



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

Fernanda Perpétua Casciotori

Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido:
ampliação de escala de biorreatores de leito fixo

São José do Rio Preto
2015

Fernanda Perpétua Casciadori

Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido:
ampliação de escala de biorreatores de leito fixo

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

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto
2015

Casciotori, Fernanda Perpétua.

Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido : ampliação de escala de biorreatores de leito fixo /
Fernanda Perpétua Casciotori -- São José do Rio Preto, 2015
177 f. : il.

Orientador: João Cláudio Thoméo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Biorreatores. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Celulase. 5. Enzimas de fungos. I. Thoméo, João Cláudio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 66:577.1

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

Fernanda Perpétua Casciatori

Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido:
ampliação de escala de biorreatores de leito fixo

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

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. José Teixeira Freire
UFSCar – São Carlos

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
UNESP – Assis

Prof. Dr. Andreas Bück
OvGU – Magdeburg

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
30 de abril de 2015

*Ao meu amado esposo, Eduardo, porto seguro em minha vida;
Aos meus pais, Donizetti e Ana, exemplos de amor e de dignidade;
À minha irmã, Priscila, amiga e confidente;
E ao meu Otávio (in memoriam), de quem guardo singelas e alegres lembranças.*

Dedico.

Fernanda Perpétua Gasciatori

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte perene de amor, bênçãos, graças, força, sabedoria e felicidade; por Sua presença constante em minha vida, sempre a iluminar os meus caminhos.

Ao Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, orientador desta tese, pelo professor completo que é; pela suma importância em minha formação profissional e pessoal.

To Prof. Dr.-Ing. Evangelos Tsotsas and Jun.-Prof. Dr.-Ing. Andreas Bück, who kindly have hosted me during one year at their research group in OvGU, Magdeburg; for all assistance and so valuable cooperation.

Ao meu pai Donizetti e à minha mãe Ana, porque minha maior motivação sempre foi enchê-los de orgulho, na tentativa de retribuir um pouquinho de tudo o que sempre fizeram e dedicaram para que eu chegasse até aqui.

Ao meu amado esposo Eduardo, pela compreensão, admiração, incentivo, força e paciência; pelo nosso relacionamento construído sobre bases sólidas; por saber me fazer sorrir independentemente das circunstâncias.

À minha irmã, Priscila, por toda ajuda nas etapas experimentais desta tese, sobretudo nos ensaios de ampliação de escala; pela parceria, pelo companheirismo de todos os dias e pela amizade única e incomparável.

Aos membros da Comissão Examinadora de meu Exame Geral de Qualificação, Prof. Dr. David Alexander Mitchell e Prof^a. Dr^a. Márcia Luzia Rizzato, que, por meio de suas sugestões, contribuíram para com o direcionamento das etapas finais do trabalho.

Aos membros da Comissão Examinadora de minha Defesa de Tese, Prof. Dr. José Teixeira Freire, Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto, Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi e Jun.-Prof. Dr.-Ing. Andreas Bück, que com muita destreza avaliaram esta tese e proporcionaram uma rica discussão do seu conteúdo, tendo em vista o melhor

fechamento deste trabalho e a prospecção de trabalhos futuros.

Special thanks to Jun.-Prof. Dr.-Ing. Andreas Bück, who came from Magdeburg, Germany, in order to participate of my PhD. Defense, among other activities as a visitor professor at IBILCE/UNESP. Also thanks for making my days before the Defense more calm and pleasant.

A todos os amigos e amigas que fiz nos grupos de pesquisa do Brasil e da Alemanha; a alguns pela colaboração experimental e científica, a outros apenas por tornarem a rotina de trabalho mais agradável.

Às famílias Casciotori, Marques, Cassemiro e Almeida, pelo incentivo incondicional.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para com a realização desta Tese de Doutorado.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos (PPG-ECA), por proporcionarem oportunidade, apoio, suporte e infraestrutura necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro com Bolsa de Doutorado (proc. DR 2011/07453-5) e Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (proc. BEPE 2012/13939-0) para desenvolvimento desta Tese.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Esta tese trata da ampliação de escala de biorreatores de leito empacotado para produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido (FES), constando de etapas experimentais, desenvolvidas no Brasil, e de modelagem e simulação, realizada na Alemanha. Em escala de frascos, foram obtidos parâmetros cinéticos de crescimento dos fungos termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414. O crescimento foi estimado com base no teor de proteínas e as velocidades específicas de crescimento foram $\mu = 0,06$ e $0,10 \text{ h}^{-1}$ para os fungos termo e mesofílico, respectivamente. No período sanduíche, foi proposto um modelo heterogêneo bidimensional capaz de prever perfis de temperatura, umidade e crescimento fúngico ao longo do processo em qualquer posição do biorreator. Simulações empregando este modelo ao cultivo de *M. thermophila* em biorreator de leito empacotado com 7,62 cm de diâmetro interno indicaram que não deveria haver sobreaquecimento, mas perfis de umidade poderiam comprometer a produtividade na zona próxima à entrada de ar. Em ampliação de escala, foram realizados experimentos em biorreatores de leito empacotado empregando-se ambos os fungos e, como substratos, bagaço de cana e farelo de trigo. O rendimento do processo foi medido em termos de atividades celulolíticas, bem como se analisaram perfis de temperatura ao longo do processo e de umidade final do fermentado. Para ambos os fungos, em biorreator com 7,62 cm de diâmetro, não houve sobreaquecimento do leito para substrato contendo fibras de bagaço, concordando com simulações. Em biorreator com diâmetro 20 cm, observou-se um perfil térmico radial expressivo, com aumento de temperatura de até $10 \text{ }^\circ\text{C}$ no centro do leito. Com o fungo termofílico *M. thermophila*, as atividades médias de endoglucanase e xilanase atingiram, respectivamente, 785 e 2120 U/gss no biorreator estreito e 580 e 2070 U/gss no biorreator largo. Com o mesofílico *T. reesei*, as atividades médias de endoglucanase e xilanase atingiram, respectivamente, 28 e 175 U/gss no biorreator estreito e 60 e 210 U/gss no largo. Diante do exposto, os biorreatores têm potencial de aplicação em plantas-piloto, podendo-se esperar bom desempenho do processo em escala industrial.

Palavras-chave: Biorreatores; Fermentação em Estado Sólido; Enzimas; Engenharia.

ABSTRACT

*This thesis deal with the scale-up of packed-bed bioreactors for fungal cellulases production by solid-state fermentation (SSF), comprising experimental steps, developed in Brazil, and modeling and simulation, developed in Germany. At flasks scale, growth kinetic parameters were obtained for thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b and mesophilic one *Trichoderma reesei* QM9414. Growth was estimated based on protein content and specific growth rates were $\mu = 0,06$ and $0,10 \text{ h}^{-1}$ for thermo and mesophilic fungi, respectively. During the abroad period, it has been proposed a heterogeneous two-dimensional model able to predict temperature, moisture content and fungal growth profiles throughout the process at any position of the bioreactor. Simulations using this model for the cultivation of *M. thermophila* in a packed-bed bioreactor with internal diameter 7.62 cm addressed that is shouldn't happen overheating; however, moisture content profiles could harm enzyme productivity in the vicinity of the air inlet. On scaling-up, experiments in packed-bed bioreactors employing both fungi and sugar cane bagasse and wheat bran as substrates were carried out. The process yield was measured as cellulolytic activities, as well as temperature profiles along the process and final moisture contents of the fermented materials were obtained. For both fungi, in bioreactor with 7.62 cm diameter, there was no overheating of the bed when substrate contained bagasse fibers, agreeing with simulations. In bioreactor with 20 cm diameter, an expressive radial thermal profile has been observed, with temperature increasing up to 10 °C at bed central axis. With thermophilic fungus *M. thermophila*, average activities of endoglucanase and xylanase reached, respectively, 785 and 2120 U/gss in thin-bioreactor and 580 and 2070 U/gss in large-bioreactor. With mesophilic fungus *T. reesei*, average activities of endoglucanase and xylanase reached, respectively, 28 and 175 U/gss in thin-bioreactor and 60 and 210 U/gss in large one. Given the above, the bioreactors have potential for application at pilot plants and good performance in industrial scale may be expected.*

Keywords: *Bioreactors; Solid-state fermentation; Enzymes; Engineering.*

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. ..INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
CAPÍTULO 2. ... REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Produção de etanol de segunda geração e enzimas hidrolíticas.....	3
2.2 Fermentação em estado sólido (FES)	7
2.3 FES em biorreatores de leito empacotado	13
2.4 Modelagem dos fenômenos de transferência de calor e massa em biorreatores de FES em leitos empacotados.....	18
2.4.1 Cinética de crescimento fúngico na fermentação em estado sólido (FES)	23
2.5 Ampliação de escala de biorreatores de FES em leito empacotado	26
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Microrganismos e substratos.....	31
3.2 Ensaio fermentativo em escala de frascos.....	32
3.2.1 Medidas indiretas da concentração de biomassa microbiana.....	33
3.3 Proposição de novo modelo de transferência de calor e umidade e simulação numérica.....	35
3.4 Ensaio fermentativo em biorreatores de leito empacotado	37
3.5 Determinação das atividades enzimáticas	41
CAPÍTULO 4. RESULTADOS DE TESTES PRELIMINARES EM ESCALA DE FRASCOS.....	43
4.1 Composição e umidade do substrato para produção de celulases pelo fungo <i>Trichoderma reesei</i> QM9414	43
4.2 Estimativa da cinética de crescimento do fungo termofílico <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	46
4.3 Estimativa da cinética de crescimento do fungo mesofílico <i>Trichoderma reesei</i> QM9414.....	52

CAPÍTULO 5. RESULTADOS EM MODELAGEM E SIMULAÇÃO.....	55
5.1 Estudo de caso para simulação.....	55
5.2 Modelagem da transferência de calor e de água.....	60
5.2.1 Balanço de massa para o vapor d'água na fase gasosa	61
5.2.2 Balanço de massa para a água na fase sólida	62
5.2.3 Balanço de energia na fase gasosa.....	63
5.2.4 Balanço de energia para a fase sólida.....	63
5.3 Crescimento fúngico e taxa específica de crescimento	64
5.4 Balanço de massa para os sólidos secos totais	66
5.5 Conteúdo de umidade da fase gasosa	67
5.6 Isoterma de sorção da fase sólida.....	67
5.7 Parâmetros de transporte de calor e massa para as fases gasosa e sólida ...	68
5.8 Coeficientes de transferência de calor e massa na interface gás-sólido	69
5.9 Razão área de transferência por volume total do biorreator (a , m^2/m^3)	71
5.10 Condições iniciais e de contorno.....	71
5.11 Resultados das simulações do estudo de caso.....	73
5.11.1 Predições gerais no biorreator pela simulação do estudo de caso sob as condições de referência.....	73
5.11.2 Efeito das condições operacionais sobre o desempenho geral do biorreator .	79
5.11.3 Efeito das variáveis ambientais sobre o crescimento fúngico.....	86
5.11.4 Simulação de biorreatores com vários diâmetros de leito.....	89
5.11.5 Verificação com dados experimentais	91
5.11.6 Influência dos valores dos parâmetros nas predições do modelo 2-D.....	94
CAPÍTULO 6. RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE AMPLIAÇÃO DE ESCALA...101	
6.1 Fermentação com <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b em biorreator com 7,62 cm de diâmetro interno.....	101
6.1.1 Biorreator com comprimento total 1,0 m e substrato BC:FT 7:3.....	101
6.1.2 Biorreator com comprimento total 0,5 m e substrato BC:FT 7:3.....	109
6.1.3 Biorreator com comprimento total 1,5 m e substrato BC:FT 7:3.....	113
6.1.4 Biorreator com comprimento total 0,4 m e substrato FT e FT:BC _{fino} 1:1.....	118

6.2	Fermentação com <i>Trichoderma reesei</i> QM-9414 em biorreator com 7,62 cm de diâmetro interno.....	123
6.2.1	Biorreator com comprimento total 1,0 m e substrato BC:FT 9:1	123
6.2.2	Biorreator com comprimento total 0,4 m e substrato FT puro.....	129
6.3	Fermentação com <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b em biorreator com 20 cm de diâmetro interno	132
6.3.1	Biorreator com comprimento total 1,0 m e substrato BC:FT 7:3.....	132
6.3.2	Biorreator com comprimento total 1,4 m e substrato BC:FT 7:3.....	137
6.4	Fermentação com <i>Trichoderma reesei</i> QM9414 em biorreator com 20 cm de diâmetro interno.....	143
6.4.1	Biorreator com comprimento total 1,0 m e substrato BC:FT 9:1	143
6.5	Síntese das atividades enzimáticas obtidas nos biorreatores e discussão ...	148
CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES		151
CAPÍTULO 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS		153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		154
APÊNDICE A.....		174
APÊNDICE B.....		176

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Neste momento em que o desenvolvimento tecnológico de uma matriz energética limpa e renovável é estratégico para o Brasil, as enzimas celulolíticas chamam atenção da comunidade científica e industrial, tendo em vista sua aplicação na hidrólise de materiais lignocelulósicos, resíduos da agroindústria, na cadeia de produção do etanol de segunda geração.

Dentre os rejeitos agroindustriais disponíveis, se destaca o bagaço da cana-de-açúcar, resíduo da produção do etanol de primeira geração e predominantemente constituído por celulose, hemicelulose e lignina, sendo potencial fonte de açúcares fermentescíveis (PANDEY et al., 2000). A produção brasileira de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 653 milhões de toneladas na safra 2013/2014 (UNICA, 2015), o que gerou cerca de 163 milhões de toneladas de bagaço, o que denota o potencial de biomassa conversível a etanol no país.

A produção do etanol de segunda geração ou bioetanol envolve três etapas principais: pré-tratamento do bagaço, hidrólise da celulose e fermentação dos açúcares liberados. A etapa de hidrólise ou sacarificação pode ocorrer por duas vias, química ou enzimática. A via química, embora eficiente e rápida, gera resíduos tóxicos que devem ser tratados, aumentando o número de operações, consumindo energia e tornando o processo pouco competitivo. A hidrólise enzimática apresenta diversas vantagens sobre a química, dentre as quais se devem destacar o menor gasto energético e a alta especificidade pelo substrato, evitando a produção de compostos indesejáveis. As principais enzimas envolvidas neste processo são as celulasas, bioproduto de interesse no presente trabalho.

Todavia, a rota enzimática é mais lenta e tem como uma das principais barreiras processos eficientes e viáveis de produção de enzimas a custo que não inviabilize seu uso (MISHIMA et al., 2006). A alternativa aqui estudada para a produção de celulasas é a fermentação em estado sólido (FES), processo que permite obter tais enzimas também a partir de rejeitos agroindustriais, o que pode ser tanto econômica quanto ambientalmente interessante.

A fermentação em estado sólido (FES) consiste no crescimento de microrganismos sobre partículas sólidas úmidas, em situações nas quais o espaço entre as partículas contém uma fase gasosa contínua e a água pode estar

impregnada nas partículas ou formar um fino filme sobre elas (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Devido às atividades de água mais baixas nos sistemas de FES, os microrganismos que mais se adaptam a esse cultivo são os fungos filamentosos, dentre os quais os termofílicos se destacam por produzirem enzimas mais termoestáveis, característica bastante interessante do ponto de vista industrial da produção do bioetanol, sobretudo quando pré-tratamentos a quente são empregados (DA SILVA et al., 2005). No entanto, a técnica de produção de celulases por FES ainda está em desenvolvimento, não se encontrando biorreatores disponíveis comercialmente para tal finalidade.

Tendo em vista a demanda por enzimas hidrolíticas para a cadeia do etanol de segunda geração combinada à carência de estudos de engenharia voltados ao desenvolvimento de equipamentos industriais para FES, o objetivo da presente tese foi desenvolver e ampliar a escala de um biorreator de leito empacotado, com baixos custos e facilidade de construção e operação, para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos em cultivo sólido empregando resíduos agroindustriais como substratos. Para tanto, o desempenho de processos de FES em biorreator de leito empacotado cilíndrico encamisado empregando dois fungos com afinidades térmicas distintas (termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414), bagaço de cana e farelo de trigo como substratos e diversas arquiteturas, geometrias, estratégias e condições operacionais foi investigado em termos de perfis térmicos e de umidade e de distribuição e rendimento dos bioprodutos de interesse, quantificados por meio de atividades das enzimas extraídas ao final da fermentação.

A relevância dos estudos de modelagem e simulação como auxiliares aos projetos de ampliação de escala de equipamentos de processo motivou a que a proposição de um novo modelo de transferência de calor e de massa para a FES em leitos empacotados e a simulação do estudo de caso da produção de celulases pelo fungo termofílico empregado neste trabalho fossem os objetivos principais da etapa realizada no exterior, o que posteriormente permitiu que os resultados dos ensaios experimentais fossem analisados e confrontados com dados provenientes de simulações. Por fim, a determinação experimental dos parâmetros cinéticos de crescimento dos fungos foi um objetivo, embora secundário, também importante do trabalho, uma vez que tais parâmetros não se encontravam na literatura e foram requeridos para simulação empregando os modelos propostos.

CAPÍTULO 2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produção de etanol de segunda geração e enzimas hidrolíticas

Diante da perspectiva de esgotamento das jazidas de combustíveis fósseis em áreas de mais fácil acesso à exploração (que são as reservas de petróleo acima da camada de sal, denominadas pós-sal), as companhias petrolíferas buscam fontes de mais difícil acesso (a camada pré-sal). Tal prática resulta em elevação de custos e aumenta a possibilidade de desastres ambientais. Ademais, a preocupação mundial com o efeito estufa requer redução do consumo de combustíveis fósseis. Neste contexto, a produção em larga escala de combustíveis limpos, como o etanol de segunda geração, é estratégica e o mercado é promissor.

O Brasil foi pioneiro na produção de combustíveis renováveis quando implantou o Proálcool, em meados de 1970, sendo hoje o segundo maior produtor mundial de etanol e o primeiro em etanol de cana-de-açúcar. Estimativas do governo brasileiro preconizavam que o país supriria álcool anidro para adição em até 5 % da gasolina consumida no mundo até 2029 (MAPA, 2011). As estratégias para atingir tal produção incluem aumento da área plantada, aumento de produtividade das usinas ou emprego de biomassa residual para produzir etanol. A última alternativa tem sido incentivada pelos governos federal e estadual paulista, tendo-se criado o Centro Paulista de Pesquisa em Bioenergia, em 2010, visando impulsionar estudos na área.

A tecnologia de produção do denominado etanol de segunda geração (2G) tem como matéria-prima açúcares provenientes da quebra das cadeias de celulose e hemicelulose. No Brasil, uma matéria-prima abundante para conversão a etanol de segunda geração é o bagaço da cana-de-açúcar, resíduo da produção do etanol de primeira geração. O bagaço de cana é predominantemente constituído por celulose, hemicelulose e lignina, sendo assim uma potencial fonte de açúcares fermentescíveis (PANDEY et al., 2000). Atualmente, esse bagaço é primordialmente empregado na geração de energia elétrica, utilizada pela usina ou vendida às companhias de distribuição. Logo, para a produção de bioetanol ser competitiva, o custo do álcool produzido deverá compensar o que se deixará de ganhar por meio da co-geração de energia.

A produção brasileira de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 653 milhões de toneladas na safra 2013/2014 (UNICA, 2015), o que gerou cerca de 163 milhões de toneladas de bagaço, o que denota o potencial de biomassa conversível a etanol no país. Calcula-se que, por meio da tecnologia do etanol 2G, seja possível elevar em até 50 % a produção anual atual de 20 bilhões de litros de álcool combustível no país. É uma alternativa interessante num momento em que se coloca em xeque a expansão de áreas agrícolas para produção de biocombustíveis em detrimento dos alimentos, o que poderia afetar a situação de segurança alimentar no país (INCT, 2013).

O processo envolvendo a conversão dos materiais lignocelulósicos a etanol consiste basicamente em quatro etapas, representadas na Figura 2.1: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e separação/purificação do produto. O pré-tratamento é essencial para desestruturar a biomassa lignocelulósica, tornando as fibras de celulose e hemicelulose mais disponíveis para a hidrólise, que por sua vez consiste na conversão dos carboidratos das cadeias de celulose ou hemicelulose do bagaço a açúcares fermentescíveis, podendo ser feita por rota química ou enzimática. Finalmente, os açúcares fermentescíveis de cinco ou seis carbonos liberados podem ser fermentados por leveduras e o mosto fermentado pode seguir para a destilação, como no processo convencional de produção do etanol de primeira geração.

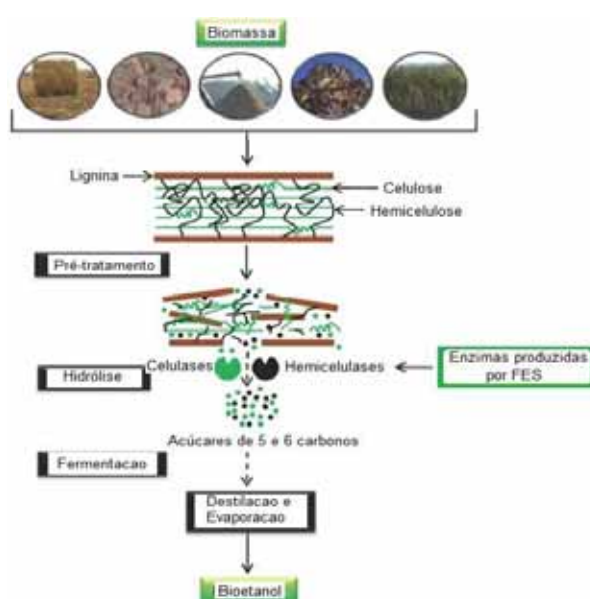


Figura 2.1. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

A hidrólise química da biomassa, feita por meio do emprego de ácidos ou bases concentrados ou diluídos, é eficiente e rápida, mas gera resíduos tóxicos que devem ser tratados, aumentando o número de operações, consumindo energia e tornando o processo pouco competitivo. A hidrólise enzimática, por sua vez, apresenta diversas vantagens sobre a química, dentre as quais se devem destacar o menor gasto energético e a alta especificidade pelo substrato, reduzindo o volume de resíduos químicos gerados e evitando a produção de compostos secundários indesejáveis para as etapas subsequentes, como furfurais, que poderiam inibir a etapa seguinte de fermentação alcoólica pelas leveduras (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Outra vantagem da hidrólise enzimática em relação à ácida é o fato de o processo enzimático ser conduzido sob condições brandas, atingindo degradação quase total da celulose, enquanto a hidrólise ácida requer altas temperaturas e baixo pH, resultando em condições corrosivas, além de não alcançar alto rendimento (OGIER et al., 1999). As principais enzimas envolvidas neste processo são as celulolíticas, bioproduto de interesse do presente trabalho, juntamente com enzimas hemicelulolíticas.

Dá-se o nome de celulasas a uma classe de enzimas constituídas por endoglucanases (quebra celulose na região amorfa e libera celo-oligossacarídeos), exoglucanases (quebra celulose e celo-oligossacarídeos maiores e libera celobiose) e β -glicosidase (libera moléculas de glicose). Portanto, a hidrólise total da celulose somente ocorre através da ação sinérgica desses três tipos de celulasas, conforme ilustrado na Figura 2.2.

As endoglucanases são as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por iniciar a hidrólise da celulose, com a função de hidrolisar randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, clivando ligações β -1,4 na região central da molécula e liberando açúcares e oligossacarídeos e, conseqüentemente, novas extremidades, sendo uma redutora e outra não redutora (LYND et al., 2002). As endoglucanases também atuam na rápida solubilização do polímero celulósico, reduzindo o grau de polimerização da molécula. Tal fato ocorre devido à fragmentação da cadeia polimérica em oligossacarídeos de diversos graus de polimerização (DIENES; EGYHÀZI; RÈCZEY, 2004). Para determinação da atividade endoglucanase, o substrato preferencialmente empregado é a carboxi-metil-celulose (CMC) devido ao seu alto grau de polimerização e baixa cristalinidade (CAO; TAN, 2002; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

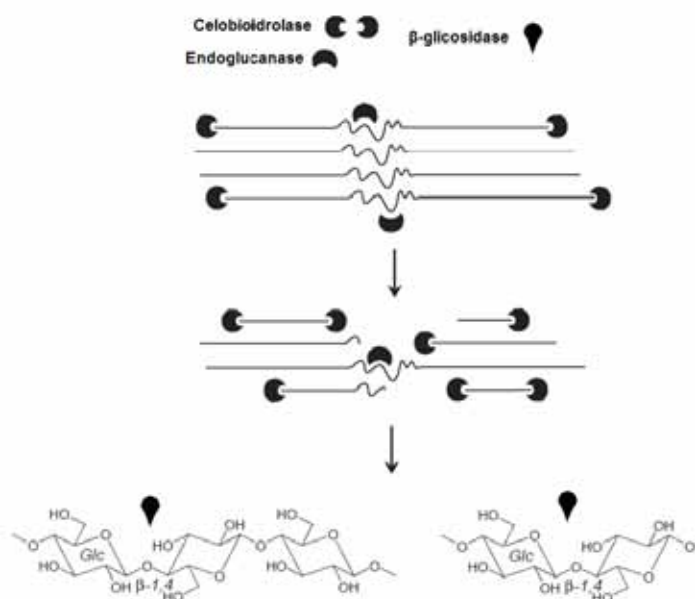


Figura 2.2. Representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose (extraído e adaptado de SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

As celobiohidrolases e as glucanohidrolases constituem o grupo das enzimas denominadas exoglucanases. Embora pouco reportadas, essas enzimas têm a importante capacidade de hidrolisar a fibra celulósica, permitindo a liberação de glicose diretamente do polímero (LYND et al., 2002). As exoglucanases atuam nas extremidades da molécula de celulose microcristalina, liberando dímeros de glicose (CAO; TAN, 2002). As celobiohidrolases participam da hidrólise primária da fibra celulósica e são responsáveis pela ruptura física do substrato, sendo divididas em dois tipos. As do tipo I possuem a função de hidrolisar as extremidades redutoras e as do tipo II são responsáveis pela hidrólise dos terminais não redutores. Essas enzimas sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise, a celobiose, por isso é de suma importância a atuação de outras enzimas do complexo celulolítico, sobretudo das celobiasas, também conhecidas como β-glicosidases (BON; GÍRIO; PEREIRA JUNIOR, 2008).

As β-glicosidases são as enzimas responsáveis por hidrolisar a celobiose e outros oligossacarídeos solúveis e liberar glicose (LYND et al., 2002; LYND; ZHANG, 2002), reduzindo a inibição das endoglucanases e exoglucanases pela presença dos dímeros de glicose (PETROVA; BAKALOVA; KOLEV, 2002) e, por sua vez, aumentando o rendimento total dos açúcares fermentescíveis (WILSON, 2008).

Como a biomassa vegetal geralmente contém também hemicelulose associada à celulose, as hemicelulases constituem outro grupo de enzimas importantes na hidrólise deste material. Neste grupo, destacam-se as xilanases, que são enzimas hemicelulolíticas também chamadas de enzimas acessórias ou auxiliares, sendo responsáveis pela desestruturação das fortes ligações cruzadas entre a celulose e a hemicelulose. A atividade das xilanases é altamente dependente da presença de enzimas capazes de degradar as cadeias laterais. Os xilooligossacarídeos são os principais produtos formados pela ação desta enzima. Similarmente ao caso do grupo das celulases, as β -xilosidases atuam sobre a xilobiose e os xilooligossacarídeos, a partir da extremidade não redutora, liberando unidades de xilose. É uma enzima importante no processo por evitar que as endoxilanases sejam inibidas pelos seus próprios produtos de degradação (POLIZELI et al., 2005).

Todavia, a hidrólise enzimática da biomassa vegetal é mais lenta que a hidrólise química, podendo requerer dias, e tem como uma das principais barreiras processos eficientes e viáveis de produção de enzimas a custo que não inviabilize seu uso (MISHIMA et al., 2006). A alternativa aqui estudada para a produção de celulases é a fermentação em estado sólido (FES), processo que permite obter tais enzimas também a partir de rejeitos agroindustriais, o que pode ser tanto econômica quanto ambientalmente interessante. Os desafios neste sentido incluem selecionar ou modificar microrganismos que secretem altos níveis de celulases e de enzimas auxiliares, desenvolver e otimizar sistemas e biorreatores para o crescimento destes microrganismos e estudar alternativas tecnológicas para ampliação de escala, tanto por meio de simulações quanto de experimentação.

2.2 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como o crescimento de microrganismos sobre partículas sólidas úmidas, em situações nas quais o espaço entre as partículas contém uma fase gasosa contínua e a água está impregnada nas partículas ou forma um fino filme sobre elas. Entretanto, o conteúdo de água da matriz porosa deve ser suficientemente alto para assegurar adequadas condições para o desenvolvimento microbiano (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Como os processos de FES são geralmente aeróbicos, o termo fermentação

usado na denominação do processo não se refere ao sentido estrito da palavra, mas sim indica o cultivo de microrganismos visando à obtenção de um bioproduto de interesse, não necessariamente em anaerobiose. Por ser largamente empregado na literatura pertinente, o termo fermentação em estado sólido (FES) também será utilizado nesta tese, em face dessa licença de representar o cultivo de microrganismos em meio sólido com finalidade biotecnológica.

