., 2001).

Os fenômenos macroscópicos envolvem a transferência de energia e massa entre o substrato e a vizinhança, estando relacionados com a fase sólida e gasosa, envolvendo os mecanismos de troca de calor, condução e convecção e os mecanismos de transferência de massa, como evaporação da água, difusão e consumo de oxigênio e a respiração do microrganismo, entre outros. Por meio dos fenômenos microscópicos busca-se entender o comportamento cinético de crescimento celular do microrganismo. Esse desenvolvimento do microrganismo é dependente de fatores físicos como umidade, tamanho de partícula,

composição, secreção e difusão de enzimas extra-celulares, hidrólise do polímeros do substrato pelas enzimas e difusão do produto de hidrólise, (MITCHELL et al., 2000b).

Para o sucesso de testes em bioreator de bancada, é necessário que se faça estudo sobre as variáveis operacionais em escala de frasco. A partir disso, deve-se ter esclarecido os parâmetros da dinâmica e a cinética da fermentação para que se possa aumentar a escala. Na etapa de frasco são exploradas características do substrato, da solução nutriente e das condições operacionais (temperatura, pH, umidade do substrato, entre outros), avaliando-se os fenômenos microscópicos. Já na etapa de bioreatores, os parâmetros avaliados são as características do substrato (granulometria, tendência à compactação, higroscopicidade), a taxa de aeração, a temperatura (do meio e do ar percolante), a umidade, a dissipação do calor e o desenho do reator. De forma geral, nessa etapa busca-se conhecer os fenômenos macroscópicos (DURAND et al., 2003; RAGHAVARAO et al., 2003).

Alguns dos principais problemas encontrados na escala de bioreator de bancada é a formação dos gradientes de temperatura e de concentração de oxigênio. A temperatura e a concentração de oxigênio dentro do bioreator no início da fermentação possuem valores uniformes. No entanto, devido à atividade metabólica do microrganismo e à baixa condutividade térmica dos materiais sólidos, a remoção de calor torna-se lenta, gerando acúmulo de calor. Esse acúmulo pode ocasionar desnaturação do produto formado ou ocasionar a morte do microrganismo (PANDEY et al., 2003; ROSA et al., 2003).

Assim, em bioreator de leito fixo uma alternativa para tentar controlar a elevação da temperatura é manipular as variáveis temperatura e vazão do ar de entrada, de tal maneira que se mantenham as condições favoráveis ao crescimento do microrganismo, obtendo fornecimento adequado de oxigênio, manutenção da temperatura e da atividade de água.

O aumento da vazão do ar de entrada pode aumentar a remoção do calor metabólico devido ao método de resfriamento evaporativo. No entanto, esse processo pode resultar em

grandes perdas de umidade, (BARGA, 2007), ocasionando segregação de umidade ao longo do reator, prejudicando o leito e o desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, a produtividade enzimática como pode ser observado na Figura 2.15 (UMSZA-GUEZ, 2009).

O aumento excessivo da umidade também é uma condição adversa, pois os materiais sólidos usados em FES tendem a aumentar o volume com o aumento da umidade, diminuindo o volume dos poros e dificultando as trocas gasosas. Em situações extremas, os poros podem ser ocupados por água não ligada, prejudicando seriamente o desenvolvimento do fungo, devido a diminuição da oxigenação. Baixas umidades proporcionam maior oxigenação do meio; contudo, reduzem a acessibilidade dos nutrientes e a solubilidade de proteínas, resultando em baixo crescimento microbiano, (PANDEY et al., 2003; MITCHELL et al.2003; GERVAIS & BENSOUSSAN, 1994).

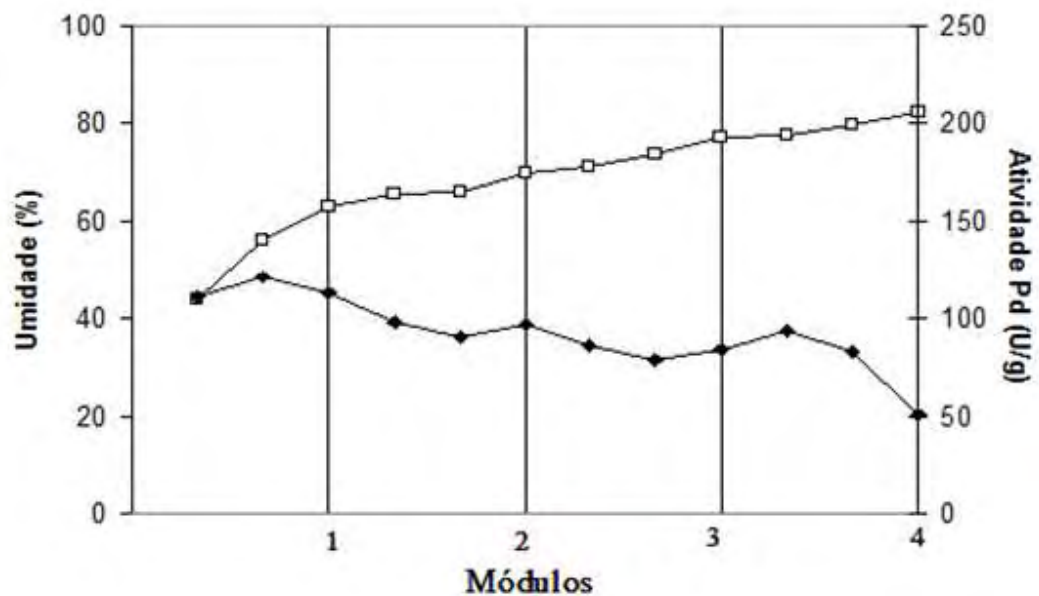


**Figura 2.15.** Perfil enzimático (pectinase) e de umidade do meio após a fermentação nas condições de temperatura do ar e da parede do reator em 50 °C e vazão de ar 120L/h (-♦- atividade enzimática e -□- umidade) (extraída de UMSZA-GUES 2009).

O aumento da escala de frasco para a escala de bioreator pode apresentar distinta produtividade enzimática. Kalogeris et al. (2003) utilizaram um bioreator de tambor rotativo e analisaram a produção das enzimas celulase, cellobiose,  $\beta$ -glicosidase, FPA,  $\beta$ -xilosidase. Por meio dos valores de atividade enzimática, constataram que a produção no bioreator foi maior que a produção em escala de frasco. Umsza-Guez (2009), em seu trabalho, avaliou a produção de pectinases pelo microrganismo termofílico *Thermomucor indicae-seudaticae* N31, em escala de frascos e em biorreator de bancada em leito fixo. A produção enzimática foi elevada, tanto na escala de frasco como na de reator, sendo observada uma produção ligeiramente maior na escala de frascos, devido a algumas dificuldades operacionais encontradas no bioreator.

### 3- MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental desenvolvido nesta dissertação foi feito nos laboratórios do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos e no Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada, ambos do IBILCE/UNESP.

#### 3.1. Materiais

##### ***3.1.1. Fungos utilizados no cultivo***

Para encontrar um fungo com boa produção de enzimas CMCase foram utilizados os fungos isolados pelo grupo de Pesquisa do Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada do IBILCE/UNESP, provenientes de pilhas de bagaço de cana da usina Guarani (localizada em Olímpia-SP). Esses microrganismos que foram utilizados para os testes de fermentação em estado sólido foram codificados como: I-1D3, I-1D5, I-3B, II-1D2, II-2D3, II-4D6-1, III-1GD5, III-3D1, III-3D2, IV-2B, N-20 e N-28.

O fungo I-1D3 foi o que apresentou melhores resultados, sendo enviado a CPQBA/UNICAMP para ser identificado. Esse fungo foi identificado como o *Myceliophthora sp.*, sendo que apenas experimentos com a proporção de 1:1 de bagaço de cana e farelo de trigo, a 45°C e 80% de umidade (b.u.), foram feitos nos ensaios de discriminação do fungo melhor produtor de enzimas celulolíticas. Todos os demais ensaios foram feitos apenas com o fungo *Myceliophthora sp.*

##### ***3.1.2. Ensaios de umidade do material sólido***

Os materiais utilizados como substratos foram o bagaço de cana e farelo de trigo, que foram tratados antes de seu uso, visto que apresentavam impurezas. O bagaço de cana foi lavado em água corrente até a retirada de restos de terra e sacarose residual. Após a lavagem,

o bagaço de cana foi seco a 80 °C em estufa de convecção forçada, até a obtenção de peso constante. Em seguida, foi peneirado com peneira de 3mm de abertura, para a retirada de material mais grosseiro, e, posteriormente com peneira de 1,41mm de abertura, para a retirada de poeira e partículas mais finas. O farelo de trigo foi lavado em água corrente para a retirada de impurezas, em seguida, foi seco a 80 °C em estufa de convecção forçada, até a obtenção de peso constante.

Foi feito ensaios de absorção de umidade com farelo de trigo e bagaço de cana para avaliar a capacidade máxima de absorção de umidade que cada material poderia incorporar no decorrer do tempo de 15 dias.

Na Figura 3.1 é apresentado diagrama esquemático do frasco empregado no ensaio de absorção de umidade no material sólido, que é composto de frasco de vidro de cerca de 0,2 L, com tampa de metal. Os frascos com as amostras foram colocados em câmara climática do tipo DBO à temperatura constante.

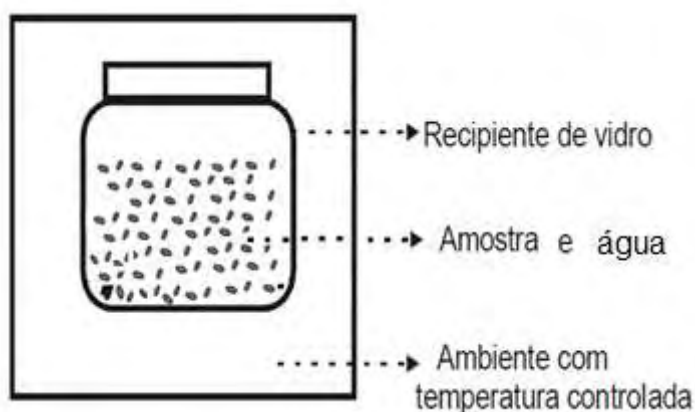


**FIGURA 3.1.** Frasco com solução aquosa com material sólido em temperatura controlada em câmara de DBO

Os ensaios foram feitos com 5,0g de material sólido inicialmente seco – farelo de trigo e bagaço de cana – acondicionados em frascos individuais, com adição de 20 ml de água destilada. Caso toda a água fosse absorvida, resultaria em material úmido com 80% de

umidade (b.u.). Posteriormente, os frascos foram hermeticamente fechados e dispostos na câmara DBO a 45°C.

### ***3.1.3 Ensaios em escala de sacos de polipropileno***

Os materiais utilizados como substrato foram bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo. O bagaço de cana foi cedido pela Usina Guarani, de Olímpia, SP e o farelo de trigo foi adquirido no comércio local.

Os sacos de polipropileno possuíam as dimensões de 12cm x 20cm, aos quais foram fixados tubos de PVC de 3,6 cm de diâmetro, dentro dos quais foram colocados algodão para evitar contaminação, como mostrado na Figura 3.2. Dentro de cada embalagem foi acoplado um arame na forma de espiral para facilitar a aeração e evitar a aglomeração do substrato, auxiliando no processo fermentativo.



**Figura 3.2.** Embalagem de polipropileno para FES

### ***3.1.4. Ensaios em fermentador de bancada***

No estudo de fermentação em escala de reator de leito empacotado foi empregado equipamento desenvolvido por Laurentino (2007) e Umsza-Guez (2009), cujo diagrama geral é apresentado na Figura 3.3 e 3.4. Nele o ar é fornecido por compressor (1) e filtrado para

remoção de impurezas por filtro cerâmico (2). A vazão foi monitorada através de conjunto de rotâmetro (3), a umidade e a temperatura do ar foram controladas através do umidificador em colunas de recheio, as quais foram empacotadas com esferas de vidros e cheias de água, sendo o ar forçado a percolar estes leitos saturados (4). O umidificador encontrava-se imerso em banho termostático, com temperatura controlada (5), do qual o ar saiu com a temperatura e a umidade desejada. As medidas de temperatura no interior do reator foram feitas por termopares (8).

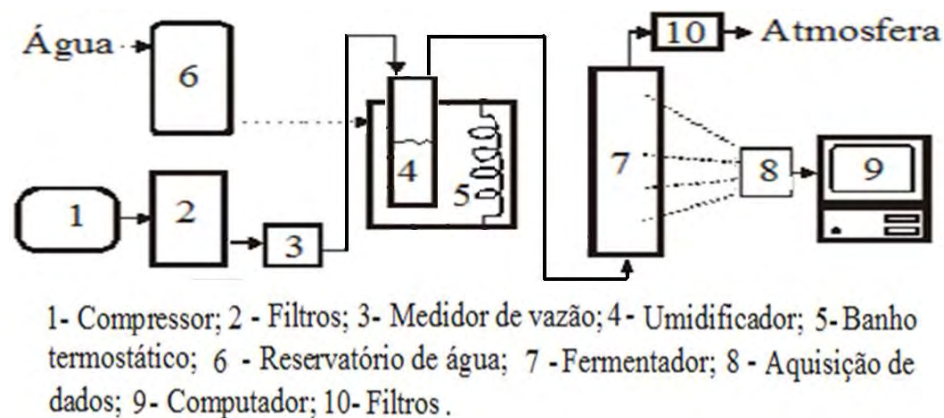


**Figura 3.3.** Diagrama geral do equipamento para fermentação em estado sólido

O bioreator é de aço-inoxidável, com geometria cilíndrica, com módulos de 10cm de comprimento, como mostrado na Figura 3.4. Cada módulo foi composto por dois cilindros concêntricos, tendo o diâmetro interno 7,62cm e o externo 9,25cm, sendo que no espaço anular circulou-se água, mantida à temperatura constante por um banho termostático.

O acoplamento de entrada do fermentador possui formato de cone, no qual foram inseridas esferas de vidro de 3mm de diâmetro para homogeneizar a distribuição do ar na entrada da seção de fermentação.

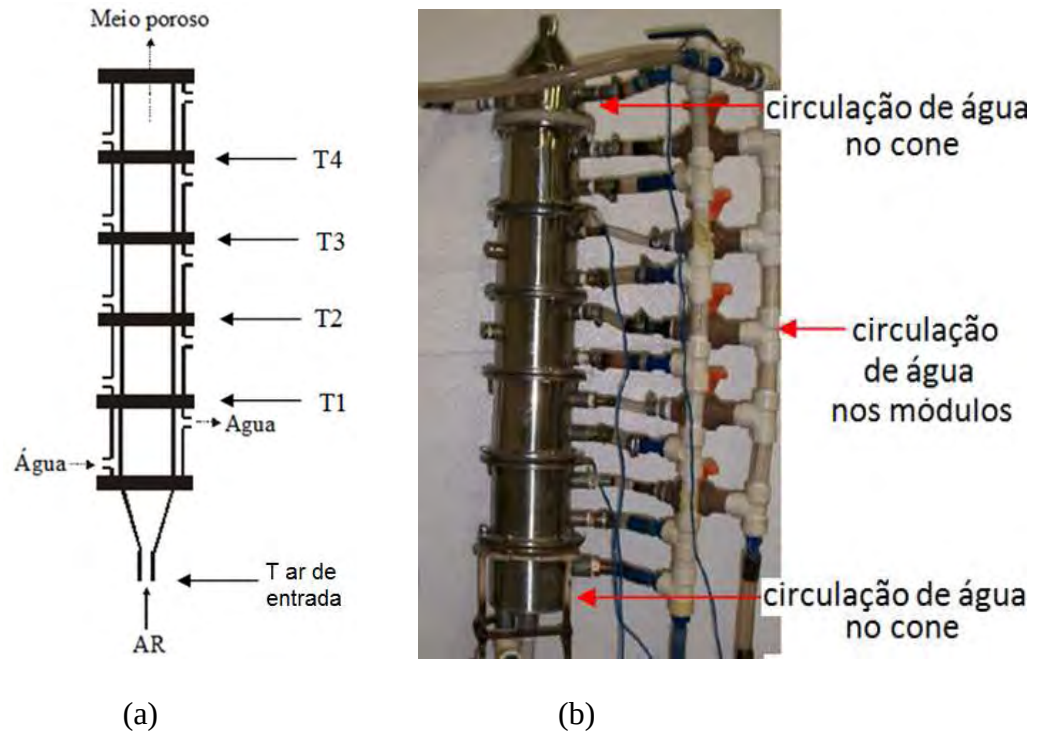


**Figura 3.4.** Fermentador Em Leito Fixo Para FES (a – Diagrama Esquemático, b – Vista Lateral), (Tar de entrada e T1 à T4 = termopar)

A configuração do leito em módulos foi adotada para avaliar os efeitos longitudinais de segregação de umidade e facilitar a coleta de dados de temperatura e do meio poroso para posterior verificação da atividade enzimática. As medidas de temperatura no interior do reator foram feitas por termopares do tipo T inseridos radialmente no reator através de flanges de nylon postadas entre os módulos, sendo a extremidade dos sensores colocados na posição radial central. Os sinais eram registrados digitalmente através do sistema de aquisição de dados National Instruments, operado por rotina do software LabVIEW 8.5.

## 3.2. Método Experimental

### 3.2.1. Método Experimental em Sacos de Polipropileno

#### 3.2.1.1. Ensaios de absorção de umidade

Para a determinação da absorção máxima de umidade foi retirado um frasco a cada 24 horas do climatizador. O material desse frasco foi colocado sobre papel toalha para a retirada

da água excedente. Em seguida, uma quantidade desse material foi colocada em placa de petri, pesado e deixado em estufa a 120°C por 24 horas. Posteriormente, esse material seco foi pesado. Esse procedimento foi feito com o farelo de trigo e o com o bagaço de cana.

### 3.2.1.2. Análise da composição centesimal do bagaço de cana e farelo de trigo

A análise de composição centesimal dos substratos bagaço de cana e farelo de trigo foi feito pela empresa Biobell Technologies, localizada em Mirassol/SP. As análises feitas foram cinzas, matéria seca, proteína bruta, fibras em detergente neutro e ácido e lignina, conforme descrito por Campos (2002).

#### 3.2.1.2.1. Análise de cinzas e matéria seca (MS)

Para a determinação da matéria seca, inicialmente a amostra foi parcialmente seca a 60°C (1ªMS) e posteriormente determinou-se o teor de massa seca a 105°C (2ªMS). Para a análise, pesou-se amostra do substrato que foi colocado em recipiente previamente tarado. Em seguida, essa amostra foi colocada em estufa com aeração forçada e deixada por 72 horas a temperatura de 60°C. Após esse período, a amostra foi deixada em dessecador até atingir a temperatura ambiente e em seguida, pesada em balança analítica. O valor da 1ª massa seca foi determinado por meio da equação 1.

$$1^{\text{a}}\text{MS (\%)} = \{(Tara + Aps - Tara) / Au\} \times 100 \quad (1)$$

Onde: MS = massa seca, Tara = Peso do recipiente, Aps = amostra seca a 60°C, Au = amostra úmida.