Os processos de FES são particularmente atrativos em comparação aos processos tradicionais de fermentação submersa (FSm), sobretudo pela possibilidade de minimizar o problema da disposição inadequada e desperdício dos rejeitos sólidos agroindustriais (PANDEY, 2003). Além disso, a FES apresenta ainda outras vantagens sobre a FSm, tais como: o meio de cultura é natural e requer pouca adição de nutrientes; os riscos de contaminação são menores devido à baixa umidade do meio fermentativo; a microflora nativa do suporte pode servir como inóculo; a porosidade do material facilita a aeração; há possibilidade de utilização direta dos materiais fermentados; a alta concentração de produtos facilita a extração (UMSZA-GUEZ, 2009).

Por outro lado, é sabido que a FSm tem sido o método fermentativo mais utilizado para as aplicações comerciais, sendo empregada pela maioria das indústrias de bioprodutos. Nos sistemas de FSm, as transferências de massa, de calor e de oxigênio são facilitadas e o meio é homogêneo, de modo que tais sistemas são mais reprodutíveis e mais facilmente monitorados e controlados que os sistemas de FES, o que torna a FSm mais viável. Neste contexto, as principais razões para que a FES ainda não tenha sido industrialmente difundida estão relacionadas à carência de estudos de engenharia de biorreatores, à dificuldade de padronização do processo e à sua limitada reprodutibilidade. Outro desafio dessa técnica é a purificação dos produtos finais, o que torna a FES particularmente interessante para aplicações em que a concentração dos bioprodutos é mais importante que sua pureza, como é o caso da produção de celulases para bioenergia.

Assim, mediante desenvolvimento em termos de engenharia de processos, a FES pode ser considerada uma alternativa sustentável para os bioprocessos, uma vez que rejeitos agroindustriais podem ser usados como meios de cultura, reduzindo impactos ambientais e permitindo obter produtos de alto valor agregado, tais como alimentos, suplementos para rações animais, suprimentos para produção de

biocombustíveis, esporos para controle biológico de pragas e vários compostos químicos e farmacêuticos. Adicionalmente, esta técnica tem sido particularmente eficiente para a metabolização de diversos tipos de enzimas para as mais diferentes aplicações nas indústrias químicas e de alimentos (CASCIATORI; THOMÉO, 2014). Mediante o exposto, o Brasil e outros países com alta produção agrícola e florestal apresentam grande potencial para o desenvolvimento da tecnologia de FES.

A seleção do substrato adequado para FES é extremamente importante, pois este material sólido atua como suporte físico, além de fornecer substâncias macromoleculares como fonte de nutrientes ao microrganismo, podendo induzir a formação do bioproduto de interesse, tais como enzimas hidrolíticas capazes de quebrar estas macromoléculas, resultando na liberação de pequenas moléculas solúveis que então podem ser utilizadas para o metabolismo microbiano (PANDEY, 2003). Vários rejeitos agroindustriais têm sido empregados como substratos ou suportes inertes em processos de FES, tais como gramas verdes ou secas, bagaços de cana, de laranja ou de mandioca, farelos e palhas de trigo e de arroz, cascas de soja ou amendoim, sabugo e palha de milho e serragens. Na Tabela 2.1, são apresentados alguns estudos recentes de obtenção de diversas enzimas por FES, empregando diferentes tipos de rejeitos agroindustriais como substratos (CASCIATORI; THOMÉO, 2014).

Tabela 2.1. Enzimas obtidas por FES a partir de rejeitos sólidos agroindustriais.

Microrganismo	Substrato	Bioproduto	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Farelos de trigo e de soja	Pectinases	Castilho, Medronho e Alves (2000)
<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8	Farelo de trigo e casca de manga	Poligalacturonase, celulase, xilanase e protease	Couri et al. (2000)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767	Sabugo de milho	Enzimas lignolíticas	Couto, Rivela e Sanromán (2001)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Palha de trigo	Celulases e hemicelulases	Kalogeris et al. (2003)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> ATCC 204492	Bagaço de mandioca e farelo de arroz	Xilanases	Palma (2003)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Torta de babaçu suplementada com melão	Lipases	Gutarra et al. (2005)

Tabela 2.1. Continuação.

Microrganismo	Substrato	Bioproduto	Referência
<i>Aspergillus niger</i> 3T5B8	Bagaço de maracujá e farelo de trigo	Poligalacturonase	Menezes (2006)
<i>Aspergillus niger</i> CCT 0916	Pedúnculo de caju seco	Pectinases	Santos (2007)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Farelo de trigo, bagaço de cana, bagaço de laranja, sabugo de milho, gramas verde e seca, serragem e palha de milho	Xilanase e endoglucanase	Da Silva et al. (2005)
<i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1	Bagaço de cana e farelo de trigo	Celulases e xilanase	Camassola e Dillon (2007)
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Aspergillus casingii</i>	Farelo de soja Desengordurado	Amilase, protease, lipase, celulase e invertase	Paris (2008)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30 e <i>Aspergillus niger</i> MTCC 7956	Farelo de trigo	Celulases	Sukumaran et al. (2009)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N-31	Bagaço de cana, casca e polpa de laranja e farelo de trigo	Pectinases	Umsza-Guez (2009)
<i>Aspergillus casingii</i>	Farelo de soja	Invertase	Novaki (2009)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N-31	Farelo de trigo (adicionado ou não de caseína)	Protease coagulante (queijos)	Dini (2010)
<i>A. fumigatus</i> M.7.1 e <i>Myceliophthora</i> sp M.7.7	Bagaço de cana e farelo de trigo	Celulases e xilanase	Moretti (2010)
<i>Streptomyces griseoalbus</i>	Farinha de soja	α -galactosidase	Anisha et al. (2010)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Bagaço de cana suplementado com melaço	Inulinase	Mazutti et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i> F3	Casca de laranja	Fitase	Rodríguez-Fernández et al. (2012)
<i>Bacillus</i> sp. KR-8104	Farelo de trigo	α -amilase	Derakhti et al. (2012)

Tabela 2.1. Continuação.

Microrganismo	Substrato	Bioproduto	Referência
<i>Paecilomyces variotii</i>	Bagaço de laranja	Tanase e fitase	Madeira Jr., Macedo e Macedo (2012)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	Bagaço de cana e farelo de trigo	Celulases e xilanase	Zanelato et al. (2012)

O tipo de microrganismo que pode crescer e formar produtos na FES é determinado, principalmente, pela atividade de água (a_w) do meio. De acordo com Mitchell et al. (2000), valores de a_w entre 0,95 e 0,98 podem ser considerados típicos para os meios da fermentação em estado sólido. Este intervalo de atividade de água é ideal para o crescimento de muitos fungos, principalmente os filamentosos, os quais geralmente possuem a condição ótima de crescimento em valores de a_w entre 0,96 e 0,98. Consequentemente, a maioria dos processos em meio sólido são conduzidos com fungos filamentosos.

Nigam e Singh (1994) enfatizam que os fungos filamentosos são os microrganismos de maior importância na FES, pois estes conseguem crescer de maneira natural em frutas, grãos e resíduos agrícolas e florestais, sendo as condições de cultivo deste tipo de processo muito próximas às condições usuais de crescimento dos fungos em seu habitat natural. A facilidade de crescimento em meios com baixos valores de pH e a capacidade dos fungos filamentosos em produzir esporos, facilitando o preparo dos inóculos e a estocagem das células na forma vegetativa por longos períodos de tempo, são outras características que os tornam mais atrativos para utilização na FES (MITCHELL et al., 2000). Além disso, os fungos filamentosos excretam naturalmente grandes quantidades de enzimas para o meio extracelular.

Os fungos empregados no presente trabalho são o mesofílico *Trichoderma reesei* QM-9414 e o termofílico recentemente isolado *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. O gênero *Trichoderma* possui uma distribuição bastante ampla, sendo observado no mundo inteiro, em quase todos os tipos de solos e outros habitats naturais, especialmente naqueles compostos por matéria orgânica (HARMAN et al., 2004). Sua atividade de biocontrole tem sido intensamente estudada e deve-se, sobretudo, à produção de enzimas extracelulares degradadoras da parede celular de diversos fungos, como celulases, quitinases, β -glicosidases e proteases (OLIVEIRA, 2010). Do ponto de vista biotecnológico, algumas espécies, como *Trichoderma viride*

e *Trichoderma reesei*, a última utilizada neste trabalho, têm sido utilizadas para a produção de celulasas em escala industrial (CORABI-ADELL; LUCON; KOIKE, 2002). Quanto ao fungo termofílico *Myceliophthora thermophila*, este é frequentemente isolado do solo ou de massas de matéria vegetal em decomposição (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1982), condições ambientais nas quais contribui para com a decomposição de polissacarídeos presentes nas estruturas das plantas. Algumas linhagens recentemente isoladas dessa espécie têm demonstrado atividades celulolíticas promissoras em estudos de FES em escala de frascos e de biorreatores de bancada (ZANELATO et al., 2012; CASCIATORI; CASCIATORI; THOMÉO, 2013).

O emprego de fungos termofílicos para a produção de enzimas por FES tem crescido recentemente. Uma das vantagens é que esses fungos crescem em temperaturas mais elevadas, reduzindo o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos competidores. Outra vantagem é que fungos termofílicos, em geral, produzem enzimas mais termoestáveis, o que é interessante do ponto de vista da aplicação industrial destas enzimas (GOMES et al., 2007).

Os fungos termofílicos desenvolvem-se normalmente durante a segunda fase dos processos de compostagem natural, numa fase de alta temperatura que sucede o desenvolvimento da microflora mesofílica. Nesta segunda fase, a flora mesofílica já consumiu as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos), tendo gerado calor através das reações metabólicas exotérmicas, conseqüentemente elevando a temperatura do meio até acima de 40 °C. Essa alta temperatura inibe o crescimento dos mesofílicos e estimula a germinação dos esporos dos fungos termofílicos. Como nesta segunda etapa as fontes de carbono facilmente assimiláveis já foram praticamente exauridas, restam aos termofílicos apenas os polissacarídeos constituintes da biomassa, como a celulose e hemicelulose, cuja degradação requer intensa liberação de enzimas extracelulares, o que de certo modo explica a boa capacidade de produção de enzimas hidrolíticas de substratos complexos pelos fungos termofílicos quando cultivados sobre rejeitos agroindustriais (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BATH, 2000).

No Grupo de Pesquisa em Bioenergia do IBILCE/UNESP, integrante do Centro Paulista de Pesquisa em Bioenergia e do qual o orientador desta tese é membro, tem-se utilizado duas linhagens do fungo termofílico *Myceliophthora*

thermophila, identificadas como I-1D3b e M.7.7, ambas isoladas pelo próprio grupo a partir de pilhas de compostagem visando à obtenção de celulases por FES em escala de frascos e de reator de bancada em leito fixo. Na Tabela 2.2, são apresentados resultados de atividades celulolíticas obtidas em alguns trabalhos da literatura em que foram empregados fungos do gênero *Myceliophthora*, sendo possível observar que a linhagem I-1D3b é promissora quando comparada a outras linhagens.

Segundo Viniegra-González (1997), o rápido crescimento da biomassa, alto rendimento de enzimas e baixa hidrólise da proteína liberada contribuem para a alta produtividade enzimática da FES em comparação com a FSm. No entanto, embora já tenha se mostrado promissora, a técnica de produção de celulases por FES ainda está em desenvolvimento, não se encontrando biorreatores disponíveis comercialmente para tal finalidade, o que denota a carência de estudos de engenharia voltados a esta aplicação, englobando tanto simulação quanto experimentação.

Tabela 2.2. Produção de enzimas fibrolíticas por linhagens de *Myceliophthora sp.*

Microrganismo	Substrato*	CMCase (U/gss)	Xilanase (U/gss)	FPU (U/gss)	Referência
<i>Myceliophthora sp.</i> (V2A2)	PA	31	590	0,6	Soni et al. (2008)
<i>Myceliophthora fergusii</i> (T41)	PA	37	885	2,3	
<i>Myceliophthora sp.</i> (MYC)	PA	35	900	2,4	
<i>Myceliophthora sp.</i> (IMI 389099)	BC	7	620	0,7	Badhan et al. (2007)
<i>Myceliophthora sp.</i> (IMI 389099)	FT	27	129	0,7	
<i>Myceliophthora sp.</i> M.7.7	BC+FT	54	1045	2,0	Moretti (2010)
<i>Myceliophthora sp.</i> I-1D3	BC+FT	800	900	8,3	Zanelato (2011)

* PA: Palha de arroz; BC: Bagaço de cana; FT: Farelo de trigo; U/gss: unidades de atividade enzimática por grama de substrato sólido seco; FPU: unidades de atividade em papel de filtro (filter paper unit).

2.3 FES em biorreatores de leito empacotado

Os leitos empacotados são extensivamente aplicados em importantes operações unitárias nas indústrias químicas, de alimentos e de processos. Alguns

exemplos de aplicação incluem seu uso como separadores, absorvedores, secadores, filtros, trocadores de calor e reatores químicos e bioquímicos (THOMÉO; ROUILLER; FREIRE, 2004; WEN; DING, 2006). Os biorreatores de fermentação em estado sólido (FES) são um caso particular de leitos empacotados que têm ganhado destaque na literatura. Basicamente, os biorreatores para FES podem ser divididos entre os de leito fixo e os de leito móvel, como apresentado na Figura 2.3. Uma descrição detalhada dos biorreatores para FES pode ser encontrada em Mitchell, Krieger e Berovic (2006).

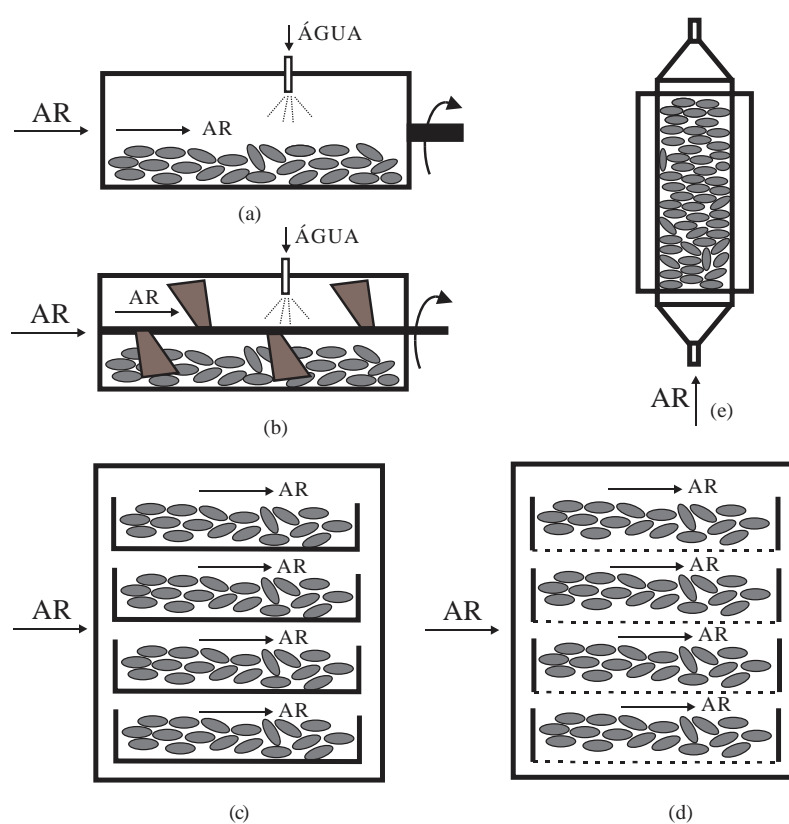


Figura 2.3. Biorreatores mais comuns para FES: a) Tambor de parede rotativa; b) Tambor de pás rotativas; c) Bandeja com fundo cego; d) Bandeja com fundo de tela; e) Leito empacotado.

O tambor rotativo é a configuração que melhor representa os biorreatores de leito móvel. Existem duas possibilidades de movimentação do meio de cultivo neste tipo de biorreator: girando-se a parede, na qual estão instalados defletores que elevam as partículas (Figura 2.3a), e girando-se um eixo interno dotado de pás (Figura 2.3b). A aplicação destes fermentadores é limitada a fungos de hifas septadas, sendo desaconselhado para fungos de hifas cenocíticas, nas quais o

material genético está disperso no citoplasma, que se distribui continuamente na hifa. Mesmo para os de hifas septadas, são necessários estudos específicos de tolerância ao cisalhamento. O giro do tambor ou das pás móveis serve à mistura das partículas, visando principalmente à uniformização das temperaturas e umidades. Devido à arquitetura destes biorreatores, as possibilidades de controle automático do processo fermentativo são amplas. No entanto, devido ao seu projeto complexo, alto custo e requisitos de manutenção, estes equipamentos são usados somente em processos para os quais o valor agregado do produto justifica o investimento.

Neste contexto, os biorreatores de leito fixo são os mais comumente aplicados na FES devido ao seu projeto simples, custo reduzido e baixas exigências de manutenção, sendo, portanto, o foco deste trabalho. Ademais, a ausência de movimentação das partículas torna estes biorreatores ideais para microrganismos sensíveis às tensões de cisalhamento. Os biorreatores de leito fixo são subdivididos entre os de bandeja e os de leito empacotado.

Os biorreatores de bandeja são mais simples e empregados no oriente para a fabricação de *koji*, um dos precursores do molho de soja. Bandejas são colocadas em câmaras de fermentação, nas quais se controlam temperatura e umidade relativa. Mesmo sendo um sistema simples, apresenta como desvantagem o alto custo operacional, devido à necessidade de grande área e de muita mão-de-obra.

Em outra vertente, biorreatores de leito fixo nos quais o ar é soprado forçadamente através do leito são denominados de biorreatores de leito empacotado, que por sua vez foram o objeto de estudo deste trabalho. Um biorreator de leito empacotado típico consiste de um tubo cilíndrico, no qual é empacotado o substrato previamente inoculado e umidificado. Este tubo é circundado por uma camisa, através da qual circula água na temperatura ideal para o desenvolvimento do fungo. O material é sustentado por uma placa perfurada posicionada no fundo do biorreator imediatamente após a seção de entrada, empacotada com inertes, que serve para condicionamento das propriedades do ar e desenvolvimento do perfil de velocidade do mesmo antes de entrar em contato com o material orgânico. Para suprir oxigênio e remover gás carbônico ao longo da fermentação, bem como para remover o excesso de calor metabólico gerado, ar a altas umidades relativas é continuamente soprado através de um orifício na base do biorreator. Vários estudos vêm sendo conduzidos em escala de bancada para a produção de alimentos e aditivos naturais derivados de microrganismos nestes

biorreatores, sendo a produção de enzimas uma aplicação frequente, especialmente por fungos filamentosos, como pode ser visto na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Bioprodutos obtidos por FES em biorreatores de leite empacotado.

Microrganismo	Substrato	Bioproduto	Observações sobre processo e equipamento	Referência
<i>K. marxianus</i>	Bagaço de mandioca	Compostos aromáticos, incluindo ésteres com aroma frutado	Foram testadas taxas de aeração de 0,06 e 0,12 L/h/g _{matéria seca} . A produção de compostos aromáticos foi maior e mais rápida com a menor taxa de aeração.	Medeiros et al. (2001)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Bagaço de cana-de-açúcar	Xilanases termoestáveis	A taxa de escoamento de ar teve um efeito significativo sobre a atividade enzimática.	Milagres et al. (2004)
<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de maçã	Ácido cítrico	Foi obtido 80 % de rendimento com base em açúcares totais.	Shojaosadati e Babaripour (2002)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Torta de babaçu embebida com melaço	Lipases	Atividades lipolíticas em biorreator de leite empacotado 30 % mais altas que em biorreator de bandeja.	Gutarra et al. (2005)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N-31	Bagaços de cana e laranja e farelo de trigo	Pectinases	A atividade enzimática alcançada no biorreator foi próxima da obtida em escala de frascos.	Umsza-Guez (2009)
<i>Streptomyces griseoalbus</i>	Farinha de soja	α -galactosidase	A atividade enzimática foi cerca de duas vezes maior que a obtida em frascos.	Anisha et al. (2010)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Bagaço de cana embebido com melaço	Inulinase	A temperatura do ar na entrada do leite e sua vazão afetaram significativamente o desempenho do processo.	Mazutti et al. (2010)
<i>Aspergillus niger</i>	Espuma impregnada com meio de cultura	Tanase	Altas atividades enzimáticas nos ensaios no biorreator.	Rodríguez-Durán et al. (2011)
<i>Myceliophthora thermophila</i>	Bagaço de cana e farelo de trigo	Celulases	O fungo desenvolveu-se bem no reator e as atividades enzimáticas foram semelhantes às encontradas em escala de sacos de polipropileno.	Zanelato (2011)
<i>Bacillus sp.</i> KR-8104	Farelo de trigo	α -amilase	Bons rendimentos, mas a produção da enzima decrescia do fundo para o topo do biorreator.	Derakhti et al. (2012)

No entanto, apesar de seu potencial de aplicação, biorreatores de leito empacotado são raramente operados em larga escala ao longo de todo o período de cultivo. Similarmente aos reatores químicos em geral, os fenômenos de transferência de calor e de massa nos biorreatores de FES em leito empacotado são simultâneos e desempenham papel crucial sobre o desempenho dos processos (WEN; DING, 2006), dependendo de alguma forma dos seguintes fatores:

- Desenvolvimento da biomassa: temperatura e umidade requeridas, tolerância às variações de temperatura e umidade do meio, velocidade de crescimento, fisiologia do microrganismo, geração de calor metabólico;
- Características do meio sólido: forma e dimensão das partículas, heterogeneidade do meio, características higroscópicas das partículas, capacidade de retenção de água do meio, porosidade do leito, taxa de consumo de substrato;
- Dimensões do equipamento: comprimento, diâmetro, forma de distribuição do ar no leito;
- Condições operacionais adotadas: vazão, temperatura e umidade do ar, temperatura da camisa.

Alguns destes fatores podem ser considerados constantes ao longo do processo fermentativo, particularmente as condições operacionais, desde que não sejam usados sistemas de controle automático do processo. No entanto, outros fatores, como velocidade de crescimento, fisiologia do microrganismo e taxa de consumo de substrato, podem sofrer dramáticas alterações que virão a interferir fortemente no rendimento do processo.

Um dos principais problemas na operação desta classe de biorreatores é a remoção deficiente do calor gerado metabolicamente, em decorrência de fatores associados ao substrato, ao microrganismo e à operação do sistema. Há relatos na literatura de que as temperaturas no interior do leito podem atingir até 20 °C acima da temperatura ideal para a fermentação, inibindo o crescimento do microrganismo e alterando rotas metabólicas, afetando desta forma o rendimento dos bioprodutos de interesse (GHILDYAL et al., 1994; MITCHELL et al., 2000; 2010). Normalmente, resíduos agroindustriais são materiais orgânicos com baixas condutividades térmicas moleculares. Devido às baixas vazões de escoamento de ar comumente empregadas nos biorreatores de FES, as condutividades térmicas efetivas estática e

dinâmica também são muito reduzidas. Assim, a dispersão do calor metabólico é dificultada, podendo acarretar sobreaquecimento no leito (CASCIATORI et al., 2013).

Outra dificuldade na operação de biorreatores de leite empacotado é a segregação de umidade no meio poroso ao longo da fermentação, o que tem consequências diretas sobre o crescimento fúngico e a produção de metabólitos (GERVAIS; MOLIN, 2003). A redução de umidade do meio poroso é decorrente do não-equilíbrio termodinâmico entre os conteúdos de água presentes no ar de percolação e no substrato sólido. Embora o ar possa entrar saturado no leito, sua temperatura aumenta ao longo do biorreator devido aos gradientes de temperatura decorrentes da atividade metabólica. Deste modo, o ar fica abaixo da saturação conforme percola o leito de partículas, passando então a ser capaz de remover água do substrato sólido ao longo do biorreator, estabelecendo assim gradientes de umidade no leito. Mesmo a entrada de ar saturado na base do leito é uma dificuldade adicional nestes experimentos, devido às vazões muito baixas do ar percolante (LAURENTINO, 2007).

Neste contexto, a modelagem matemática é uma ferramenta essencial para orientar o projeto e a operação de biorreatores, fornecendo indicativos de como os vários fenômenos de transporte no interior do sistema fermentativo se combinam para resultar no desempenho global do processo (MITCHELL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003).

2.4 Modelagem dos fenômenos de transferência de calor e massa em biorreatores de FES em leitos empacotados

O conceito de modelagem em FES é a busca por expressões matemáticas que representem o sistema reacional em questão, de forma que os modelos matemáticos, validados com base em dados obtidos em escala laboratorial, possam ser usados como ferramentas no dimensionamento de biorreatores de larga escala. Essas expressões têm o objetivo de descrever como o desempenho dos biorreatores é afetado pelas variáveis operacionais que podem ser manipuladas na tentativa de manter o processo sob as condições ideais. Por exemplo, um modelo matemático pode prever como a taxa de escoamento do ar, sua umidade relativa e temperatura irão afetar a temperatura e o conteúdo de umidade do substrato e também como essas variáveis ambientais irão afetar o crescimento microbiano e a formação de

produtos. Portanto, os modelos dos biorreatores devem também incluir um sub-modelo da cinética de crescimento do microrganismo, tanto para descrever a dependência da taxa de crescimento em função das condições ambientais experimentadas ao longo do processo quanto para quantificar a geração de calor e de água em decorrência da atividade metabólica. A obtenção de tais sub-modelos cinéticos de crescimento não é trivial, tendo em vista as dificuldades de determinação do aumento da biomassa microbiana nos sistemas de FES, como será mais bem discutido na subseção 2.4.1. Tarefa ainda mais complexa é a de prever a secreção das enzimas, uma vez que seria necessário conhecer as rotas metabólicas e incluí-las nos modelos.

Comumente, as expressões que modelam os sistemas de FES são dadas na forma de equações diferenciais parciais que sejam capazes de descrever a cinética de reação e os fenômenos de transferência de calor e de água no sistema reacional. Essas equações diferenciais, que em geral não possuem solução analítica, são comumente resolvidas empregando-se métodos numéricos avançados, como discretização de variáveis por diferenças ou volumes finitos para as equações diferenciais parciais e fórmulas de diferenciação numérica para as ordinárias, utilizando-se com frequência programas computacionais desenvolvidos para esta finalidade específica em linguagens variadas. Sistemas de cálculos mais avançados, como a Dinâmica dos Fluidos Computacional (CFD), ainda não são aplicáveis a estes sistemas, devido à natureza irregular das partículas e às muitas variáveis que interagem simultaneamente.

Mediante os inconvenientes em fazer medidas experimentais diretas, que por sua vez dificultam o projeto e a ampliação de escala de sistemas de FES, levando a uma lacuna de aplicações industriais reais, a modelagem de biorreatores de FES e a simulação desses sistemas reacionais em leitos empacotados mostram-se como importantes ferramentas para o desenvolvimento desses equipamentos. As simulações podem, por exemplo, fornecer informações de prováveis pontos quentes e secos no interior do leito e alternativas operacionais de como evitar estes problemas (SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1990; THOMÉO; ROUILLER; FREIRE, 2004). Em outras palavras, modelos que descrevam os mecanismos de transferência de calor e de água em biorreatores de FES podem fornecer bons indicativos do que virá a ocorrer em escala ampliada antes de se prosseguir diretamente aos testes experimentais, embora a experimentação, pelo menos em

escala de bancada ou piloto, ainda seja imprescindível para que os modelos possam ser validados (MITCHELL et al., 1999; MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006; CUNHA et al., 2009).

Alguns modelos matemáticos para a transferência de calor na FES em biorreatores de leitos empacotados têm sido propostos na literatura (SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1990; SANGSURASAK; MITCHELL, 1995a; 1995b; 1998; FANAEI; VAZIRI, 2009), apesar de que algumas informações básicas requeridas pelos modelos, tais como as propriedades físicas da matriz porosa e as características biológicas do microrganismo, são escassas na literatura e frequentemente são adaptadas de um sistema biológico para outro sem uma profunda consideração acerca da validade de tais aproximações.

Saucedo-Castañeda et al. (1990) foram um dos pioneiros neste tópico, aplicando um balanço geral de transferência de calor, sem considerar as dispersões axial e radial. Sangsurasak e Mitchell (1995a; 1995b) melhoraram este modelo original, considerando a transferência de calor bidimensional em um modelo adequado a várias geometrias e condições operacionais. Posteriormente, Sangsurasak e Mitchell (1998) estenderam seu próprio modelo anterior incluindo um termo para descrever a evaporação de água da matriz porosa, que contribui significativamente para a remoção de calor global, embora este fenômeno resulte na secagem do leito. Todos esses modelos são pseudo-homogêneos, isto é, consideram que, em um elemento de volume representativo do sistema, as temperaturas e as atividades de água são iguais para ambas as fases sólida e fluida (THOMÉO; FREIRE, 2012).

O modelo de Sangsurasak e Mitchell (1998) expressa a variação da temperatura ao longo da fermentação em função de vários fenômenos físicos e biológicos: armazenamento de entalpia no leito; variação da entalpia do ar entre a entrada e a saída do leito; remoção de calor por evaporação; calor gerado metabolicamente, assumido como diretamente proporcional à produção de nova biomassa, de modo que o metabolismo de manutenção é negligenciado; e, finalmente, dispersões radial e axial de calor no leito.

Os autores validaram seu modelo com os dados experimentais de Saucedo-Castañeda et al. (1990), que estudaram o crescimento de *Aspergillus niger* em farelo de mandioca em biorreator de leito empacotado com 35 cm de comprimento e 6 cm de diâmetro, percolado por ar saturado a cerca de 100 L/h. Houve concordância

razoável entre os perfis de temperatura preditos pelo modelo e os experimentais, uma vez que o modelo predisse magnitude e instante do pico de temperatura relativamente próximos dos experimentais, notando-se uma elevação de temperatura ao longo do ensaio de mais de 10 °C e uma variação radial de temperatura não desprezível.

É importante salientar que algumas propriedades físicas empregadas por Sangsurasak e Mitchell (1998) para o meio poroso, algumas obtidas do trabalho de Saucedo-Castañeda et al. (1990), podem ter comprometido de alguma forma a adequação do modelo. O valor do coeficiente de transferência de calor parede-fluido (α_{wall}) empregado foi igual a 10 W/m²/K, um valor próximo ao de Casciadori (2011), embora os meios porosos empregados sejam completamente distintos. Casciadori (2011) empregara uma mistura de bagaços de cana e de laranja e farelo de trigo (1:2:2 m/m), cuja porosidade foi acima de 0,60, enquanto Saucedo-Castañeda et al. (1990) empregaram farelo de mandioca com porosidade 0,35, fazendo-se prever valores de α_{wall} acima do utilizado. O valor da condutividade térmica do meio sólido (λ_s) utilizado por Sangsurasak e Mitchell (1998) foi igual a 0,03 W/m/K, baixo mesmo para um material com porosidade 0,35 e muito abaixo do obtido por Casciadori et al. (2013) para farelo de trigo, um material similar, determinado entre 0,21 e 0,33 W/m/K para uma faixa de umidade entre 3 e 37 % (em base úmida). Ressalte-se que Saucedo-Castañeda et al. (1990) usaram um procedimento de estimativa dos parâmetros de seu modelo a partir do ajuste aos dados experimentais, empregando o método dos mínimos quadrados para a estimativa, e não procederam à determinação experimental destes parâmetros.

O modelo de Sangsurasak e Mitchell (1998) é similar aos modelos pseudo-homogêneos clássicos da transferência de calor em reatores químicos resfriados pela parede, uma vez que o crescimento fúngico pode ser tratado no modelo como uma reação exotérmica (VORTMEYER; HAIDEGGER, 1991). Entretanto, a principal deficiência desses modelos pseudo-homogêneos é que eles predizem a remoção de calor por evaporação devido ao escoamento de ar, mas não são adequados para prever a secagem do leite. Somente modelos heterogêneos que contemplam as fases sólida e gasosa separadamente são capazes de representar bem o fenômeno de secagem do leite ao longo da fermentação em decorrência da percolação de ar.

Von Meien e Mitchell (2002) foram os primeiros a sugerir um modelo heterogêneo de duas fases para a predição de gradientes de temperatura e umidade

em um biorreator de FES agitado intermitentemente com aeração forçada, usando a mesma aproximação aplicada para transferência de calor e de água durante a secagem de grãos em leitos fixos (SRIVASTAVA; JOHN, 2002), uma vez que modelaram apenas os estágios em que o biorreator operava como leito empacotado, entre os sucessivos estágios de agitação. O sistema foi dividido em uma fase sólida, contendo água e sólidos secos, e uma fase fluida, incluindo vapor d'água e ar seco. Embora a implementação dos modelos de duas fases requeira as informações fluido-partícula e ainda a temperatura da fase sólida, geralmente difíceis de serem obtidas, esses modelos são mais realistas e são os únicos capazes de representar adequadamente a transferência de água da fase sólida para a fase gasosa.

O modelo de Von Meien e Mitchell (2002) foi então constituído por balanços de umidade e de calor nas fases sólida e gasosa. No balanço de água na fase sólida, estão representadas a evaporação e a produção de água metabólica. No balanço de água na fase gás, inclui-se ainda o escoamento convectivo de água na corrente de ar. No balanço de energia na fase sólida, a variação de entalpia do sólido resulta da troca de calor sensível entre as fases sólida e fluida, da transferência de calor evaporativo do sólido para o gás e do calor gerado metabolicamente. Por fim, no balanço de energia na fase fluida, aparece o transporte de calor por advecção na fase gasosa. Os autores consideraram a dispersão radial desprezível frente aos demais mecanismos de transporte de calor, tendo proposto, portanto, um modelo unidimensional, capaz de prever somente perfis axiais de umidade e temperatura. Uma vantagem da aproximação por modelos unidimensionais é a maior simplicidade da solução numérica das equações diferenciais e conseqüentemente o menor esforço computacional requerido na simulação.

Empregando este modelo na simulação do crescimento do fungo *Aspergillus niger* em grãos de milho em biorreator intermitentemente agitado, Von Meien e Mitchell (2002) predisseram o aumento de temperatura durante a fase em que o biorreator operava como leito empacotado, bem como a conseqüente secagem do substrato, mesmo que tenham usado ar praticamente saturado na entrada do leito na simulação. Deste modo, os autores puderam estimar os instantes em que se deveria proceder à reposição de água e agitação do biorreator, tendo assumido que, após cada evento de mistura, a atividade de água e a temperatura da fase sólida retornavam ao seu valor ótimo inicial.

Apesar da certa complexidade do modelo de Von Meien e Mitchell (2002), este ainda é incompleto, uma vez que é unidimensional e não considera todas as contribuições para os fenômenos de transferência de calor e de massa no biorreator, tais como dispersões térmica e de água em ambas as fases. Além disso, os coeficientes de transferência na interfase gás-sólido e algumas importantes propriedades físicas, tais como as isothermas de sorção do meio poroso, foram obtidas da literatura de secagem e não necessariamente correspondem ao real sistema de FES.

Tais lacunas dão margem a que novos modelos sejam propostos, os quais sejam capazes de incluir a maior parte dos fenômenos de transporte de calor e de umidade possíveis de ocorrer em biorreatores de FES. Além disso, os parâmetros de crescimento fúngico e propriedades físicas e térmicas de sistemas fermentativos reais carecem de mais exploração experimental, de modo que estudos diversos de aspectos de engenharia encontram terreno fértil no campo da FES.

2.4.1 Cinética de crescimento fúngico na fermentação em estado sólido (FES)

Na FES, a quantificação direta da biomassa microbiana é muito difícil, senão impossível, devido à inviabilidade prática de se separar o microrganismo do material em fermentação, especialmente no caso de processos envolvendo fungos. Isso porque os fungos filamentosos aderem e penetram suas hifas no suporte, de modo que se cria uma forte ligação entre a matriz sólida e o micélio. Portanto, para conhecer a cinética de crescimento fúngico na FES, é necessário lançar mão de métodos indiretos de quantificação da biomassa.

Desgranges et al. (1991) classificaram os métodos indiretos de medida de biomassa em FES em três categorias: (1) determinação de constituintes celulares, tais como quitina, ergosterol, ácidos nucleicos, glicosamina e proteínas; (2) determinação de atividade biológica, tais como atividade enzimática e velocidade de respiração; (3) determinação de níveis de nutrientes no sistema, como carbono e nitrogênio. No entanto, há um consenso de que nenhum método indireto de estimativa de biomassa é universal para toda e qualquer combinação de substratos e microrganismos. Para cada situação, deve ser escolhido o método mais conveniente, havendo que se considerar ainda custo, simplicidade e disponibilidade de recursos e equipamentos necessários (ROCHE et al., 1993; KRISHNA, 2005).

Os métodos indiretos baseados na determinação de constituintes celulares não são acurados devido ao fato de que a composição da biomassa microbiana pode mudar durante o ciclo de crescimento, como já reportado para o conteúdo de proteínas e de glicosamina nas células (MITCHELL et al., 1991; NAGEL et al., 2001). Além disso, a composição do substrato também pode mudar durante o processo de fermentação.

Ainda assim, determinações de ergosterol e glicosamina têm sido empregadas por uma série de pesquisadores para avaliar o crescimento fúngico em FES (DESGRANGES et al., 1991; SCOTTI et al., 2001; CASTRO; BRAGAGNOLO; VALENTINI, 2002; MORAES et al., 2003; BABITHA; SOCCOL; PANDEY, 2007; HUI, 2010; DINI, 2010), uma vez que ambos os compostos, presentes na membrana da parede celular dos fungos, não são comuns em células vegetais. No entanto, como os métodos de quantificação são espectrofotométricos, estão sujeitos a interferência de uma série de outros componentes que absorvem luz no mesmo comprimento de onda que o composto de interesse. O teor desses interferentes pode ser suficientemente alto para mascarar os teores reais de glicosamina ou ergosterol fúngicos, comprometendo os resultados.

A determinação de proteína também tem sido empregada para avaliar o crescimento de microrganismos na FES (SANTOS, 2007; EDUARDO, 2010; SILVA FILHO, 2005; PARIS, 2008). Em geral, duas alternativas podem ser aplicadas para a evolução do conteúdo proteico do fermentado ao longo do tempo: a determinação do conteúdo total das proteínas ou a obtenção das proteínas solúveis.

O método de Kjeldahl determina o teor de nitrogênio total de uma amostra, o que implica que os teores de nitrogênio proveniente de outras fontes além de proteína, tais como ácidos nucleicos, alcalóides, lipídeos nitrogenados, carboidratos nitrogenados, sais inorgânicos, porfirinas ou pigmentos nitrogenados, também entram no cômputo total. Estes, no entanto, quando comparados ao total de proteínas, são geralmente componentes menores em qualquer amostra, e assim o método de Kjeldahl continua sendo um método químico muito útil para a determinação do conteúdo total de proteínas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

No entanto, tendo em vista que normalmente os fungos produzem um coquetel de diferentes tipos de enzimas durante o seu crescimento na FES, a atividade proteolítica do extrato enzimático obtido deve ser um importante ponto a ser considerado quando se pensa em fazer a estimativa da biomassa fúngica por

quantificação de proteínas totais. A composição do substrato é outro ponto importante a se considerar para decidir se a estimativa da biomassa por quantificação de proteínas totais é viável ou não. O método não é recomendado para substratos altamente proteicos, haja vista a perda de sensibilidade ao teor de proteínas fúngicas, em decorrência do alto teor de proteínas do substrato.

A vantagem das medidas das concentrações de CO₂ e de O₂ está no fato de não haver amostragem, pré-tratamentos e análises químicas do fermentado, além de que podem ser realizadas medidas *online*. Esta determinação já foi empregada por alguns pesquisadores para avaliar o crescimento fúngico (KOUTINAS; WANG; WEBB, 2003; EDUARDO, 2010), embora se saiba que o consumo de O₂ nem sempre é diretamente relacionado ao crescimento celular, uma vez que o consumo está ligado tanto ao metabolismo de crescimento como ao de manutenção. Porém, se o propósito da medida for obter dados para alimentar os modelos de transferência com o termo de quantidade de calor gerado metabolicamente, não haverá distinção se o calor for gerado para crescimento ou manutenção. No entanto, sondas analisadoras de gases, normalmente de alta precisão e alto custo, são requeridas para realização dessas medidas.

À parte dos inconvenientes inerentes aos métodos indiretos de quantificação da biomassa microbiana ao longo do cultivo em FES, Viccini et al. (2001) ajustaram modelos cinéticos a uma gama de resultados experimentais de crescimento microbiano na FES, disponíveis na literatura. Os autores reportaram que o modelo logístico se ajustou bem aos resultados da maioria dos trabalhos considerados. A equação logística é um modelo empírico não estruturado e baseado em observações experimentais. Apesar da simplicidade matemática, a equação logística pode representar uma aproximação adequada da curva de crescimento completa em uma única equação, permitindo visualizar as fases lag, de crescimento rápido e estacionária, sendo representada por:

$$\frac{db}{dt} = \mu b \left(1 - \frac{b}{b_m} \right) \quad (2.1)$$

onde b é a fração de biomassa microbiana no material fermentado e b_m seu valor máximo; e μ é a velocidade específica de crescimento.

A condição inicial adotada para solução da equação logística é: em $t = 0$, $b = b_0$ (fração de biomassa inoculada no início do processo). Assim, a forma integrada do modelo logístico é dada por:

$$b = \frac{b_m}{1 + \left(\frac{b_m}{b_0} - 1\right) e^{-\mu t}} \quad (2.1a)$$

Por meio da velocidade específica de crescimento μ , a equação logística pode representar o efeito da temperatura e da umidade do meio sobre o crescimento do microrganismo. Para tanto, foram definidos na literatura μ_T e μ_W como frações da velocidade específica de crescimento máxima μ_{opt} , que é aquela determinada quando todas as condições do meio são as ótimas para o crescimento, enquanto μ_T é a fração da velocidade específica de crescimento afetada pela temperatura do sistema e μ_W é a fração da velocidade específica afetada pela atividade de água do meio sólido. O efeito da temperatura é normalmente representado por uma equação tipo Arrhenius, que permite calcular a variação da constante de velocidade de uma reação química com a temperatura, enquanto o efeito da atividade de água é geralmente obtido por ajuste de modelos empíricos aos dados experimentais obtidos para diferentes umidades iniciais do substrato (GLENN; ROGERS, 1988; SAUCEDO-CASTANEDA et al., 1990).

No entanto, para fungos recentemente isolados, dados experimentais e parâmetros cinéticos de crescimento não se encontram disponíveis na literatura. Ressalte-se que tais parâmetros são específicos para cada combinação de microrganismo, substrato e produto, de modo que medidas experimentais específicas do crescimento no sistema de interesse são fundamentais para fins de modelagem, simulação e controle dos processos de FES.

2.5 Ampliação de escala de biorreatores de FES em leite empacotado

De um modo geral, a ampliação de escala em FES não segue uma técnica pré-definida, devendo ser individualmente testada para cada combinação de microrganismo, substrato e produto, como se vê em trabalhos da literatura (ABDAESHAHIAN et al., 2010; CUNHA et al., 2009; VIRTANEN et al., 2008a,

2008b), e depende bastante da experiência do projetista. É de consenso comum que a ampliação de escala em FES é um desafio, pois as condições de aeração, umidade e temperatura mudam drasticamente da menor para a maior escala (ZHAO et al., 2008), de modo que as condições ótimas obtidas na escala de frascos para crescimento microbiano e metabolização de produtos raramente são reproduzidas em escala ampliada (CUNHA et al., 2009).

Enquanto nos processos de fermentação submersa (FSm) o desenvolvimento do microrganismo é comumente limitado apenas pela transferência de oxigênio na interface gás-líquido, nos processos de FES o crescimento pode ser limitado pela transferência de calor, pela transferência de oxigênio, de água ou de nutrientes, dependendo da localização no substrato, do estágio da fermentação e do projeto e operação do biorreator. Como resultado, não há critérios claramente definidos para ampliação de escala de biorreatores de leito empacotado para FES. Neste contexto, a adoção de uma estratégia de ampliação de escala baseada nos conceitos de engenharia de reatores deve ter como objetivo minimizar os inevitáveis desvios temporais e espaciais das condições ótimas de operação dos processos de FES.

Na operação de um biorreator de FES em leito empacotado, a manipulação do processo se limita às variáveis externas de controle, tais como temperatura, umidade e vazão de ar percolante. No entanto, os efeitos das variáveis de operação externas sobre as condições no interior do biorreator, tais como a temperatura e a umidade do leito em função do tempo e do espaço, não são diretos. Isso se deve ao fato de que, entre a manipulação que é feita na variável operacional e qualquer posição particular no leito, há vários fenômenos de transporte envolvidos (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Destacam-se os fenômenos de transferência de calor e de umidade no interior dos biorreatores, os quais, por sua vez, estão sujeitos a altas resistências impostas tanto pelo substrato (baixas condutividade térmica e difusividade de umidade) quanto pelas condições operacionais (baixas vazões de ar e aeração unidirecional). Em geral, estas resistências aumentam conforme a distância através da qual o transporte deve ocorrer aumenta, e, por sua vez, essa distância aumenta conforme o tamanho do biorreator aumenta. Conseqüentemente, a implementação de controle automático do processo em biorreatores de larga escala torna-se ainda mais dificultada.

Por outro lado, se sabe que o mecanismo fisiológico do microrganismo não se altera com a escala de produção, o que significa que o microrganismo responde

exatamente da mesma forma para um determinado conjunto de condições que ele encontra em seu ambiente, independentemente de estar localizado no interior de um biorreator contendo 10 g de substrato ou de um biorreator contendo toneladas deste. Em outras palavras, em ambos os biorreatores, a taxa de crescimento e de liberação de calor será a mesma para uma dada combinação de concentração de oxigênio e de nutrientes, pH, temperatura e atividade de água, de modo que é plausível controlar as variáveis em escala de laboratório para obter os parâmetros de crescimento do microrganismo e avaliar seu potencial de produção do metabólito de interesse antes da ampliação (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

De acordo com Cunha et al. (2009), a melhor alternativa de ampliação de escala para reatores de leito empacotado é através do conceito modular, em que se empregam vários módulos em série ou em paralelo, o que permite melhor gerenciamento da ampliação de escala em decorrência de um controle mais efetivo das variáveis de processo, com respostas mais ágeis das variáveis controladas. No entanto, dependendo da maneira como for conduzida, esta estratégia de ampliação pode estar restrita simplesmente a uma replicação do biorreator de pequena escala, o que não é interessante do ponto de vista industrial e não depende dos conceitos de ampliação de escala estudados na engenharia química. Para biorreatores de FES em leitos empacotados, esta estratégia pode ser interessante, desde que os módulos possam ser integrados entre si, configurando assim ampliação de escala propriamente dita, de modo que os módulos componham um reator maior.

Tendo em vista sua geometria, duas alternativas para ampliação de escala dos biorreatores de FES em leito empacotado são aumentar o comprimento do leito sem modificar o diâmetro, aumentar o diâmetro sem aumentar o comprimento ou aumentar o diâmetro e o comprimento do leito simultaneamente. Leitos muito longos podem ter maiores custos de operação em decorrência do aumento da perda de carga ao longo do comprimento, o que implica em aumento do consumo de energia pelo compressor de ar. Ademais, leitos longos verticais tendem a provocar compactação das camadas inferiores, dificultando a aeração do reator. Por outro lado, leitos de grande diâmetro tendem a acentuar a heterogeneidade térmica radial e axial, devido a que a remoção do calor metabólico será feita basicamente por meio da aeração longitudinal, além de que os leitos de grande diâmetro requerem maior disponibilidade de área numa planta industrial.

Mitchell, Krieger e Berovic (2006) recomendam que, após a etapa preliminar de investigação da cinética de crescimento em escala de laboratório, sejam feitos experimentos em um leito empacotado em escala piloto. Os autores sugerem que os testes sejam feitos em escala da ordem de 15 cm de diâmetro e 1 m de altura, com as paredes da coluna sendo bem isoladas, a fim de imitar a situação do biorreator em larga escala, na qual a remoção de calor radial poderá ser desprezível. Se a altura real do biorreator de larga escala for de 1 m, os autores sugerem que este biorreator piloto representará uma seção cilíndrica vertical do biorreator de larga escala, o que possibilita um estudo dos fenômenos que dependem da altura do leito, tais como perfis axiais de temperatura e quedas de pressão, bem como a formação de biomassa e de produtos como funções da altura e como esses resultados são afetados pela temperatura e velocidade do ar de entrada. O objetivo nestes testes, denominados *scale-down*, é identificar limitações de desempenho do biorreator não previstos pelos modelos matemáticos antes de construir o biorreator em larga escala propriamente dito, ainda sendo possível reformular o projeto, se necessário.

Quando da ampliação de escala de reatores químicos de leito catalítico heterogêneo, recomenda-se que o aumento da vazão de operação deve ser proporcional ao aumento do volume do reator, de modo a manter o gradiente longitudinal de temperatura constante (NAUMAN, 2002). Mitchell et al. (1999) desenvolveram em seu trabalho dois critérios de ampliação de escala de biorreatores de leito empacotado para FES, sendo um baseado em um modelo axial de transferência de calor, e outro baseado no número adimensional de Damköler modificado pelos autores, relacionando a máxima capacidade de acúmulo e geração à máxima capacidade de remoção de calor no sistema. De ambas as formas, os autores mostraram que, para uma dada velocidade superficial de ar, há uma limitação na altura do leito, considerando os perfis axiais de temperatura quando se emprega aeração saturada e se considera desprezível a remoção radial de calor. Quanto maior a velocidade superficial do ar, maior pode ser o comprimento do biorreator sem que a temperatura no topo do leito exceda os limites suportados pelo microrganismo e pelo processo. Conseqüentemente, maior quantidade de substrato pode ser fermentada por unidade de área.

De fato, se a razão velocidade superficial por altura do biorreator é mantida constante, não há limitação na altura do leito. No entanto, a velocidade superficial não pode ser aumentada indiscriminadamente num sistema de FES, uma vez que

altas taxas de escoamento de ar poderiam ocasionar secagem excessiva do meio de cultivo, além de que se deve evitar a fluidização das partículas e minimizar o cisalhamento entre o ar percolante e a fase sólida para evitar danos às hifas fúngicas, sobretudo às hifas aéreas. Deste modo, gradientes axiais de temperatura são inevitáveis e as temperaturas no topo do leito podem atingir valores críticos.

Diante desta limitação de aumento indiscriminado da velocidade superficial do ar nos biorreatores de FES em leito empacotado, fica claro que nos processos de ampliação de escala haverá um limite na altura do leito, pois leitos muito longos poderiam ter produtividades muito baixas devido aos gradientes axiais de temperatura. Quando o comprimento limite é atingido, o aumento de escala do biorreator passa a poder ser feito somente através de aumento do diâmetro. Por outro lado, acredita-se que o aumento do diâmetro do fermentador provavelmente causará variações radiais de temperatura que, por sua vez, também poderão afetar negativamente o rendimento do processo fermentativo, devido ao aumento da distância entre o centro do leito e o contorno resfriado.

Mediante tal impasse, estudos de modelagem e simulação necessariamente devem ser combinados a estudos experimentais, ao menos em escala de bancada e piloto, para que uma estratégia de ampliação de escala de um biorreator de FES em leito empacotado possa ser definitivamente considerada bem sucedida. Ainda assim, é possível haver desvios quando da implantação em escala final de processamento. De toda forma, ainda são escassos na literatura estudos combinando modelagem, simulação e experimentação, o que tem comprometido a aplicação da FES como tecnologia industrial real.

Diante do panorama exposto nesta *Revisão da Literatura*, buscou-se, na presente tese, desenvolver e ampliar a escala de um biorreator de leito empacotado para a produção de enzimas celulolíticas por fungos em cultivo sólido empregando resíduos agroindustriais como substratos. O trabalho englobou desde a realização de experimentos em escala de frascos, de bancada e semi-piloto até a simulação do processo por meio de novos modelos de transferência de calor e de umidade para diferentes dimensões e condições operacionais e empregando-se propriedades físicas, térmicas e de crescimento fúngico específicas para o sistema fermentativo de interesse.

CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do IBILCE/UNESP. As etapas de modelagem e simulação foram desenvolvidas no Institut für Verfahrenstechnik da Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik (IVT/TVT) da Otto-von-Guericke Universität, em Magdeburg, Alemanha, sob supervisão do Prof. Dr. Ing. Evangelos Tsotsas, com cooperação do Jr. Prof. Dr. Ing. Andreas Bück.

3.1 Microrganismos e substratos

Foram empregados os fungos *Myceliophthora thermophila* I-1D3b (termofílico) e *Trichoderma reesei* QM-9414 (mesofílico). O primeiro foi isolado pela Prof^a. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini (IQ/UNESP) a partir de pilhas de bagaço de cana da Usina Guarani, de Olímpia-SP, e fora utilizado por Zanelato (2011), que obteve resultados promissores de produção de celulase em escalas de frascos e de reator de bancada. Já o fungo mesofílico é bastante comum na literatura de FES, sobretudo para produção de celulases, e encontrava-se estocado na coleção do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada do IBILCE/UNESP.

As cepas dos fungos foram mantidas em tubos de ensaio com Agar Sabouraud Dextrose ASD (*M. thermophila*) ou Agar Batata Dextrose BDA (*T. reesei*) inclinados, submersos em óleo mineral e mantidos em câmara fria a 5 °C. Para utilização, a cultura de *M. thermophila* foi repicada em frascos de Erlenmeyer contendo ASD inclinados e mantidos em câmara de cultura DBO por 48 horas a 45 °C; similarmente, a cultura de *T. reesei* foi repicada em frascos de Erlenmeyer com BDA incubado a 28 °C por 168 horas. Para inoculação do substrato, 100 mL de solução nutriente foram adicionados aos frascos, após o que a superfície do meio foi raspada com alça de platina para suspensão dos esporos do meio de cultura, obtendo-se a suspensão de esporos, padronizada em 10⁵ esporos/mL.

Como substratos, foram empregados bagaço de cana e farelo de trigo. O bagaço foi doado pela Usina Vale, de Onda Verde-SP, e o farelo foi comprado no comércio local e foi utilizado nos ensaios tal como adquirido. O bagaço de cana, por

sua vez, foi lavado com água corrente para remoção de terra e de açúcares residuais, após o que foi seco em estufa a 65 °C até peso constante. Para fins de padronização do tamanho das fibras, o bagaço foi passado por peneiras de 4 e 3 mm, separando-se para uso nos experimentos apenas o bagaço retido na peneira de 3 mm, separando-se as fibras maiores e o excesso de pó fino. Bagaço de cana e farelo de trigo foram acondicionados em sacos de polietileno de parede espessa em câmara de refrigeração até utilização.

Para os experimentos, o substrato foi previamente esterilizado em autoclave (121 °C, 1,1 atm, 20 minutos), bem como a solução nutriente, que consiste em uma solução salina contendo 0,35 % (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 % (m/v) de KH_2PO_4 , 0,05 % (m/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 % (m/v) de CaCl_2 e 0,1 % (v/v) de Tween 20, com pH 5,0 (ZANELATO, 2011). Posteriormente, o substrato foi inoculado com a suspensão de esporos e umidificado com solução nutriente até atingir a umidade adequada para a fermentação para cada fungo, após o que foi homogeneizado e, para os ensaios em biorreator, o substrato já úmido e inoculado foi empacotado no leito.

3.2 Ensaios fermentativos em escala de frascos

Os ensaios fermentativos em escala de frascos foram realizados utilizando-se sacos de polipropileno de 12 cm x 20 cm acoplados a um bocal de PVC de 3,6 cm de diâmetro, os quais foram tampados com algodão envolto por tecido, a fim de garantir a troca de gases e assegurar que não houvesse contaminação por outros microrganismos. Dentro de cada saco fermentador, foram adicionados 5,0 g de substrato sólido seco inicial. Também foi colocado no interior dos sacos um arame na forma de espiral, visando facilitar a aeração e evitar o colapso do saco plástico após autoclavagem. Um saco fermentador pronto para a fermentação pode ser visto na Figura 3.1, sendo estes sacos incubados em câmara de cultura DBO pelo tempo desejado de fermentação.

De acordo com Zanelato (2011), as condições ótimas de cultivo do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila*. I-1D3b em escala de sacos são proporção de bagaço de cana para farelo de trigo secos (BC:FT) igual a 7:3 (frações mássicas, m/m), conteúdo de umidade inicial 80 % (base úmida, b.u.) e temperatura 45 °C. Para o fungo mesofílico *Trichoderma reesei*, a temperatura de cultivo foi fixada em 28 °C (PINTO, 2010), tendo-se variado a composição e a umidade inicial do

substrato. Os níveis testados para composição foram BC:FT 1:1, 7:3 e 9:1 (m/m) e 70, 75 e 80 % (b.u.) para o conteúdo de umidade. Buscou-se encontrar a composição e a umidade que resultassem maiores atividades de enzimas celulolíticas em escala de frascos, a fim de definir os níveis dessas variáveis a serem usados posteriormente em biorreator.



Figura 3.1. Saco fermentador de polipropileno pronto para incubação.

Ao final do tempo de fermentação desejado, a extração das enzimas, quando aplicável, foi feita pela adição de água destilada (20 mL de água por grama de substrato sólido seco inicial, em câmara de agitação orbital, por 30 min a 100 rpm). O extrato foi filtrado e centrifugado (10000 rpm, 15 min, 5 °C), após o que o sobrenadante foi tomado como solução enzimática bruta para as análises de atividade.

3.2.1 Medidas indiretas da concentração de biomassa microbiana

Os ensaios em escala de sacos fermentadores também incluíram a estimativa da fração de biomassa fúngica no material fermentado ao longo do tempo de cultivo. Para tal estimativa, foram testadas duas técnicas de medidas indiretas: determinação do teor total de proteínas e determinação do teor de glicosamina. No entanto, maior ênfase será dada à estimativa da biomassa fúngica por meio da

determinação do teor total de proteínas, uma vez que, no presente trabalho, este foi o método que forneceu melhores resultados.

Amostras independentes dos sacos, em duplicata, foram retiradas da BOD ao longo do tempo de fermentação, que totalizou cinco e oito dias para os fungos *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e *Trichoderma reesei*, respectivamente.