A determinação da 2ªMS foi feita da seguinte forma: em cadinho devidamente pesado foi colocado 1,0 g da amostra (1ªMS), que foi colocada em estufa a 105°C por 12 horas. Após esse período, ela foi deixada em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesada. O valor da 2ª massa seca foi determinado por meio da equação 2.

$$2^{\text{a}}\text{MS} (\%) = \{(\text{Pcad} + \text{As} - \text{Pcad}) / 1^{\text{a}}\text{MS}\} \times 100 \quad (2)$$

Onde: Pcad = peso do cadinho, As = amostra seca a 105°C, 1ªMS = amostra seca a 60°C

Para a determinação de cinzas ou Matéria Mineral (MM), inicialmente a amostra foi colocada em cadinho, pesada e incinerada a 550°C em mufla por 3 horas. Após esse período, a temperatura foi reduzida para 200°C com o desligamento do equipamento e abertura da tampa por 30 minutos; o cadinho foi colocado em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesado em balança analítica. O valor da cinzas foi determinado por meio da equação 3.

$$\text{MM}(\%) = \frac{\{(\text{peso cadinho} + \text{cinzas} - \text{peso do cadinho}) \times 100\}}{\text{peso da amostra}} \quad (3)$$

#### 3.2.1.2.2. *Análise de proteína bruta (PB)*

A proteína bruta ou nitrogênio total foi determinada pelo método Micro Kjeldahl. Em amostra do substrato de 0,5g foi adicionado 8,0 mL de solução digestora que foi submetida ao aquecimento em bloco digestor até a solução apresentar coloração verde cristalina e translúcida. Após a adição de 10 mL de água destilada, a solução foi destilada em destilador de amônia. Ao final foi realizada a quantificação da amônia por titulação. O valor de proteína bruta foi determinado por meio da equação 4.

$$(\%)N = \{\text{vol}(\text{HCl}) \times N/10 \times 0,014 \times 100 / \text{peso da amostra (g)} / 2^{\text{a}} \text{MS} \times 100\} \quad (4)$$

Onde: vol(HCl) = volume gasto na titulação com HCl 0,1N; N/10 = valor normalidade de HCl 1N diluído por 10 vezes; fator do ácido = 1mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> equivale a 0,014 de nitrogênio.

$$\text{PB} (\%) = (\%)N \times 6,25$$

#### 3.2.1.2.3. *Análise de fibra em detergente neutro (FDN)*

Em 1,0 g de amostra foi adicionado 100 mL de solução detergente neutro, essa solução foi aquecida até a ebulição e deixada em fervura no ebulidor de refluxo por 60

minutos. O conteúdo foi filtrado a vácuo em cadinho de Gooch. O resíduo presente no cadinho foi colocado em estufa a 105°C por 12 horas. Em seguida, a amostra foi esfriada em dessecador e pesada obtendo-se assim o peso do resíduo (FDN) da amostra. O resíduo foi incinerado em mufla a 550°C por 3 horas e, após esfriar no dessecador, o cadinho foi pesado com as cinzas. O valor de fibras em detergente neutro foi determinado por meio da equação 5.

$$(\%)FDN = \frac{\{[(Tara\ do\ cadinho + FDN) - Tara\ do\ cadinho] \times 100/2^a\ MS\}}{Peso\ da\ amostra} \quad (5)$$

#### 3.2.1.2.4. *Análise de fibra detergente ácido (F.D.A)*

Mesmo procedimento da análise do item 3.2.1.2.3., usando o detergente ácido ao invés do detergente neutro.

#### 3.2.1.2.5. *Análise de lignina*

Em cadinho foi colocado o resíduo da determinação de FDN não incinerado, sendo adicionado ácido sulfúrico a 72%. O volume de ácido foi completado até a total imersão da amostra no ácido por 3 horas, em seguida a amostra foi lavada com água destilada fervente. O cadinho foi levado para estufa a 105°C por 12 horas e, após esse período, a amostra foi esfriada em dessecador e pesada. O resíduo foi incinerado em mufla a 550°C por 3 horas. Após esfriar em dessecador, o cadinho foi pesado com as cinzas. O valor de lignina foi determinado por meio da equação 6.

$$(\%)Lig = \frac{\{[(Tara\ do\ cadinho + res.AC) - Tara\ do\ cadinho] - [(Tara\ do\ cadinho + res.\ mufla) - Tara\ do\ cadinho] \times 100/2^a\ MS\}}{Peso\ da\ amostra} \quad (6)$$

Onde: res. AC = resíduo após tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 72%

#### 3.2.1.3. Meio de cultivo

O fungo selecionado (*Myceliophthora sp.*) foi estocado para a sua conservação em tubos criogênicos contendo o meio de Agar Sabouraud Dextrose (Oxoid) inclinado com adição de glicerol a 20%, à temperatura de -20°C. Também foi mantido em tubos contendo o meio de Agar Sabouraud Dextrose (Oxoid) inclinado, com a adição de óleo mineral e também em água destilada, ambos conservados em geladeira a 5°C.

#### 3.2.1.4. Preparo dos substratos

Foram utilizadas duas técnicas de preparo das fibras do bagaço de cana seco. A primeira por simples peneiramento, como descrito no item 3.1.2. Para a segunda, antes do peneiramento o bagaço foi triturado com picador elétrico de 2CV de potência e 60HZ, com peneira de 3 mm de diâmetro. Posteriormente, esse material triturado foi peneirado em peneira de 1,41mm de abertura, para a retirada de poeira e partículas mais finas.

#### 3.2.1.5. Preparo do Pré-inóculo

Os fungos isolados foram transferidos para tubos de ensaio inclinados contendo o meio de cultura Sabouraud e em seguida, foram deixados por período de 48 horas a 45°C em estufa termostaticada (DBO). Posteriormente, fez-se o preparo do pré-inóculo dos fungos desenvolvidos nos tubos de repique, que foram introduzidos em erlenmeyers contendo os meios de cultura Sabouraud e incubados por 48 horas a 45°C

#### 3.2.1.6. Ensaios fermentativos

Inicialmente, os ensaios fermentativos foram feitos com bagaço de cana e farelo de trigo na proporção de 1:1 (p/p). Esta proporção inicial foi adotada para possibilitar maior

flexibilidade aos ensaios futuros, para os quais foi feito um planejamento estatístico de experimentos que incluía a variação da composição do meio.

Esses substratos foram colocados nos sacos de polipropileno, os quais foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos. No mesmo procedimento de autoclavagem, foi esterilizado frasco contendo solução nutriente composta de 0,35% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,3% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05% de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05% de  $\text{CaCl}_2$  e 0,1% de Tween em pH 5,0. Depois desta etapa, iniciou-se a inoculação em sala asséptica apropriada e introduziu-se o pré-inóculo na solução nutriente e, com o auxílio de uma haste, raspou-se a superfície do meio Sabourad para a liberação dos esporos na solução. Destaca-se que a concentração de esporos foi de aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  esporos/mL em todos os ensaios, sendo a contagem dos esporos feita em câmara de Neubauer. Introduziu-se essa solução nutriente com o inóculo nos sacos de polipropileno, numa quantidade satisfatória para que o meio atingisse a umidade de 80% ou a quantidade requerida para os testes de umidade inicial. Em seguida, o material foi manualmente revolvido para homogeneização e levado para câmara DBO, cuja temperatura foi ajustada para o valor previsto no planejamento experimental.

A fermentação foi realizada com amostras individuais de saco de polipropileno, sendo recolhidas amostras a cada 48 horas, totalizando a utilização de 7 amostras com período de 14 dias de fermentação. A extração das enzimas brutas foi feita adicionando-se 100 mL de água destilada ao material fermentado, que foi revolvido manualmente e posteriormente agitado por 30 minutos em *shaker* a 100 rpm para a homogeneização. Alguns ensaios foram feitos empregando-se outros solventes, que não a água, para a extração das enzimas, como descrito no item 3.2.1.7. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta (extrato), que foi utilizada para a determinação de atividade enzimática.

#### 3.2.1.7. Efeito do solvente na extração das enzimas

Com o intuito de determinar o melhor solvente para a extração das enzimas, foram feitos ensaios fermentativos em sacos de polipropileno na temperatura de 45°C, na proporção de 1:1 bagaço de cana e farelo de trigo, com umidade inicial de 80%.

Na etapa de extração da enzima foram utilizados três solventes: água; tampão acetato na concentração de 20 mM com pH 5,0; tampão fosfato na concentração de 20 mM com pH 7,0; tween 20, na concentração de 0,01%. Os testes também foram feitos em três diferentes concentrações de 8, 16 e 24 ml de cada solvente para cada grama de substrato utilizado na fermentação.

#### 3.2.1.8. Estabilidade da enzima em função do período de armazenamento do extrato

Para avaliar a influência do tempo de armazenamento sobre a atividade das enzimas, amostras do extrato foram colocados em refrigerador doméstico a 5°C. Foram feitos testes de atividade enzimática da enzima celulase empregando-se amostras provenientes de extração com três diferentes volumes de água (8, 16 e 24 ml), em três diferentes períodos (0, 10 e 30 dias).

#### 3.2.1.9. Análise da repetibilidade de produção enzimática

Com o intuito de avaliar quantitativamente a repetibilidade de ensaio para produção de enzimas, foram feitos 10 repetições independentes de ensaio a 45°C, com a proporção 1:1 de bagaço de cana e farelo de trigo e 80% de umidade inicial, coletando-se amostras em intervalos de 48 horas até 336 horas. Foi feita análise estatística descritiva e de variância para estimar a variabilidade dos ensaios.

3.2.1.10. Determinação da proporção ótima de bagaço de cana e farelo de trigo em diferentes temperaturas de fermentação

Para a determinação da proporção ótima de bagaço de cana e farelo de trigo para a produção enzimática, foram feitos experimentos com bagaço de cana e farelo de trigo em três diferentes proporções (1:1, 7:3 e 9:1) e em três diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C). O tempo de fermentação total foi de 288 horas, retirando-se amostras a cada 48 horas.

3.2.1.11. Determinação da umidade inicial ótima em diferentes temperaturas de fermentação

Para verificar a influência da umidade inicial na produção enzimática, foram feitos experimentos com umidade inicial de fermentação em três diferentes teores (75, 80 e 85%) e com o melhor resultado de temperatura de fermentação e proporção de bagaço de cana e farelo de trigo obtidos no item 3.2.1.8. O tempo de fermentação foi de 288 horas, retirando-se amostras a cada 48 horas.

3.2.1.12. Avaliação da atividade enzimática

3.2.1.12.1. Avaliação da atividade de CMCase e Xilanase

As atividades enzimáticas de CMCase e xilanase, foram determinadas a partir de reações contendo 0,1 mL da solução enzimática e 0,9 mL de solução de carboximetilcelulose (CMC – Sigma), para os testes da atividade da enzima de CMCase, e 0,9 mL de solução de xilana (Sigma), para os testes da atividade da enzima de xilanase. A reação foi mantida a 60°C por 10 minutos em banho-maria, sendo interrompida pela adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido 1-3-dinitrosalicílico) usado para a quantificação dos açúcares redutores liberados, como proposto por (Miller, 1959), a partir da curva padrão de glicose. Em seguida, essa

solução foi mantida em água em ebulição por 10 minutos, sendo a reação interrompida com o abaixamento da temperatura em banho de gelo.

Posteriormente, adicionou-se 8,0 mL de água destilada à solução que foi agitada em agitador de tubos. Em seguida, foi feita a leitura da atividade enzimática em um espectrofotômetro a 540 nm. O mesmo procedimento foi feito para a determinação da absorbância da amostra controle, à qual foi adicionado 0,1 mL de água destilada em lugar do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto de reação por mL de extrato enzimático.

#### *3.2.1.12.2. Avaliação da atividade de PFase*

A atividade das enzimas celulolíticas pela técnica de papel de filtro (PFase) avalia a ação das enzimas celulolíticas endogluconases, exo-glucanases e  $\beta$ -glicosidase sobre substrato celulósico cristalino. A atividade foi quantificada de acordo com a metodologia proposta por Miller (1959).

A atividade foi obtida pela liberação de açúcares redutores na mistura de reação contendo como substrato papel filtro Whatman nº1, cortado em tiras de 1x6cm (aproximadamente 50 mg), imerso em 0,9 mL de tampão ácido acético/NaOH 0,1M, pH 5,0 e 0,1 mL de extrato enzimático bruto. A reação foi efetuada em banho-maria com agitação (150 rpm) na temperatura de 60°C durante 60 minutos. Em seguida a reação foi interrompida pela adição de 1,0mL de reagente DNS (ácido 3-5-dinitrosalicílico), sendo o restante do procedimento é similar ao descrito no item 3.2.1.10.1.

### **3.2.2. Método experimental em escala de reator**

Após a conclusão dos ensaios microbiológicos para a discriminação do fungo e a determinação das variáveis físicas (temperatura, proporção de substrato, umidade inicial e tempo de reação) em escala de sacos de polipropileno, deu-se início à fermentação em bioreator de leito fixo, tendo a vazão do ar de entrada, a temperatura da camisa de resfriamento e a do ar de entrada como as variáveis de estudo. Devido às características termofílicas e de rápido crescimento do fungo não foi necessário esterilizar o fermentador.

A proporção de bagaço de cana e farelo de trigo foi determinada no experimento do item 3.2.1.10, qual seja, de 7:3 respectivamente. Esse material foi acondicionado em sacos de polipropileno em quantidades de 15g cada, totalizando 10 sacos, as quais foram autoclavadas a 120°C durante 20 minutos e posteriormente inoculado e empacotado no fermentador.

Os substratos adicionados ao bioreator foram separados por telas de plástico que permitia a passagem de umidade e gases ( $O_2$  e  $CO_2$ ), porém, impedia a mistura dos materiais. O reator foi porcionado em 10 porções possuindo a mesma massa, sendo utilizado bagaço de cana umedecido nos módulos inferior e superior, conforme a Figura 3.5. A duração dos ensaios fermentativos foi determinada com base nos testes em saco de polipropileno, sendo fixado o melhor tempo de produção de enzimas obtido no teste em saco de polipropileno.

Após a fermentação, as amostras foram analisadas quanto a atividade enzimática de celulase e de umidade. A extração das enzimas brutas foram feitas adicionando-se 300 ml de água destilada em cada amostra de 15 gramas de substrato, que foi revolvida manualmente e posteriormente agitada por 30 minutos em agitador orbital a 100 rpm para a homogeneização do substrato. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 g durante 15 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta, que foi utilizada no teste de atividade enzimática. A avaliação da atividade de CMCase foi feita com a metodologia descrita no item 3.2.1.12.1.

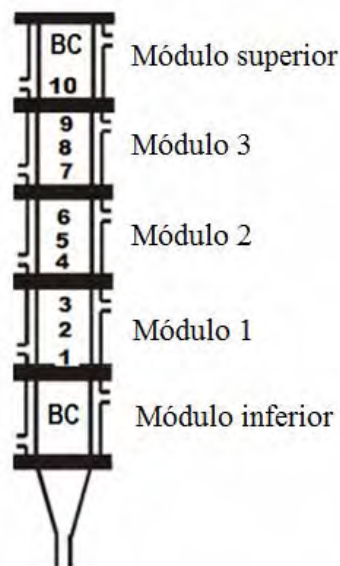


**Figura 3.5.** Separação do substrato em 10 porções no bioreator e utilização de bagaço de cana umedecido (BC) nos módulos inferior e superior

Para a avaliação da umidade final do substrato no bioreator, foi retirada uma porção de material fermentado de cada amostra (totalizando 10 amostras) do bioreator e com a utilização de balança analítica determinou-se a sua massa. Em seguida, este material foi seco a 80°C em estufa de convecção forçada, até a obtenção de peso constante.

Para verificar a influência da vazão do ar e da temperatura de fermentação no bioreator, foram feitos experimentos com duas temperaturas 45 e 50°C, tanto para o ar, como para a camisa, e vazão do ar de entrada em três diferentes valores (80, 100 e 120 L/h).

### 3.3. Tratamento estatístico dos dados

Algumas análises estatísticas foram empregadas para validar os resultados obtidos. Ao longo da apresentação e discussão dos resultados os métodos estatísticos são citados. Todas as análises foram feitas através do *software* Minitab versão 15 (Minitab Inc.).



**Tabela 4.2:** Atividade enzimática de Xilanase obtidos em embalagem de polipropileno na etapa de seleção do microrganismo

| Fungo    | Tempo<br>(horas) | Atividade da enzima Xilanase (U/g) |     |     |     |     |     |     |
|----------|------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|          |                  | 48                                 | 96  | 144 | 196 | 240 | 288 | 336 |
| I-1D3b   |                  | 501                                | 714 | 633 | 564 | 517 | 607 | 325 |
| IV-2B    |                  | 80                                 | 120 | 208 | 494 | 148 | 375 | 448 |
| III-3D2  |                  | 213                                | 92  | 165 | 142 | 120 | 188 | 167 |
| N-20     |                  | 37                                 | 56  | 138 | 76  | 245 | 105 | 328 |
| III-3D1  |                  | 163                                | 178 | 234 | 272 | 268 | 292 | 195 |
| III-1GD5 |                  | 164                                | 193 | 190 | 171 | 227 | 166 | 238 |
| N-28     |                  | 315                                | 299 | 172 | 288 | 270 | 282 | 105 |
| I-3B     |                  | Produção não significativa         |     |     |     |     |     |     |
| I-1D5    |                  |                                    |     |     |     |     |     |     |
| II-1D2   |                  |                                    |     |     |     |     |     |     |
| II-2D3   |                  |                                    |     |     |     |     |     |     |
| II-4D6-1 |                  |                                    |     |     |     |     |     |     |

**Tabela 4.3:** Máxima atividade enzimática de Xilanase e CMCase obtida e seu período de cultivo na etapa de seleção do microrganismo

| Fungos   | XILANASE                   |                    | CMCase                |                    |
|----------|----------------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|          | Máxima produção (U/g)      | Cultivo (amostras) | Máxima produção (U/g) | Cultivo (amostras) |
| I-1D3b   | 714                        | 2                  | 730                   | 6                  |
| IV-2B    | 494                        | 4                  | 628                   | 7                  |
| III-3D2  | 213                        | 1                  | 433                   | 3                  |
| N-20     | 328                        | 7                  | 410                   | 7                  |
| III-3D1  | 292                        | 6                  | 238                   | 7                  |
| III-1GD5 | 238                        | 7                  | 160                   | 7                  |
| N-28     | 288                        | 4                  | 174                   | 7                  |
| I-3B     | Produção não significativa |                    |                       |                    |
| I-1D5    |                            |                    |                       |                    |
| II-1D2   |                            |                    |                       |                    |
| II-2D3   |                            |                    |                       |                    |
| II-4D6-1 |                            |                    |                       |                    |

Em uma primeira etapa dos testes buscou-se encontrar a máxima produção enzimática entre os fungos selecionados, sem, no entanto, alterar as variáveis temperatura, umidade inicial e proporção dos substratos, que foram estudadas na sequência deste trabalho, com o fungo que apresentou maior produtividade na etapa atual. Por meio dos resultados obtidos, verificou-se que, dentre os fungos analisados, o fungo I-1D3b apresentou a maior produção enzimática tanto para a enzima xilanase (714 U/g, na segunda amostra ou 96 horas de fermentação), quanto para a enzima CMCase (730 U/g, na sexta amostra, ou seja, 288 horas de fermentação).

Observou-se que o fungo IV-2B apresentou produção significativa para CMCase (628U/g na sétima amostra ou 336 horas de cultivo), embora não tenha apresentado produção significativa para xilanase. Os fungos III-3D2, N-20, III-3D1, III-1GD5 e N-28 apresentaram baixa produção para ambas as enzimas. Por fim, verificou-se que os fungos I-3B, I-1D5, II-1D2, II-2D3 e II-4D6-1 não produziram as enzimas desejadas em quantidade que pudessem ser detectadas pelos métodos analíticos empregados.

Nas Tabelas 4.4 e 4.5 são apresentadas as atividades enzimáticas fornecidas para xilanase e CMCase, respectivamente, obtidas por FES, compiladas de trabalhos publicados na literatura. Observa-se que os valores obtidos no presente trabalho são próximos aos maiores valores encontrados.

Para a xilanase o único valor que foi muito superior ao obtido com o fungo I-1D3b, foi o obtido por Silva et al. (2005), com o fungo *Thermoascus aurantiacus*, em farelo de trigo. Da mesma forma, para a CMCase, o único valor que foi muito superior ao obtido com o fungo I-1D3 foi o obtido por Kalogeris et al. (2003), com o fungo *Thermoascus aurantiacus*, em farelo de trigo.