Na determinação do teor de proteínas totais, utilizou-se o método tradicional de Kjeldahl. Aproximadamente 170 mg de amostra foram digeridos com 3 mL de ácido sulfúrico concentrado em aparelho digestor a 350 °C, na presença do catalisador sulfato de potássio:sulfato de cobre 96:4 (m/m). Assim, o nitrogênio presente na amostra foi convertido a nitrogênio amoniacal.

Às amostras digeridas, adicionaram-se 8 mL de água destilada, após o que as mesmas foram neutralizadas a quente com excesso de solução de NaOH 40 % m/v no destilador. Paralelamente, um frasco de Erlenmeyer contendo 10 mL de solução de ácido bórico a 2 % m/m (excesso) foi alocado na saída do destilador, contendo ainda uma e três gotas dos indicadores vermelho de metila e verde bromocresol, respectivamente, ambos 0,1 % em álcool. Na destilação, a amônia, que quando em meio ácido estava sob a forma de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$, não volátil, passou para a forma de amônia NH_3 , volátil, de modo que pôde ser recolhida no excesso de ácido bórico. Por fim, o líquido foi titulado diretamente com ácido clorídrico (HCl) 0,02 N, que deslocou a amônia da molécula de borato.

A massa de nitrogênio na amostra foi obtida pelo produto entre o volume gasto de solução de HCl, a concentração da solução e a massa molar do nitrogênio. A porcentagem de nitrogênio foi dada pela razão da massa de nitrogênio pela massa total da amostra, e finalmente a porcentagem de proteína foi dada pelo produto da porcentagem de nitrogênio por 6,25 (fator de correção para nitrogênio proteico).

Os substratos umidificados com solução nutriente foram primeiramente analisados para determinação do conteúdo de proteínas totais. O valor obtido foi tomado como linha de base e subtraído do valor experimental de cada ponto ao longo do cultivo, para estimativa do conteúdo de proteínas fúngicas. A degradação da proteína do substrato pelo fungo durante o processo foi considerada desprezível frente à quantidade total de proteína no farelo de trigo, aproximadamente 18 % (m/m) (LAURENTINO, 2007). Além disso, a solução nutriente forneceu nitrogênio inorgânico diluído (sulfato de amônia) ao fungo, que foi uma fonte de nitrogênio mais facilmente acessível que o nitrogênio proteico do farelo. Considerando ainda a curta

duração do processo fermentativo, a quantidade de proteína por grama de biomassa foi considerada constante ao longo do cultivo, para ambos os fungos.

Análise direta pelo método de Kjeldahl do conteúdo de proteína na biomassa fúngica obtida por cultivo líquido (Czapek Dox Broth) mostrou que, para o fungo *Myceliophthora thermophila*, tem-se 0,5 gramas de proteína por grama biomassa fúngica. Para o gênero *Trichoderma*, esse valor é de 0,32 gramas de proteína por grama de biomassa (DE GREGORIO et al., 2002). Apesar de se saber que o nível de proteínas pode variar com o tipo de substrato e com as condições de cultivo mantidas, esta relação foi considerada válida para estimativa da biomassa fúngica no presente trabalho. Assim, com base na quantificação de proteínas, estimou-se a fração de biomassa no fermentado ao longo do tempo de cultivo.

Também se testou estimar a biomassa fúngica pela quantificação do teor de glicosamina no material fermentado, o que foi feito seguindo-se o método descrito por Aidoo, Hendry e Wood (1981) e Dalsenter (2005). O fator 6,6 mg de glicosamina por grama de biomassa seca foi usado para converter o conteúdo de glicosamina em fração de biomassa estimada para o fungo *Myceliophthora*. Este fator foi experimentalmente obtido por determinação direta do teor de glicosamina na biomassa fúngica obtida por cultivo líquido. Para *Trichoderma*, esse fator de conversão foi assumido igual a 8,1 mg/g (SMITS et al., 1996). Devido à curta duração do processo fermentativo, o teor de glicosamina por grama de biomassa também foi considerado constante ao longo do cultivo, para ambos os fungos.

Aos dados de fração de biomassa fúngica no material fermentado ao longo do tempo de cultivo, estimados por meio do teor de proteínas totais, foi ajustado o modelo logístico da cinética de crescimento microbiano, representado na equação (2.1a) da *Revisão da Literatura*. Para tanto, foi utilizado o método de mínimos quadrados não lineares através do *software Microcal Origin*[®] 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, USA), que emprega o algoritmo de Levenberg-Marquardt para a busca dos valores dos parâmetros.

3.3 Proposição de novo modelo de transferência de calor e umidade e simulação numérica

A metodologia de proposição do novo modelo para a transferência de calor e de umidade em biorreatores de FES em leite empacotado consistiu em propor

equações matemáticas que representassem os mecanismos de transporte ocorrendo no biorreator ao longo do tempo e em função do espaço. Assim, a migração de umidade foi modelada a partir de um balanço de massa para toda a água presente no sistema fermentativo, e a transferência de calor a partir de balanços de energia. Os modelos de Sangsurasak e Mitchell (1998) para a transferência de calor e o modelo de Von Meien e Mitchell (2002) para a transferência de umidade foram utilizados como referências comparativas para os modelos propostos no presente trabalho. Os modelos propostos englobaram ainda a cinética de crescimento do microrganismo ao longo da fermentação e o efeito das variáveis de processo sobre o crescimento.

Os programas de simulação desenvolvidos para solução do modelo permitiram prever a distribuição de temperaturas e de umidade no interior do reator durante o processo e em diferentes posições do leite, bem como a concentração de biomassa fúngica. Propriedades físicas e térmicas do leite e as condições do processo fermentativo foram extraídas de trabalhos previamente realizados pelo grupo de pesquisa liderado pelo orientador desta tese, enquanto alguns parâmetros microbianos foram determinados neste trabalho e outros extraídos da literatura pertinente.

Para resolver o sistema de equações diferenciais parciais (EDPs), as derivadas espaciais foram aproximadas por volumes finitos, o que é apropriado para modelos 2-D, usando elementos de volume de igual tamanho. Os tamanhos dos passos espaciais foram definidos arbitrariamente em $N_r = 10$ divisões radiais e $N_z = 20$ divisões axiais. Posteriormente, tais números de divisões foram confirmados como os menores capazes de gerar resultados independentes do tamanho do passo, fornecendo assim previsões confiáveis por meio de simulações com curto tempo de execução, evitando esforço computacional desnecessário (LEAP, 2012).

Esta aproximação por volumes finitos resultou em um conjunto de equações diferenciais ordinárias (EDOs) para cada grade ou malha, as quais foram simultaneamente integradas numericamente pelo método das fórmulas de diferenciação numérica com o passo da variável tempo definido pelo solucionador *ode15s* no MatLab[®] R2012b (MathWorks Inc., Natick, USA). As equações foram inseridas num programa em MatLab[®] e resolvidas mediante valores apropriados dos parâmetros, além de sujeitas às devidas condições iniciais e de contorno.

3.4 Ensaios fermentativos em biorreatores de leite empacotado

Os ensaios fermentativos foram realizados num sistema similar ao empregado por Umsza-Guez (2009) e Zanelato (2011). Neste sistema, o ar foi fornecido por compressor e filtrado para retirada de impurezas grosseiras, passando por medidor de vazão, após o que foi umidificado em coluna recheada com esferas de vidro cheia de água destilada, imersa em banho termostático ou encamisada. Antes do fermentador, o ar ainda passou por um filtro de algodão estéril. Para melhorar o controle térmico do biorreator e minimizar a possibilidade de contaminação microbiológica, foi construída uma sala fechada e com ar condicionado, destinada exclusivamente à operação dos biorreatores de FES em leite empacotado.

Termopares tipo T foram instalados ao longo do comprimento do biorreator através de cada uma das flanges de acoplamento entre dois módulos consecutivos, com o sensor posicionado no centro do leito ($r/R = 0,0$) e, no caso dos módulos com 20 cm de diâmetro interno, em até mais quatro posições radiais ($r/R = 0,20; 0,45; 0,70; 0,95$), o que permitiu acompanhar a temperatura ao longo do processo em várias posições no interior do fermentador. Para alguns ensaios, uma sonda GMP221 com sensor CARBOCAP[®] (Vaisala, Vantaa, Finland) foi instalada no topo do biorreator para determinação da concentração de gás carbônico (CO₂) na corrente de saída do ar percolante, dados úteis como indicativos do crescimento dos fungos ao longo do processo no interior dos biorreatores. Os sinais elétricos dos sensores foram registrados por sistema de aquisição de dados COMPAQ-DAQ[®] (National Instruments, Austin, USA) gerenciado por rotina em *Labview*[®].

Foram utilizados os seguintes biorreatores, construídos de forma modular: um fermentador em aço inox composto por módulos de diâmetro interno 7,62 cm e comprimento 10 cm, de modo que pôde atingir até 1,5 m de comprimento total; um fermentador em alumínio com diâmetro interno 20 cm e comprimento 20 cm, de modo que pôde atingir até 1,4 m de comprimento total. O comprimento do biorreator foi variado em função do número de módulos adicionados no momento da montagem do equipamento. Na Figura 3.2, são mostrados ambos os fermentadores em operação.

Algumas estratégias foram adotadas visando minimizar certos problemas já encontrados na operação deste tipo de biorreator (UMSZA-GUEZ, 2009; ZANELATO, 2011). Para evitar a condensação da umidade do ar na entrada do

biorreator, a coluna de umidificação do ar e o acoplamento de entrada do reator foram mergulhados num mesmo banho termostático mantido na temperatura do processo ou encamisados para circulação de água na temperatura do processo, de modo que o ar não se resfriasse entre a coluna de umidificação e o acoplamento de entrada do biorreator. Além disso, os acoplamentos de entrada e saída foram encamisados, circulando-se água na temperatura do processo na camisa desses acoplamentos, o que evitava resfriamento tanto do ar de entrada quanto do de saída.



(a)



(b)

Figura 3.2. Biorreatores de leito empacotado em operação: a) 7,62 cm de diâmetro; b) 20 cm de diâmetro.

Ainda visando minimizar a heterogeneidade de umidade, o primeiro módulo, mais próximo da entrada de ar no biorreator, foi empacotado somente com bagaço de cana grosso (> 4mm) úmido, enquanto o último módulo, mais próximo da saída de ar, foi empacotado apenas com bagaço de cana grosso seco. Para o biorreator com módulos de diâmetro e comprimento 20 cm, apenas a primeira metade da altura do primeiro módulo e a segunda metade da altura do último módulo foram, respectivamente, empacotadas com bagaços úmido e seco. A finalidade do emprego desses módulos não inoculados na base e no topo do leito foi justamente proteger os módulos inoculados da secagem excessiva, no caso da base, e da condensação de umidade, no caso do topo.

Para o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, os cultivos no biorreator foram feitos em meio composto por bagaço de cana e farelo de trigo (BC:FT) 7:3 (m/m). A umidade inicial do substrato foi 75 % (b.u.), as temperaturas do ar e da camisa foram 45 °C, e a duração da fermentação foi de 96 horas (ZANELATO, 2011). As fermentações empregando *M. thermophila* foram realizadas para vários comprimentos do biorreator com 7,62 cm de diâmetro (0,4, 0,5, 1,0 e 1,5 m), bem como para várias taxas de aeração (30 a 360 L/h). Também foi feito um cultivo em farelo de trigo puro e um cultivo em mistura FT:BC_{fino} 1:1 (m/m), sendo BC_{fino} a fração de BC composta por partículas menores que 0,84 mm. No biorreator com 20 cm de diâmetro, foram realizadas duas fermentações com este fungo, uma com comprimento 1,0 m e taxa de aeração 900 L/h e outra com comprimento 1,4 m e taxa de aeração 1500 L/h.

Para o fungo mesofílico *Trichoderma reesei* QM-9414, os cultivos no biorreator foram feitos em meio composto por BC:FT 9:1 (m/m) com conteúdo de umidade inicial de 70 % (b.u.), as temperaturas do ar e da camisa foram de 28 °C, e a duração da fermentação foi de 168 horas (PINTO, 2010). As fermentações empregando *T. reesei* foram realizadas com 1,0 m de comprimento do biorreator com 7,62 cm de diâmetro sob três taxas de aeração (60, 120 e 240 L/h). Também foi feito um cultivo em farelo de trigo puro no biorreator com 0,4 m de comprimento. No biorreator com 20 cm de diâmetro, foi realizado um ensaio fermentativo empregando este fungo, utilizando-se comprimento total 1,0 m e taxa de aeração 900 L/h.

Para cada fermentação, a quantidade apropriada de substrato, definida de acordo com os dados de densidade de Casciadori et al. (2014), foi pesada e esterilizada em sacos plásticos com capacidade de 2 litros. Nestes mesmos sacos

plásticos, o substrato foi inoculado, umidificado e homogeneizado manualmente, após o que foi empacotado no biorreator, módulo a módulo, já no local de montagem e operação do equipamento. Ao final da montagem e após estabelecimento das temperaturas da camisa e de entrada do ar, a aeração do biorreator e as aquisições de dados foram iniciadas. A vazão de ar percolante no biorreator foi fixada no nível selecionado.

Ao final do processo, amostras de meio fermentado foram retiradas radial e longitudinalmente dos fermentadores para extração das enzimas, que foi feita mediante adição de 20 mL de água destilada por grama de substrato sólido seco inicial, da mesma forma como já descrito para os ensaios fermentativos em escala de sacos de polipropileno. No biorreator com módulos de 7,62 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento, todo o material fermentado de cada módulo foi tomado para extração, sendo possível obter o perfil axial de atividades enzimáticas.

Para o biorreator com módulos de 20 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento, o material fermentado foi coletado fazendo-se divisões radiais e longitudinais arbitrárias, sendo possível avaliar as atividades enzimáticas em função das posições radial e axial. Para o comprimento total de 1,0 m, foram feitas 2 divisões radiais (centro e bordas) e 4 divisões axiais (a cada 5 cm). Assim, de cada módulo fermentativo, foram obtidos 8 diferentes extratos enzimáticos, tomando-se portanto todo o material fermentado para extração. Para o comprimento total de 1,4 m, foram feitas novamente 2 divisões radiais (centro e bordas) e 4 divisões axiais (a cada 5 cm), mas tomaram-se para extração apenas 2 das amostras axiais, compreendidas entre 5 e 10 cm e entre 15 e 20 cm de cada módulo fermentativo. Neste caso, de cada módulo, foram obtidos 4 diferentes extratos enzimáticos para análise. Para o cultivo de *T. reesei* no biorreator com 20 cm de diâmetro e comprimento total 1,0 m, também foram tomadas para extração apenas 2 das amostras axiais, como no caso do cultivo de *M. thermophila* no biorreato com 1,4 m de comprimento total.

As atividades enzimáticas obtidas em função da posição nos biorreatores e sob as diferentes condições de fermentação foram analisadas estatisticamente por meio de testes de variância e de comparação de médias por testes de Tukey, realizados com auxílio do *software* Minitab[®] 15.1.1 (Minitab Inc., State College, USA).

Testes de umidade do meio fermentado também foram realizados com uma alíquota do material de cada amostra, seguindo-se o procedimento de tomada de amostras empregado para a extração de enzimas. As determinações de umidade foram feitas por analisador halógeno de umidade Ohaus[®] modelo MB 35 (Ohaus Corporation, Parsippany, USA).

3.5 Determinação das atividades enzimáticas

Foram determinadas as atividades endoglucanase (CMCase), papel de filtro ou FPA (atividade conjunta das três celulases), betaglicosidase e hemicelulase (xilanase) dos extratos enzimáticos brutos.

As atividades enzimáticas de CMCase e xilanase foram determinadas seguindo-se Ghose (1987) e Ghose e Bisaria (1987) com modificações, reagindo-se 0,1 mL de solução enzimática e 0,9 mL de solução de substrato, quais sejam, respectivamente, carboximetilcelulose (CMC, Sigma) e xilana (Sigma). A reação se deu em banho termostático a 60 °C para os extratos produzidos pelo fungo termofílico e a 45 °C para os produzidos pelo mesofílico, por 10 minutos, sendo interrompida por adição de 1,0 mL do reagente DNS (ácido-1,3-dinitrosalicílico). A quantificação de açúcares redutores liberados da reação de análise da atividade foi feita segundo Miller (1959). A solução foi mantida em banho de água em ebulição por 10 minutos, após o que foi imediatamente transferida para banho de gelo. Durante a ebulição, o reagente DNS, ao reagir com açúcares redutores presentes no meio, altera sua coloração inicialmente amarela para tons castanhos. A intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de açúcares no meio, e a reação de coloração é interrompida quando as amostras são transferidas para o banho de gelo.

Finalmente, foram adicionados aos tubos 8,0 mL de água destilada, após o que foi feita leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. Nos tubos controles, o extrato enzimático foi adicionado após paralisação da reação. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de glicose (para celulase) ou de xilose (para xilanase) por minuto de reação por mL de extrato.

A atividade de betaglicosidase foi quantificada como descrito por Pinto (2010) a partir da reação de 50 μ L de extrato enzimático bruto, 250 μ L de 4-nitrofenol-beta-

D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, Sigma) e 250 μ L de solução tamponante ácido acético/NaOH 0,1 M e pH 5,0 por 10 minutos em banho termostático a 60 °C para os extratos do fungo termofílico e 45 °C para os do mesofílico. A reação foi interrompida pela adição de 2 mL de Na₂CO₃ 2 M, e o nitrofenol liberado foi quantificado por leitura da absorbância a 410 nm em espectrofotômetro. Foi definida uma unidade enzimática como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de nitrofenol.

A atividade papel de filtro ou FPA foi quantificada seguindo-se a metodologia empregada por Pinto (2010) e baseada em Ghose (1987), sendo determinada, conforme Miller (1959), a concentração de açúcares redutores liberados da reação tendo como substrato papel de filtro Whatman n°1 cortado em tiras 1 x 6 cm (50 mg), imerso em 0,9 mL de tampão ácido acético/NaOH 0,1 M pH 5,0 e 0,1 mL de extrato enzimático bruto. A reação se deu em banho termostático com agitação a 60 °C para extratos do fungo termofílico e 45 °C para os do mesofílico, por 60 minutos, sendo paralisada por 1,0 mL de DNS. O restante do procedimento foi similar ao exposto para a determinação de atividades CMCase e xilanase.

Com base no volume de água utilizado para extração das enzimas, os resultados das atividades enzimáticas foram convertidos para serem expressos em unidades por grama de substrato sólido (U/gss).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS DE TESTES PRELIMINARES EM ESCALA DE FRASCOS

4.1 Composição e umidade do substrato para produção de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei* QM9414

Os resultados de atividades enzimáticas dos extratos produzidos pelo fungo mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414 em escala de sacos para diferentes composições e umidades do substrato são apresentados na Tabela 4.1, onde constam os valores das médias e dos desvios padrões das triplicatas dos cultivos, além dos resultados sintetizados da comparação de médias por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). As atividades estão expressas em unidades de atividade enzimática por grama de substrato sólido seco inicial (U/gss).

Tabela 4.1. Atividades enzimáticas do extrato produzido por *Trichoderma reesei* QM9414 em escala de sacos.

		Atividade enzimática média \pm desvio padrão (U/gss)*			
	Umidade (% b.u.)	BC:FT (m/m)			← Média
		1:1	7:3	9:1	
FPA	70	5,2 (\pm 0,7)	4,0 (\pm 0,1)	9,9 (\pm 2,4)	6,4 (\pm 3,1) ^a
	75	2,8 (\pm 1,6)	3,5 (\pm 2,7)	8,5 (\pm 0,7)	4,9 (\pm 3,1) ^a
	80	1,5 (\pm 1,2)	2,1 (\pm 0,1)	7,9 (\pm 2,9)	3,8 (\pm 3,5) ^a
	Média \uparrow	3,2 (\pm 1,9) ^B	3,2 (\pm 1,0) ^B	8,8 (\pm 1,0) ^A	
β -glicosidase	70	5,0 (\pm 0,1)	3,8 (\pm 0,2)	3,9 (\pm 0,5)	4,2 (\pm 0,7) ^b
	75	5,0 (\pm 0,7)	4,3 (\pm 0,3)	4,2 (\pm 0,3)	4,5 (\pm 0,4) ^{ab}
	80	5,4 (\pm 0,3)	4,6 (\pm 0,3)	4,3 (\pm 0,3)	4,8 (\pm 0,6) ^a
	Média \uparrow	5,1 (\pm 0,2) ^A	4,2 (\pm 0,4) ^B	4,1 (\pm 0,2) ^B	
CMCase	70	34,3 (\pm 1,3)	32,4 (\pm 3,4)	48,8 (\pm 9,2)	38,5 (\pm 9,0) ^b
	75	35,8 (\pm 1,8)	37,1 (\pm 2,4)	50,8 (\pm 4,4)	41,2 (\pm 8,3) ^{ab}
	80	40,1 (\pm 0,5)	40,6 (\pm 1,8)	62,9 (\pm 9,6)	47,9 (\pm 13,0) ^a
	Média \uparrow	36,7 (\pm 3,0) ^B	36,7 (\pm 4,1) ^B	54,2 (\pm 7,6) ^A	

* Letras maiúsculas diferentes numa mesma linha indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da composição do substrato, para média dos teores de umidade; letras minúsculas diferentes numa mesma coluna indicam que há diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da umidade do substrato, para média das composições; letras maiúsculas iguais numa mesma linha e minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido aos efeitos da composição (para média da umidade) e da umidade do substrato (para média da composição), respectivamente.

Como se observa na Tabela 4.1, a mínima atividade FPA, 1,5 U/gss, foi obtida para composição de substrato BC:FT 1:1 (m/m), com 80 % de umidade, enquanto que a máxima atividade, 9,9 U/gss, foi obtida para BC:FT 9:1, com 70 % de umidade. Portanto, a combinação entre a menor umidade e a menor proporção de farelo de trigo resultou em atividade celulolítica mais alta. O conteúdo de umidade coincide com o utilizado por Latifian, Hamidi-Esfahani e Barzegar (2007) para cultivo do mesmo fungo em farelo de arroz. Os autores reportaram atividade FPA máxima de 1,2 U/gss após oito dias de cultivo sólido de outra linhagem do fungo *Trichoderma reesei*. Os maiores valores encontrados no presente trabalho podem ser atribuídos à indução da produção da enzima devido ao maior conteúdo de celulose presente no bagaço de cana.

A mínima atividade β -glicosidase, 3,8 U/gss, foi obtida para proporção de substrato BC:FT 7:3 (m/m), com 70 % de umidade, enquanto a máxima, 5,4 U/gss, foi obtida para BC:FT 1:1 (m/m) e 80 % de umidade, após 168 h de cultivo. Pinto (2010) também obteve atividade β -glicosidase máxima, igual a 4,4 U/gss, no cultivo sólido do fungo *T. reesei* para essa composição e umidade do meio, mas para tempo de cultivo de 216 h. Portanto, no presente trabalho, conseguiram-se maiores atividades β -glicosidase num período de tempo mais curto, o que indica maior produtividade. Por outro lado, como as condições de fermentação e a cepa foram as mesmas que as de Pinto (2010), pode ser que aquele autor teve perdas enzimáticas devido ao longo tempo de cultivo, possivelmente em decorrência de atividades proteolíticas no meio.

A mínima atividade de endoglucanase, ou CMCase, 32,4 U/gss, foi obtida para BC:FT 7:3 (m/m) e 70 % de umidade, enquanto que a máxima atividade, 62,9 U/gss, foi obtida para BC:FT 9:1 (m/m) e 80 % de umidade. Tendo em vista a influência da composição do substrato, tais resultados indicam que a produção de endoglucanases é induzida pela maior concentração de celulose no meio. Provavelmente por esse motivo, Smits et al. (1996) obtiveram atividade CMCase muito inferior à obtida neste trabalho, pois os autores empregaram apenas farelo de trigo como substrato, tendo o mesmo fungo como agente fermentativo. Reiteram essa hipótese os resultados de Zanelato (2011), que testou composições de substrato BC:FT 1:1, 7:3 e 9:1 (m/m) para a produção de CMCase por *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. O autor concluiu que o substrato BC:FT 1:1 (m/m) continha quantidades de proteína e fontes de carbono facilmente assimiláveis,

oriundas do farelo, que auxiliavam o desenvolvimento do fungo, porém quantidade de celulose insuficiente para induzir a produção de celulases.

De acordo com os resultados da comparação estatística das médias, a atividade FPA sofre efeito significativo apenas da composição do substrato ($p < 0,05$), sendo significativamente maior para BC:FT 9:1 (m/m), enquanto a umidade do meio não teve efeito significativo sobre a FPA ($p > 0,05$). A atividade β -glicosidase, por outro lado, sofre efeito significativo de ambas as variáveis, composição e umidade do substrato, sendo significativamente maior para BC:FT 1:1 (m/m) e umidade 80 %. A atividade CMCcase, similarmente à β -glicosidase, é estatisticamente afetada tanto pela composição quanto pela umidade do substrato, sendo significativamente maior para a proporção BC:FT 9:1 (m/m) e umidade 80 %. Sendo assim, para definição das condições a serem adotadas para os ensaios no biorreator, priorizou-se a composição do substrato que rendeu maior atividade FPA, que representa a atividade do complexo celulolítico conjunto. Além disso, a proporção BC:FT 9:1 (m/m) utiliza maior quantidade de bagaço-de-cana, que é um resíduo agroindustrial bastante abundante no Brasil. A umidade selecionada para trabalho foi de 70 %, apesar de esta variável não ter tido efeito significativo sobre a atividade FPA. Zanelato (2011) testou umidades 75, 80 e 85 % para a produção de CMCcase por *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e obteve atividade enzimática mais baixa para o maior conteúdo de umidade, o que foi atribuído à redução da oxigenação devida à diminuição da porosidade do substrato. Além disso, Casciatori et al. (2015) mostraram que o farelo de trigo pode absorver água até atingir 80 % de umidade, ao passo que o bagaço de cana absorve uma quantidade máxima de água suficiente para atingir a umidade limite de 75 %. Assim, para substrato composto por 90 % de bagaço de cana, é mais seguro trabalhar-se com conteúdo de umidade inicial inferior a 75 %, de modo a evitar a presença de água não absorvida pela matriz sólida em escala de frascos e o gotejamento de água nos biorreatores.

É possível observar ainda que, enquanto as atividades FPA e CMCcase foram maiores para a composição BC:FT 9:1 (m/m), a atividade β -glicosidase foi maior para BC:FT 1:1 (m/m). No entanto, como as composições do farelo e do bagaço diferem entre si, há que se considerar que o meio contendo mais farelo tende a induzir a produção de enzimas diferentes daquelas induzidas pelo meio contendo mais bagaço. É razoável supor que, no meio contendo mais farelo de trigo, haverá maior atividade de proteases, já que este constituinte contém mais proteína que o

bagaço de cana. Conseqüentemente, as proteases podem ter atacado as demais enzimas, reduzindo suas atividades. Por outro lado, CMCase e β -glicosidase aumentaram significativamente com o aumento da umidade. Tais resultados denotam a dificuldade em se produzir um coquetel eficiente de enzimas celulolíticas, sendo comum a combinação de extratos obtidos a partir de diferentes combinações de microrganismos e substratos.

4.2 Estimativa da cinética de crescimento do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b

A Figura 4.1 mostra os resultados de fração de biomassa do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em BC:FT 7:3 (m/m) estimada pelo conteúdo total de proteínas, onde é possível identificar as fases típicas do crescimento.

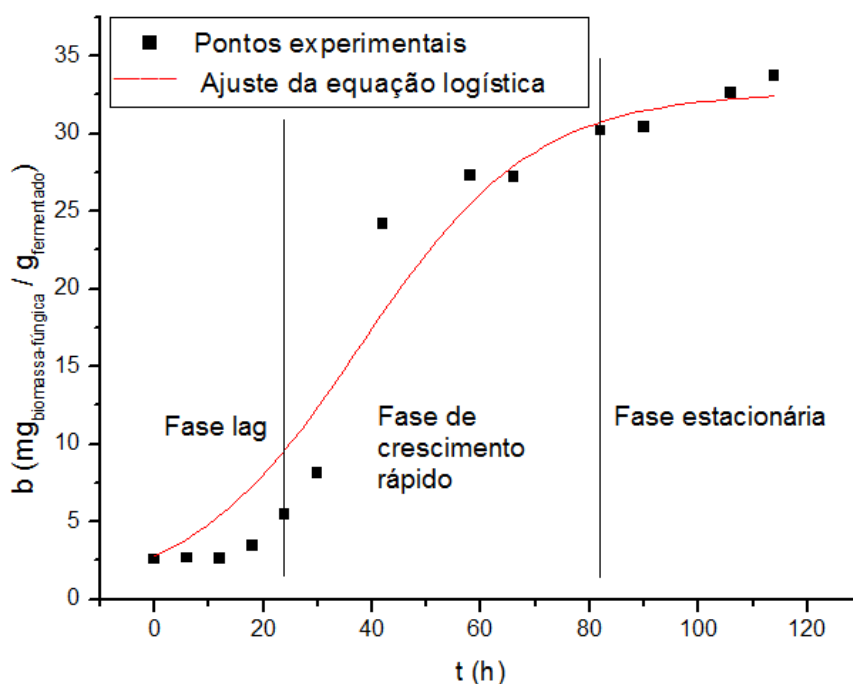


Figura 4.1. Fração de biomassa do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b estimada a partir da determinação do teor de proteínas totais.

As limitações do método de estimativa de biomassa com base no teor de proteínas totais determinadas por Kjeldahl incluem: interferência dos teores de nitrogênio não proteico; atividade proteolítica do extrato enzimático; perda de sensibilidade para substratos ricos em proteínas; variação do teor de proteína na

biomassa com a idade do fungo e com o meio de cultivo. Considerou-se que a interferência dos componentes não proteicos seria constante para todos os pontos e que, devido ao curto tempo de cultivo, o teor de proteínas na biomassa seria constante. Além disso, Zanphorlin (2010) reportou atividade proteolítica baixa para extrato enzimático produzido por uma linhagem de *M. thermophila* na faixa de pH ácido utilizado neste trabalho, permitindo supor que a degradação de proteínas do substrato seria desprezível frente ao conteúdo total de proteínas do farelo de trigo.

O teor de proteínas do substrato não inoculado foi 0,52 %, valor que foi descontado do resultado experimental de cada ponto ao longo do cultivo. Para obtenção da fração de biomassa fúngica (b , $\text{mg}_{\text{biomassa-fúngica}}/\text{g}_{\text{fermentado}}$), o teor de proteína determinado pelo método de Kjeldahl foi dividido pelo conteúdo de proteína da biomassa fúngica obtida por cultivo líquido, igual a $0,5 \text{ g}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{biomassa-fúngica}}$.

O modelo logístico foi ajustado ao conjunto de dados da Figura 4.1, com coeficiente de regressão satisfatório ($r^2 = 0,95$). Os valores dos parâmetros cinéticos de crescimento foram $b_{\text{max}} = 32,7$ mg de biomassa fúngica seca por grama de material fermentado seco, $b_0 = 2,8$ mg de biomassa por grama de fermentado e $\mu_{\text{opt}} = 0,06 \text{ h}^{-1}$. Considerando a curva ajustada, observa-se que a fase lag parece estar compreendida dentro das primeiras 24 horas de fermentação, a fase de crescimento rápido se estende de 24 até aproximadamente 82 horas, seguida por uma fase estacionária. Uma vez que o experimento foi interrompido às 120 h, as fases de declínio e morte não foram observadas.

Zanelato (2011) cultivou o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b nos mesmos substratos e condições empregados neste trabalho. O autor observou que a atividade de endoglucanase obtida aumenta acentuadamente durante as primeiras 48 h de cultivo e estabiliza após 96 h. Considerando esses resultados de cinética de atividade enzimática e os de cinética de crescimento aqui apresentados, as fases de crescimento acelerado e estável de produção enzimática e de crescimento fúngico aparentemente são coincidentes, levando a crer que o fungo secrete as enzimas celulolíticas para obter nutrientes assimiláveis do substrato e então poder colonizar o meio. Para propósitos industriais, é importante conhecer tais cinéticas para melhoria de produtividade. No entanto, são necessários estudos mais detalhados e aprofundados a respeito das cinéticas de crescimento e de produção de enzimas no cultivo sólido de fungos filamentosos, haja vista a complexidade desses sistemas.

Quanto ao ajuste, na realidade, a equação logística não descreve a fase lag do ciclo de crescimento. Somente com concentração inicial de biomassa muito baixa, a equação logística pode mostrar um aumento inicial muito lento da concentração de biomassa, o que parece ser uma fase lag (VICCINI et al., 2001). Uma vantagem de usar a equação logística para ajustar o crescimento fúngico é que este é o único tipo de equação que descreve uma limitação final da quantidade de biomassa atingida nos estágios finais da fermentação. Viccini et al. (2001) ajustaram várias equações empíricas a dados de crescimento obtidos da literatura e observaram que a equação logística dá um ajuste adequado na maioria dos casos. Um problema com o ajuste da equação logística é que, em alguns casos, ela se ajusta bem aos dados coletados no meio e nos estágios finais da fermentação, mas claramente superestima a concentração de biomassa inicial, o que parece ter acontecido com os dados do presente trabalho (Figura 4.1). Este problema decorre de a equação logística ser simétrica em torno do ponto de inflexão em $b = 0,5 b_m$, assim a equação não se ajustará bem aos perfis de crescimento nos quais a fase inicial de aceleração e a fase final de desaceleração do crescimento não sejam simétricas por rotação, o que ocorre quando há uma fase lag curta seguida por uma longa fase estacionária (VICCINI et al., 2001).

Alguns testes preliminares foram feitos para determinação do conteúdo de n-acetilglicosamina do substrato BC:FT 7:3 (m/m) não inoculado, resultando em 0,1 mg/g, que foi tomado como a linha de base para os resultados do material fermentado. A Figura 4.2 mostra que biomassa estimada a partir dos experimentos de n-acetilglicosamina tem uma tendência indefinida em relação ao tempo de fermentação. Devido ao pequeno tamanho da amostra usada para esta determinação (500 mg de material fermentado), suspeitou-se que o procedimento de amostragem pudesse resultar amostras heterogêneas e conseqüentemente o material amostrado poderia não ser representativo do material fermentado como um todo. Assim, alguns testes foram feitos empregando-se todo o material fermentado de um saco plástico, mas os conteúdos de glicosamina foram igualmente indefinidos e até mesmo menores que os obtidos usando as pequenas amostras.

Mediante estes resultados, considerou-se que a determinação de n-acetilglicosamina foi inconclusiva para o sistema fermentativo aqui estudado. Ademais, várias diferentes metodologias foram encontradas na literatura para a estimativa de biomassa com base no conteúdo de glicosamina (SAKURAI; LEE;

SHIOTA, 1977; AIDOO; HENDRY; WOOD, 1981; VIGNON et al., 1986; DESGRANGES et al., 1991; SMITS et al., 1996; EKBLAD; NÄSHOLM, 1996; SCOTTI et al., 2001), o que indica a incerteza deste método. Os problemas mais comuns já reportados na literatura sobre este método são os seguintes: o conteúdo de glicosamina varia de acordo com a idade da cultura (DESGRANGES et al., 1991; NAGEL et al., 2001), a hidrólise da quitina a n-acetilglicosamina pode ser incompleta (TSUJI; KINOSHTA; HOSINO, 1969); o conteúdo de glicosamina do micélio varia com o tipo de cultivo (submerso ou superficial) e com a composição do meio, dificultando obter fatores de conversão confiáveis de glicosamina para biomassa (SAKURAI; LEE; SHIOTA, 1977).

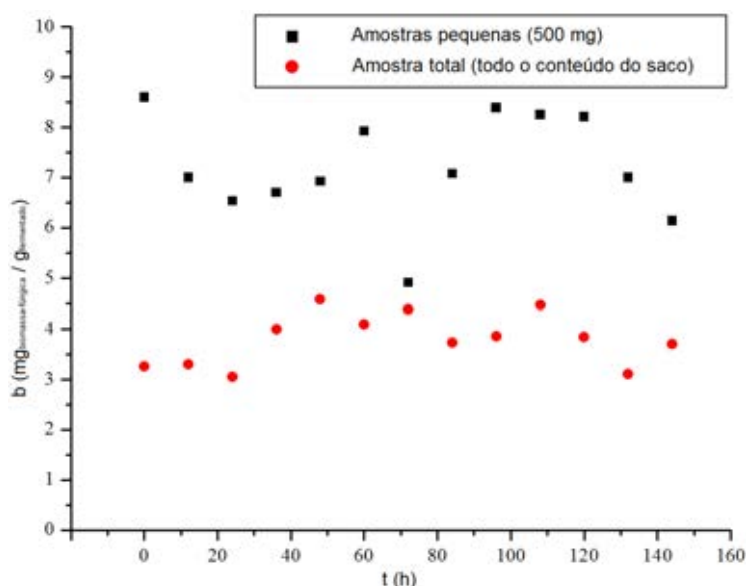


Figura 4.2. Resultados de estimativa da fração de biomassa do fungo *M. thermophila* I-1D3b a partir da determinação do teor de teor de n-acetilglicosamina.

Poucos artigos estão disponíveis na literatura sobre a cinética de crescimento de fungos termofílicos em FES, e nenhum foi encontrado para o cultivo em bagaço de cana. Membrillo et al. (2011) determinaram a cinética de crescimento de *Pleurotus ostreatus* cultivado em partículas de bagaço de cana de diferentes tamanhos (0,92, 1,68 e 2,9 mm de diâmetro; os autores denominaram de diâmetro o tamanho das fibras coletadas entre duas peneiras consecutivas da série Tyler), e obtiveram um resultado razoável para a estimativa da biomassa por n-acetilglicosamina e uma tendência não esperada quando utilizaram o teste de Bradford para determinação de proteínas solúveis. Os autores não comentaram o

método de conversão de n-acetilglicosamina em biomassa, mas o modelo logístico ajustou-se bem aos resultados experimentais e os parâmetros são mostrados na Tabela 4.2. Para a produção de proteínas solúveis, um valor aproximadamente estável foi encontrado a partir do segundo dia de fermentação (primeira medida realizada) para as partículas de diâmetros 1,68 e 2,9 mm e depois do terceiro dia para a partícula de diâmetro 0,92 mm. Os autores também determinaram a produção de enzimas (xilanase, lacase, endoglucanase e papel de filtro) e nenhuma tendência específica pôde ser observada.

Tabela 4.2. Parâmetros cinéticos da literatura para o crescimento de fungos termofílicos ou tendo bagaço de cana como substrato (*).

Referência	Microrganismo	Sistema fermentativo	Método	Parâmetros
Membrillo et al. (2011)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Frascos de vidro Substrato: bagaço de cana de açúcar T = 29,5 °C	Glicosamina	<u>d = 0,92 mm</u> $\mu_{opt} = 0,050 \text{ h}^{-1}$ $b_{max} = 8 \text{ mg/g}$ <u>d = 1,68 mm</u> $\mu_{opt} = 0,049 \text{ h}^{-1}$ $b_{max} = 8 \text{ mg/g}$ <u>d = 0,92 mm</u> $\mu_{opt} = 0,043 \text{ h}^{-1}$ $b_{max} = 8 \text{ mg/g}$
Palma (2003)	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Biorreator de leito empacotado Substratos: bagaço de mandioca e farelo de arroz (7:3 m/m) + 1 % extrato de levedura, T = 45 °C	Glicosamina	$\mu_{opt} = 0,0061 \text{ h}^{-1}$ $b_{max} = 8 \text{ mg/g}$
Kalogeris et al. (2003)	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Tambor rotativo Substrato: farelo de trigo	Glicosamina	<u>T = 48,3 °C</u> $b_{max} = 41,3 \text{ mg/g}$ <u>X = 74 % (b.u.)</u> $b_{max} = 43,8 \text{ mg/g}$ <u>Vazão de ar = 6,6 L/min/g</u> $b_{max} = 46,4 \text{ mg/g}$
Este trabalho	<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	Sacos plásticos Substratos: bagaço de cana e farelo de trigo (7:3 m/m) T = 45 °C, X: 75 % (b.u.)	Proteínas totais	$\mu_{opt} = 0,06 \text{ h}^{-1}$ $b_0 = 2,8 \text{ mg/g}$ $b_{max} = 32,7 \text{ mg/g}$

(*) mg/g: miligramas de biomassa microbiana por grama de material fermentado; X: porcentagem de umidade em base úmida (X, b.u.); d: diâmetro de partícula do substrato.

Palma (2003) cultivou o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* em frascos de vidro e em biorreator de leito empacotado para produzir xilanase, empregando bagaço de mandioca e farelo de arroz como substratos. A autora mediu

o conteúdo de proteínas solúveis, pelo método de Lowry, e de n-acetilglicosamina para estimar a biomassa, embora apenas o último método tenha sido usado para estimativa dos parâmetros de crescimento, apresentados na Tabela 4.2. Os resultados experimentais para o conteúdo de proteínas foram bastante dispersos, mas uma tendência aproximadamente constante pôde ser visualizada, similarmente aos resultados observados por Membrillo et al. (2011) para *Pleurotus ostreatus*.

Kalogeris et al. (2003) também mediram o conteúdo de n-acetilglicosamina para estimar o crescimento da biomassa de *T. aurantiacus* quando cultivado em farelo de trigo em um tambor rotativo, variando o conteúdo de umidade inicial do substrato, a taxa de aeração e a temperatura. Esses autores concluíram que a fração máxima de biomassa (b_{max}) aumentava com aumento da umidade e da taxa de aeração, mas não apresentou uma tendência definida com relação às temperaturas testadas. A Tabela 4.2 apresenta somente os valores médios para a estimativa da biomassa para as variáveis adotadas. Esta dependência da biomassa em função do conteúdo de umidade inicial do substrato e da taxa de escoamento de ar é ainda mais importante em biorreatores de leito empacotado, uma vez que essas variáveis também afetarão o conteúdo de umidade do sólido durante a fermentação, e conseqüentemente o crescimento do microrganismo. O fenômeno de secagem é possível de ser evitado em biorreator rotativo porque a água pode ser repostada por aspersão.

Assim, como já destacado previamente por vários autores (DESGRANGES et al., 1991; VICCINI et al., 2001; KOUTINAS; WANG; WEBB, 2003; MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006; DUAN; WANG; CHEN, 2012; CUNHA et al., 2012), não há um método absoluto para quantificar o crescimento da biomassa em FES, e cada método diferente deve ser usado para cada sistema fermentativo a fim de se identificar qual é o mais apropriado para a estimativa da cinética, sendo este um entrave para a obtenção de informações dos microrganismos requeridas para a simulação dos processos. Esta dificuldade está exemplificada na Tabela 4.2, onde os resultados de Palma (2003) e Kalogeris et al. (2003) são comparados, notando-se que os valores de b_{max} obtidos por Kalogeris et al. (2003) são cerca de cinco vezes maiores que o obtido por Palma (2003) para o mesmo microrganismo.

Diante do exposto e apesar das limitações do método de estimativa da biomassa fúngica por determinação de proteínas totais, optou-se por utilizar os parâmetros cinéticos de crescimento do fungo *M. thermophila* obtidos através desta

técnica para estudos futuros de simulação. Justifica-se o uso destes dados pela ausência de informações sobre o crescimento deste fungo na literatura e pelo fato de o modelo de crescimento logístico ter se ajustado razoavelmente bem aos resultados.

4.3 Estimativa da cinética de crescimento do fungo mesofílico *Trichoderma reesei* QM9414

A Figura 4.3 mostra os resultados de fração de biomassa do fungo *Trichoderma reesei* QM9414 em BC:FT 9:1 (m/m) estimada pelo conteúdo total de proteínas, onde é possível identificar as fases típicas do crescimento. Para melhor estabelecer o perfil de crescimento, poderiam ser necessários mais pontos experimentais na fase inicial do cultivo, a intervalos de tempo menores. No entanto, como o método de Kjeldahl é laborioso, a inclusão de mais pontos não foi realizada. Ademais, a dispersão dos pontos ao final da curva denota que a exatidão do método é baixa, indicando que maior número de pontos não necessariamente melhoraria a estimativa da biomassa inicial.

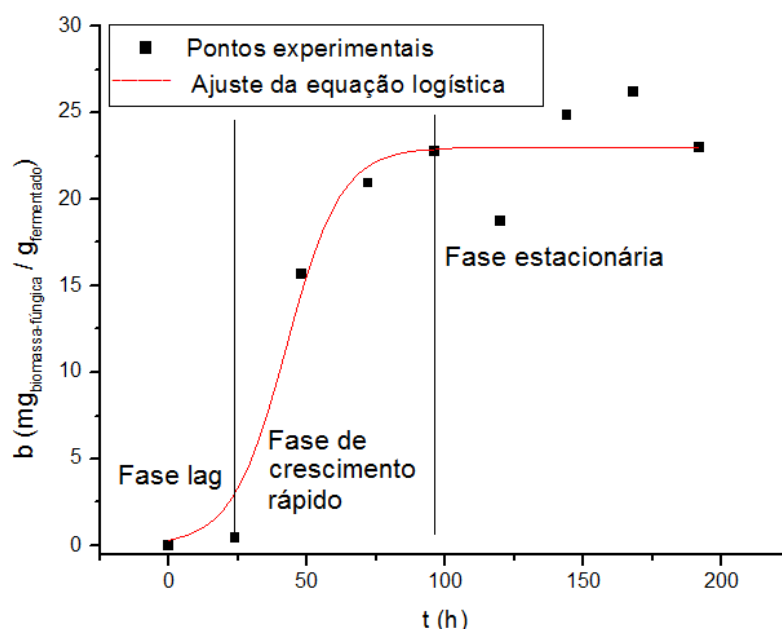


Figura 4.3. Fração de biomassa do fungo *Trichoderma reesei* QM9414 estimada a partir da determinação do teor de proteínas total.

Para estimativa da biomassa a partir dos dados obtidos pelo método de Kjeldahl, foram seguidas as mesmas considerações já adotadas para o fungo *M. thermophila*. Neste caso, o teor de proteínas do substrato não inoculado foi 0,89 %, descontado de cada ponto ao longo do cultivo. Para obtenção de b ($\text{mg}_{\text{biomassa-fúngica}}/\text{g}_{\text{fermentado}}$), o teor de proteína determinado foi dividido pelo teor de proteína da biomassa obtida por cultivo líquido, igual a $0,32 \text{ g}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{biomassa-fúngica}}$.

O modelo logístico foi ajustado ao conjunto de dados da Figura 4.2, com coeficiente de regressão satisfatório ($r^2 = 0,95$). Os valores dos parâmetros cinéticos de crescimento foram $b_{\text{max}} = 23,0$ mg de biomassa fúngica seca por grama de material fermentado seco, $b_0 = 0,3$ mg de biomassa por grama de fermentado e $\mu_{\text{opt}} = 0,10 \text{ h}^{-1}$. Considerando a curva ajustada, observe-se que a fase lag parece estar compreendida dentro das primeiras 24 horas de fermentação, a fase de crescimento rápido se estende de 24 até aproximadamente 96 horas, intervalo de tempo durante o qual a biomassa fúngica aumenta rapidamente, seguida por uma fase estacionária.

Também para o fungo *T. reesei* foi testada a estimativa da biomassa por determinação do conteúdo de n-acetilglicosamina no material fermentado. No entanto, notou-se a mesma tendência indefinida em relação ao tempo de fermentação já observada para o fungo *M. thermophila*. Diante disso e das desvantagens já comentadas da estimativa da biomassa fúngica na FES pelo teor de n-acetilglicosamina do fermentado, considerou-se que esta metodologia também não seria aplicável ao cultivo do fungo *T. reesei* no substrato aqui estudado.

Os valores dos parâmetros de crescimento obtidos pelo ajuste do modelo logístico aos dados de biomassa estimada pela determinação do teor de proteínas total estão apresentados na Tabela 4.3, juntamente com alguns dados da literatura, observando-se que o valor de μ_{opt} encontrado no presente trabalho foi inferior aos demais. Para *T. reesei* QM9414 cultivado em farelo de trigo, Smits et al. (1996) obtiveram velocidade específica de crescimento igual a $0,15 \text{ h}^{-1}$. Assim, acredita-se que a composição do substrato afete diretamente a velocidade de crescimento. Tendo em vista que o bagaço de cana é um substrato basicamente celulósico, sua composição limita a velocidade de crescimento do fungo quando comparado ao farelo de trigo, que é mais rico em nutrientes e atua como fonte de carbono facilmente assimilável.

Tabela 4.3. Parâmetros cinéticos da literatura para o crescimento de fungos mesofílicos ou tendo bagaço de cana como substrato (*).

Referência	Microrganismo	Sistema fermentativo	Método	Parâmetros
Smits et al. (1996)	<i>Trichoderma reesei</i>	Placas de Petri Substrato: farelo de trigo T = 26 °C, X = 53 % (b.u.)	Glicosamina	$\mu_{opt} = 0,15 \text{ h}^{-1}$
Gelmi et al. (2000)	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Colunas de vidro Suporte inerte impregnado com solução nutriente	Glicosamina	$\mu_{opt} = 0,23 \text{ h}^{-1}$
Este trabalho	<i>Trichoderma reesei</i> QM9414	Sacos plásticos Substratos: bagaço de cana e farelo de trigo (9:1 m/m) T = 28 °C, X: 70 % (b.u.)	Proteínas totais	$\mu_{opt} = 0,10 \text{ h}^{-1}$ $b_0 = 0,3 \text{ mg/g}$ $b_{max} = 23,0 \text{ mg/g}$

(*) mg/g: miligramas de biomassa microbiana por grama de material fermentado; X: porcentagem de umidade em base úmida (X, b.u.); d: diâmetro de partícula do substrato.

Sendo assim, apesar de se reconhecerem as limitações em se estimar a fração de biomassa fúngica na FES por determinação do teor de proteínas total no fermentado, optou-se por utilizar os parâmetros cinéticos de crescimento do fungo *T. reesei* obtidos através desta técnica no substrato BC:FT 9:1 (m/m) para estudos futuros de simulação. O uso de tais dados é justificado pela ausência de informações sobre o crescimento deste fungo no substrato aqui empregado e pelo fato de que a metodologia de determinação de n-acetilglicosamina não forneceu resultados confiáveis para este sistema.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS EM MODELAGEM E SIMULAÇÃO

5.1 Estudo de caso para simulação

O biorreator selecionado como estudo de caso para simulação é similar ao utilizado nos ensaios experimentais deste trabalho, consistindo de um leito de substrato, suportado por uma placa perfurada, através da qual ar é continuamente soprado com taxa de escoamento fixa, sendo operado como leito empacotado ao longo de toda a fermentação. Um diagrama do biorreator pode ser visto na Figura 3.2. Para informações detalhadas a respeito do projeto e da operação experimental do equipamento, vide seção 3.4 desta tese.

A dimensão escolhida para o estudo de caso foi o biorreator com 7,62 cm de diâmetro e 1,0 m de comprimento, assumido suficientemente estreito para que a transferência de calor para as paredes seja significativa, de modo que se assume que a camisa tenha uma importante contribuição para o resfriamento do leito. As transferências de calor e de massa, em ambas as direções axial e radial, são consideradas para modelagem e simulação. Do ponto de vista matemático, as equações bidimensionais propostas poderão ser “reduzidas” a unidimensionais. No entanto, fisicamente, esta “redução” depende de hipóteses com consistência física. No presente estudo de caso, o modelo 2-D (r, z) pode ser resolvido como 1-D (z) quando as variações na direção radial forem desprezíveis frente às variações na direção axial. O sistema microbiano para o caso de estudo foi composto pelo fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, cultivado em uma mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (BC:FT 7:3 m/m) visando à produção de celulases.

Este trabalho focou-se somente na modelagem das transferências de calor e de água. A transferência de calor foi considerada devido a que é sabido ser um dos mais importantes fenômenos na FES em leitos empacotados. Como resultado da geração de calor metabólico e das dificuldades na dissipação do calor devido às baixas propriedades de dispersão do meio poroso e à baixa taxa de aeração, já foram reportados na literatura sobreaquecimento no interior dos biorreatores (GHILDYAL et al., 1994; SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1990). A transferência de água também é relevante, uma vez que evaporação significativa também ocorre durante a fermentação, reduzindo a atividade de água do substrato e

consequentemente limitando o crescimento fúngico (VON MEIEN; MITCHELL, 2002). A transferência de gases não foi considerada porque em biorreatores com aeração forçada o suprimento de oxigênio para a superfície da partícula já foi mostrado como não limitante. De acordo com a literatura, se a aeração satisfaz os requerimentos de resfriamento, então satisfará igualmente as necessidades de suprimento de O_2 e remoção de CO_2 (GHILDYAL et al., 1994; GOWTHAMAN et al., 1993; SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1990).

Algumas considerações foram feitas no presente trabalho para propor e resolver o modelo: a) propriedades físicas e térmicas independentes da temperatura para a faixa de temperaturas atingidas ao longo da fermentação; b) perfil radial de velocidade do ar plano; c) porosidade do leito constante; d) migração de umidade através da fase sólida porosa por capilaridade; e) todas as quantidades homogêneas e área de transferência de calor e massa igualmente distribuída dentro de cada elemento de volume discreto; f) reação exotérmica e hidrolítica; g) remoção de calor pela parede do tubo; h) estrutura física do leito não afetada pelo crescimento do fungo; i) efeitos Soret e Dufour desprezíveis.

A Tabela 5.1 apresenta os símbolos, descrições e valores de variáveis, parâmetros e propriedades físicas e microbianas requeridas pelos modelos.

Tabela 5.1. Definições de parâmetros e variáveis e valores das condições de referência para simulação do estudo de caso (*).

Parâmetro ou variável	Descrição	Valor / Unidade	Fonte e comentários
Variáveis independentes			
t	Tempo	Até 96 h ($t_0 = 0$)	Estabelecidos com base em Zanelato et al. (2012) e condições de referência deste trabalho
r	Posição radial	Varia de 0 a 38,1 mm	
z	Posição axial	Varia de 0 a 1,0 m	
Variáveis dependentes			
Sub	Concentração de substrato	kg-substrato-seco/ m^3 ($Sub_0 = 98$)	Casciadori et al. (2014)
S	Concentração de sólidos secos totais	kg-sólidos-secos-totais/ m^3 ($S_0 = 98,3$)	Calculada ($S_0 = B_0 + Sub_0$)
b	Fração de biomassa nos sólidos secos totais	kg-biomassa/kg-sólidos-secos-totais ($b_0 = 0,00281$)	b_0 estimada neste trabalho

(*) Subíndice 0: condição inicial.

Tabela 5.1. Continuação (*).

Parâmetro ou variável	Descrição	Valor / Unidade	Fonte e comentários
Variáveis dependentes			
B	Concentração de biomassa	kg-biomassa/m ³ (B ₀ = 0,3)	Calculada (B ₀ = b ₀ ·S ₀)
T _g	Temperatura da fase gasosa	°C (T _{g0} = 45)	T _{g0} estabelecida como temperatura ótima de processo (Zanelato et al., 2012)
T _s	Temperatura da fase sólida	°C (T _{s0} = 45)	T _{s0} assumida igual a T _{g0} em t = 0
Y	Umidade da fase gasosa	kg-vapor-água/ kg-ar-seco	Y ₀ definida a partir da umidade relativa (UR) de entrada do ar (condição de referência: UR 85 %)
X	Umidade da fase sólida	kg-água/ kg-sólidos-secos-totais (X ₀ = 3)	X ₀ estabelecida no preparo do substrato (Zanelato et al. 2012)
Parâmetros calculados			
Y*	Umidade de saturação do ar a T _g	kg-vapor-água/ kg-ar-seco	Calculada por eq. (5.7a)
a _{wg}	Atividade de água da fase gasosa	Adimensional	Calculada por eq. (5.7c)
a _{ws}	Atividade de água da fase sólida	Adimensional	Calculada por eq. (5.8), a _{ws} = a _{wg} no equilíbrio
μ _w	Fração da taxa específica de crescimento com base na atividade de água	Adimensional D ₁ = 131,60; D ₂ = 94,99; D ₃ = 214,22; D ₄ = 177,67	Calculada por eq. (5.5a); coeficientes de Glenn e Rogers (1988) para <i>Rhizopus oligosporus</i>
μ _T	Fração da taxa específica de crescimento com base na temperatura da fase sólida	Adimensional A = 7,483 x 10 ⁷ s ⁻¹ ; B = 1,300 x 10 ⁴⁷ ; E _{A1} = 70225 J/mol; E _{A2} = 283356 J/mol	Calculada por eq. (5.5b); coeficientes de Saucedo-Castañeda et al. (1990)
μ	Taxa específica de crescimento	s ⁻¹	Calculada por eq. (5.5c); Sargantanis et al. (1993)

(*) Subíndice 0: condição inicial.

Tabela 5.1. Continuação.

Parâmetro ou variável	Descrição	Valor / Unidade	Fonte e comentários
Parâmetros operacionais e de projeto			
a_{wge}	Atividade de água do ar na entrada	0,85	Condição de referência adotada
Y_e	Conteúdo de umidade do ar na entrada	kg-vapor-água/ kg-ar-seco	Determinada por a_{wge} adotada
u_0	Velocidade superficial do ar	0,0146 m/s	Condição de referência adotada
T_{ge}	Temperatura do ar de entrada	45 °C	Zanelato et al. (2012)
T_{wall}	Temperatura da parede do biorreator	45 °C	
L	Comprimento total do biorreator	1,0 m	Condição de referência adotada neste trabalho
R	Raio total do biorreator	38,1 mm	
Propriedades da fase gasosa			
C_{pa}	Calor específico do ar seco	1006 J/kg-ar-seco/°C	Perry et al. (2008)
C_{pv}	Calor específico do vapor d'água	1880 J/kg-vapor-água/°C	
P	Pressão atmosférica na planta	101325 Pa	
P_w^*	Pressão de vapor de saturação de água no ar	Pa	Calculada por eq. (5.7b); Reid, Prausnitz e Sherwood (1977)
ρ_a	Densidade do ar seco	1,11 kg-ar-seco/m ³	Perry et al. (2008)
Pr	Número de Prandtl do ar seco	0,71	
ν_a	Viscosidade cinemática do ar seco	17,5 x 10 ⁻⁶ m ² /s	
Propriedades do leito, do substrato e da água			
C_{ps}	Calor específico dos sólidos secos	1760 J/kg-sólidos-secos/°C	Prieto (2003)
C_{pw}	Calor específico da água líquida	4184 J/kg-água/°C	Perry et al. (2008)
R_g	Constante universal dos gases	8,314 J/mol/°C	
ΔH_{vap}	Entalpia de evaporação da água	2414300 J/kg-água	

Tabela 5.1. Continuação.