**Tabela 4.4.** Atividade de xilanase por vários autores

| <b>Microrganismo</b>                 | <b>Substrato</b>                                  | <b>xilanase<br/>(U/g)</b> | <b>Referências</b>     |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------|------------------------|
| <i>Trichoderma longibrachiatum</i>   | Farelo de trigo                                   | 738                       | Ridder et al. (1999)   |
| <i>Bacillus sp</i>                   | Farelo de trigo                                   | 700                       | Gessesse & mano (1999) |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i> miehe | Bagaço de cana                                    | 220                       | Silva et al. (2005)    |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i> miehe | Farelo de trigo                                   | 1280                      | Silva et al. (2005)    |
| <i>Aspergillus ninger</i> 3T5B8      | Farelo de trigo com a adição de 0,1% de celobiose | 806                       | Couri et al. (2000)    |

**Tabela 4.5:** Atividade de CMCase por vários autores

| <b>Microrganismo</b>            | <b>Substrato</b>   | <b>CMCase<br/>(U/g)</b> | <b>Referências</b>          |
|---------------------------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|
| <i>Fusarium oxysporum</i>       | Sabugo de milho    | 304                     | Panagiotou et al. (2003)    |
| <i>Funalia trogi</i> IBB 146    | Palha de trigo     | 356                     | Kachlishivili et al. (2006) |
| <i>Sporotrichum thermophile</i> | Polpa de beterraba | 109                     | Grajek et al. (1987)        |
| <i>Trichoderma koningi</i> F244 | Farelo de trigo    | 287,3                   | Li et al. (2004)            |
| <i>Termoascus aurantiacus</i>   | Palha de trigo     | 1572                    | Kalogeris et al. (2003)     |
| <i>Aspergillus ninger</i> KK2   | Palha de arroz     | 129                     | Kang et al. (2004)          |
| <i>Aspergillus ninger</i> M11   | Sabugo de milho    | 563                     | Gao et al. (2008)           |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i>  | Bagaço de cana     | 60                      | Silva et al. (2005)         |
| <i>Thermoascus aurantiacus</i>  | Farelo de trigo    | 600                     | Silva et al. (2005)         |

Na Figura 4.1 apresenta-se a cinética de produção de endoglucanase e xilanase do fungo I-1D3b, em que se verifica a produção da enzima xilanase e CMCase com os substratos de bagaço de cana e farelo de trigo. Observa-se que o pico de produção de xilanase 714 U/g, ocorreu em 96h, mesmo tempo observado por Silva e Couri para a produção da mesma enzima com farelo de trigo. O fato de a produtividade dar-se em tempo relativamente curto contribui para que haja diminuição dos gastos operacionais e do risco de contaminação em etapa industrial.

A respeito da produção de CMCase, observa-se que o pico de produção 730 U/g ocorreu em 288 horas, enquanto que Silva obteve produção máxima em 96 horas. Nota-se que com 96 horas de processo, a produção de CMCase foi próxima a 500 U/g. Assim, seria necessário uma análise custo/benefício para que se possa decidir qual a melhor alternativa operacional: terminar o processo com 96 horas, com menor atividade, mas com economia de energia ou aguardar tempo mais longo, com mais enzimas, destacando-se que há redução de xilanase com 288 horas de processo.

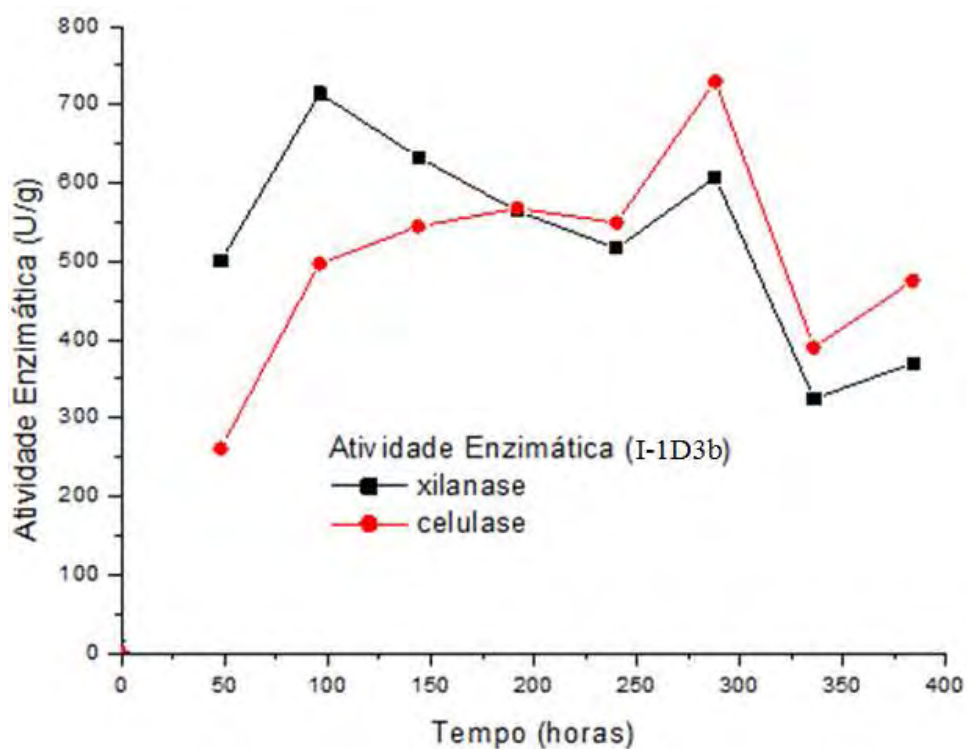


**Figura 4.1.** Produção enzimática de xilanase e CMCase pelo fungo I-1D3b

#### 4.1.2. Identificação do fungo I-1D3b

O fungo I-1D3 foi enviado para identificação ao laboratório do CPQBA/UNICAMP, Paulínia, SP, sendo identificado como *Myceliophthora sp.*

Esse fungo apresentou aspecto de colônia cotonosa branca, como se pode verificar na Figura 4.2. Essa característica contribui positivamente para a condução dos experimentos, pois facilita a identificação de possíveis contaminantes de coloração diferente. O fungo

apresentou bom crescimento e esporulação em meio gelatinoso, como também no substrato sólido utilizado, bagaço de cana e farelo de trigo.



**Figura 4.2.** Aspecto do fungo *Myceliophthora* sp.

Trata-se de fungo termofílico deuteromiceto (SHARMA et al., 2008), tendo vários gêneros sido utilizados na literatura, tais como, *Myceliophthora thermophila*, *Myceliophthora hinnulea*, *Myceliophthora fergusii* (SALAR & ANEJA, 2007), *Myceliophthora* sp (SONIA et al., 2004) e *Myceliophthora* sp. IMI 389099 (BADHAN et al., 2007), *Myceliophthora* sp. M.7.7 (MORETTI, 2010).

Sonia et al. (2004) estudaram a produção de diferentes hemicelulases ( xilanase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -galactosidase, acetil esterase,  $\beta$ -manosidase e  $\beta$ -glucosidase) por fermentação submersa, demonstrando que o fungo *Myceliophthora* sp. produz várias enzimas hemicelulolíticas.

Soni et al. (2008) estudaram a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas pelos fungos *Myceliophthora sp* (V2A2), *Myceliophthora fergusii* (T41) e *Myceliophthora sp* (MYC) por FES cultivado em palha de arroz, enquanto que Bandhan et. al.(2007) empregaram o fungo *Myceliophthora sp.* (IMI 387099) cultivado em vários substratos (palha de arroz, palha de trigo, bagaço, sabugo de milho e farelo de trigo) para produzir enzimas das mesmas classes. Na Tabela 4.6 apresenta-se a produção enzimática destes fungos, bem como a do presente trabalho.

Nota-se que a produção de CMCase (endoglucanase) e FPase, no presente estudo, foi muito superior às produções obtidas em outros estudos. Com relação à enzima xilanase, o resultado obtido nesse trabalho revelou-se próximo aos maiores obtidos por outros autores. Deste modo, evidencia-se o bom potencial tecnológico do fungo em questão na produção destas enzimas por FES.

**Tabela 4.6:** Produção de enzimas pelo fungo *Myceliophthora sp.* por outros autores

| <b>Enzimas</b><br><b>Fungo</b>            | <b>Substrato</b>                    | <b>CMCase<br/>(U/g)</b> | <b>Xilanase<br/>(U/g)</b> | <b>FPase<br/>(U/g)</b> | <b>Ref</b>             |
|-------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| <i>Myceliophthora sp</i><br>(V2A2)        | Palha de arroz                      | 31,3                    | 590,2                     | 0,63                   | Soni et al (2008)      |
| <i>Myceliophthora fergusii</i> (T41)      | Palha de arroz                      | 36,7                    | 884,7                     | 2,29                   | Soni et al (2008)      |
| <i>Myceliophthora sp</i><br>(MYC)         | Palha de arroz                      | 35                      | 900,2                     | 2,44                   | Soni et al (2008)      |
| <i>Myceliophthora sp.</i><br>(IMI 389099) | Bagaço de cana                      | 6,62                    | 620,1                     | 0,70                   | Badhan et al<br>(2007) |
| <i>Myceliophthora sp.</i><br>(IMI 389099) | Farelo de trigo                     | 26,6                    | 128,9                     | 0,74                   | Badhan et al<br>(2007) |
| <i>Myceliophthora sp.</i>                 | Bagaço de cana e<br>Farelo de trigo | 800                     | 900                       | 8,30                   | (Este trabalho)        |

#### 4.1.3. Testes preliminares

Antes de fazer os ensaios definitivos com o fungo *Myceliophthora sp.* no meio de cultivo bagaço de cana e farelo de trigo, optou-se por fazer alguns ensaios preliminares acerca da influência do farelo de trigo como único substrato para a produção de CMCase, bem como o efeito de diferentes solventes na extração das enzimas, estabilidade das enzimas depois de um período de armazenamento de até 30 dias após a extração e repetibilidade dos resultados. Estes ensaios preliminares visaram dar maior certeza às análises e conclusões dos testes definitivos.

##### 4.1.3.1. Influência do substrato na produção de CMCase

Inicialmente foi feita a análise centesimal dos substratos bagaço de cana e farelo de trigo utilizados neste trabalho. Esta análise foi feita na empresa Biobell Technologies, localizada em Mirassol/SP. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.7.

**Tabela 4.7:** Análise de composição centesimal do bagaço de cana e do farelo de trigo (em % p/p)

|                | Bagaço de cana | Farelo de trigo |
|----------------|----------------|-----------------|
| Matéria seca   | 87,46          | 88,03           |
| Proteína bruta | 0,00           | 17,77           |
| Lignina        | 8,99           | 7,04            |
| Hemicelulose   | 33,39          | 43,03           |
| Celulose       | 45,97          | 15,22           |

Observa-se que o farelo de trigo possui quantia considerável de celulose em sua composição, que provavelmente atuará como indutor de celulasas nos períodos iniciais de fermentação. O intuito original do projeto é o de empregar bagaço de cana de açúcar para a

produção das enzimas, sendo o farelo de trigo utilizado apenas como fonte de nutrientes para os estágios iniciais de incubação.

Nos ensaios iniciais utilizou-se bagaço de cana e farelo de trigo na proporção de 1:1, observou-se boa produção em tempos curtos, que se suspeitava estar atribuída ao farelo de trigo, pois o trabalho de Soni et al. (2008) e Badhan et al. (2007) apresentaram bons resultados para fungos do mesmo gênero cultivados apenas em farelo de trigo (Tabela 4.4). Assim, os ensaios com farelo de trigo como única fonte de carbono puderam elucidar a importância deste substrato na produção de endoglucanase.

A Figura 4.3, apresenta o resultado dos ensaios com farelo de trigo e com a mistura entre farelo de trigo e bagaço de cana na proporção 1:1. Onde pode-se observar elevada produção da enzima nos primeiros períodos de fermentação (até 144 horas), quando apenas farelo de trigo foi utilizado como substrato, havendo redução no prosseguimento do processo. Analisando o teste com 50% de farelo de trigo, observou-se que a produção de enzima foi superior e constante até o período de 144 horas, apresentando um pico em 196 horas e leve decréscimo nos tempos seguintes.

Com base nos resultados, pode-se supor que a alta produção enzimática ocorrida no teste com 100% de farelo de trigo, nos estágios iniciais da fermentação, deve-se à porção celulósica de sua composição. Como a produção elevada de CMCase concentra-se apenas nos períodos iniciais, supõe-se que o substrato celulósico do farelo de trigo tenha sido consumido rapidamente e que, após esse período inicial, o fungo tenha produzido metabólitos para consumir outras fontes de carbono do farelo.

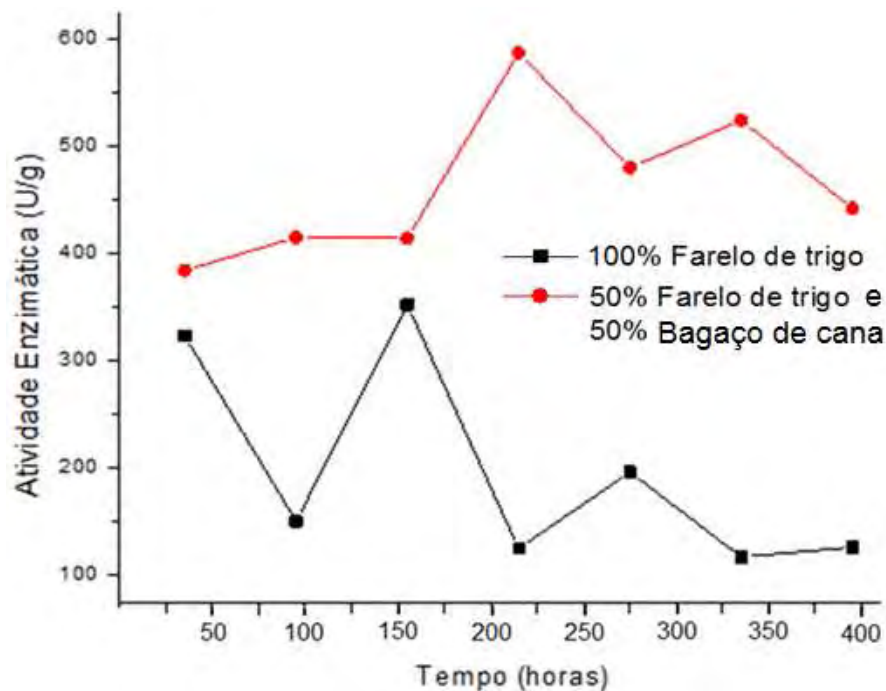


**Figura 4.3.** Influência do substrato farelo de trigo na produção de CMCase.

Ao analisar-se o perfil do teste com 50% de farelo de trigo, os teores iniciais de celulase (até 144h) podem ser atribuídos quase que totalmente ao ataque do fungo à porção celulósica do farelo de trigo, após esse período, o fungo passa a secretar celulases para adquirir celulose do bagaço de cana.

#### 4.1.3.2. Testes de absorção de umidade com material sólido

Na Figura 4.4 apresenta-se a cinética de absorção de umidade com relação ao tempo, para os substratos farelo de trigo e bagaço de cana. Pode-se observar que ambos são altamente higroscópicos, porém, a quantidade de água absorvida pelo farelo de trigo é maior que a do bagaço de cana em todos os períodos do processo.

Observa-se também que ambos tendem a absorver umidade com o tempo, atingindo, assim, ao final do período analisado a máxima retenção de umidade de 2% e 4% acima da umidade da primeira amostra (24 horas) para o farelo de trigo e o bagaço de cana,

respectivamente. No entanto, observa-se que o bagaço de cana não atinge 80% de umidade ao final dos testes.

Assim, quando nos ensaios de FES certa quantidade de água é adicionada ao meio composto por substratos variados, deve-se esperar que o teor de umidade em cada um dos constituintes seja distinto, o que pode resultar em uma umidade do meio não satisfatória para o metabolismo microbiano. Portanto, os experimentos nos quais o teor de umidade é uma das variáveis controladas devem ser criteriosamente conduzidos.

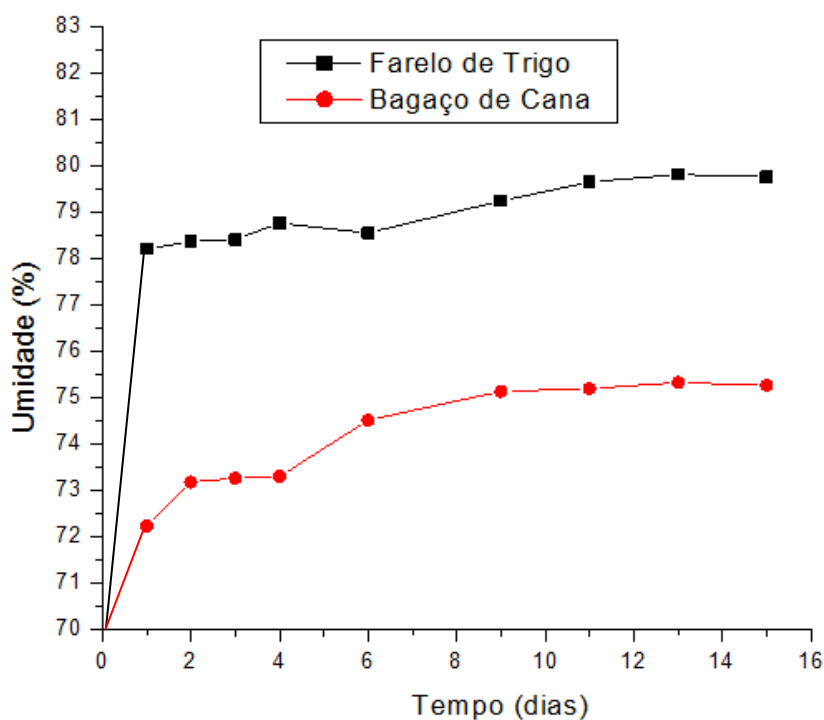


**Figura 4.4.** Absorção de umidade do substrato farelo de trigo e bagaço de cana

#### 4.1.3.3. Testes de extração da enzima

Alguns solventes podem potencializar o processo de extração das enzimas, dessa forma, com o intuito de verificar a influência do solvente e de sua concentração na etapa de extração da enzima, foram realizados testes com quatros tipos de solventes: água; tampão acetato, na concentração de 20 mM com pH de 5,0; tampão fosfato na concentração de 20 mM com pH de 7,0 e tween 20 na concentração de 0,01%. Foram empregados três diferentes concentrações de cada solvente (8, 16 e 24 mL/g).

Na Tabela 4.8 estão apresentados os resultados da extração da enzima realizada com os solventes selecionados. Verifica-se que as atividades de celulase, em unidade por grama de sólido seco, foram próximas para os quatro solventes utilizados, nas três concentrações empregadas. Desse modo, verifica-se que tanto o solvente como a concentração apresentaram pouca influência sobre a extração desta enzima. Conseqüentemente, o uso da água como solvente torna-se interessante tendo em vista sua aplicação industrial, devido à diminuição de custos e à praticidade. Os demais resultados deste trabalho foram obtidos utilizando-se água como solvente.

**Tabela 4.8:** Extração de enzima CMCase com a utilização de diferentes solventes.

| <b>Concentração<br/>Solvente</b> | <b>8 mL/g<br/>(U/g)</b> | <b>16 mL/g<br/>(U/g)</b> | <b>24 mL/g<br/>(U/g)</b> |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Água                             | 111,2                   | 131,2                    | 134,4                    |
| Tampão Acetato                   | 114,2                   | 139,2                    | 134,4                    |
| Tampão Fosfato                   | 128,0                   | 132,8                    | 144,0                    |
| Tween 20                         | 125,6                   | 145,6                    | 158,4                    |

#### 4.1.3.4. Estabilidade da enzima em função da temperatura e do tempo de armazenamento

Foi feito um teste para avaliar se o tempo de armazenamento do extrato enzimático a 5°C afetaria a estabilidade da enzima. Na Figura 4.5 estão apresentados os resultados da atividade de CMCase por um período de 0, 10 e 30 dias de armazenamento. As amostras utilizadas foram as mesmas do teste de extração em três diferentes volumes de água: 8, 16 e 24 mL.