Parâmetro ou variável	Descrição	Valor / Unidade	Fonte e comentários
Propriedades do leite, do substrato e da água			
ϵ_0	Fração de vazios ou porosidade do leite (constante)	0,75 m ³ -vazios/m ³ -total	Casciadori et al. (2014)
d_{part}	Diâmetro de partícula do substrato	0,46 mm	Valor médio de medição direta de 10 fibras de bagaço de cana com paquímetro
L_{part}	Comprimento de partícula do substrato	10,00 mm	
Parâmetros microbianos			
R_Q	Calor liberado pelo crescimento do fungo	8,366 x 10 ⁶ J/kg-biomassa	Saucedo-Castañeda et al. (1990)
R_W	Coefficiente estequiométrico relacionando produção de água ao crescimento fúngico	0,3 kg-água/kg-biomassa	Sargantanis et al. (1993)
R_S	Variação nos sólidos secos totais (substrato + biomassa fúngica) por unidade de biomassa produzida	- 2 kg-sólidos-secos-totais/ kg-biomassa	Von Meien e Mitchell (2002)
η	Coefficiente de rendimento de biomassa a partir do substrato	0,33 kg-biomassa/kg-substrato-seco	
b_{max}	Máxima fração possível de biomassa nos sólidos totais	0,0327 kg-biomassa/kg-sólidos-secos-totais	Estimadas neste trabalho
μ_{opt}	Taxa específica de crescimento ótima	1,67 x 10 ⁻⁵ s ⁻¹ (0,06 h ⁻¹)	
Coefficientes de transporte e coefficients de transferência na interface			
α_{wall}	Coefficiente de transferência de calor parede-fluido	W/m ² /°C	Calculado por eq. (5.9e); Li e Finlayson (1977)
D_s	Coefficiente de dispersão efetiva na fase sólida por capilaridade	1,5 x 10 ⁻¹⁰ m ² /s	Ajustado a partir de dados experimentais (Mendes e Gutierrez, 2014)
λ_s	Condutividade térmica efetiva da fase sólida na estagnação	0,065 W/m/°C	Casciadori et al. (2013)

Tabela 5.1. Continuação.

Parâmetro ou variável	Descrição	Valor	Fonte e comentários
Coefficientes de transporte e coeficientes de transferência na interface			
$D_{g,m}$	Difusividade molecular do vapor d'água no ar	$2,5 \times 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$	Perry et al. (2008)
$\lambda_{g,m}$	Condutividade térmica molecular do ar	$0,02745 \text{ W/m}^\circ\text{C}$	
$D_{g,z}$	Difusividade efetiva axial da fase gasosa	m^2/s	$D_{g,z}$, $D_{g,r}$, $\lambda_{g,z}$ e $\Lambda_{g,r}$ calculadas, respectivamente, por eq. (5.9a), eq. (5.9b), eq. (5.9c) e eq. (5.9d)
$D_{g,r}$	Difusividade efetiva radial da fase gasosa	m^2/s	
$\lambda_{g,z}$	Condutividade térmica efetiva axial da fase gasosa	$\text{W/m}^\circ\text{C}$	
$\Lambda_{g,r}$	Condutividade térmica efetiva radial da fase gasosa	$\text{W/m}^\circ\text{C}$	
B_a	Coefficiente volumétrico de transferência de massa na interface gás-sólido	s^{-1}	Calculados por eq. (5.10a) a (5.10d) e Apêndice B
H_a	Coefficiente volumétrico de transferência de calor na interface gás-sólido	$\text{W/m}^3^\circ\text{C}$	
$\dot{v}'(X)$	Taxa normalizada de secagem modificada	Assumida igual a 1	Primeiro período de secagem

5.2 Modelagem da transferência de calor e de água

Na Figura 5.0, é apresentado o diagrama esquemático de um elemento de volume representativo (EVR) do biorreator de FES. No EVR, balanços de energia e de água foram aplicados e, em ambos os casos, equações individuais foram propostas para as fases sólida e gasosa. Cada termo nas equações foi expresso por metro cúbico do biorreator; logo, os termos no balanço de água têm unidades de $\text{kg-água}/\text{m}^3/\text{s}$ e no balanço de energia têm unidades de W/m^3 .

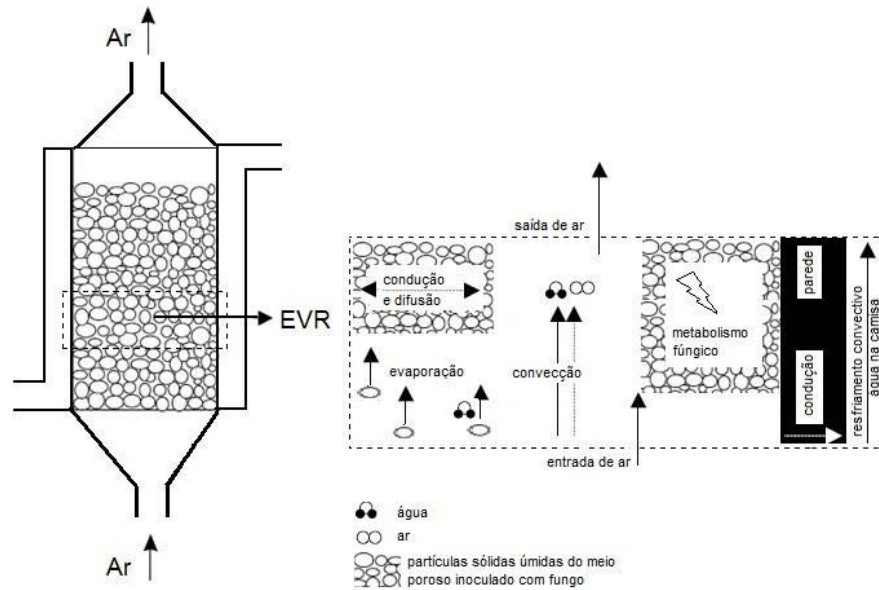


Figura 5.0. Elemento de volume representativo (EVR) do biorreator de FES.

A fração de biomassa nos sólidos secos totais (b) e o conteúdo de umidade da fase sólida (X) foram expressos com base na concentração de sólidos secos totais (S), que é equivalente à soma da concentração de biomassa seca (B) e de substrato seco (Sub).

5.2.1 Balanço de massa para o vapor d'água na fase gasosa

O balanço de água na fase gasosa foi expresso pela equação (5.1):

$$\rho_a \epsilon_0 \frac{\partial Y}{\partial t} + \rho_a u_0 \frac{\partial Y}{\partial z} = \dot{v}'(X) \beta \rho_a \epsilon_0 (Y^* - Y) + \rho_a \epsilon_0 D_{g,z} \frac{\partial^2 Y}{\partial z^2} + \rho_a \epsilon_0 D_{g,r} \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial Y}{\partial r} \right) \quad (5.1)$$

O primeiro termo à esquerda da equação representa a variação total do conteúdo de umidade na fase gasosa, enquanto o segundo termo representa o escoamento de vapor d'água na corrente de ar por advecção. O primeiro termo à direita da equação representa a transferência de água na interface sólido-gás, dada pelo produto do coeficiente de transferência de massa (β) e a diferença entre o conteúdo de umidade real da fase gasosa (Y) e o conteúdo de umidade de saturação do ar (Y^*), multiplicado por $(\rho_a \epsilon_0)$ para ajustar as unidades e pela área de transferência em um elemento de volume específico (a) para se obter a taxa volumétrica. Este termo também foi corrigido pela taxa normalizada de secagem

modificada $\dot{v}'(X)$, que é um parâmetro de secagem empírico que considera a resistência à transferência de massa no sólido. Considerando que o conteúdo de água inicial da matriz sólida foi grande o suficiente para assegurar que o conteúdo de umidade do sólido seria mais alto que o valor crítico (X_{crit}) no biorreator ao longo da fermentação, a secagem foi assumida ocorrer no primeiro período durante o processo. Observe-se que este termo não assume a fase sólida como saturada durante todo o processo, de modo que a equação também poderia ser usada para secagem em leito empacotado. O segundo e terceiro termos à direita representam a difusão de vapor d'água na fase gasosa nas direções axial e radial, respectivamente.

5.2.2 Balanço de massa para a água na fase sólida

O balanço de água na fase sólida foi expresso pela equação (5.2):

$$\frac{\partial(SX)}{\partial t} = -\dot{v}'(X) \beta \rho_a \varepsilon_0 (Y^* - Y) + R_W \left[\frac{\partial(Sb)}{\partial t} \right] + D_s S \frac{\partial^2 X}{\partial z^2} + D_s S \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial X}{\partial r} \right) \quad (5.2)$$

O termo à esquerda da equação representa a variação no conteúdo de água da fase sólida. Uma vez que a concentração de sólidos secos totais (S) varia com o tempo ao mesmo tempo em que varia o conteúdo de umidade nos sólidos secos totais (X), a regra do produto deve ser utilizada a fim de se isolar a variável de interesse X .

À direita da equação (5.2), o primeiro termo corresponde à quantidade de água sendo removida da fase sólida por secagem, que por sua vez é a mesma quantidade de água sendo incorporada à fase gasosa, representando a transferência de água na interface sólido-gás. O segundo termo representa a água produzida durante a fermentação como consequência do crescimento do microrganismo. Portanto, da mesma forma que para o termo à esquerda da equação, a regra do produto foi empregada para o termo de produção metabólica de água.

Os últimos dois termos à direita da equação (5.2) representam a dispersão de água líquida nas direções axial e radial, respectivamente. Deve-se salientar que, em um meio poroso, a difusão líquida através da fase sólida é dominada pelo

mecanismo de capilaridade. Portanto, o coeficiente de difusão não tem o mesmo significado que o coeficiente de difusão molecular da água no material sólido [vide Datta (2007) para mais detalhes a respeito dessa consideração].

Após emprego da regra do produto para derivação do termo à esquerda e do segundo termo à direita da equação (5.2), obtém-se:

$$S \frac{\partial X}{\partial t} + X \frac{\partial S}{\partial t} = -\dot{v}'(X) \beta a \rho_a \varepsilon_0 (Y^* - Y) + R_w \left[S \frac{\partial b}{\partial t} + b \frac{\partial S}{\partial t} \right] + D_s S \frac{\partial^2 X}{\partial z^2} + D_s S \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial X}{\partial r} \right) \quad (5.2a)$$

5.2.3 Balanço de energia na fase gasosa

O balanço de energia na fase gasosa foi expresso pela equação (5.3):

$$\rho_a \varepsilon_0 (C_{p_a} + Y C_{p_v}) \frac{\partial T_g}{\partial t} + \rho_a u_0 (C_{p_a} + Y C_{p_v}) \frac{\partial T_g}{\partial z} = \Delta H_{\text{vap}}(T_s) \dot{v}'(X) \beta a \rho_a \varepsilon_0 (Y^* - Y) \dots \\ - h_a (T_g - T_s) + \varepsilon_0 \lambda_{g,z} \frac{\partial^2 T_g}{\partial z^2} + \varepsilon_0 \lambda_{g,r} \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial T_g}{\partial r} \right) \quad (5.3)$$

O primeiro termo à esquerda da equação representa o acúmulo de energia na fase gasosa ao longo da fermentação. O segundo termo representa o escoamento de energia com a corrente de ar por advecção. Em ambos os termos, a quantidade $(C_{p_a} + Y C_{p_v})$ representa o calor específico do ar úmido.

O primeiro termo à direita da equação (5.3) representa a quantidade de energia associada à evaporação de água na interface sólido-gás, enquanto o segundo termo descreve a transferência de calor convectivo na interface. Os dois últimos termos representam a condução de calor através do ar nas direções axial e radial, respectivamente.

5.2.4 Balanço de energia para a fase sólida

O balanço de energia para a fase sólida foi expresso pela equação (5.4):

$$\begin{aligned}
 (Cp_s + XCp_w) \frac{\partial(ST_s)}{\partial t} = ha(T_g - T_s) - \Delta H_{vap} \dot{v}'(X) \beta a \rho_a \varepsilon_0 (Y^* - Y) \dots \\
 + R_Q \left[\frac{\partial(Sb)}{\partial t} \right] + (1 - \varepsilon_0) \lambda_s \frac{\partial^2 T_s}{\partial z^2} + (1 - \varepsilon_0) \lambda_s \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial T_s}{\partial r} \right)
 \end{aligned} \quad (5.4)$$

O termo à esquerda representa o acúmulo de energia na fase sólida. Uma vez que a concentração de sólidos secos totais (S) e a temperatura da fase sólida (T_s) variam simultaneamente, a regra do produto foi usada para derivação deste termo a fim de isolar a variável de interesse T_s . A quantidade $(Cp_s + Y Cp_w)$ representa o calor específico do sólido úmido. Assume-se que o calor específico da biomassa formada é igual àquele do substrato.

O primeiro termo à direita da equação (5.4) descreve a transferência convectiva de calor na interface sólido-gás, enquanto o segundo termo representa a quantidade de energia associada à evaporação de água na interface. O terceiro termo denota a produção de calor metabólico durante o crescimento do fungo, sendo este termo similar ao que representa a produção metabólica de água na equação (5.2). Logo, a regra de derivação de produto foi usada também para este termo de geração de calor metabólico.

Os dois últimos termos da equação (5.4) representam a condução de calor através da fase sólida nas direções axial e radial, respectivamente.

5.3 Crescimento fúngico e taxa específica de crescimento

Uma vez que o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b foi recentemente isolado, nenhuma informação sobre sua cinética de crescimento está disponível na literatura. Neste trabalho, foram obtidos alguns parâmetros cinéticos de crescimento para este fungo, incluindo a taxa específica de crescimento ótima (μ_{opt}) e as frações inicial (b_0) e máxima (b_{max}) de biomassa nos sólidos totais, conforme já apresentado na sub-seção 4.2. Correlações descrevendo a dependência da taxa específica de crescimento (μ) em função da temperatura (T_s) e da atividade de água (a_{ws}) da fase sólida foram obtidas da literatura (GLENN; ROGERS, 1988; SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1990; SARGANTANIS et al., 1993; VON MEIEN; MITCHELL, 2002).

O aumento da biomassa fúngica (b) foi assumido seguir a equação logística, comumente usada para expressar o crescimento em FES (VICCINI et al., 2001):

$$\frac{db}{dt} = \mu b \left(1 - \frac{b}{b_{\max}} \right) \quad (5.5)$$

Deve ser salientado que o processo de crescimento resulta em perda de massa do sistema na forma de gás carbônico proveniente da respiração. Assim, expressar a fração da biomassa microbiana como a razão entre a massa seca de microrganismo e a massa de matéria seca total implica em uma variação simultânea de duas quantidades diferentes, isto é, a geração de nova biomassa fúngica e a perda de matéria seca do substrato na forma de dióxido de carbono (VICCINI et al., 2001). Portanto, a equação (5.5) não representa uma taxa de reação típica, uma vez que b não é a concentração de apenas uma espécie, mas, ao invés disso, agrupa a biomassa fúngica e a massa de substrato seco. No entanto, uma vez que não é possível separar a biomassa fúngica do substrato seco durante a fermentação, tal aproximação é inevitável.

A fim de expressar matematicamente o aumento da concentração de biomassa e o decréscimo da concentração de substrato, B foi definida como a concentração de biomassa seca no biorreator (dada por $B = S \cdot b$), enquanto Sub foi definida como a concentração de substrato no biorreator, dada pela diferença entre as concentrações de sólidos secos totais (S) e de biomassa fúngica seca (B) no biorreator, ou seja, $Sub = S - B$. Portanto, o consumo de substrato está diretamente relacionado ao crescimento fúngico.

No Apêndice A, as relações entre as variáveis b , B , S e Sub e suas variações ao longo do tempo foram desenvolvidas, seguindo as convenções tradicionais da engenharia de reações (NIELSEN; VILLADSEN; LIDEN, 2003).

Taxas específicas de crescimento relativas μ_T (fração da taxa específica de crescimento dependente da temperatura da fase sólida) e μ_W (fração da taxa específica de crescimento dependente da atividade de água da fase sólida) foram definidas como frações da taxa específica de crescimento quando todas as condições são ótimas para crescimento (μ_{opt}), como já havia sido assumido previamente por Von Meien e Mitchell (2002). Para a dependência da atividade de

água (a_{ws}), μ_w foi dada por um ajuste empírico aos dados experimentais de Glenn e Rogers (1988) para *Rhizopus oligosporus*:

$$\mu_w = \exp(D_1 a_{ws}^3 + D_2 a_{ws}^2 + D_3 a_{ws} + D_4) \quad (5.5a)$$

Para a dependência da temperatura da fase sólida (T_s), μ_T foi dada por um ajuste empírico baseado numa equação do tipo Arrhenius proposta por Saucedo-Castañeda et al. (1990) para *Aspergillus niger*:

$$\mu_T = \frac{1}{\mu_{opt}} \frac{A \exp\left(\frac{-E_{A1}}{R [T_s + 273]}\right)}{1 + B \exp\left(\frac{-E_{A2}}{R [T_s + 273]}\right)} \quad (5.5b)$$

A taxa específica de crescimento real (μ) foi então calculada a partir da média geométrica das duas taxas específicas de crescimento relativas, conforme proposto por Sargantanis et al. (1993):

$$\mu = \mu_{opt} \sqrt{\mu_w \mu_T} \quad (5.5c)$$

5.4 Balanço de massa para os sólidos secos totais

A concentração de sólidos secos totais (S), que inclui as concentrações de substrato (Sub) e de biomassa (B), depende do tempo devido ao consumo de substrato para o crescimento do microrganismo e à produção de nova biomassa fúngica, como segue:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = R_s \frac{\partial B}{\partial t} = R_s \frac{\partial (S.b)}{\partial t} \quad (5.6a)$$

Observe que R_s advém da taxa de reação de conversão de substrato em biomassa, expressando a variação dos sólidos secos totais, englobando o substrato seco e a biomassa seca, por unidade de biomassa fúngica produzida ao longo da fermentação. Aplicando a regra do produto à equação (5.6a), chega-se a:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \frac{R_s}{1 - b R_s} S \frac{\partial b}{\partial t} \quad (5.6b)$$

5.5 Conteúdo de umidade da fase gasosa

A umidade de saturação da fase gasosa foi calculada com base na pressão de saturação de vapor d'água na temperatura do ar:

$$Y^* = \frac{0,62413 P_w^*}{P - P_w^*} \quad (5.7a)$$

onde 0,62413 representa a razão entre a massa molar da água e uma média da massa molar do ar seco, Y^* é o conteúdo de umidade de saturação específica do ar, P é a pressão atmosférica na planta de processo e P_w^* é a pressão de saturação do vapor d'água, calculada pela equação de Antoine em função da temperatura do ar T_g (REID; PRAUSNITZ; SHERWOOD, 1977):

$$P_w^* = 133,322 \exp \left(18,3036 - \frac{3816,44}{(T_g + 273,15) - 46,13} \right) \quad (5.7b)$$

A atividade de água da fase gasosa na temperatura T_g , que é equivalente à umidade relativa do ar (UR), foi calculada como segue:

$$a_{wg} = \frac{Y P}{P_w^* (Y + 0,62413)} \quad (5.7c)$$

5.6 Isoterma de sorção da fase sólida

Como o substrato foi composto em maior proporção por bagaço de cana (70 % bagaço de cana e 30 % farelo de trigo), assumiu-se que a isoterma de sorção do substrato seria bem representada pela isoterma de sorção do bagaço de cana. De acordo com Casciadori et al. (2015), a equação de Oswin (1946) pode ser usada para descrever a isoterma do bagaço de cana em função da atividade de água:

$$X^* = 0,052 \left(\frac{a_{wg}}{1 - a_{wg}} \right)^{0,409} \quad (5.8)$$

O emprego desta equação para cálculo da atividade de água da fase sólida ao longo de todo o processo fermentativo é uma simplificação forte. Ela implica que o material contido no interior do biorreator, constituído inicialmente por substrato úmido inoculado que, por sua vez, é gradativamente consumido e colonizado pela biomassa fúngica, mantém o mesmo comportamento higroscópico ao longo de toda a fermentação.

5.7 Parâmetros de transporte de calor e massa para as fases gasosa e sólida

Os coeficientes efetivos de transferência de calor e de massa para a fase gasosa foram assumidos como dependentes do escoamento de ar na direção axial e da estrutura do leito empacotado, empregando-se correlações disponíveis na literatura para avaliar estes parâmetros. Os parâmetros estimados fora os coeficientes efetivos de dispersão axial e radial de transferência de massa (respectivamente $D_{g,z}$ e $D_{g,r}$) e de calor (respectivamente $\lambda_{g,z}$ e $\Lambda_{g,r}$) e o coeficiente de transferência de calor parede-fluido (α_{wall}).

As considerações para a estimativa dos parâmetros de dispersão foram porosidade do leito constante, perfil plano de velocidade do ar e $d_{part} \ll R$. As seguintes correlações simplificadas foram utilizadas para avaliar os coeficientes de dispersão (VORTMEYER; HAIDEGGER, 1991; TSOTSAS, 2010a; 2010b):

$$D_{g,z} = \left[1 - (1 - \varepsilon_0)^{1/2} \right] D_{g,m} + \frac{Re_p}{2} v \quad (5.9a)$$

$$D_{g,r} = \left[1 - (1 - \varepsilon_0)^{1/2} \right] D_{g,m} + \frac{Re_p}{8} v \quad (5.9b)$$

$$\lambda_{g,z} = \left[1 - (1 - \varepsilon_0)^{1/2} \right] \lambda_{g,m} + \frac{Re_p}{2} v \quad (5.9c)$$

$$\Lambda_{g,r} = \left[1 - (1 - \varepsilon_0)^{1/2}\right] \lambda_{g,m} + \frac{\text{Re}_p}{8} \nu \quad (5.9d)$$

onde $\text{Re}_p = \frac{u_0 d_{\text{part}}}{\nu_a}$.

O coeficiente de transferência de calor parede-fluido (α_{wall}) foi estimado a partir da correlação de Li e Finlayson (1977):

$$\text{Nu}_{\text{wall}} = \frac{\alpha_{\text{wall}} d_{\text{part}}}{\lambda_{g,m}} = 0,17 \text{Re}_p^{0,79} \quad (5.9e)$$

onde Nu_{wall} é o número de Nusselt na parede. Uma vez que as fibras de bagaço de cana são os componentes majoritários da matriz sólida, o diâmetro de partícula foi assumido como o diâmetro das fibras, que foi determinado pelo valor médio das medidas diretas de 10 fibras com paquímetro.

Uma vez que a fase sólida é estática, os coeficientes efetivos de transferência de calor e de massa da fase sólida foram assumidos não depender do escoamento de ar, tendo-se empregado as propriedades do meio poroso na estagnação. Assim, os parâmetros de dispersão de água $D_{s,z}$ e $D_{s,r}$ para as difusividades de água axial e radial da fase sólida foram fixados como $D_{s,z} = D_{s,r} = D_s$. Para este trabalho, D_s foi obtido experimentalmente por análise termogravimétrica (TGA) de acordo com Chen, Zhang e Zhu (2012) e o meio foi considerado isotrópico. Também para o parâmetro de condução de calor, a matriz sólida foi considerada isotrópica e a condutividade térmica da fase sólida (λ_s) foi fixada a partir de dados experimentais para a condutividade térmica efetiva na estagnação (λ_0) (CASCIATORI et al., 2013) e foi assumida constante e igual para as direções axial e radial.

5.8 Coeficientes de transferência de calor e massa na interface gás-sólido

No presente trabalho, os coeficientes de transferência de calor e de massa na interface gás-sólido foram calculados a partir de correções clássicas para os números de Nusselt (Nu) e Sherwood (Sh), encontradas na literatura.

As partículas de bagaço de cana foram assumidas como cilindros infinitos ($d_{part} = 0,46$ mm e $L_{part} = 15$ mm). Para o cálculo, tomou-se como exemplo o caso suposto de que 70 % das partículas estariam posicionadas de modo a ter o ar percolando entre elas em escoamento cruzado, enquanto os restantes 30 % teriam o ar em escoamento paralelo. Assim, dois diferentes números de Nusselt foram calculados por correlações apropriadas para cilindros em fluxo cruzado (Nu_{cf}) ou em fluxo paralelo (Nu_{pf}), então um número de Nusselt médio (Nu_w) foi obtido.

O número de Sherwood foi assumido como numericamente igual ao número de Nusselt, utilizando-se como aproximação uma analogia entre a transferência de calor e a de massa. Portanto, o coeficiente de transferência de calor na interface gás-sólido (h) foi obtido a partir do número de Nusselt médio ponderado e o coeficiente de transferência de água na interface gás-sólido (β) a partir do número de Sherwood médio ponderado.

Para ar em escoamento cruzado às fibras, a correlação de Churchill e Bernstein (1977) foi empregada:

$$Nu_{cf} = 0,3 + \frac{0,62 Re_p^{1/2} Pr^{1/3}}{[1 + (0,4/Pr)^{2/3}]^{1/4}} \left[1 + \left(\frac{Re_p}{282000} \right)^{5/8} \right]^{4/5} \quad (5.10a)$$

onde Nu_{cf} é o número de Nusselt para os 70 % de fibras com ar em escoamento cruzado.

Para o ar em escoamento paralelo às fibras, o cilindro infinito foi aproximado para uma placa plana de comprimento L_{part} (medido experimentalmente) e então a seguinte correlação para cálculo do número de Nusselt foi aplicada (LIENHARD IV; LIENHARD V, 2000):

$$Nu_{pf} = 0,664 Re_{fp}^{0,5} Pr^{1/3} \quad (5.10b)$$

onde é o número de Nusselt para os 30 % de fibras com ar em escoamento paralelo

$$e Re_{fp} = \frac{u_0 L_{part}}{v_a} \text{ (placa-plana).}$$

O número de Nusselt ponderado (Nu_w) foi então dado por:

$$Nu_w = 0,7 Nu_{cf} + 0,3 Nu_{pf} \quad (5.10c)$$

Com base na analogia entre transferência de calor e de massa:

$$Nu_w = Sh_w \quad (5.10d)$$

5.9 Razão área de transferência por volume total do biorreator (a , m^2/m^3)

Ambos os coeficientes de transferência de calor (h) e de massa (β) na interface gás-sólido devem ser normalizados pela razão entre a área total de transferência no biorreator e o volume total do biorreator ($a = A_{TT}/V_R$), a fim de englobar a transferência na interface através de todo o biorreator. Os cálculos, feitos para um elemento de volume representativo do biorreator, bem como as considerações empregadas, são apresentados no Apêndice B.

O valor de $a = A_{TT}/V_R$ para um elemento de volume é constante para o biorreator como um todo. Assim, embora os coeficientes h e β tenham sido calculados para uma única partícula e a razão área de troca por volume do biorreator para um elemento de volume, ao serem multiplicados por $a = A_{TT}/V_R$, os coeficientes ha e βa dos balanços de energia e de água, respectivamente, estão escalonados.

5.10 Condições iniciais e de contorno

As condições iniciais, para $t = 0$ (início do processo), são:

$$t = 0 \quad \left\{ \begin{array}{l} B = B_0 \\ b = b_0 \\ S = S_0 \\ Sub = Sub_0 \\ Y = Y_0 \\ X = X_0 \\ T_g = T_{g0} \\ T_s = T_{s0} \end{array} \right. \quad (5.11)$$

Todas essas condições iniciais puderam ser estabelecidas na preparação do substrato inoculado e no início da operação do biorreator.

As condições de contorno foram assumidas como segue:

Em $z = 0$ (entrada do leito):

$$z = 0 \quad \left\{ \begin{array}{l} Y = Y_e = Y_0 \\ \frac{\partial X}{\partial z} = 0 \quad \frac{\partial T_s}{\partial z} = 0 \\ T_g = T_{ge} = T_{g0} \end{array} \right. \quad (5.12a)$$

Em $z = L$ (saída do leito):

$$z = L \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y}{\partial z} = 0 \\ \frac{\partial X}{\partial z} = 0 \\ \frac{\partial T_g}{\partial z} = 0 \\ \frac{\partial T_s}{\partial z} = 0 \end{array} \right. \quad (5.12b)$$

Simetria em $r = 0$ (eixo central):

$$\frac{\partial Y}{\partial r} = \frac{\partial X}{\partial r} = \frac{\partial T_g}{\partial r} = \frac{\partial T_s}{\partial r} = 0 \quad (5.12c)$$

Em $r = R$ (parede do leito):

$$r = R \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y}{\partial r} = 0 \\ \frac{\partial X}{\partial r} = 0 \\ -\Lambda_{g,r} \frac{\partial T_g}{\partial r} = \alpha_{\text{wall}} (T_{gR} - T_{\text{wall}}) \\ -\lambda_s \frac{\partial T_s}{\partial r} = \alpha_{\text{wall}} (T_{sR} - T_{\text{wall}}) \end{array} \right. \quad (5.12d)$$

onde T_{gR} e T_{sR} são as temperaturas das fases gasosa e sólida, respectivamente, em $r = R$.

5.11 Resultados das simulações do estudo de caso

A simulação do estudo de caso empregando os modelos aqui propostos foi feita empregando-se os valores dos parâmetros e das condições operacionais de referência apresentados na Tabela 5.1. Algumas simulações foram feitas posteriormente para leitos de maiores diâmetros, a fim de prever possíveis dificuldades quando da ampliação de escala do biorreator, e também para diferentes condições operacionais, a fim de se prever o efeito da taxa de escoamento e da umidade relativa do ar percolante sobre as variáveis ambientais no interior do biorreator ao longo da fermentação, bem como o efeito de parâmetros do substrato e do microrganismo.

5.11.1 Predições gerais no biorreator pela simulação do estudo de caso sob as condições de referência

A Figura 5.1 apresenta os perfis preditos, em função do tempo e da posição axial, para as temperaturas e conteúdos de umidade das fases sólida e gasosa, bem como para concentrações de biomassa (B) e de substrato (Sub), quando a simulação do estudo de caso foi feita empregando-se o modelo como unidimensional.

Quanto à simulação com o modelo como 1-D, as Figuras 5.1a e 5.1b apresentaram perfis similares em função do tempo e da posição axial, o que significa dizer que as fases sólida e gasosa foram preditas a ter aproximadamente a mesma temperatura ao longo da fermentação. A razão provável para tal é o alto valor do coeficiente volumétrico de transferência de calor na interface (h_a), uma vez que a área total de transferência em um elemento de volume é grande, cerca de $2 \cdot 10^3 \text{ m}^{-1}$. Somente na posição axial muito próxima à entrada do leito foi possível observar que a temperatura da fase gasosa foi mantida em $45 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto a temperatura da fase sólida caiu um pouco abaixo dos $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 5.1a), provavelmente devido à intensa remoção de água da fase sólida observada nesta região (Figura 5.1c). Entretanto, a diferença entre as temperaturas do gás e do sólido foram inferiores a

0,5 °C, podendo ser consideradas iguais no interior do leito ao longo da fermentação, uma vez que sensores térmicos convencionais não seriam capazes de indicar variações de temperatura dessa magnitude com exatidão em medidas no interior do meio poroso (THOMÉO; ROUILLER; FREIRE, 2004).

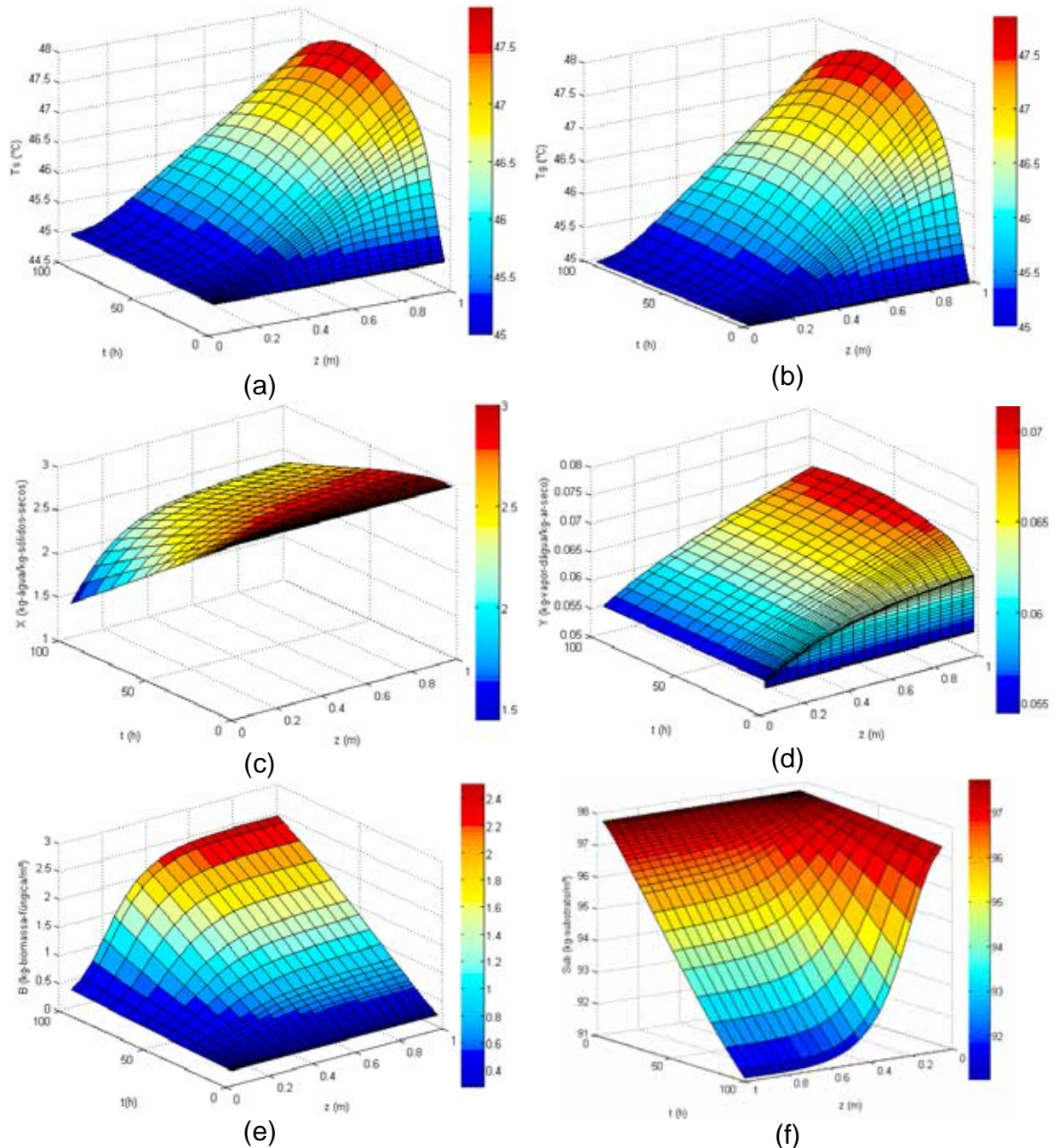


Figura 5.1. Perfis de temperatura preditos em função do tempo e da posição axial para: a) T_s ; b) T_g ; c) X ; d) Y ; e) B ; f) Sub .

Portanto, a aproximação pseudo-homogênea usualmente aplicada na literatura pode ser considerada razoável para o processo aqui simulado. Assim, tal resultado sugere que, apesar de o modelo ter de ser heterogêneo para representar a transferência de água da fase sólida para a fluida, permitindo predições de perfis de umidade, pode ser suficiente medir somente a temperatura da fase gasosa para representar o sistema fermentativo como um todo, incluindo a fase sólida, contornando o problema de medir a temperatura da fase sólida para validar o modelo.

As temperaturas mais altas foram previstas a serem atingidas no topo do biorreator por volta da metade do tempo de fermentação ($t = 48$ h), como já havia sido reportado na literatura referente aos modelos homogêneos (SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1990; SANGSURASAK; MITCHELL, 1995a; 1995b; 1998; FANAEI; VAZIRI, 2009). No entanto, observe-se que a temperatura máxima prevista foi próxima de 47,5 °C, ou seja, apenas 2,5 °C acima da temperatura ideal de processo, um resultado expressivo considerando-se que o modelo 1-D não leva em conta a remoção de calor pela camisa. Isso sugere que o sobreaquecimento não é um problema sério quando do emprego de fungos termofílicos como agentes fermentativos na FES, concordando com observações experimentais prévias (UMSZA-GUEZ, 2009; ZANELATO et al., 2012; CASCIATORI; CASCIATORI; THOMÉO, 2013).

O conteúdo de umidade da fase gasosa (Figura 5.1d) segue o comportamento de aumento da temperatura, uma vez que ambas as variáveis são diretamente conectadas. A redução severa do conteúdo de umidade da matriz sólida na base do biorreator (Figura 5.4c) pareceu ser mais séria que o sobreaquecimento neste estudo de caso sob as condições de referência. No entanto, a umidade relativa de 85 % é incomum para o suprimento de ar em biorreatores de FES, embora este valor tenha sido escolhido como uma condição de referência para simulação a fim de tornar claro o efeito indesejado de secagem ocorrendo no biorreator de FES em leito empacotado. O efeito da umidade relativa do ar de entrada sobre a temperatura e a umidade da fase sólida ao longo da fermentação e seus consequentes efeitos no crescimento fúngico também foram explorados, como se verá mais adiante, com a umidade relativa sendo variada para as simulações.

Consequentemente, o crescimento da biomassa fúngica e o consumo de substrato foram retardados nesta região próxima à entrada do leito (Figuras 5.1e e

5.1f, respectivamente). Uma vez que a temperatura nas proximidades da entrada do leito foi mantida próxima do valor ótimo para o crescimento microbiano, a única explicação para o crescimento fúngico ter sido prejudicado foi a intensa redução do conteúdo de umidade do substrato, e conseqüentemente as atividades de água mais baixas ali atingidas (a_{ws}). Pode-se sugerir que provavelmente algumas atividades metabólicas que requerem um filme de água para serem realizadas podem ter sido afetadas pela redução de a_{ws} a valores menores que 0,90.

Grajek (1988) estudaram as condições de crescimento de um fungo mesofílico (*Trichoderma viride*) e dois fungos termofílicos na FES (*Thermoascus aurantiacus* e *Sporotrichum thermophile*). O autor reportou que uma sutil variação em torno do valor ótimo de a_{ws} para o desenvolvimento dos fungos causava uma grande perturbação no crescimento e no metabolismo fúngicos. Os resultados apresentados por Grajek (1988) mostraram que a variação admissível de a_{ws} que assegura um desenvolvimento normal da cultura varia somente 0,005 a 0,01 em torno do valor ótimo de a_{ws} . Além disso, o mesmo autor observou que ambas as linhagens termofílicas foram mais sensíveis às variações de a_{ws} que a do fungo mesofílico, uma vez que uma taxa de crescimento apreciável para os organismos termofílicos somente foi observada a valores muito elevados de a_{ws} , aproximadamente 1,0.

Portanto, para o sistema fermentativo aqui tomado como estudo de caso, a produção de enzimas na zona da base do biorreator tende a ser mais baixa que nas regiões superiores, um problema já reportado na literatura mesmo quando ar saturado ou próximo à saturação foi fornecido ao biorreator (GOWTHAMAN et al., 1993; GHILDYAL et al., 1994; KHANAHMADI et al., 2006; AHLAWAT et al., 2007; UMSZA-GUEZ, 2009; ZANELATO et al., 2012). Observe que, de acordo com as Figuras 5.1e e 5.1f, o crescimento fúngico e o consumo de substrato atingirão valores máximos para alturas do leito a partir de 30 cm, significando que cerca de um terço do biorreator é subutilizado.

Para o estudo de simulação empregando o modelo bidimensional, a Figura 5.2 apresenta os perfis espaciais preditos em $t = 48$ h (meio período de fermentação) para as temperaturas das fases sólida e gasosa e em $t = 96$ h (final da fermentação) para os conteúdos de umidade das fases sólida e gasosa e concentrações de biomassa e substrato.

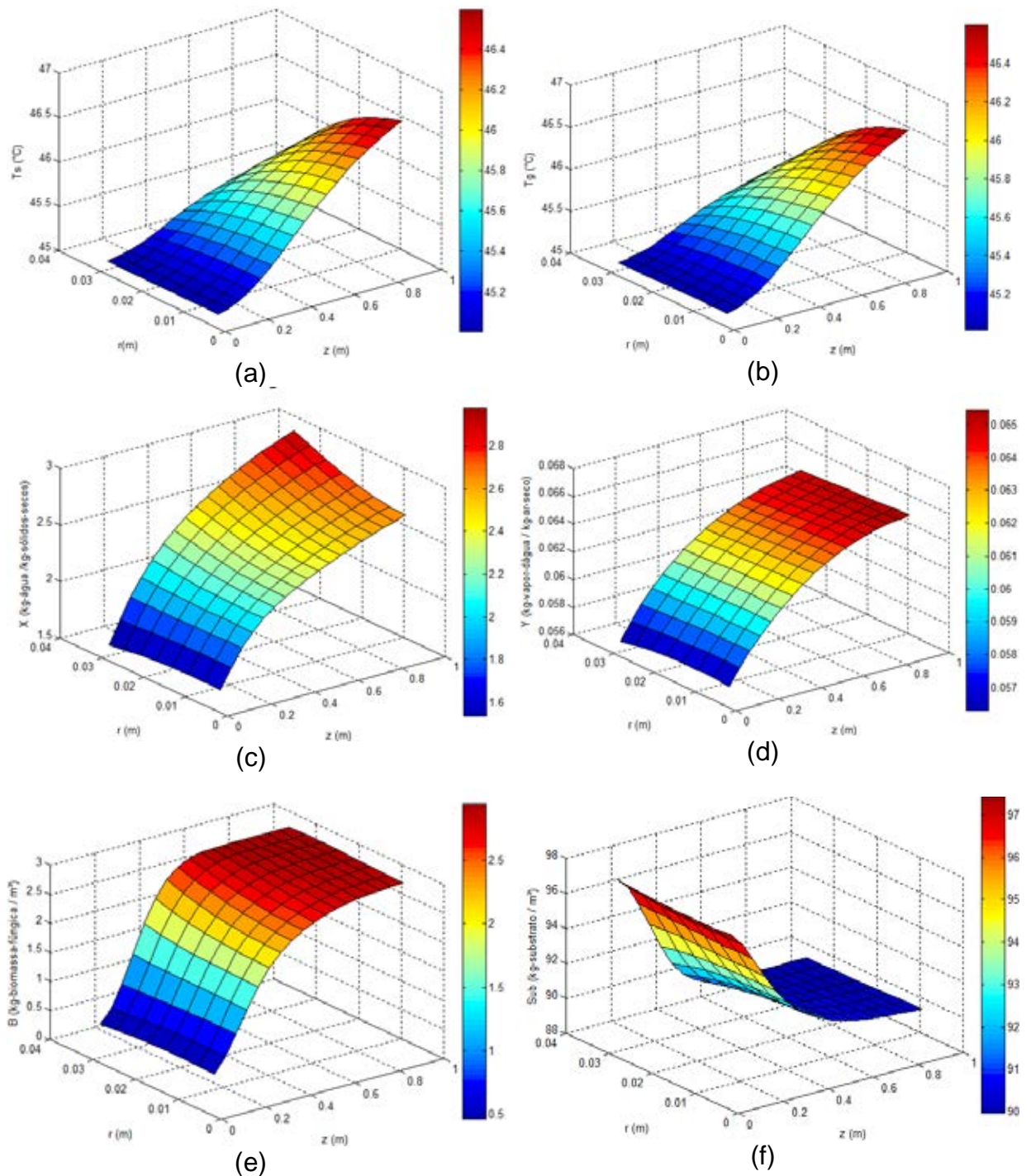


Figura 5.2. Perfis espaciais preditos para: a) T_s e b) T_g (em $t = 48$ h); c) X ; d) Y ; e) B e f) Sub (em $t = 96$ h).

As Figuras 5.2a e 5.2b mostram perfis espaciais similares e valores de T_s e T_g muito próximos em $t = 48$ h (metade do tempo de fermentação), indicando que as fases podem ser consideradas a estarem próximas ao equilíbrio térmico ao longo da fermentação. Similarmente ao modelo 1-D, as temperaturas mais elevadas foram previstas pelo modelo 2-D no topo do biorreator ao redor das 48 h, apesar de que a

simulação 2-D permitir a observação de um perfil de temperatura radial apreciável como consequência da remoção de calor pela camisa. Assim, os valores máximos ficaram abaixo de 46,5 °C, ou seja, apenas 1,5 °C acima da temperatura ideal de processo. Este resultado demonstrou que a camisa desempenha uma importante contribuição para a remoção de calor metabólico nesta configuração de pequeno diâmetro do biorreator, uma vez que a temperatura mais alta predita pelo modelo 2-D foi menor do que quando não se considerou a remoção de calor radial. Assim, sobreaquecimento não deve ser esperado neste sistema do estudo de caso sob as condições de referência.

O perfil espacial de umidade do ar (Y) ao final da fermentação (Figura 5.2d) segue o perfil espacial de T_g . Uma vez que as temperaturas aumentaram em direção à saída do leito e ao eixo central, o conteúdo de umidade no ar também aumentou, devido à mudança em seu conteúdo de umidade de saturação em função da temperatura (equações 5.7a e 5.7b). No entanto, a queda de Y em direção à parede do leito foi mais discreta que a de T_g .

O perfil espacial de umidade do sólido (X) ao final da fermentação (Figura 5.2c) também seguiu o perfil espacial de T_s , assim foi possível também ver um discreto perfil radial de X , com valores de X ligeiramente mais altos preditos nas proximidades da parede do leito. Entretanto, nas proximidades da entrada do leito, os valores de X foram ainda muito baixos, uma vez que a fase sólida sofreu rápida remoção de água devido à percolação longitudinal de ar abaixo da saturação (UR 85 %), o que se espera ser minimizado se ar saturado for suprido ao biorreator. Como consequência da secagem severa da fase sólida nas proximidades da entrada do leito, perfis espaciais de crescimento da biomassa fúngica e de consumo de substrato também foram preditos (Figuras 5.2e e 5.2f), mostrando acentuados e leves gradientes nas direções axial e radial, respectivamente.

O modelo pseudo-homogêneo (de uma fase) proposto por Sangsurasak e Mitchell (1998) também foi aplicado para simular a transferência de calor no leito empacotado para o mesmo sistema de FES aqui simulado sob as condições de referência, à exceção de Y_0 , já que aeração saturada é mandatória para modelos de uma fase. Uma vez que as temperaturas das fases sólida e gasosa foram preditas como sendo muito próximas ao longo da fermentação pelo modelo de duas fases proposto neste trabalho, essas temperaturas puderam ser comparadas com a temperatura da matriz pseudo-homogênea predita pelo modelo de uma fase.

Os resultados da simulação pelo modelo de Sangsurasak e Mitchell (1998) mostraram que as temperaturas mais altas previstas foram de 45,9 °C desprezando-se a dispersão radial (1-D) e 45,1 °C para o modelo 2-D, que por sua vez foram menores que as previstas pelo modelo heterogêneo aqui proposto, iguais a 49,3 °C sem dispersão radial e 46,7 °C para o modelo completo (2-D), mesmo considerando-se aeração saturada para ambos os casos. Apesar de os aumentos de temperatura não terem sido tão elevados para ambos os casos no biorreator de leito empacotado com 7,62 cm de diâmetro, o modelo homogêneo predisse picos de temperatura mais baixos no topo do leito, o que poderia se tornar um problema para maiores escalas. Acredita-se que tais diferentes resultados nas previsões de temperatura estejam associados à forma de representar a remoção de calor por evaporação. Enquanto o modelo heterogêneo aqui proposto é capaz de representar adequadamente o fenômeno de secagem em leitos porosos, o modelo pseudo-homogêneo calcula essa quantidade de calor removido com base na restrição de que a fase gasosa se mantém sempre saturada, uma aproximação teórica severa.

5.11.2 Efeito das condições operacionais sobre o desempenho geral do biorreator

Os efeitos da velocidade superficial (u_0) e do conteúdo de umidade do ar na entrada (Y_e) sobre os perfis previstos de temperatura (T_s) e do conteúdo de umidade (X) da fase sólida ao longo do tempo de fermentação foram avaliados através dos modelos 1-D e 2-D.

Os valores de $u_0 = 0,0073$, $0,0146$ e $0,0292$ m/s foram testados. O valor $u_0 = 0,0073$ m/s corresponde à taxa de aeração 120L/h empregada por Zanelato et al. (2012) para o mesmo sistema de FES, porém para comprimento do leito de somente 0,5 m. A condição de referência $u_0 = 0,0146$ m/s foi estabelecida usando critérios básicos de ampliação de escala (NAUMAN, 2002) com base em Zanelato et al. (2012). Uma vez que o comprimento do biorreator foi dobrado, enquanto o diâmetro permaneceu constante (7,62 cm), o biorreator usado por Casciotori, Casciotori e Thoméo (2013) e escolhido como estudo de caso para simulação, teve o dobro do volume do biorreator de leito empacotado usado por Zanelato et al. (2012), o que levou à necessidade de se dobrar a taxa de aeração (de 120 para 240 L/h). Uma vez que o diâmetro do leito foi constante, isso resultou em $u_0 = 0,0146$ m/s. O valor de u_0

= 0,0292 m/s foi escolhido como uma superestimativa. A Figura 5.3 mostra os perfis temporais de T_s (próximo à saída do leito) e de X (próximo à entrada do leito) preditos pelos modelos 1-D e 2-D para os três valores de u_0 .

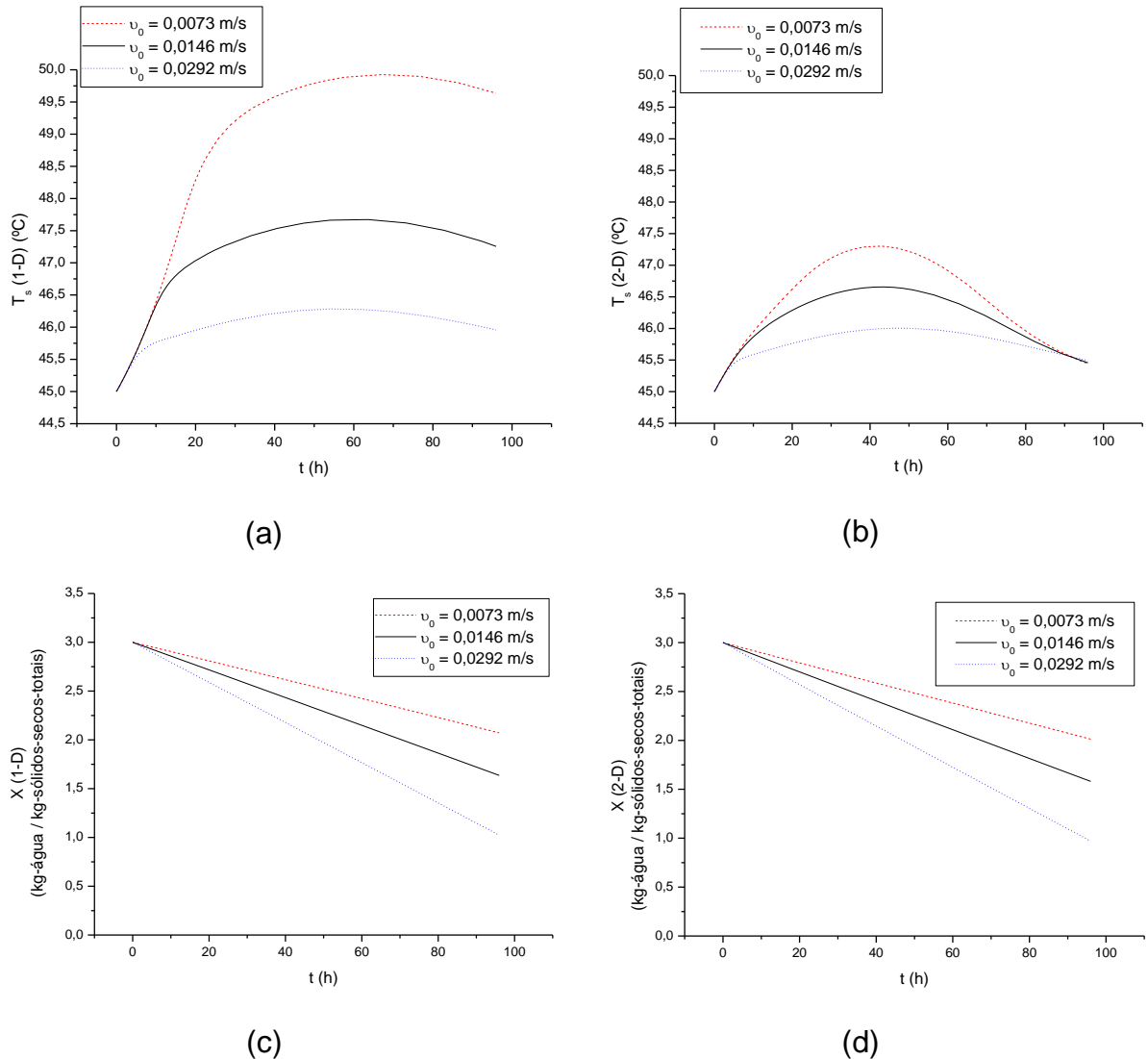


Figura 5.3. Efeito de u_0 sobre variáveis da fase sólida: a) T_s predita pelo modelo 1-D ($z/L = 0,925$); b) T_s predita pelo modelo 2-D ($z/L = 0,925$ e $r/R = 0,05$); c) X predito pelo modelo 1-D ($z/L = 0,075$); d) X predito pelo modelo 2-D ($z/L = 0,075$ e $r/R = 0,05$). $Y_0 = 0,0544$ kg-vapor-d'água / kg-ar-seco.

A influência de u_0 sobre os perfis temporais previstos de T_s no topo do biorreator do leito empacotado mostrou-se maior para o modelo 1-D (Figura 5.3a) que para o modelo 2-D (Figura 5.3b). A explicação para tal resultado é que o modelo

1-D simula um reator não resfriado pela parede, portanto o único mecanismo de transferência de calor é através do ar.

De acordo com Sangsurasak e Mitchell (1995a, 1995b), velocidades superficiais de ar tipicamente usadas em biorreatores de leito empacotado são inferiores a 0,1 m/s. O modelo 1-D mostrou uma forte dependência dos perfis de temperatura em função da taxa de escoamento superficial de ar. Com $u_0 = 0,0073$ m/s, a temperatura mais alta predita foi 49,9 °C, enquanto 47,7 °C havia sido prevista sob a condição de referência $u_0 = 0,0146$ m/s, denotando que o decréscimo de u_0 aumenta as diferenças de temperatura no interior da coluna (Figura 5.3a).

De acordo com Grajek (1988), do ponto de vista tecnológico, a máxima variação de temperatura considerada admissível num biorreator é tal que o crescimento fúngico decresça no máximo 20 %. Para aquele autor, uma variação de temperatura de 4 °C foi definida como máxima aceitável para uma cultura de fungo termofílico. No presente estudo de caso, com velocidades superficiais tão baixas quanto 0,004 m/s, o modelo 2-D predisse que a temperatura no topo do leito poderia atingir no máximo 47,5 °C, temperatura que ainda não seria deletéria ao crescimento fúngico e conseqüentemente à formação de produtos. Por outro lado, o modelo 2-D predisse que altas velocidades do ar diminuiriam consideravelmente a máxima temperatura atingida no topo do leito, uma vez que a temperatura mais elevada prevista com $u_0 = 0,0292$ m/s foi 46,3 °C. No entanto, velocidades de ar mais altas também consumiriam mais energia para o suprimento do ar e também levariam a secagem do substrato até níveis de umidade muito baixos (Figuras 5.3c e 5.3d). Conseqüentemente, a matriz sólida seria submetida a atividades de água também muito baixas, o que afetaria negativamente o crescimento fúngico e prejudicaria a produção de enzimas, diminuindo o rendimento do processo.

Ghildyal et al. (1994) mostraram experimentalmente que altas velocidades de ar decresciam o pico de temperatura em seus testes com *Aspergillus niger*, um fungo mesofílico de crescimento rápido, cultivado em farelo de trigo num biorreator de leito empacotado com 34,5 cm de altura e 15 cm de diâmetro. Quando o leito empacotado foi percolado por ar a 30 °C, a temperatura máxima observada no meio da coluna foi 52 °C para velocidade superficial de 0,0047 m/s, e apenas 36 °C para 0,0236 m/s.

Os perfis de temperatura preditos no topo do leito através do modelo 2-D mostraram-se pouco sensíveis às mudanças da velocidade superficial do ar (Figura

5.3b), uma vez que as temperaturas mais altas foram previstas como 46,0 °C para $u_0 = 0,0292$ m/s e 47,3 °C para $u_0 = 0,0073$ m/s. Este resultado sugere que, num biorreator estreito, o mecanismo de remoção de calor pela parede do tubo é muito intenso, de forma que a influência do transporte convectivo é pouco sentida. Assim, poderia-se propor que taxas de escoamento de ar mais baixas poderiam ser empregadas a fim de minimizar a secagem do substrato, como pode ser visto nas Figuras 5.3c e 5.3d.

Em relação ao efeito da taxa de aeração sobre o conteúdo de umidade da fase sólida, os modelos 1-D e 2-D predisseram praticamente os mesmos perfis nas proximidades da entrada do leito (Figuras 5.3c e 5.3d), uma vez que as temperaturas nas porções inferiores do leito foram mantidas em torno de 45 °C para ambas as simulações 1-D e 2-D.