Observa-se que a estabilidade da enzima produzida foi pouco afetada pelo tempo de armazenamento. Dessa forma, evidencia-se que esse extrato enzimático possui boa característica biotecnológica, podendo ser estocado sem grandes perdas no período testado.

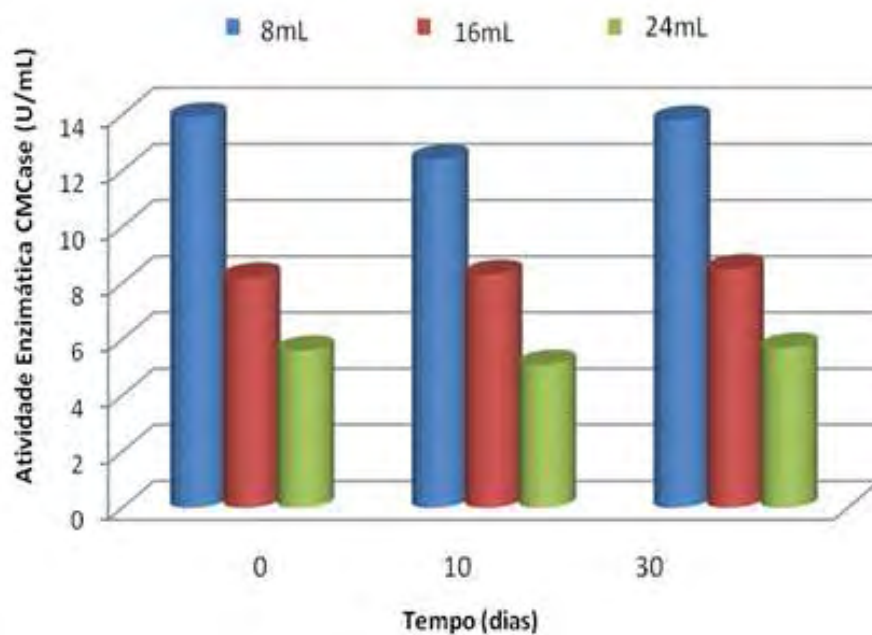


**Figura 4.5.** Estabilidade dos extratos enzimáticos armazenados a 5°C em diferentes períodos, para diferentes volumes de extração com água (■ 8 mL, ■ 16 mL, ■ 24 mL).

#### 4.1.3.5. Análise de repetibilidade

Como nos experimentos iniciais de atividade enzimática verificou-se grande variação dos resultados na repetição das fermentações, buscou-se realizar experimentos específicos de modo a estimar a repetibilidade deste tipo de experimento em FES, tendo bagaço de cana e farelo de trigo (1:1) como substratos. Para tanto, foram feitos dez ensaios, a 45°C, e feitas análises estatísticas que avaliassem a normalidade e a variabilidade dos dados. O tempo de cultivo foi considerado tratamento, enquanto que a atividade de CMCase foi considerada como resposta. A cada dia de ensaio, uma nova amostra era colocada em uma das três câmaras DBO utilizadas, de modo a caracterizar a independência dos ensaios.

Ressalte-se que todas as variáveis envolvidas no processo de fermentação (forma de preparo do substrato, técnica de preparo do inóculo e inoculação) foram padronizadas de modo a analisar de forma criteriosa e isolada a influência do tempo de fermentação sobre a atividade das enzimas produzidas.

A análise estatística foi dividida em duas partes: análise descritiva e análise de variância, com aplicação de teste de Tukey, para verificar possíveis diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.

#### *Análise descritiva*

A Tabela 4.9 mostra as estatísticas descritivas da atividade enzimática em relação à variável tempo, onde “n” representa o número de repetições para o tratamento, “ $\bar{x} \pm s$ ” a média das atividades enzimáticas, com seu respectivo desvio padrão, “Md” o valor da mediana, “Min.” e “Máx.” os valores de mínimo e máximo obtido no tratamento e “CV” o coeficiente de variação.

**Tabela 4.9:** Estatísticas descritivas da atividade enzimática em relação aos tratamentos.

| Tratamento | Tempo (horas) | Atividade Enzimática (U/g) |                 |       |       |       |        |
|------------|---------------|----------------------------|-----------------|-------|-------|-------|--------|
|            |               | n                          | $\bar{x} \pm s$ | Md    | Mín   | Máx   | CV (%) |
| 1          | 48            | 10                         | 316,0±57,6      | 307,4 | 237,6 | 430,4 | 18,22  |
| 2          | 96            | 10                         | 415,4±80,0      | 432,8 | 307,4 | 537,0 | 19,25  |
| 3          | 144           | 10                         | 437,9±77,1      | 421,6 | 327,5 | 584,7 | 17,60  |
| 4          | 192           | 10                         | 510,3±79,5      | 520,2 | 402,2 | 614,3 | 15,57  |
| 5          | 240           | 10                         | 479,0±93,8      | 483,9 | 316,5 | 589,7 | 19,58  |
| 6          | 288           | 10                         | 518,6±124,3     | 511,1 | 341,2 | 778,4 | 23,96  |
| 7          | 336           | 10                         | 504,9±60,0      | 486,6 | 430,2 | 614,9 | 11,88  |

A partir dos dados da Tabela 4.9 é possível verificar a existência de diferenças entre as médias de atividade enzimática em relação aos tempos avaliados. No tempo de 48 horas foi observado o menor valor médio de atividade enzimática (316,0 U/g), enquanto que no tempo de 288 horas obteve-se o maior valor médio (518,6 U/g).

Os coeficientes de variação, determinados pela razão entre o desvio padrão e a média dos tratamentos, resultaram em valores divergentes em relação aos tratamentos. O maior coeficiente de variação determinado foi referente ao tempo de fermentação de 288 horas (23,96%) e o menor coeficiente de variação foi referente ao tempo de 336 horas (11,88%). Isso indica que os valores da atividade enzimática no tempo de 288 horas apresentaram maior dispersão em relação aos outros tempos avaliados. A análise da distribuição dos dados (com cálculos de Box-plot e intervalo de quartis) permite verificar a presença de um valor discrepante (*outlier*) superior, no tempo de 288 horas, que influencia no valor da média para valores superiores, como pode ser visto na Figura 4.6.

Nos tratamentos avaliados, notou-se a proximidade da média e da mediana, pressupondo simetria e, conseqüentemente, normalidade dos dados. Analisando-se apenas o

comportamento médio para cada tratamento, é nítida uma tendência de aumento das atividades até o tempo de 192 horas, após o que há uma certa estabilização. Os testes de Tukey permitiram confirmar com maior certeza estatística esta tendência.

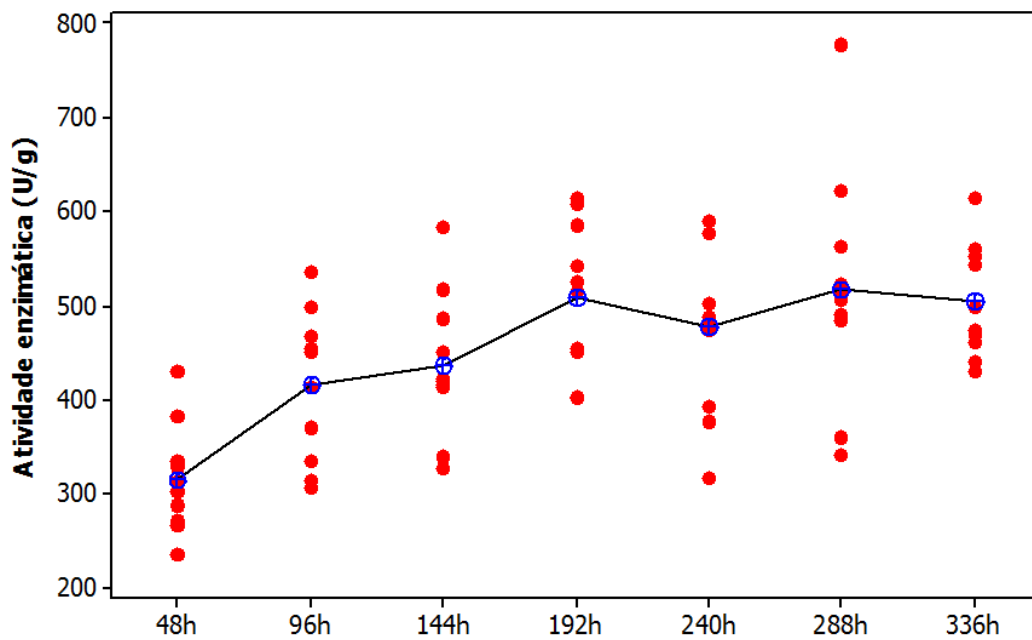


**Figura 4.6.** Cinética de produção de CMCase em ensaios de repetitibilidade ( $\oplus$  - média).

A partir desta avaliação descritiva é possível constatar-se que experimentos biológicos, particularmente os de FES, têm grande variabilidade, muitas vezes justificando a discrepância dos resultados observados na literatura para ensaios realizados nas mesmas condições experimentais, com o mesmo microrganismo e substrato.

#### *Análise de variância*

A análise dos tratamentos está centrada na verificação de existência de possíveis diferenças estatisticamente significativas entre as distribuições dos dados de atividade enzimática em relação aos tempos de fermentação avaliados. Para embasar essa análise e a utilização da ANOVA como teste estatístico, realizou-se o teste de duas hipóteses: as

variâncias das distribuições analisadas são homogêneas (teste de Levene e teste de Bartlett) e os resíduos entre os valores médios e os individuais seguem distribuição normal, verificado pela aplicação do teste de normalidade de Anderson-Darling.

A Figura 4.7 mostra o resultado do teste de homogeneidade de variância para as distribuições de dados de atividade enzimática em relação aos tratamentos efetuados, na qual se pode verificar que os dados de atividade enzimática relativo a cada tratamento apresentaram variância aparentemente homogênea. Os valores de estatística P resultantes dos testes de Bartlett ( $P = 0,281$ ) e Levene ( $P = 0,708$ ), foram superiores ao nível de significância adotado (0,05), de modo que a hipótese de homocedastidade foi confirmada.

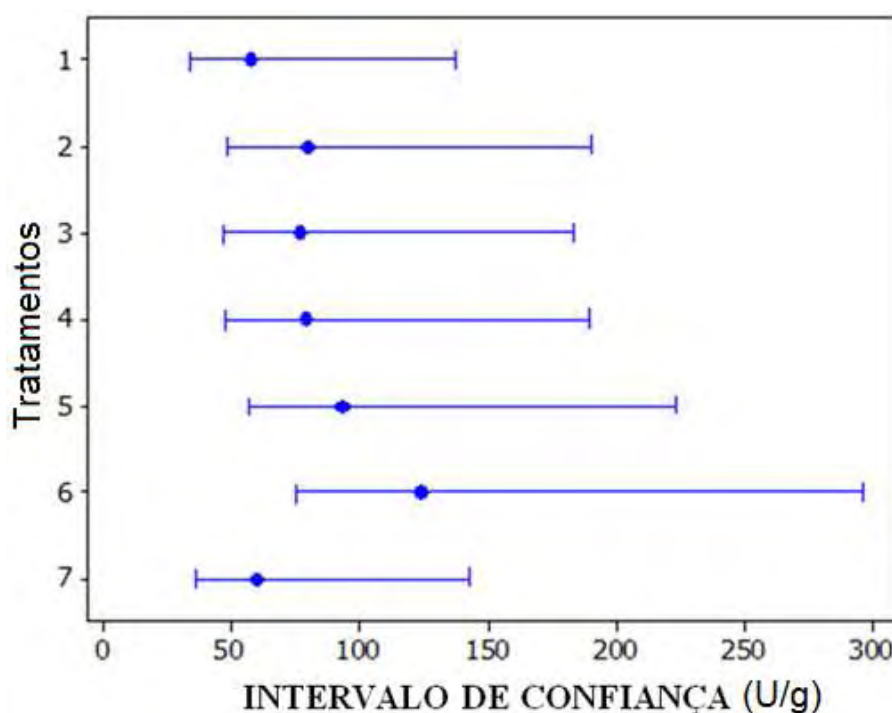


Figura 4.7. Teste de hipótese para a igualdade de variância para a atividade enzimática

Note-se novamente que apenas o tratamento 6 (288 horas) apresentou-se discrepante dos demais, ainda que os testes de hipótese aplicados não tenham evidenciado diferença estatística desta variabilidade em relação às demais.

A Figura 4.8 mostra o teste de normalidade dos resíduos de todos os ensaios, onde é possível admitir a distribuição normal dos mesmos, uma vez que os resíduos alinham-se em torno de uma reta. Confirma esta hipótese o teste de Anderson-Darling, para o qual o valor da estatística P calculada foi superior ao nível de significância adotado para o teste.

Os valores de estatística P resultantes dos teste de normalidade de Anderson-Darling para os resíduos de todos os ensaios ( $P = 0,767$ ), foi superior ao nível de significância adotado (0,05), levando-se à conclusão de que há normalidade na distribuição de resíduos dos dados.

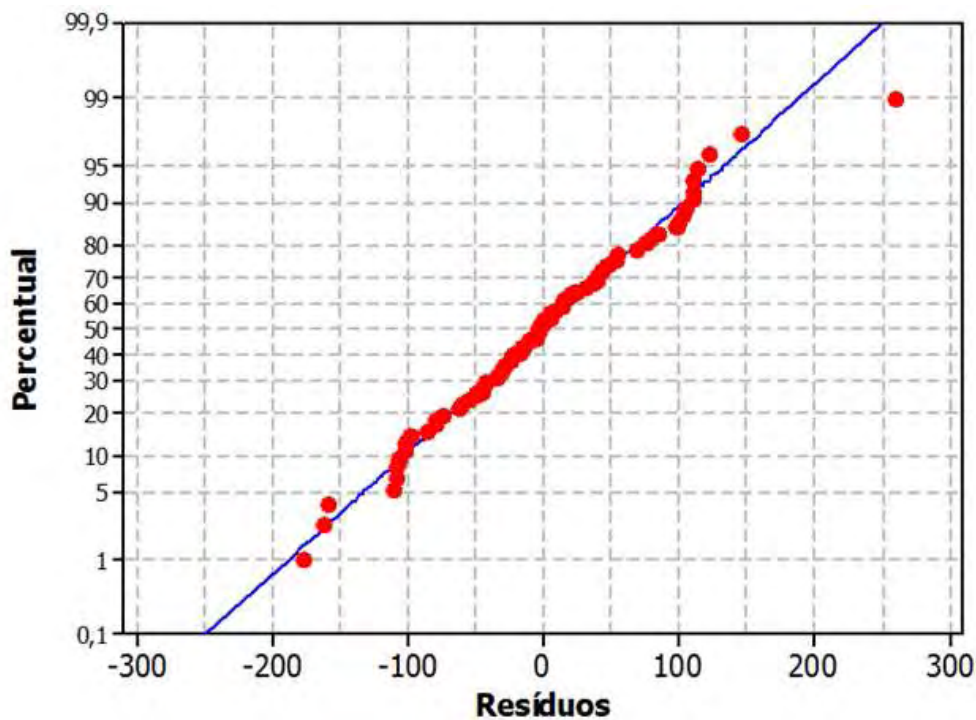


**Figura 4.8.** Teste de normalidade dos resíduos dos testes de atividade enzimática.

A partir dos resultados de normalidade e homocedasticidade, aplicou-se o teste de Tukey para comparação entre as médias das atividades enzimáticas para os diferentes dias de fermentação, cujo resultado é apresentado na Tabela 4.10, podendo-se constatar que o tempo de fermentação de 48 horas apresenta resultados estatisticamente iguais aos de 96 horas, sendo distinto dos tempos superiores. Assim, as maiores produções de enzimas, considerando-se um nível de significância de 0,05 foram obtidos para tempos iguais ou superiores a 96

horas. Assumindo-se que os demais ensaios desta dissertação tenham variabilidade similar, adotou-se o tempo de 96 horas como padrão para finalizar a fermentação, a menos de indicações contrárias.

Em termos industriais esta é uma informação relevante, pois permitiria que o processo fosse concluído já em 96 horas, representando uma economia energética e aumento de produção em relação a tempos de incubação superiores. Um erro bastante freqüente encontrado na literatura é o de adotar-se o maior valor de atividade enzimática como único critério para fixar-se o tempo de fermentação, excluindo-se análises estatísticas mais elaboradas e custos operacionais associados.

**Tabela 4.10:** Intervalos de confiança para atividade enzimática em relação aos tratamentos avaliados.

| Tratamento | Tempo | Atividade Enzimática (U/g) |                          |                 |              |
|------------|-------|----------------------------|--------------------------|-----------------|--------------|
|            |       | n                          | $\bar{x} \pm s$ (*)      | IC (95%)        | Valor P (**) |
| 1          | 48    | 10                         | 316,0±57,6 <sup>a</sup>  | (274,79;357,22) | 0,652        |
| 2          | 96    | 10                         | 415,4±80,0 <sup>ab</sup> | (358,11;472,62) | 0,582        |
| 3          | 144   | 10                         | 437,9±77,1 <sup>b</sup>  | (382,79;493,06) | 0,505        |
| 4          | 192   | 10                         | 510,3±79,5 <sup>b</sup>  | (453,38;567,19) | 0,512        |
| 5          | 240   | 10                         | 479,0±93,8 <sup>b</sup>  | (411,87;546,09) | 0,415        |
| 6          | 288   | 10                         | 518,6±124,3 <sup>b</sup> | (429,64;607,49) | 0,268        |
| 7          | 336   | 10                         | 504,9±60,0 <sup>b</sup>  | (461,98;547,89) | 0,451        |

(\*) Médias seguidas de mesma letra não têm diferença estatística a 95% de confiança.

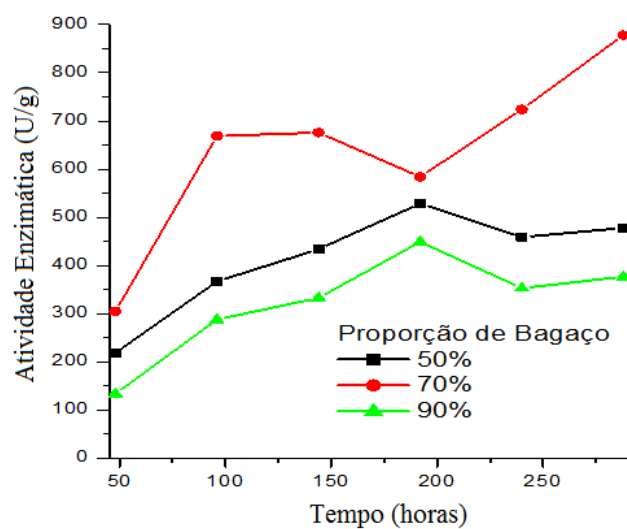
(\*\*) Valor P referente ao teste de normalidade de Anderson-Darling.

#### ***4.1.4. Influência da composição do meio fermentativo, da temperatura e da proporção dos substratos sobre a produção de CMCase***

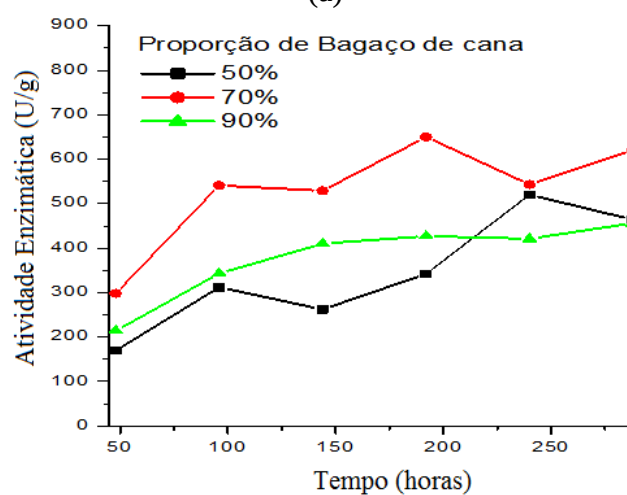
Foram feitos ensaios para determinar a proporção dos substratos bagaço de cana e farelo de trigo e a temperatura ideais para a produção de CMCase. A Figura 4.9 apresenta os perfis de produção da enzima em função do tempo de fermentação, nas três diferentes proporções de bagaço de cana e farelo de trigo selecionadas (1;1 (50%), 7:3 (70%) e 9:1 (90%)) e também em três diferentes temperaturas (40, 45 e 50°C) com a umidade inicial fixa de 80%.

Para as três temperaturas utilizadas observa-se que a proporção de 7:3 de bagaço de cana foi a que proporcionou o melhor resultado, apresentando 669 U/g em 96 horas de fermentação e atingindo máximo de 878 U/g para 288 horas de fermentação, para 50°C de temperatura. Para todas as proporções observou-se tendência de aumento da atividade de CMCase com o tempo de fermentação.

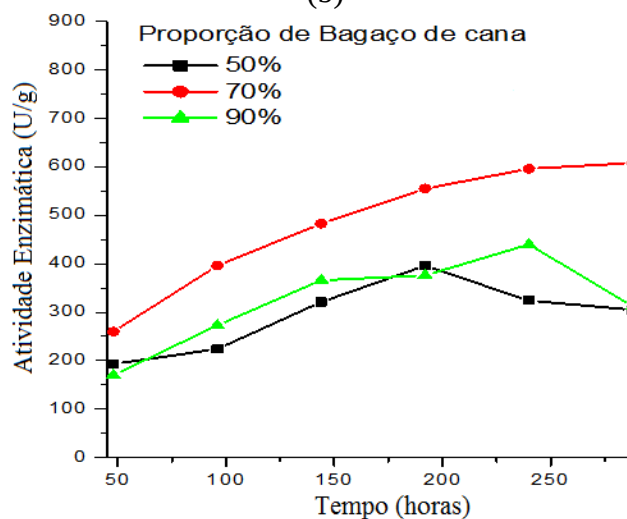
O farelo de trigo e o bagaço de cana possuem composições distintas, como mostrado na Tabela 4.5, e, portanto, funções diferentes na fermentação. O farelo de trigo é rico em sais inorgânicos, nitrogênio e carbono, sendo assim considerado bom substrato para estudos de FES (CASTILHO et al., 2000; COURY et al., 2000; SINGH et al., 1999). O farelo é composto pelo pericarpo e pela camada de aleurona e é constituído de proteínas (principalmente albuminas e globulinas), celulose, hemicelulose (arabinoxilanas) e lipídeos (fosfolipídios).



(a)



(b)



(c)

**Figura 4.9.** Cinética de atividade enzimática em três diferentes proporções de bagaço de cana e temperaturas variadas (a- 50°C; b- 45°C; c- 40°C)

Na Tabela 4.11 é apresentado um balanço de massa, feito a partir dos resultados apresentados na Tabela 4.5, das quantidades de celulose, hemicelulose e proteínas para as diferentes proporções de farelo de trigo e bagaço de cana. Pode-se verificar que o aumento da proporção de bagaço de 50% para 70% proporciona aumento de 21% de celulose e redução de 40% de proteína. Já o aumento da proporção de bagaço 50% para 90% ocasiona aumento de 41% de celulose e redução de 80% de proteína.

Dessa forma, a proporção de bagaço de cana com 50% possui quantidade de proteína e fontes de carbono facilmente assimiláveis presentes no farelo de trigo que auxilia o desenvolvimento do fungo, porém quantidade de celulose inferior em relação às demais proporções. Já na proporção de 90% de bagaço de cana, há escassez de fontes de nitrogênio presente nas proteínas, comprometendo o desenvolvimento do microrganismo e sua produção enzimática, como pode ser visto na Figura 4.10, na qual se observa que o crescimento celular do fungo é nitidamente mais intenso na proporção de 50% de bagaço de cana, decaindo para 70 e 90%.

Como a proporção de 70% apresentou a maior produção enzimática, essa relação entre a quantidade de bagaço de cana e farelo de trigo representa o balanço ideal entre fontes de nitrogênio, carboidratos facilmente assimiláveis e carboidratos de assimilação mais complexa (celulose e hemicelulose). Destaque-se que não foram considerados nesta análise alguns carboidratos estruturais, tais como a pectina e alguns não estruturais, como os polióis, por assumir-se que a proporção dos mesmos nos substratos empregados é muito baixa.

**Tabela 4.11:** Quantidade de celulose e proteína em cada proporção de bagaço de cana e farelo de trigo para 5g de meio

| Proporção de bagaço de cana |                 | Massa de substrato (g) | Celulose (g) | Proteína (g) |
|-----------------------------|-----------------|------------------------|--------------|--------------|
| 90%                         | Bagaço de cana  | 4,5                    | 2,36         | ---          |
|                             | Farelo de trigo | 0,5                    | 0,09         | 0,10         |
|                             | Total           | 5,0                    | 2,45         | 0,10         |
| 70%                         | Bagaço de cana  | 3,5                    | 1,84         | ---          |
|                             | Farelo de trigo | 1,5                    | 0,26         | 0,30         |
|                             | Total           | 5,0                    | 2,10         | 0,30         |
| 50%                         | Bagaço de cana  | 2,5                    | 1,31         | ---          |
|                             | Farelo de trigo | 2,5                    | 0,43         | 0,50         |
|                             | Total           | 5,0                    | 1,74         | 0,50         |

Sherief et al. (2010) pesquisaram a produção de celulase por *Aspergillus fumigatus* com variação na proporção dos substratos, palha de arroz e farelo de trigo entre 1:9 e 9:1. Eles obtiveram bons resultados com a proporção de 5:5 e 7:3, verificando que o farelo de trigo é necessário para o desenvolvimento e produção do fungo. Contudo, a utilização de composto lignocelulósico também é necessário como indutor de celulase, como observado também no presente trabalho.



(a)



(b)



(c)

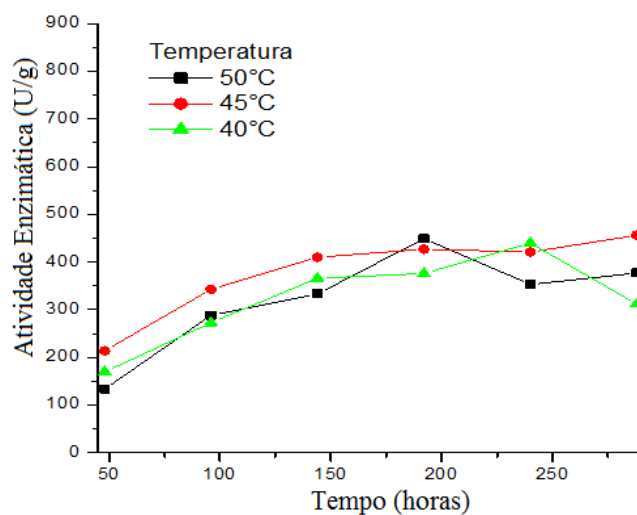
**Figura 4.10:** Desenvolvimento do fungo *Myceliophthora sp* após 96 horas de fermentação, na temperatura de 50°C e 80% de umidade inicial, em diferentes proporções de bagaço de cana (a- 90%; b- 70%; c- 50%)

Martin et al. (2007) observaram que a proporção dos substratos utilizados pode aumentar a eficiência na produção enzimática. Os autores testaram várias proporções do substrato bagaço de cana, farelo de trigo e bagaço de laranja para a produção da enzima pectinase pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. Foi observado que com 40% de bagaço de laranja, 40% de farelo de trigo e 20% de bagaço de cana os resultados foram superiores aos da utilização de 70% de bagaço de laranja, 10% de farelo de trigo e 20% de bagaço de cana. Essa combinação proporcionou meio rico em pectina, que atua como indutor de pectinase (bagaço de laranja), ou seja, composto com grandes quantidades de nutrientes necessários para o desenvolvimento do fungo nos estágios iniciais (farelo de trigo) e material fibroso (bagaço de cana) capaz de proporcionar boa estrutura física ao meio fermentativo, favorecendo a aeração.

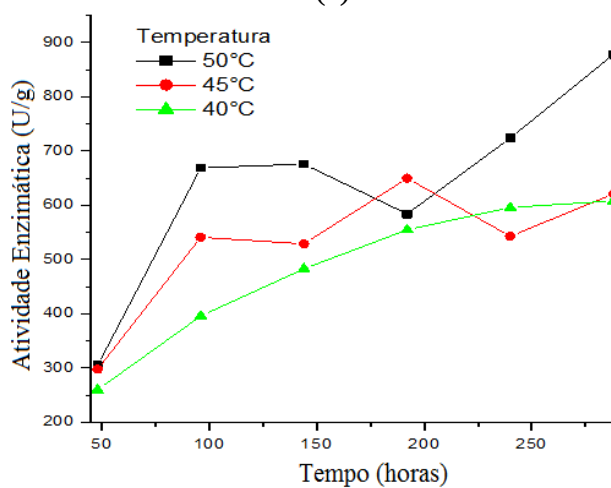
Na Figura 4.11 é apresentada a influência da temperatura sobre a produção de endoglucanase para as três proporções empregadas. Observa-se que, de modo geral a temperatura de 40°C proporcionou os piores resultados. Para a proporção de 90% de bagaço de cana (Figura 4.11a) há pouca influência da temperatura, que se torna mais evidente nas demais proporções, para as quais a temperatura de 50°C resultou em maiores atividades enzimáticas. Particularmente para a proporção de 70% (Figura 4.11b) há forte influência da temperatura nos tempos iniciais da fermentação, como destacado na Tabela 4.12.

**Tabela 4.12:** Produção de celulase na proporção de 70% de bagaço de cana

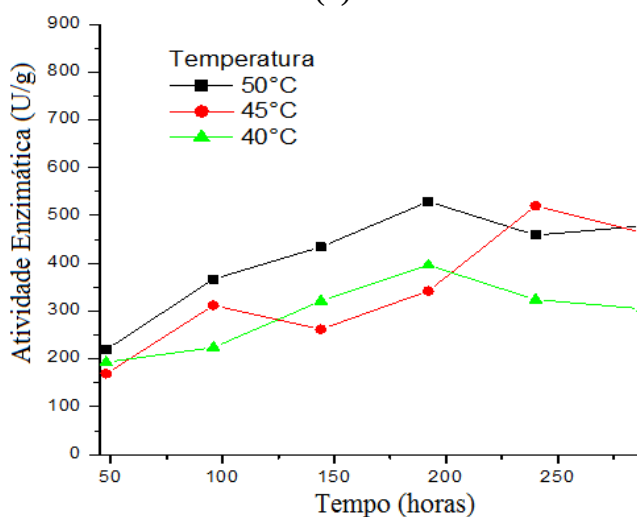
| Temperatura (°C) | 50  | 45  | 40  |
|------------------|-----|-----|-----|
| Tempo (horas)    |     |     |     |
| 96               | 669 | 541 | 398 |
| 144              | 676 | 529 | 483 |



(a)



(b)



(c)

**Figura 4.11.** Cinética de atividade enzimática em três diferentes temperatura e proporções de bagaço de cana variadas (a- 90%; b- 70%; c- 50%)

Gao et al. (2008), em seu estudo de produção de celulase com o fungo termofílico *Aspergillus terreus* M11, observaram que a variável temperatura foi o fator físico analisado de maior importância no processo fermentativo. A maior produtividade ocorreu com a temperatura de 45°C. Já temperaturas superiores apresentaram queda acentuada na produção enzimática, provavelmente, devido ao ressecamento do meio. Silva et al.(2005) no estudo da produção de xilanase e CMCase por fermentação em estado sólido com o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*, obtiveram a máxima produção de celulase na temperatura de 50°C, sendo observada queda acentuada para temperatura acima desse valor e queda suave para valores de temperatura abaixo de 50°C.

Para dar maior confiabilidade estatística às análises sobre as influências da temperatura e da proporção de bagaço de cana sobre as atividades enzimáticas, foi feita análise de variância (ANOVA) dos resultados. Cabe destacar que os ensaios haviam sido conduzidos seguindo-se planejamento estatístico fatorial completo totalmente casualizado, a três níveis, resultando em nove experimentos todos realizados com repetições.

Nota-se que há grande variabilidade entre as repetições dos resultados para alguns dos tratamentos adotados, o que é representado pelos altos valores dos quadrados médios dos resíduos da ANOVA apresentada na Tabela 4.13. Assim, apenas a variável temperatura apresentou influência significativa para 288 horas, sendo que nenhum outro tratamento foi significativo para níveis de significância inferior a 15%.

Estes resultados corroboram os observados nos testes de repetibilidade (item 4.1.2.4), que demonstraram haver grande variabilidade na produção de enzimas por este fungo neste tipo de sistema em fermentação em estado sólido, o que torna difícil determinar-se condição ótima de operação, fazendo-se prever dificuldades de programação de produção em sistemas industriais, ou a necessidade de padronização.

**Tabela 4.13:** Análise de variância da produção de CMCase no período de 48 horas, tendo temperatura e composição do substrato como variáveis independentes

| <i>Causas de Variação</i> | <i>GL</i> | <i>SQ</i> | <i>QM</i> | <i>F</i> | <i>P</i> |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| <b>Tempo de 48 horas</b>  |           |           |           |          |          |
| Fator A (temperatura)     | 1         | 3781      | 3780,8    | 0,43     | 0,520    |
| Fator B (proporção BC)    | 1         | 16280     | 16280,3   | 1,87     | 0,193    |
| Fator AxB                 | 1         | 392       | 392,0     | 0,05     | 0,835    |
| Resíduo                   | 14        | 121767    | 8697,6    |          |          |
| <b>Tempo de 96 horas</b>  |           |           |           |          |          |
| Fator A (temperatura)     | 1         | 17787     | 17787     | 1,32     | 0,270    |
| Fator B (proporção BC)    | 1         | 9861      | 9861      | 0,73     | 0,407    |
| Fator AxB                 | 1         | 5151      | 5151      | 0,38     | 0,546    |
| Resíduo                   | 14        | 188627    | 13473     |          |          |
| <b>Tempo de 144 horas</b> |           |           |           |          |          |
| Fator A (temperatura)     | 1         | 42602     | 42602     | 1,87     | 0,193    |
| Fator B (proporção BC)    | 1         | 27361     | 27361     | 1,20     | 0,292    |
| Fator AxB                 | 1         | 3362      | 3362      | 0,15     | 0,707    |
| Resíduo                   | 14        | 319107    | 22793     |          |          |
| <b>Tempo de 192 horas</b> |           |           |           |          |          |
| Fator A (temperatura)     | 1         | 32137     | 32137     | 1,46     | 0,247    |
| Fator B (proporção BC)    | 1         | 8748      | 8748      | 0,40     | 0,538    |
| Fator AxB                 | 1         | 7626      | 7626      | 0,35     | 0,565    |
| Resíduo                   | 14        | 307744    | 21982     |          |          |
| <b>Tempo de 240 horas</b> |           |           |           |          |          |
| Fator A (temperatura)     | 1         | 21336     | 21336     | 0,71     | 0,414    |
| Fator B (proporção BC)    | 1         | 67350     | 67350     | 2,23     | 0,157    |
| Fator AxB                 | 1         | 9112      | 9112      | 0,30     | 0,591    |
| Resíduo                   | 14        | 422063    | 30147     |          |          |
| <b>Tempo de 288 horas</b> |           |           |           |          |          |
| Fator A (temperatura)     | 1         | 130834    | 130834    | 4,60     | 0,050    |
| Fator B (proporção BC)    | 1         | 27456     | 27456     | 0,96     | 0,343    |
| Fator AxB                 | 1         | 23762     | 23762     | 0,83     | 0,376    |
| Resíduo                   | 14        | 398501    | 28464     |          |          |

#### **4.1.5. Influência da umidade inicial em diferentes temperaturas de fermentação**

Como a atividade enzimática sofreu pouca influência da temperatura e da proporção de bagaço de cana, optou-se por avaliar a influência da umidade inicial do substrato fixando-se a temperatura em 45°C e a proporção de bagaço de cana de 70%. A Tabela 4.14 mostra os resultados destes ensaios, juntamente com a comparação estatística entre as médias determinadas com teste de Tukey. As umidades empregadas foram 75, 80 e 85% e as comparações entre as médias foram feitas para cada tempo de ensaio individualmente. Somente para o tempo de 48h houve diferença estatística entre as médias entre os tratamentos, para nível de significância de 95%, sendo os resultados para 85% de umidade inferiores aos obtidos para 75 e 80%.

De acordo com Kalogeris et al. (2003), a umidade inicial exerce influência sobre o crescimento do microrganismo, sendo a umidade ótima dependente da natureza do substrato utilizado, das exigências do microrganismo e do produto final. Gao et al. (2008) pesquisaram a produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus terreus* M11 com o substrato farelo de trigo, palha de trigo e sabugo de milho em temperatura de 45°C. Eles observaram que o aumento do teor de umidade inicial de 60% para 80% aumentou a atividade enzimática, fato esse atribuído ao rápido crescimento do microrganismo em ambientes úmidos, propiciando produção enzimática precoce. Sherief et al. (2010) produziram celulase empregando *Aspergillus fumigatus*, cultivado em palha de arroz e farelo de trigo, observando pico de produção de celulase com 75% de umidade. Valores acima (80%) e abaixo (66%) resultaram na diminuição do nível de produção enzimática. A queda para altas umidades foi atribuída à redução da oxigenação devida à diminuição da porosidade do substrato e para baixas umidades ocorreu redução da solubilidade de nutrientes e proteínas (GERVAIS & MOLIN, 2003).

**Tabela 4.14:** Atividade celulolítica em função da umidade inicial do meio fermentativo  
(T = 45°C; proporção de bagaço de cana de açúcar = 70%)

| Tempo (h) | Umidade inicial (%) | Atividade de CMCase (U/g) |     |
|-----------|---------------------|---------------------------|-----|
| 48        | 85                  | 239                       | 218 |
|           | 80                  | 302                       | 289 |
|           | 75                  | 277                       | 289 |
| 96        | 85                  | 227                       | 260 |
|           | 80                  | 336                       | 314 |
|           | 75                  | 199                       | 267 |
| 144       | 85                  | 415                       | 382 |
|           | 80                  | 328                       | 486 |
|           | 75                  | 441                       | 530 |
| 192       | 85                  | 384                       | 272 |
|           | 80                  | 541                       | 402 |
|           | 75                  | 564                       | 518 |
| 240       | 85                  | 411                       | 430 |
|           | 80                  | 377                       | 590 |
|           | 75                  | 509                       | 520 |
| 288       | 80                  | 490                       | 624 |
|           | 75                  | 448                       | 571 |
|           | 85                  | 580                       | 442 |

O fato dos resultados para 48h terem sido influenciados pela umidade inicial parece estar relacionado ao tempo necessário para que o bagaço e o farelo absorvam a água adicionada ao meio. Na Figura 4.4, observa-se que, a rigor, são necessários 6 dias para que o bagaço de cana atinja a umidade de 75% e o farelo de trigo atinja cerca de 80% de umidade após onze dias, sendo que a água excedente não absorvida fica retida ao fundo do saco. Assim, para 85% de umidade inicial é de se esperar que mais água não esteja absorvida nas primeiras 48h de ensaio, bloqueando os poros e dificultando as trocas gasosas.

## 4.2. Experimentos em escala de bioreator de bancada

Todos os ensaios no bioreator foram feitos com proporção de bagaço de cana e farelo de trigo (7:3) e ar com umidade relativa de 95%, estimada por meio de carta psicrométrica.

### 4.2.1. Testes preliminares

Os primeiros ensaios fermentativos no bioreator, utilizando o fungo *Myceliophthora sp.*, foram feitos nas temperaturas do ar e da camisa a 45°C e umidade inicial de 80%, sendo estes valores escolhidos após os ensaios em escalas de sacos, os quais demonstraram pouca influência destas variáveis sobre a atividade enzimática. A vazão do ar de entrada no bioreator foi fixada em 80, 100 e 120L/h. O tempo de fermentação foi estipulado com base nos resultados de repetibilidade, os quais demonstraram que a partir 96 horas de ensaio os resultados eram estatisticamente iguais, com 95% de confiança, aos testes com tempos superiores (item 4.1.3.5).

Nos ensaios iniciais, verificou-se que a umidade inicial do substrato igual a 80% foi imprópria, pois observou-se gotejamento pelo fundo do bioreator, devido ao excesso de água, mesmo antes do início dos experimentos. Este aspecto já foi discutido no item 4.1.5, quando se justificou a baixa produção de enzimas para elevados teores iniciais de umidade em baixos tempos de fermentação, atribuindo este comportamento ao tempo requerido pelos materiais que compõem o substrato para absorver a água adicionada. Desta forma, optou-se nos demais ensaios por utilizar a umidade inicial de 75 %, que não apresentou o mesmo problema.

O equipamento utilizado nesse trabalho foi o mesmo utilizado por Umsza-Guez (2009), cujo diagrama esquemático foi apresentado na Figura 3.3. Nos ensaios preliminares, constatou-se que havia gotejamento de água condensada do ar de entrada na base do fermentador. Esta condensação foi decorrente do resfriamento do ar entre o umidificador (colocadas em um banho termostático a 45°C) e a entrada do fermentador, mesmo estando a

tubulação isolada termicamente. Para contornar esta dificuldade, foi confeccionado um trocador de calor duplo-tubo, escoando-se o ar pelo tubo interno e água a 45°C no externo, de modo que o ar foi mantido na temperatura desejada até a entrada do bioreator.

Na configuração adotada por Umsza-Guez (2009), os acoplamentos de entrada e saída do fermentador não eram encamisados. Assim, para evitar que houvesse resfriamento do ar de entrada, o cone de entrada do equipamento era mergulhado em banho termostático de água na temperatura desejada. A falta de controle de temperatura no acoplamento de saída fazia com que o ar saturado que saía do processo na temperatura de fermentação resfriasse ao entrar em contato com o ambiente do laboratório, a cerca de 30°C, condensando a água excedente que molhava os módulos superiores do leito, reduzindo a produção de enzimas, (UMSZA-GUEZ, 2009).

No presente estudo, ambos os acoplamentos foram encamisados de modo que a água circulou na camisa do bioreator na temperatura desejada. A Figura 4.12 apresenta as modificações introduzidas no equipamento, após as quais foram feitos novos testes e observou-se bom desenvolvimento do fungo no bioreator. Na Figura 4.13 apresenta-se o substrato colonizado pelo fungo após um ensaio, verificando-se o mesmo aspecto cottonoso do seu desenvolvimento em meio Sabourad, apresentado na Figura 4.1, demonstrando boa adaptação e homogeneidade do fungo nesse sistema.

Inicialmente o extrato bruto enzimático foi extraído da mesma forma como descrito por Umsza-Guez (2009), ou seja, o material fermentado de cada módulo foi subdividido em três porções iguais, de modo que cada fermentação compreendia nove amostras longitudinais, de cada qual foi retirado 5g de material fermentado. No entanto, esse método não permite utilizar a mesma metodologia empregada nos ensaios em sacos de polipropileno, que se baseia na massa inicial utilizada (5g), pois durante a fermentação a massa inicial do substrato

é modificada devido ao consumo de nutrientes pelo microrganismo, ao aumento da massa celular do fungo e às alterações de umidade decorrentes do processo.

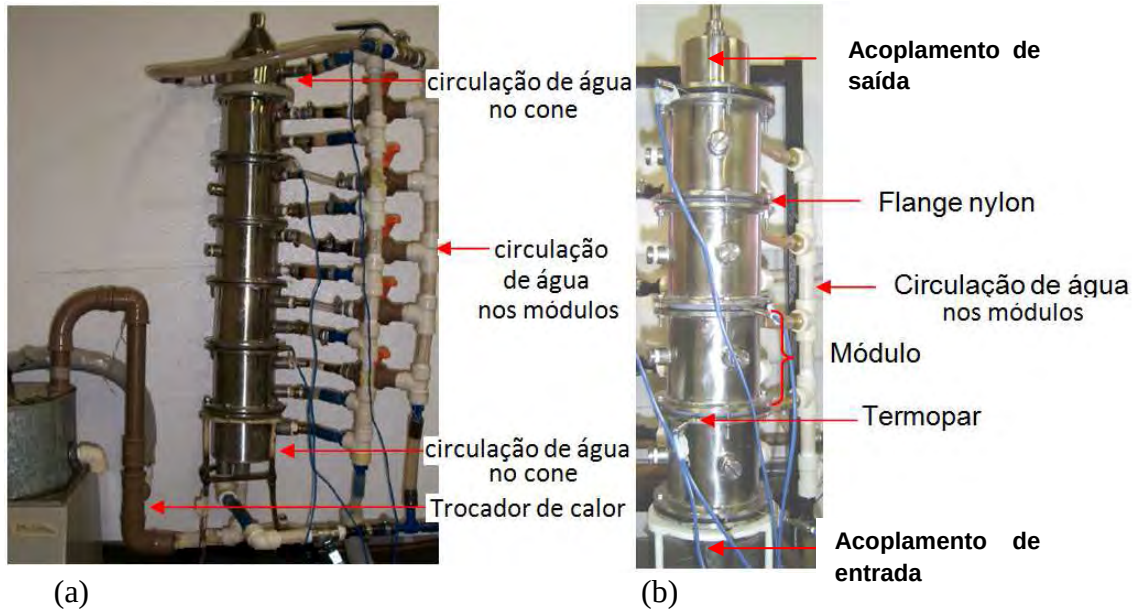


**Figura 4.12.** Fermentador em leito fixo para FES (a- modificações estruturais introduzidas, b- fermentador empregado por Guez (2009)).



**Figura 4.13.** Aspecto do fungo ao fim do processo fermentativo em biorreator de leito fixo.

Para contornar esta dificuldade, o material empacotado no leito foi subdividido em 10 amostras longitudinais de 15 gramas cada, sendo cada amostra separada de outras por telas de nylon que permitia a passagem de umidade e gases ( $O_2$  e  $CO_2$ ), impedindo, porém, a mistura dos materiais. Dessa forma, sabe-se a quantidade de substrato inicial presente em cada porção. A Figura 4.14 ilustra o bioreator separado em 10 amostras de 15 g.

Outra modificação feita nessa etapa preliminar foi a substituição do método de classificação do bagaço de cana por peneiramento pelo método de triturar o material e peneirá-lo. Tal alteração foi adotada após a verificação de que o bagaço de cana, mesmo peneirado, ainda apresentava fibras de tamanhos muito variados, composta por fibras longas, curtas, grossas e finas, formando um meio muito heterogêneo. Com a trituração, foram obtidas partículas de dimensões mais homogêneas, sendo empregadas as fibras que foram retidas por peneira com abertura de 1,4 mm.

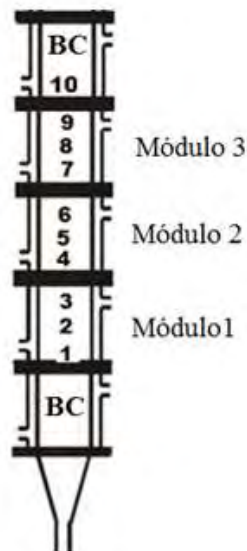


**Figura 4.14.** Separação do substrato em 10 porções de 15 gramas para o processo de fermentação em biorreator

A Figura 4.15 apresenta o resultado dos testes feitos com as fibras apenas peneiradas e com as trituradas e peneiradas, para oito porções de 15g, onde se pode constatar que a atividade enzimática do leito empacotado com bagaço triturado e peneirado foi superior, sendo em média 30% maior. No entanto, não observou-se diferença entre as médias das atividades enzimáticas para os dois tratamentos pelo teste t-Student a 95% de significância, mesmo com uma grande variabilidade dos dados, como pode ser visto na Tabela 4.15. Ainda assim, qualitativamente, pode-se atribuir os valores superiores observados na produção da

enzima com o bagaço de cana triturado e peneirado à maior área superficial de suas partículas. Assim, decidiu-se prosseguir os experimentos com o bagaço de cana triturado.

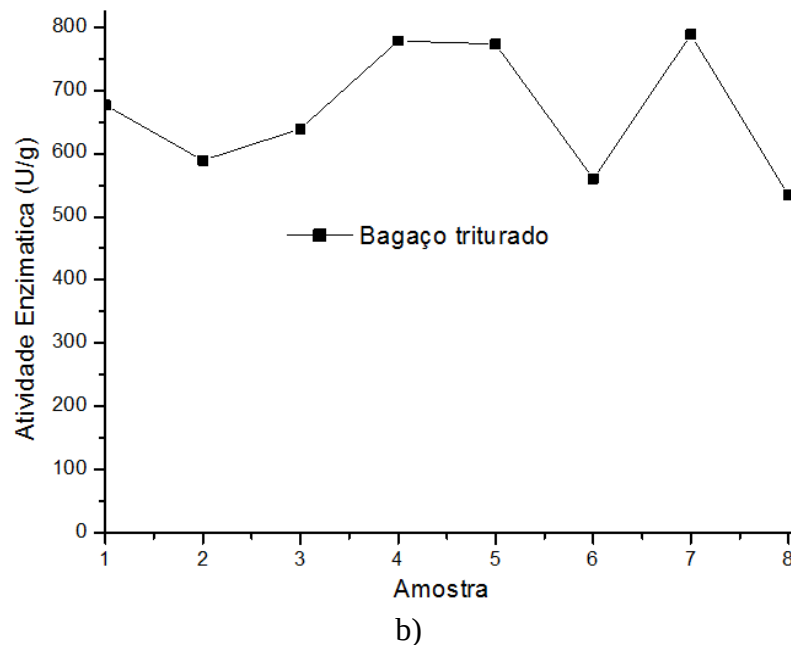
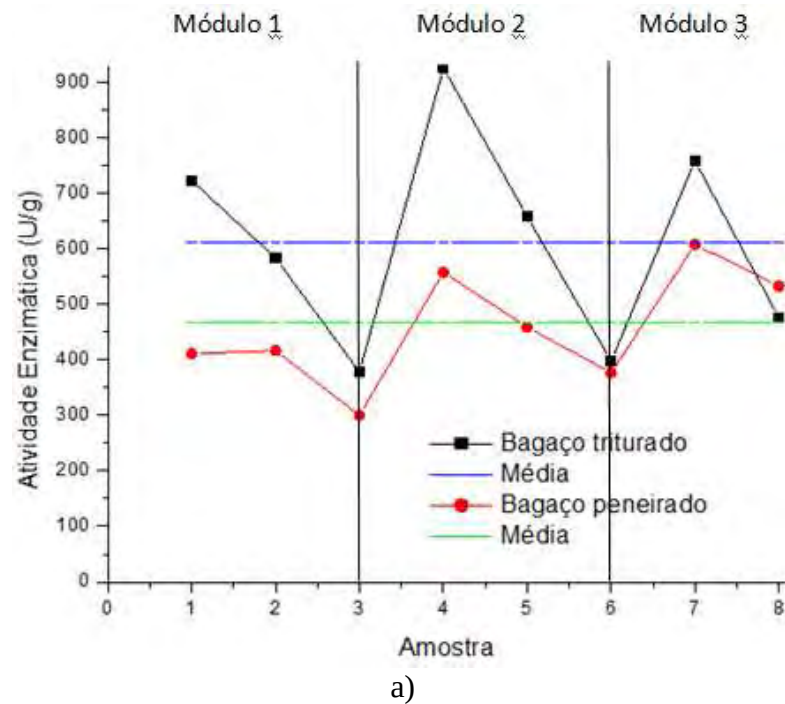


**Figura 4.15.** Atividade de CMCase em biorreator com vazão do ar de entrada de 80L/h, em temperatura de 45°C e 75% de umidade inicial após 144 horas de fermentação a) Influência da granulometria do bagaço de cana sobre a produção de CMCase; b) com empacotamento por meio de pressão com um cilindro sobre o substrato

Na Figura 4.15a observa-se que para ambos os bagaços (peneirado e triturado) o perfil de atividade apresenta declínio de produção da primeira à última amostra de cada módulo. Esse fato pode ser atribuído à técnica de empacotamento inicialmente utilizada, que implicava na deposição de certa quantidade de substrato nos módulos, seguida de leves batidas na parede do módulo para acomodação do material sólido. Devido à diferença no formato e granulometria do farelo e do bagaço, observou-se que essa técnica provocava segregação do farelo de trigo para a base de cada módulo, mesmo que entre as porções de 15g de meio fermentativo houvesse uma tela perfurada de nylon de malha com abertura de 1mm, como mencionado anteriormente.

Deste modo, decidiu-se alterar o procedimento de empacotamento, utilizando-se um cilindro maciço de diâmetro próximo ao do módulo, pressionando as amostras. A Figura 4.15b apresenta o perfil de atividade enzimática no bioreator com esse método de empacotamento. Pode-se verificar maior uniformidade em relação ao perfil enzimático anterior. Dessa forma, para os testes seguintes utilizou-se este sistema de empacotamento.

**Tabela 4.15:** Produção de CMCase (U/g) em ensaios de fermentação com bagaço de cana peneirado e triturado.

| <b>Amostras*</b> | <b>Peneirado</b> | <b>Triturado</b> |
|------------------|------------------|------------------|
| 1                | 411              | 723              |
| 2                | 417              | 584              |
| 3                | 300              | 378              |
| 4                | 558              | 926              |
| 5                | 459              | 658              |
| 6                | 377              | 398              |
| 7                | 608              | 759              |
| 8                | 533              | 475              |
| Média**          | 467 <sup>a</sup> | 613 <sup>a</sup> |
| Desvio-padrão    | 95               | 172              |

(\*) Referem-se às amostras indicadas na Figura 4.11.

(\*\*) Colunas seguidas de mesma letra não têm diferença pelo teste t-student a 95% de significância.

#### **4.2.2. Influencia da vazão do ar**

Foram feitos testes para avaliar o processo fermentativo no bioreator com diferentes vazões do ar de entrada. Nessa etapa, foi utilizada umidade inicial de 75% do substrato, a temperatura do ar de entrada e da camisa de refrigeração, ambas foram fixada em 45 e 50°C e a vazão do ar de entrada em 80, 100 e 120L/h, como apresentado na Figura 4.16 e 4.18. Nela apresenta os perfis de umidade e de atividade enzimática ao final da fermentação a 50 °C, nas vazões de ar citadas, resultado similar aos obtidos para a temperatura de 45°C.

Observa-se que, para todas as vazões, a umidade final do leito foi crescente da base para o topo, comportamento inverso ao observado para a atividade enzimática. Este problema da segregação de umidade já havia sido observado por outros autores (GOWTHAMAN et al., 1993; AHLAWAT et al., 2007; CASTILHO et al., 2000; CHINN et al., 2008; FOONG et al., 2009; KHANAHMADI et al., 2006; MAMMA et al., 2008; UMSZA-GUEZ, 2009) e é reputado como sendo um dos maiores problemas nos reatores de leito fixo para fermentação em estado sólido, uma vez que atinge diretamente o metabolismo microbiano e, conseqüentemente, a formação dos produtos.

Comparativamente aos dados de Umsza-Guez (2009), os dados deste trabalho mostram variação menos intensa da umidade nas porções mais baixas do leito, o que pode ser atribuído ao uso de um módulo empacotado apenas com bagaço de cana antes do primeiro módulo reacional e ao uso do acoplamento encamisado. Sem o módulo empacotado apenas com bagaço, o ar entraria em contato direto com o primeiro módulo reacional e, estando a 95% de umidade relativa, teria potencial de secagem suficiente para reduzir os teores de umidade a valores tão baixos quanto 17% e 33% para o bagaço de cana e o farelo de trigo, respectivamente (LAURENTINO, 2007).

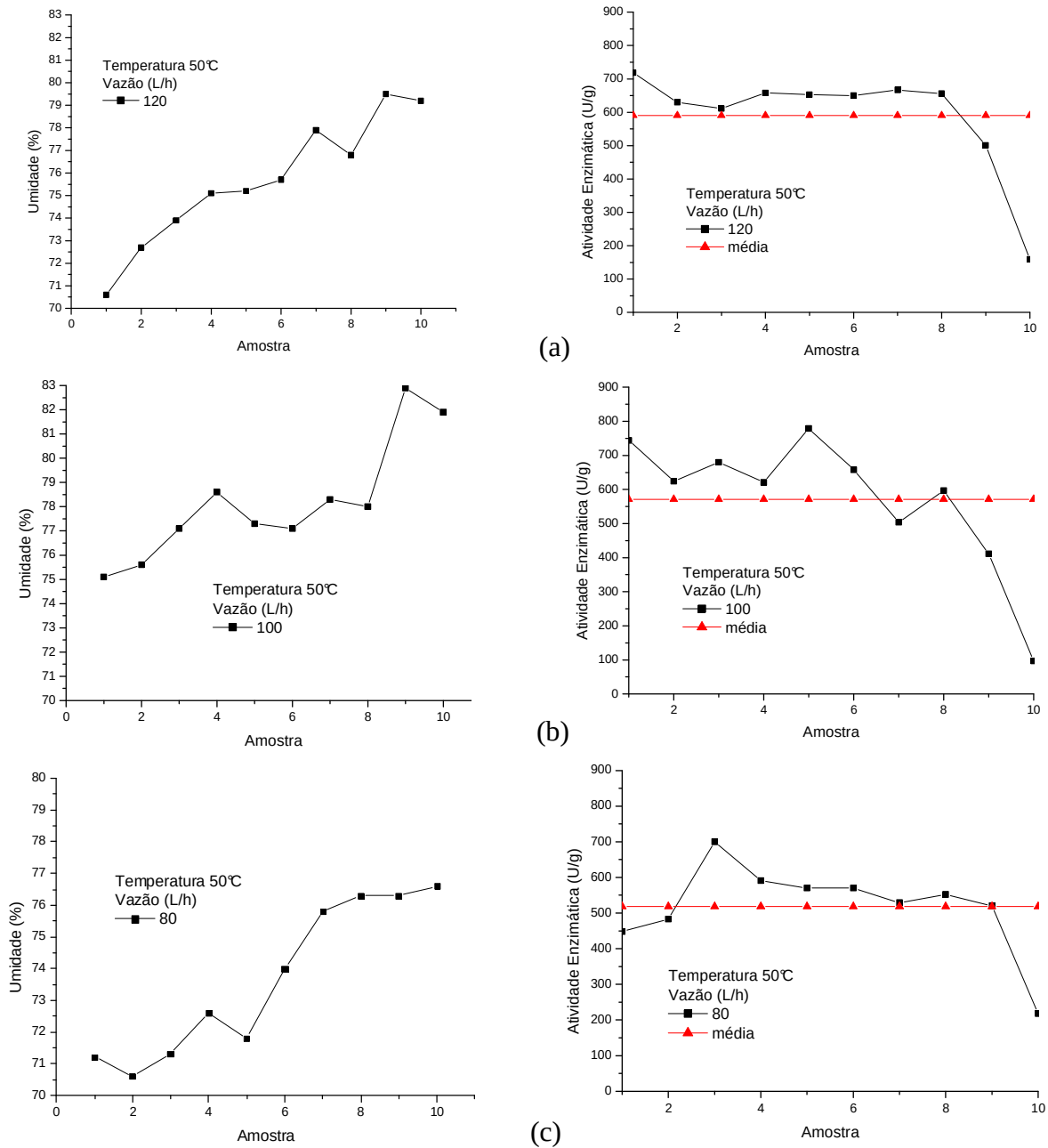


**Figura 4.16.** Distribuições longitudinais de umidade e atividade enzimática em temperatura de 50°C em diferentes vazões de ar para 96h de fermentação (a- 120; b- 100; c- 80 L/h)

Por outro lado, o ar ao sair do leito tem sua temperatura reduzida, tornando-se, portanto, supersaturado e a água excedente é condensada, molhando as porções superiores do leito. Apesar da introdução do acoplamento encamisado na saída do leito, este efeito ainda não foi eliminado, necessitando ainda de soluções tecnológicas mais elaboradas.

Como consequência desta distribuição longitudinal de umidade, a atividade enzimática só foi afetada negativamente nas maiores alturas de leito, nas quais a condensação de água deve ter bloqueado os poros do empacotamento, dificultando as trocas gasosas e, desta forma, afetando o metabolismo microbiano.

A Figura 4.17 agrupa os resultados apresentados na Figura 4.16, podendo-se constatar que a influência da vazão de ar é discreta sobre a variação de umidade sendo observado segregação nas três vazões e não ocorre interferência sobre a atividade enzimática. O mesmo efeito da pouca influência da vazão do ar também pode ser observado na Figura 4.18 para ensaios realizados a 45°C. No entanto, é possível constatar-se que as atividades enzimáticas para 45°C foram sensivelmente menores do que para 50°C, o que é comprovado pela aplicação do teste de Tukey apresentado na Tabela 4.16. Note-se que não há diferença significativa com 95% de confiabilidade entre os resultados entre vazões distintas e mesma temperatura, mas que todos os resultados a 50°C foram superiores aos de 45°C, o que contraria os resultados obtidos nos ensaios em sacos, nos quais a influência da temperatura não foi significativa.

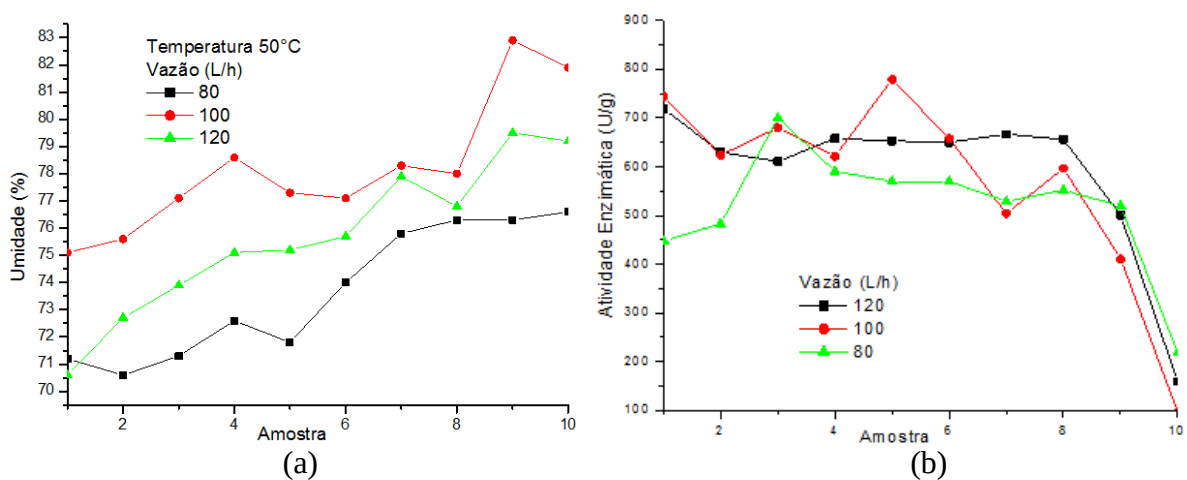


**Figura 4.17.** Distribuição longitudinal de umidade e de atividade enzimática para fermentação a 50 °C, 75% de umidade a diferentes vazões de ar para 96h de fermentação (a- Umidade; b- atividade enzimática)

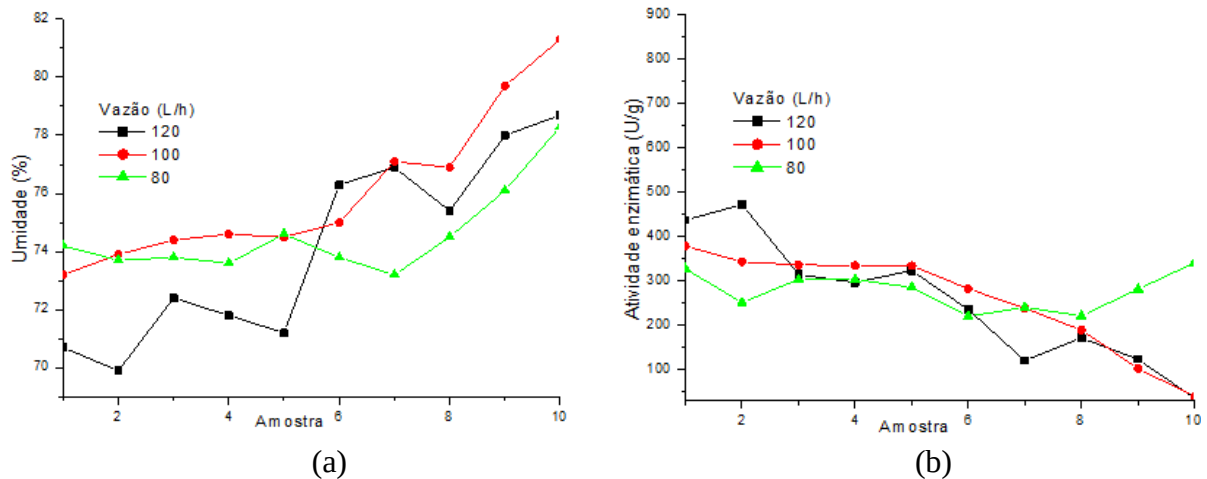


**Figura 4.18.** Distribuição longitudinal de umidade e de atividade enzimática para fermentação a 45°C, 75% de umidade inicial a diferentes vazões de ar para 96h de fermentação (a- Umidade; b- atividade enzimática)

**Tabela 4.16:** Atividade enzimática em ensaios para diferentes vazões de ar

| Módulo<br>(porção)   | 50°C                   |                        |                        | 45°C                   |                        |                        |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                      | 80 L/h                 | 100 L/h                | 120 L/h                | 80 L/h                 | 100 L/h                | 120 L/h                |
| 1                    | 448                    | 744                    | 719                    | 328                    | 379                    | 438                    |
| 2                    | 483                    | 624                    | 630                    | 252                    | 344                    | 473                    |
| 3                    | 700                    | 680                    | 611                    | 304                    | 337                    | 315                    |
| 4                    | 591                    | 621                    | 658                    | 304                    | 335                    | 297                    |
| 5                    | 570                    | 779                    | 653                    | 286                    | 335                    | 324                    |
| 6                    | 570                    | 658                    | 650                    | 221                    | 283                    | 236                    |
| 7                    | 529                    | 504                    | 667                    | 241                    | 239                    | 121                    |
| 8                    | 552                    | 597                    | 656                    | 222                    | 190                    | 172                    |
| 9                    | 520                    | 411                    | 501                    | 282                    | 103                    | 124                    |
| 10                   | 218                    | 97                     | 159                    | 342                    | 40                     | 36                     |
| <b>Média *</b>       | <b>518<sup>a</sup></b> | <b>572<sup>a</sup></b> | <b>590<sup>a</sup></b> | <b>278<sup>b</sup></b> | <b>259<sup>b</sup></b> | <b>254<sup>b</sup></b> |
| <b>Desvio-padrão</b> | <b>81</b>              | <b>135</b>             | <b>104</b>             | <b>35</b>              | <b>92</b>              | <b>116</b>             |

(\*) Médias seguidas de mesma letra não têm diferença estatística a 95% de confiança.

No entanto, deve-se levar em consideração que nos ensaios em sacos a temperatura desempenha papel importante na fisiologia do fungo e nas interações fungo-substrato, enquanto que no bioreator, a temperatura influencia não só estes aspectos, mas também a dinâmica do escoamento do ar e os fenômenos de transferência de calor e massa.

Umsza-Guez (2009), em seus ensaios de produção enzimática em bioreator de leito fixo com temperatura de 40, 45 e 50°C e vazões do ar de entrada de 60, 120 e 180L/h, observou que ocorreu leve tendência de aumento da produção enzimática com o aumento da

vazão de ar. Como a temperatura de 45°C apresentou valores inferiores aos observados para a temperatura de 50°C, fez-se um ensaio para verificar se esse comportamento enzimático permanecia no período de 144 horas de fermentação, cujo resultado é apresentado na Figura 4.19. Nota-se que as atividades enzimáticas aumentaram sensivelmente em relação às 96h de fermentação e que a distribuição longitudinal de atividade enzimática foi similar à observada para os ensaios a 50°C e 96h.

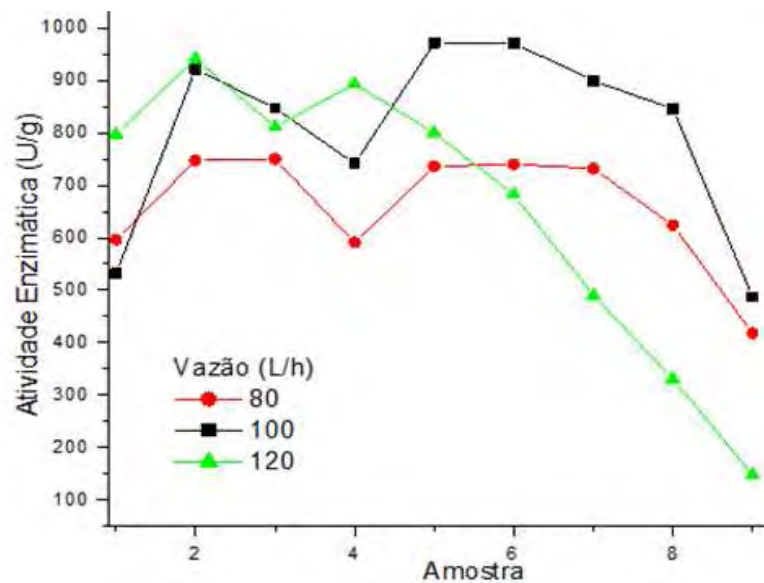


**Figura 4.19.** Atividade de celulase a diferentes vazões de ar, a temperatura de 45°C após 144h de fermentação

A Tabela 4.17 apresenta os valores de atividade enzimática para as três vazões na temperatura de 45°C e nos dois tempos de fermentação, com respectivas médias e desvios padrões. Observa-se que há diferença estatística significativa a 95% de confiabilidade pelo teste de Tukey entre os diferentes tempos de fermentação, mas que não há para as diferentes vazões.

Não é trivial encontrar explicação para a maior produção de enzimas a 45°C, em 144h de fermentação e a 50°C, apenas observando-se as umidades e atividades enzimáticas. No entanto, é possível supor-se que para a temperatura de 50°C, o meio poroso entrou em equilíbrio com a água de embebição em período mais curto do que a 45°C, de modo que para tempos curtos a 45°C muita água ainda não teria sido absorvida pela matriz porosa,

dificultando as trocas gasosas.

**Tabela 4.17:** Atividade enzimática em ensaios para diferentes vazões de ar e tempos de fermentação a 45°C

| Amostra              | 96h                    |                        |                        | 144h                   |                        |                        |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                      | 80 L/h                 | 100 L/h                | 120 L/h                | 80 L/h                 | 100 L/h                | 120 L/h                |
| 1                    | 328                    | 379                    | 438                    | 596                    | 532                    | 797                    |
| 2                    | 252                    | 344                    | 473                    | 747                    | 921                    | 941                    |
| 3                    | 304                    | 337                    | 315                    | 750                    | 847                    | 811                    |
| 4                    | 304                    | 335                    | 297                    | 591                    | 741                    | 893                    |
| 5                    | 286                    | 335                    | 324                    | 736                    | 971                    | 800                    |
| 6                    | 221                    | 283                    | 236                    | 740                    | 971                    | 682                    |
| 7                    | 241                    | 239                    | 121                    | 732                    | 899                    | 490                    |
| 8                    | 222                    | 190                    | 172                    | 624                    | 846                    | 331                    |
| 9                    | 282                    | 103                    | 124                    | 418                    | 487                    | 148                    |
| 10                   | 342                    | 40                     | 36                     | ND*                    | ND                     | ND                     |
| <b>Média**</b>       | <b>278<sup>a</sup></b> | <b>259<sup>a</sup></b> | <b>254<sup>a</sup></b> | <b>609<sup>b</sup></b> | <b>802<sup>b</sup></b> | <b>655<sup>b</sup></b> |
| <b>Desvio-padrão</b> | <b>35</b>              | <b>92</b>              | <b>116</b>             | <b>118</b>             | <b>170</b>             | <b>257</b>             |

(\*) ND: valores não disponíveis

(\*\*) Médias seguidas de mesma letra não têm diferença estatística a 95% de confiança.

#### 4.2.3. Análise térmica

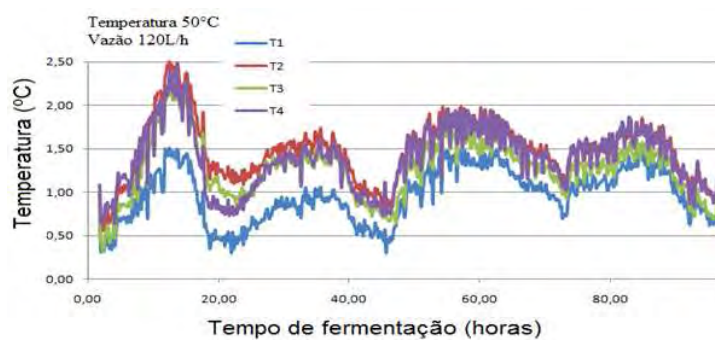
A maioria das informações encontradas na literatura sobre a dinâmica de fermentação nos reatores é referente a microrganismos mesofílicos, com temperaturas de processo entre 25-35°C, havendo poucas informações sobre microrganismos termofílicos. A manutenção de temperaturas altas no fermentador tende a apresentar algumas variações de temperatura durante o processo fermentativo, decorrentes da geração de calor metabólico gerado pelo microrganismo. Em fungos mesofílicos essa variação pode chegar até 15°C (MITCHELL et al., 2010), enquanto que para fungos termofílicos essa variação é bem mais discreta, podendo chegar a 5°C (UMSZA-GUEZ, 2009), como apresentado na Tabela 4.18. Nela observam-se estudos, presentes na literatura, que analisaram a variação de temperatura utilizando-se fungos mesofílicos e termofílicos.

A remoção do calor metabólico é tarefa difícil em reatores de leito fixo, devido à baixa condutividade térmica efetiva do substrato, sendo este fato inconveniente bastante estudado na literatura, uma vez que temperaturas acima das ideais podem inibir o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, afetar a produção de metabólitos (MITCHELL et al., 2010).

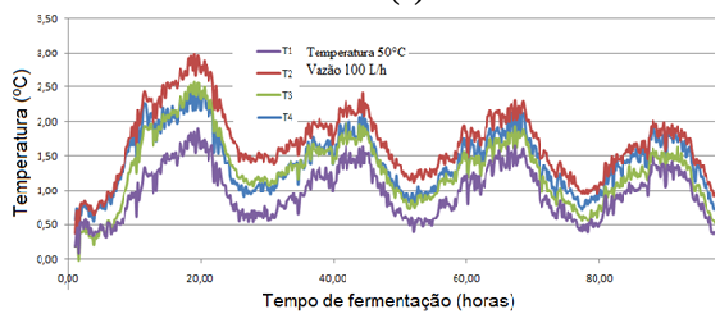
**Tabela 4.18:** Aumento da temperatura durante a geração do calor metabólico

| <b>Fungo</b>                               | <b>Substrato</b>                          | <b>Produto</b>                        | <b>Temperatura de estudo (°C)</b> | <b>Variação de temperatura (°C)</b> | <b>Referência</b>         |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10 864       | farelo de trigo                           | Glucoamilase                          | 30                                | 6-12                                | Khanahmadi. et al. (2004) |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571 | bagaço de cana e Farelo de soja           | Inulinase                             | 30                                | 15                                  | Mazutti (2009)            |
| <i>Penicillium italicum</i> IZ 1584        | bagaço de laranja                         | <i>exo e endo – poligalacturonase</i> | 28                                | 4                                   | Rizzatto et al. (2003)    |
| <i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31  | farelo de trigo, bagaço de cana e laranja | Pectinase                             | 45                                | 3-5                                 | Umsza-Guez (2009)         |
| <i>Myceliophthora sp.</i>                  | farelo de trigo e bagaço de cana          | CMCase                                | 45 e 50                           | 4-6                                 | (Este trabalho)           |

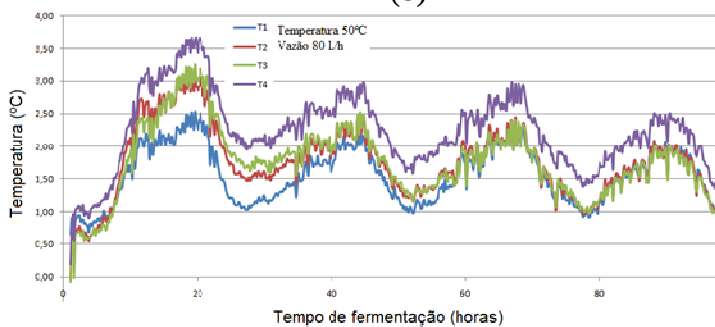
Nas Figuras 4.20 e 4.21 são apresentados os perfis temporais de temperatura dos ensaios conduzidas a 50°C, para diferentes vazões de ar, e para 45°C apenas na vazão de 80L/h, uma vez que as demais reproduziram os efeitos observados na figura anterior. Os termopares foram fixados em 4 posições longitudinais do equipamento, indicadas por diagrama fornecido nas próprias figuras. Os ruídos nos sinais coletados pelo sistema de aquisição de dados são típicos deste tipo de ensaio, para os quais não se espera que a exatidão da medida supere 0,5°C (THOMÉO et al., 2004). As figuras foram obtidas subtraindo-se da temperatura lida pelos termopares a temperatura da parede e da entrada do leito, de modo que apenas a elevação provocada nessa geração de calor metabólico fosse visualizada.



(a)



(b)



(c)

**Figura 4.20.** Distribuição temporal de temperatura para temperatura da parede e de ar de entrada iguais a 50°C e diferentes vazões de ar (a- 120; b- 100; c- 80 L/h).

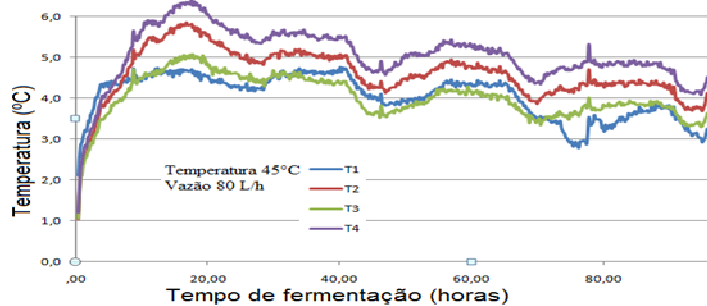


**Figura 4.21.** Distribuição temporal de temperatura para temperatura da parede e de ar de entrada iguais a 45°C, para vazão de ar 80 L/h.

Nestas figuras observa-se que há pouca variação de temperatura nas diferentes posições de coleta, indicando boa homogeneidade do processo fermentativo e a inexistência de pontos quentes. Apenas o termopar mais próximo à entrada do leito (T1) apresentou temperaturas inferiores às demais, o que pode ser atribuído à remoção, pelo ar, de calor latente de vaporização da água líquida presente no meio poroso. Gowthaman et al., (1993) estudaram a produção da enzima amiloglucosidase pelo fungo *Aspergillus niger* CFTRI 1105 com o substrato farelo de trigo e observaram que a temperatura do leito na posição mais baixa do leito (33 mm) era inferior às demais.

Mitchell et al. (2010) estudaram o aumento da temperatura em bioreator de leito fixo com o fungo *Aspergillus niger*, e observaram aumento da temperatura com relação ao aumento da altura do leito, apresentando 36°C na base do reator e 45,6°C na parte superior do leito. Mazzutti (2009) investigou a produção de inulinase por FES em bioreator de leito fixo usando a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Ele observou variação de 20°C entre o ar de entrada e de saída no bioreator. Ghildyal et al. (1994) estudaram a produção da enzima amiloglucosidase com fungo *Aspergillus niger* CFTRI 1105 em bioreator de coluna utilizando farelo de trigo como substrato, e observaram que a temperatura do leito a 170 mm era de 35,6°C, enquanto que para altura do leito de 280 mm era de 37,4°C.

São identificadas nitidamente quatro elevações de temperatura, demonstrando que o metabolismo do fungo tem fases de maior e menor atividade. O maior pico ocorre em torno de 18h de fermentação, sendo observado que os picos maiores ocorreram para as menores vazões. Tal efeito indica que a componente convectiva de transferência de calor no meio é significativa. O limite superior de vazão que pode ser aplicado ao reator foi determinado neste trabalho e dependeu da remoção de umidade do leito, que é fator crítico para o metabolismo microbiano.

Ghildyal et al. (1994) observaram em seu trabalho a diminuição da temperatura proveniente do calor metabólico devido ao aumento na taxa de fluxo de ar, observando que a temperatura passou de 52 para 35,6°C quando o fluxo de ar passou de 5 para 25 Lpm, observando a eficiência da aeração forçada na eliminação do calor metabólico, fato este também observado por outros autores (GOWTHAMAN et al., 1993; MAZZUTTI, 2009; UMSZA-GUEZ, 2009).

Observou-se também leve decréscimo na atividade enzimática com o aumento na altura do leito, possivelmente, devido ao aumento da variação da temperatura ocorrido com o aumento da altura do leito, como apresentado na Figura 4.21. O aumento da temperatura pode ter prejudicado o desenvolvimento do microrganismo, fato este também observado pelos autores (GOWTHAMAN et al., 1993; MITCHELL et al, 2010; UMSZA-GUEZ, 2009)

Rosa et al. (2003) estudaram a desativação térmica com o uso da protease de *Penicillium fellutanum*, como enzima modelo para entender como projetar biorreatores utilizando a FES. Eles observaram que quanto maior o tempo em que altas temperatura são mantidas no leito, maior será a desnaturação de enzimas durante a fermentação.

Para a temperatura de 50°C, os picos são mais baixos do que para 45°C, o que revela que o fungo tem maior atividade na temperatura mais amena, sem que no entanto, secrete mais enzimas como ficou comprovado no item 4.2.2, quando da comparação dos resultados a 45°C e 50°C a diferentes vazões e 96h de fermentação. Desta forma, entende-se que a oferta de nutrientes para o fungo na menor temperatura favoreça seu desenvolvimento sem a necessidade de produção de maior quantidade de enzimas celulolíticas, de modo que o crescimento celular é obtido a partir de outras fontes de carbono.

Também é observada queda na intensidade dos picos de atividade e da temperatura de modo geral com o decorrer do tempo de fermentação, indicando menor atividade metabólica do fungo.

Estas elevações de temperatura são próximas às observadas por Umsza-Guez (2009), que não observou elevações superiores a 5°C durante a fermentação de bagaço de laranja e de farelo de trigo pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. Tais elevações são bem menos intensas das observadas para fungos mesofílicos, o que a princípio faria supor que o metabolismo do fungo não seria fortemente afetado pelo comportamento térmico do sistema. No entanto, os resultados no bioreator para as temperaturas de 45 e 50°C são muito distintos, demonstrando que mesmo com variações amenas de temperatura pode haver alterações significativas no metabolismo microbiano, decorrente de modificações do meio fermentativo.

## 5. CONCLUSÕES

O fungo termofílico utilizado neste trabalho *Myceliophthora sp.* demonstrou ser bom produtor de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, equiparando-se aos melhores produtores encontrados na literatura, evidenciando-se seu bom potencial para a produção destas enzimas em larga escala por fermentação em estado sólido (FES).

Nos ensaios em escala de sacos de polipropileno observou-se grande variabilidade dos dados para ensaios repetidos sob as mesmas condições experimentais, dos quais se constatou que após 96h de fermentação as atividades enzimáticas observadas eram estatisticamente iguais às de tempos superiores. Os estimadores estatísticos não indicaram diferença significativa da produção de celulase com as variações da proporção de bagaço de cana e de farelo de trigo, da temperatura de fermentação e da umidade inicial do substrato, mas os melhores resultados foram obtidos para a proporção de 70% de bagaço de cana e 30% de farelo de trigo, temperatura de 50°C e umidade inicial do substrato de 80%.

Em escala de reator, o fungo apresentou bom desenvolvimento tendo produtividade enzimática semelhante à encontrada em escala de sacos. Nos testes preliminares, observou-se que o bagaço de cana triturado e peneirado apresentou melhor rendimento, do que bagaço apenas peneirado. Foi constatada heterogeneidade de umidade no interior do leito, sendo esta crescente do fundo para o topo do bioreator, comportamento inverso ao da atividade enzimática.

As diferentes vazões não afetaram estatisticamente a fermentação, possuindo pouca influência sobre as distribuições longitudinais de umidade e de atividade enzimática. Já os ensaios para as temperaturas de 45 e 50°C mostraram-se distintos, sendo a maior produção de enzimas após 96h de processo obtida a 50°C. Após 144h de fermentação, os resultados para 45°C foram iguais aos de 50°C obtidos em 96h.

Foram observados quatro picos de temperatura, com intervalos aproximados de 18h entre eles, sendo o maior pico notado após 18h de fermentação, cuja intensidade foi dependente da vazão do ar e da temperatura do processo. O maior pico teve intensidade de 6°C acima da temperatura da camisa de refrigeração e do ar (45°C) e vazão de ar de 80L/h de vazão, diminuindo com o aumento da vazão e com o aumento da temperatura.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Com relação à umidade do material utilizado, observou-se que o farelo de trigo e o bagaço de cana possuem cinética de absorção de água distintas, sendo necessário elaborar uma técnica de umidificação do meio que contemple esta característica.

Nos estudos em escala de frasco, apesar de o fungo IV-2B ter apresentado valor de atividade menor em relação ao fungo I-1D3b, estudo com outros meios e outras concentrações ou em associação com outros fungos, como por exemplo o fungo I-1D3b, buscando sinergismo entre eles, poderia potencializar sua produtividade.

Estudar o efeito de maiores vazões de ar de forma a obter maiores informações sobre o comportamento da variação de temperatura no leito, sem comprometer a produção de enzimas.

Com relação à maior produção de enzimas a 45°C e 144h de fermentação e 50°C em 96h, é necessário fazer ensaios específicos para elucidar melhor esse comportamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLAWAT, S.; BATTAN, B.; DHIMAN, S.S.; SHARMA, J.; MANDHAN, R.P. Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34:763-770, 2007.

ALVES, S. B. & PEREIRA, R. M. - Produção de fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed). *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ, p. 845-869, 1998.

ASAGBRA, A. E.; SANNI, A. I.; OYEWOLE, O. B. Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 107-114, 2005.

BADINO JR. A. C. Variação de escala. In: SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. ed. 10, vol. 2, Ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 333-353.

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

BARGA, M. C. **Modelo de inferência para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido**. 2007. 158 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2007.

BERNARDES, J. Produção conjunta de etanol e biodiesel pode reduzir emissões. Inovação tecnológica. Set. 2010. Disponível em: <<http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/meta.php?meta=Biocombust%EDveis>>. Acesso em: 01 dez 2010.

BORZANI, W. Algumas aplicações industriais. In: \_\_\_\_\_. **Biotecnologia Industrial**. ed.12, vol. 1, Ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 253-254.

CASTILLO, M. R.; CORREIA, M. G.; LINDEN, J. C.; TEGERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnology Lett.*, v. 16, n. 9, p. 967-972, set, 1994.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Biores Technol.*, 71: 45-50, 2000.

CASTRO, H. F. de; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. dos. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, vol. 27, nº1: 146-156, 2004.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P. K.; SANGWAN, R. S. Cellulase production by six *Trichoderma* spp. Fermented on medicinal plant processings. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 605–609, 10 march, 2009.

CHARLAN, G.& HOROWITZ, N. H. Membrane Permeability and the loss of germination factor from *Neurospora crassa* at low water activities. *Journal of Bacteriology*, 117: 261-26, 1974.

CHINN, M.S; NOKES, S.E.; STROBEL, H.J. Influence of moisture content and cultivation duration on *Clostridium thermocellum* 27405 end-product formation in solid substrate cultivation on Avicel. *Bioresource Technol.* 99:2664–2671, 2008.

COURI, S.; TERZI, S. da C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; da COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*, 36: 255-261, 17 june, 2000.

COUTO, S. R.; LOPEZ, E. e SANROMAN, M. A. Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. *Journal of Food Engineering*, 74: 263-267, 2006.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; DEAMER, D. W. Hydration dependent phase changes in biological membrane. *Biophysics of water*, wiley, Chichester, UK, 295-299, 1982.

DALSENTER, F. D. H., **Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus Oryzae* em cultivo no estado sólido.** 2005. 136 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DOMÍNGUEZ, A.; RIVELA, I.; RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. *Process Biochemistry*, 37: 549–554, 2001.

DURAND, A. Bioreactor designs for Solid State Fermentation. *Biochem. Engn. J.*, 13: 113-125, 2003.

EVELEIGH, D. E. Cellulase: a Perspective. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 321: 435-447, 1987.

FONTES, V. Dedini e Novozymes fazem parceria para desenvolvimento tecnológico. DEDINI indústrias de base. Ago. 2010. Disponível em <[www.dedini.com.br/web/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=20&Itemid=40&lang=pt](http://www.dedini.com.br/web/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=20&Itemid=40&lang=pt)>, acesso 01/12/2010.

FOONG, C.W.; KRISHNAIAH, K.; JANAUN J.; SUBBARAO, D.; PRABHAKAR, A. Heat and mass transfer studies of palm kernel cake (PKC) in fluidized bed fermenter. *Ind. Crops. Prod.* 30:227-234, 2009.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresource Technology*, 99: 7623-7629, 17 march, 2008.

GERVAIS, P.& BENSOUSSAN, M. Solid-state fermentations of the genus *Aspergillus*, In: J.E. Smith, *Aspergillus*, Plenum Press, New York, p. 101–140, 1994.

GERVAIS, P.& MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 85–101, 2003.

GESSESSE, A.& MAMO, G. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus sp.* by using solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 68-72, 1999.

GHILDYAL, N. P.; GOWTHAMAN, M. K.; RAGHAVA RAO, K. S. M. S.; KARANTH, N. G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 16, March, 1994.

GOES, T.; MARRA, R. A expansão da cana-de-açúcar e sua sustentabilidade. Embrapa. 2008. Disponível em:< [http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/A%20expansao%20da%20cana-de-acucar%20e%20a%20sua%20sustentabilidade.pdf/view?searchterm=A](http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008/A%20expansao%20da%20cana-de-acucar%20e%20a%20sua%20sustentabilidade.pdf/view?searchterm=A%20expans%C3%A3o%20da%20cana-de-a%C3%A7%C3%BAcar%20e%20sua%20sustentabilidade) expansão da cana-de-açúcar e sua sustentabilidade>. Acesso em: 14 maio. 2009.

GOLDEMBERG, J.& LUCON, O. Energy and Environment in Brazil. *Estudos Avançados*, 21(59), 2007.

GOMES, E.; GUES, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. da; Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim. Nova*, 30, 1: 136-145, 2007.

GOWTHAMAN, M. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; GHILDYAL, N. P.; KARANTH, N. G. Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor. *Prunled in Great Britain*, vol. 11: 611-620, 1993.

GRAJEK, W. & GERVAIS, P. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 9: 658-662, 1987.

GRAMINHA, E. B. N.; GONCALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v.144, p. 1-22, 2008.

GUTIERREZ-ROJAS, M.; AMAR ABOUL HOSN, S.; AURIA, R.; REVAH, S.; FAVELATORRES, E. Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 31: 363–369, 1996.

IBGE. Comentários. Produção Agrícola Municipal, v. 36, 2009. ISSN 0101-3963 **Prod. agric. munic.**, Rio de Janeiro, v. 36, p.1-93, 2009 Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2009/PAM2009\\_Publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2009/PAM2009_Publicacao_completa.pdf)>, acesso em 2010.

KACHLISHVILI, E., PENNINCKX, M.J., TSIKLARI, N., ELISASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 22: 391-397, 2006.

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

KANG, S.W., PARK, Y. S., LEE, J. I. Production of cellulose and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Biores. Technol.*, 91: 153-156, 2004.

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. Microbial Production of Gallic Acid by Modified Solid State Fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.23, p. 173-177, 1999.

KHANAHMADI, M.; ROOSTAAZAD, R.; SAFEKORDI, A.; BOZORGMEHRI, R.; MITCHELL, D.A. Investigating the use of cooling surface in solid-state fermentation tray bioreactors: modeling and experimentation. *J Chem Technol Biotechnol* 79:1228–1242, 2004.

KHANAHMADI, M.; ROOSTAAZAD, R.; MITCHELL, D.A.; MIRANZADEH, M.; BOZORGMEHRI, R.; SAFEKORDI, A. Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed solid-state fermentation. *Chem. Eng. Sci.*, 61:5654 – 5663, 2006.

LAURENTINO, C. L. **Transferência de calor em leitos fixos com aplicações em reatores de fermentação em estado sólido**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

LI, P. J.; JING, D.B.; ZHOU, Q. X.; ZHANG, C. G. Optimization of solid fermentation of cellulase from *Trichoderma koningii*. *Sci. (China)*, 16: 816-820, 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**, Prentice Hall International Inc., New York, 10<sup>a</sup> ed., 2003.

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry, *Bioresource Technol.* 99:2373 – 2383, 2008.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47: 813-819, 2004.

MARTIN, N.; GUEZ, M.; LEITE, R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Study of pectinase produced by thermophilic fungi *Rhizomucor sp.* N31 in FES. *Journal of Biotechnology*, 131: 133–187, 2007.

MAZZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F.; TREICHEL, H. Mathematical modeling of *Kluyveromyces marxianus* growth in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *J. ind Microbiol Biotechnol*, 37:391-400, 2010.

MAYERHOFF, Z. D. V. L. Patentes em bioetanol evidenciam desenvolvimento brasileiro. Propriedade intelectual. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-superior/imprensa/artigoseentrevistas/patentes>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, E.; PIOVAN, T.; ROBERTO, I. C. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* CBMAI756 from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. *Process. Biochemistry*, 39: 1387 - 1391, 2004.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3):426-428, 1959.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspect of solid state bioprocessing. *Advances Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.68, p.61-138, 2000a.

MITCHELL, D. A., KRIEGER, N., STUART, D. M., PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation – II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process. Biochemistry*, v.35, p.1211-1225, 2000b.

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

MITCHELL, D. A., CUNHA, L. E. N.; MACHADO, A. V. L.; JR, L. F. L. L.; KRIEGER, N. A Model-Based Investigation of Potential Advantages of Multi-Layer Packed Beds in Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v.48, p.195-203, 2010.

MISHIMA, D.; TATEDA, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. *Bioresour. Technol.*,97(16): 2166-72, 2006.

MORETTI, M. M. de S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulasas xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis.** 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

ORIOLE, E.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Water and water activity in the solid-state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27: 498-503, 1988.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Biotechnology Laboratory*, 18: 37-45, 5 feb, 2003.

PANDEY, A., SOCOOL, C. R., NIGAM, P. Biotechnological potential of agroindustrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74:69-80, 2000.

PANDEY, A. Solid-State Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84, 2003.

PATURAU, J. M. By-products of the cane sugar industry - an introduction to their industrial utilization. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 435 p, 1989.

PEIXOTO, A. B., **Estudo da produção de enzimas e gomas por leveduras selvagens coletadas em diversas regiões do Brasil**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

RABELO, S. C., **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAGHAVARAO, K. S. M.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engeneering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, v. 13, p. 149-155, 2003.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Jornal of Biotechnology*, 1: 1– 15, 1998.

RIDDER, E. R.; NOKES, S. E. ; KNUTSON, B. L. Optimization of Solid-State fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. *American Society of Agricultural Engineers*, 42(6): 1785 – 1790, 1999.

RIZZATTO, M. L.; SILVA, D.; GOMES, E.; ALEGRE, R. M. Estudo da variação da temperatura em reator de coluna com diferentes densidades aparentes em fermentação semi-sólida para produção de pectinases. In: SINAFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis - SC, 2003. Disponível em <[http:// www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos\\_completos/t382.doc.2003](http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t382.doc.2003)>6, acesso em 2010.

ROSA, A. S. DA; SANTOS, M. M. DOS; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Desativação térmica de enzimas em bioreator de fermentação em estado sólido. In: SINAFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis - SC, 2003. Disponível em <[http:// www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos\\_completos/t382.doc.2003](http://www.enq.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t382.doc.2003)>6, acesso em 2010.

SALAR, R. K. & ANEJA, K.R. Thermophilic Fungi: Taxonomy and Biogeography. *Journal of Agricultural Technology*. 3(1): 77-107, 2007.

SCHMIDELL, W. Biorreatores e processos fermentativos. In:\_\_\_\_. **Biotecnologia Industrial**. ed. 10, vol. 10, Ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 179-192.

SENTHIL, C. & DAS, K. C. Converting sugar cane industry wastes into ecofriendly bioproducts. *Biocycle*, 45: 58 -62, 2004.

SHARMA, M.; CHADHA, B. S.; KAUR, M.; GHATORA, S. K.; SAINI, H. S. Molecular characterization of multiple xylanase producing thermophilic/thermotolerant fungi isolated from composting materials. *Applied Microbiology*, 46: 526-535, 2008.

SHERIEF, A. A.; EL-TANASH, A. B.; ATIA, N. Cellulase production by *Aspergillus fumigates* grown on mixed substrate of rice straw and wheat bran. *Journal of Microbiology*, 5 (3): 199-211, 2010.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 318-324, 2002.

SILVA, R. da; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K. Production of Xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in Different Residues by *Thermoascus aurantiacus* Miehe. *Braz. J. Microbiol.* 36: 235 - 241, 2005.

SINGH, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 25:420-425, 1999.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA B. S.; SAINI, H. S. Novel sources of fungal cellulases for efficient deinking of composite paper wast, *BioResources*. 3(1): 234-246. 2008.

SONIA, K.G.; CHADHA, B. S.; BADHAN, A. K., SAINI, H.S. Diversity of hemicellulases in thermophilic fungi. *Marine Biotechnology Poster*. MB (P) 01, 2004.

SUK-JIN, H.; KI-SUNG, L.; MIN-EUI, H.; SUK-CHAE, J.; BYUNG, J. Y.; HYUN, M. K.; SUNG M. P.; JIN-HO, S.; DAE-HYUK, K., JAE, C. P.; YONG-SU, J. Improved galactose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic. *Engineering Biotechnology and Bioengineering V*. 108, n. 3, p. 621–631, 2010.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, [s. v.], p. 1-4, 2008.

TECHAPUN, C.; POOSARAN, N.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process. Biochemistry*, 38:1327-1340, 2003.

THOMÉO, J.C.; ROUILLER, C. O.; FREIRE, J.T. Experimental analysis of heat transfer in packed beds with air flow. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 43: 4140 – 4148, 2004.

UMSZA-GUEZ, M. A. **Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo.** 2009. 124 f. Tese (Doutorado) – Universidade estadual paulista, São José do Rio Preto, 2009.

VICCINI, G.; MITCHELL, D. A.; BOIT, S. D.; GERN, J. C.; ROSA, A. S.; COSTA, R. M.; DALSENER, F. D. H.; von MEIEN, O. F.; KRIEGER, N., Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 39, n. 4, p. 271-294, 2001.