A secagem do substrato foi prevista ocorrer para todas as velocidades superficiais testadas, sendo a remoção de água aumentada pelo aumento da taxa de aeração. Conteúdos de umidade da fase sólida menores que 2 kg-água / kg-sólidos-secos-totais levam a atividades de água da fase sólida inferiores a 0,85, o que prejudica o crescimento do fungo nas proximidades da entrada do leito, conforme já visto nas Figuras 5.1e e 5.2e. Considerando-se que, para $u_0 = 0,0073$ m/s, a fase sólida levaria mais tempo para atingir $a_{ws} < 0,85$, e que, por outro lado, tal velocidade do ar poderia representar uma restrição às necessidades metabólicas de oxigênio do microrganismo, um equilíbrio entre ambos os efeitos deve ser encontrado, a fim de se determinar a taxa de aeração mais adequada para o processo. Logo, não somente a temperatura e o conteúdo de umidade devem ser considerados na análise de um sistema de FES, uma vez que o microrganismo tem outras necessidades que podem ser afetadas pelas condições operacionais. Casciotori, Casciotori e Thoméo (2013) encontraram experimentalmente que as atividades de celulasas foram significativamente mais baixas para $u_0 = 0,0073$ m/s do que para 0,0146 m/s, atribuindo tal resultado a uma provável restrição de oxigênio às necessidades metabólicas do fungo *M. thermophila* I-1D3b. Assim, o modelo pode ser futuramente melhorado, de modo a incluir também a troca de gases, sobretudo o consumo de oxigênio e a liberação de gás carbônico, entre suas previsões.

Os valores de $Y_0 = 0,0544$, 0,0615 e 0,0649 kg-vapor-d'água / kg-ar-seco foram testados, correspondendo respectivamente a 85, 95 e 100 % de umidade

relativa (UR) a 45 °C. A Figura 5.4 mostra os perfis temporais de T_s (próximo à saída do leito) e de X (próximo à entrada do leito) preditos pelos modelos 1-D e 2-D para os três valores de Y_0 .

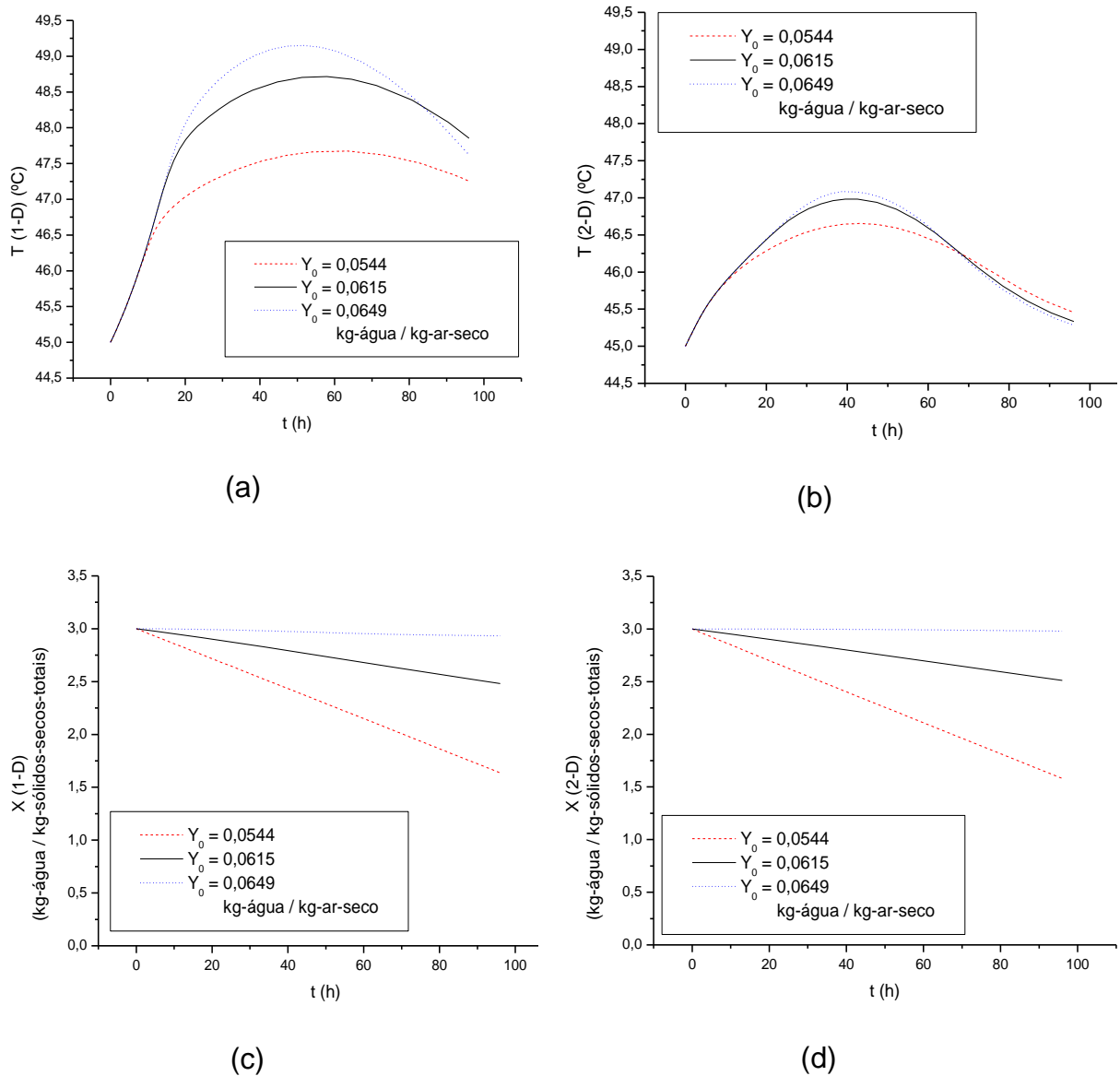


Figura 5.4. Efeito de Y_0 sobre variáveis da fase sólida: a) T_s predita pelo modelo 1-D ($z/L = 0,925$); b) T_s predita pelo modelo 2-D ($z/L = 0,925$ and $r/R = 0,05$); c) X predito pelo modelo 1-D ($z/L = 0,075$); d) X predito pelo modelo 2-D ($z/L = 0,075$ and $r/R = 0,05$). $u_0 = 0,0146$ m/s.

Quanto ao efeito do conteúdo de umidade do ar na entrada sobre a temperatura da fase sólida, novamente as predições de temperatura pelo modelo 1-D (Figura 5.4a) foram mais sensíveis que as predições pelo modelo 2-D (Figura

5.4b). Quanto maior a umidade relativa do ar, maior a temperatura máxima prevista a ser atingida, devido à menor capacidade de evaporação de água pelo ar. Neste caso, tal resultado sugere que a evaporação é um mecanismo importante para remoção de calor metabólico residual no interior do biorreator quando a dispersão de calor radial é desprezada; por outro lado, a capacidade evaporativa do ar não desempenha papel tão importante quando a condução radial é considerada em biorreatores de leito empacotado de pequeno diâmetro.

Finalmente, quanto ao efeito da umidade relativa (UR) de entrada do ar sobre o conteúdo de umidade da fase sólida, os modelos 1-D e 2-D predisseram perfis idênticos nas proximidades da entrada do leito (Figuras 5.4c e 5.4d), demonstrando que a migração de umidade por capilaridade na direção radial foi mínima em comparação à remoção de água por evaporação sob a condição de referência de $u_0 = 0,0146$ m/s. Sabe-se que a evaporação de água ocorre na operação de biorreatores de leito empacotado até mesmo se ar saturado é fornecido, uma vez que o ar é aquecido no interior do leito devido ao calor metabólico gerado, com consequente aumento da umidade de saturação do ar (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Tal fato foi confirmado pelos resultados encontrados no presente trabalho, embora o aumento de temperatura tenha sido brando, com máximos previstos em cerca de 2 e 4 °C pelos modelos 1-D e 2-D, respectivamente.

Em modelos nos quais o leito é tratado como uma matriz pseudo-homogênea, o termo evaporativo é capaz de representar o fenômeno térmico decorrente da secagem, mas não representa o fenômeno de transferência de massa propriamente dito (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Tal consideração é severa, uma vez que a secagem é basicamente definida como um processo de transferência de massa consistindo da remoção de água por evaporação de um sólido para uma corrente gasosa. Portanto, os modelos heterogêneos são mais apropriados quando balanço de água é requerido para representar bem o sistema e, sobretudo, quando a secagem do leito afeta mais o desempenho do sistema que o sobreaquecimento, como ocorre no presente estudo de caso.

Outra observação relevante a respeito do efeito da umidade relativa de entrada do ar é que tal variável operacional pode modificar a forma do perfil axial de umidade da fase sólida, sugerindo que o fenômeno de secagem em biorreatores de FES em leitos empacotados pode ser bastante complexo. Se ar abaixo da saturação é soprado, o fundo do leito seca rapidamente (Figuras 5.5a e 5.5b), enquanto com ar

saturado as regiões do fundo do leito secam mais lentamente que as regiões superiores (Figuras 5.5c e 5.5d).

Tais resultados concordaram com simulações apresentadas por Mitchell et al. (2006) empregando o modelo de duas fases proposto por Von Meien e Mitchell (2002), bem como com os resultados experimentais reportados por Gowthaman et al. (1993) e Ghildyal et al. (1994). Para aeração saturada e velocidade superficial de 0,0141 m/s, próxima da usada no presente trabalho, Ghildyal et al. (1994) observaram experimentalmente que o conteúdo de umidade do leito aumentava ao longo do tempo ou permanecia constante próximo da entrada e decrescia ao longo do tempo a partir da meia-altura do leito.

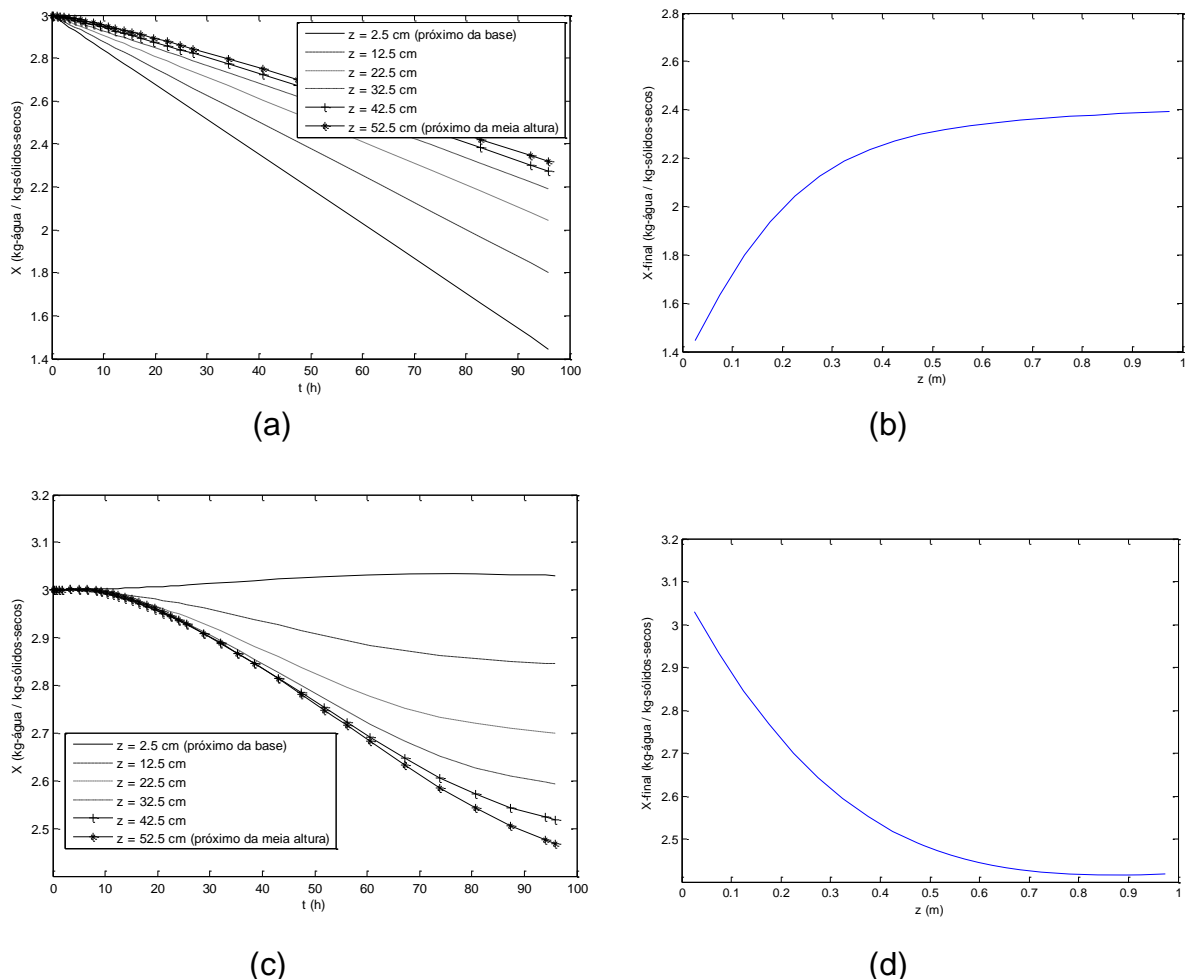


Figura 5.5. Perfis axiais preditos do conteúdo de umidade da fase sólida pelo modelo 1-D: a) ao longo do tempo com ar abaixo da saturação; b) ao final da fermentação com ar abaixo da saturação (UR 85 %); c) ao longo do tempo com ar saturado; d) ao final da fermentação com ar saturado. $u_0 = 0,0146$ m/s.

5.11.3 Efeito das variáveis ambientais sobre o crescimento fúngico

A Figura 5.6a apresenta as predições do modelo 2-D para os perfis temporais da atividade de água da fase sólida (a_{ws}) em $z/L = 0,075$ (próximo à entrada), $0,525$ (próximo à meia-altura) e $0,925$ (próximo à saída) no eixo central do leito, para o sistema sob as condições de referência (UR 85 %), enquanto a Figura 5.6b apresenta os mesmos resultados para entrada de ar a UR 95 %. Similarmente, as Figuras 5.6c e 5.6d apresentam perfis temporais de temperatura da fase sólida (T_s), enquanto as Figuras 5.7a e 5.7b mostram a concentração de biomassa fúngica (B).

Uma vez que as temperaturas da fase sólida nas proximidades da entrada do leito permaneceram próximas da temperatura ideal de processo ao longo da fermentação (Figura 5.6c), pode-se concluir que o crescimento fúngico (Figura 5.7a) foi fortemente limitado pelas atividades de água da fase sólida (a_{ws}) menores que 0,9 atingidas nesta região por conta da baixa umidade relativa do ar (Figura 5.6a).

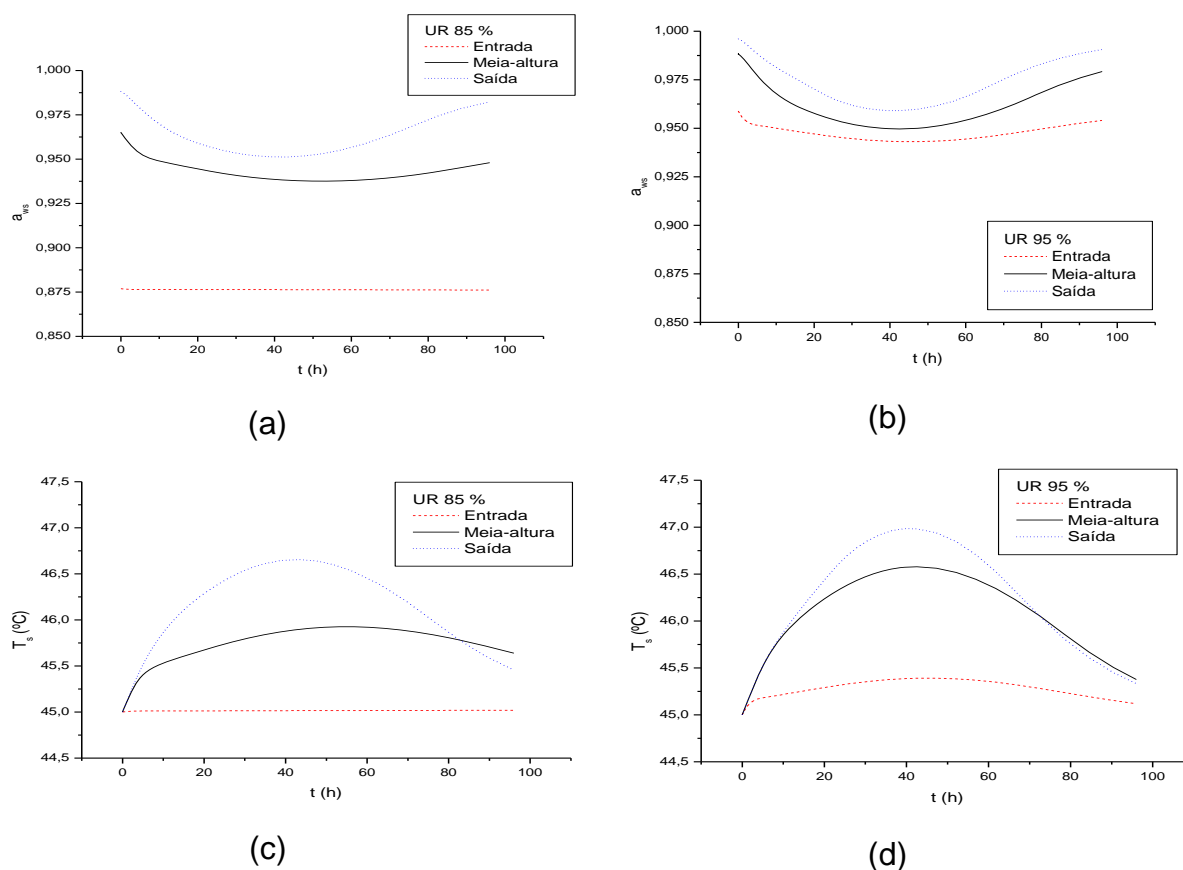


Figura 5.6. Predições do modelo 2-D para as variáveis ambientais da fase sólida em função do tempo de fermentação: a) a_{ws} para UR 85 %; b) a_{ws} para UR 95 %; c) T_s para UR 85 %; d) T_s para UR 95 %.

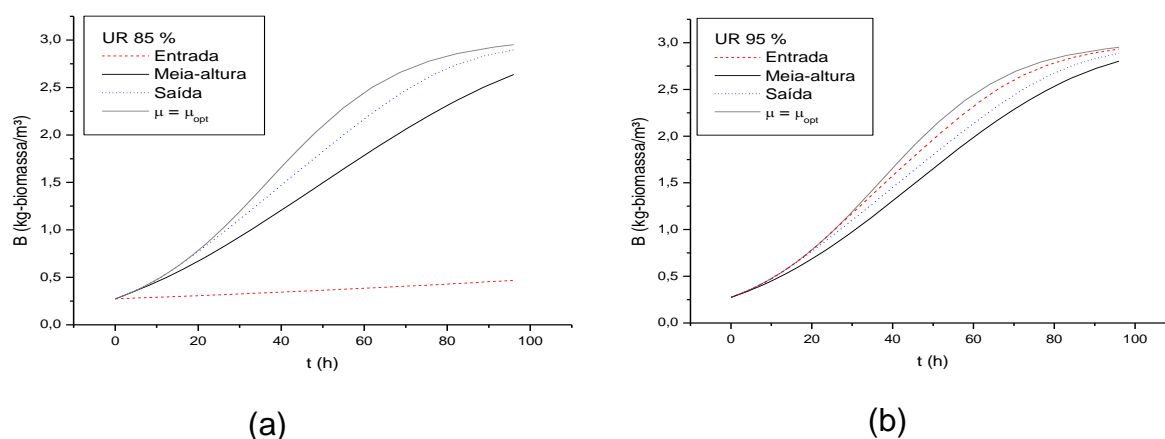


Figura 5.7. Concentração de biomassa em função do tempo de fermentação preditos pelo modelo 2-D: a) para UR 85 %; b) para UR 95 %.

Por outro lado, mesmo para UR 85 %, a_{ws} e T_s permaneceram praticamente constantes a partir da meia altura e nas partes superiores do leito, mantendo valores favoráveis para o desenvolvimento fúngico, o que foi confirmado pelo fato de que as curvas de crescimento microbiano em $z/L = 0,525$ e $0,925$ se aproximaram da curva obtida mantendo-se a taxa de crescimento em seu valor ótimo (μ_{opt}).

Quando ar com UR 95 % foi fornecido, apesar de T_s ter aumentado ligeiramente (Figura 5.6d), a_{ws} permaneceu maior que 0,95 através do leito (Figura 5.6b), resultando em perfis homogêneos de crescimento fúngico (Figura 5.7b). Os resultados preditos pelo modelo concordaram bem com os experimentais reportados por Grajek (1988), que investigou o efeito de mudanças de temperatura e de atividades de água sobre o crescimento fúngico.

As Figuras 5.8a e 5.8b apresentam a fração da taxa específica de crescimento baseada na temperatura (μ_T) ao longo da fermentação em $z/L = 0,075$, $0,525$ e $0,925$ e $r/R = 0,05$ para entrada de ar a 85 e 95 % UR, respectivamente, enquanto as Figuras 5.8c e 5.8d apresentam a fração da taxa específica de crescimento baseada na atividade de água da fase sólida (μ_W). Finalmente, as Figuras 5.9a e 5.9b apresentam os valores calculados da taxa específica de crescimento (μ) ao longo da fermentação.

Conforme visto nas Figuras 5.8a e 5.8b, a fração da taxa específica de crescimento baseada na temperatura da fase sólida (μ_T) comportou-se similarmente para ambas as umidades relativas de entrada do ar, embora uma sutil diferença possa ser vista na região próxima à entrada do leito, uma vez que o aumento de

temperatura nesta região foi ligeiramente maior para entrada de ar a maior UR (vide Figuras 5.6c e 5.6d). Pode-se observar que os valores de μ_T decresceram à medida que os valores T_s aumentaram ao longo da fermentação.

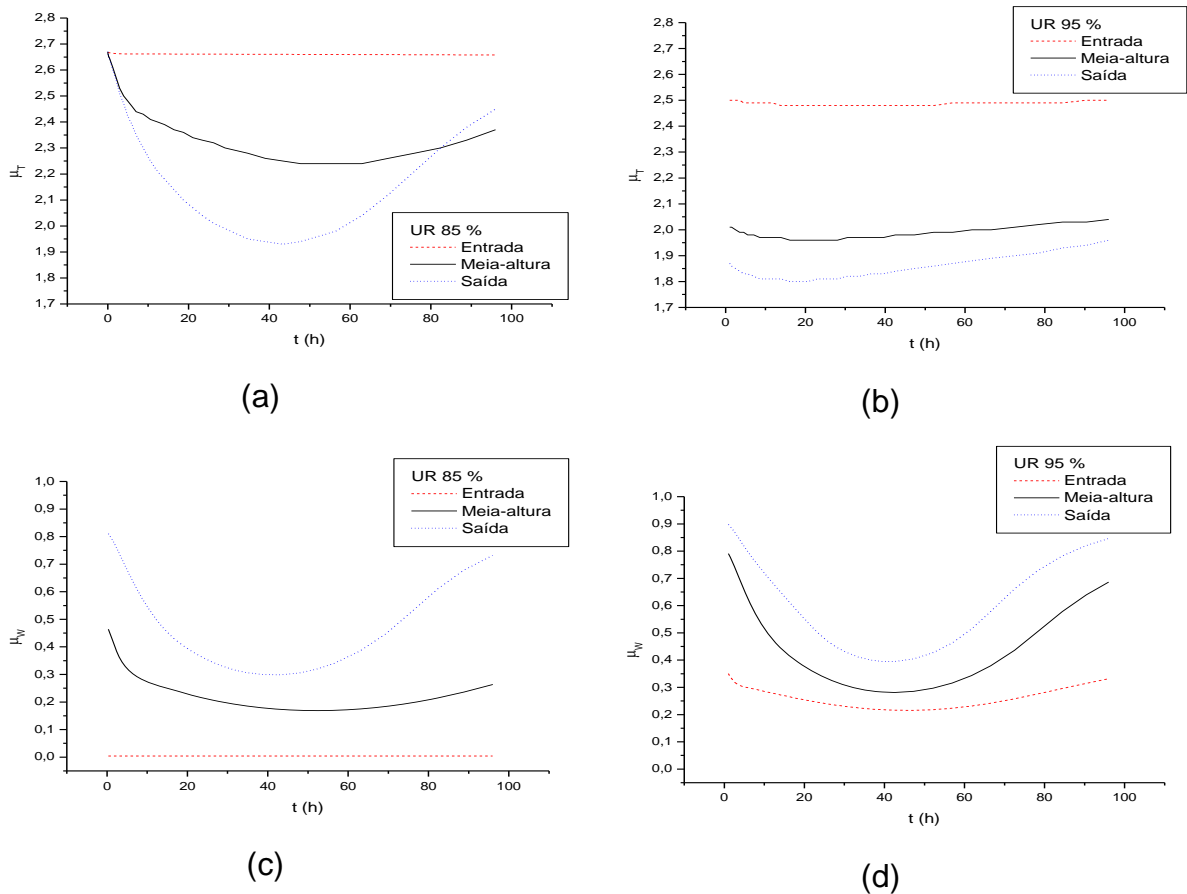


Figura 5.8. Frações da taxa específica de crescimento ao longo da fermentação: a) baseada em T_s para UR 85 %; b) baseada em T_s para UR 95 %; c) baseada em a_{ws} para UR 85 %; d) baseada em a_{ws} para UR 95 %.

De acordo com as Figuras 5.8c e 5.8d, a fração da taxa específica de crescimento baseada na atividade de água da fase sólida (μ_W) apresentaram valores similares para ambas as umidades relativas de entrada do ar a partir da meia-altura até a saída do leite. Entretanto, nas proximidades da entrada do leite, uma diferença bastante significativa pôde ser observada, uma vez que os valores de a_{ws} nesta região foram significativamente mais baixos para entrada de ar a menor UR (vide Figuras 5.6a e 5.6b). Essas tendências de μ_T e μ_W são úteis para compreender os perfis de crescimento fúngico e de consumo de substrato discutidos previamente.

Os valores da taxa de crescimento específico (μ), calculados com base nos valores preditos de T_s e a_{ws} , mostraram-se mais dependentes de μ_w que de μ_T , uma vez que os valores de μ nas proximidades da entrada do leito foram significativamente menores para entrada de ar a 85 % UR (Figura 5.9a) do que a 95 % UR (Figura 5.9b), acompanhando o padrão de μ_w . Deve-se destacar que o programa foi ajustado para adotar μ_{opt} como o máximo valor admissível de μ .

Diante do exposto, fica claro que, para o sistema fermentativo empregado neste estudo de caso, a secagem do meio poroso é mais deletéria ao crescimento fúngico que o sobreaquecimento. No entanto, é importante lembrar que o sobreaquecimento pode tornar-se uma situação crítica quando da ampliação de escala do biorreator ou quando o microrganismo gerar quantidades maiores de calor.

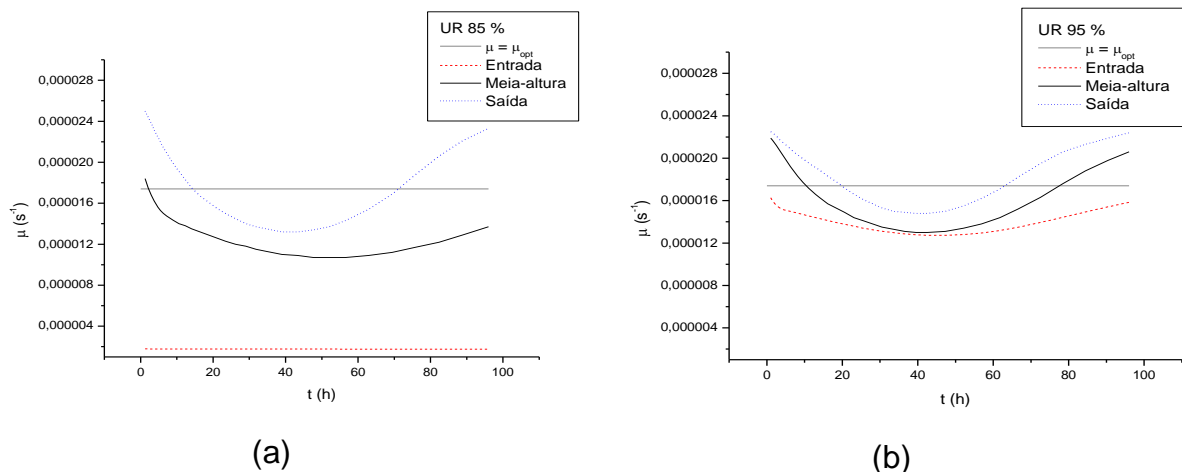


Figura 5.9. Taxa específica de crescimento ao longo da fermentação:

a) UR 85 %; b) UR 95 %.

5.11.4 Simulação de biorreatores com vários diâmetros de leito

Tendo em vista a necessidade de ampliação de escala do processo, simulações sob as condições de referência também foram feitas para diâmetros de leito de 15, 20 e 50 cm. A taxa de aeração foi aumentada proporcionalmente ao aumento de volume, a fim de manter a mesma velocidade superficial do ar. Quanto aos requisitos biológicos do processo, o aumento da taxa de aeração é necessário para atender à demanda de oxigênio pelo fungo.

Perfis radiais da temperatura da fase sólida preditos após 48 horas de fermentação são apresentados nas Figuras 5.10a a 5.10d em função de r/R e para

três posições axiais, sendo uma próxima à entrada do leito ($z/L = 0,075$), uma próxima à meia-altura ($z/L = 0,525$) e uma próxima à saída do leito ($z/L = 0,925$).

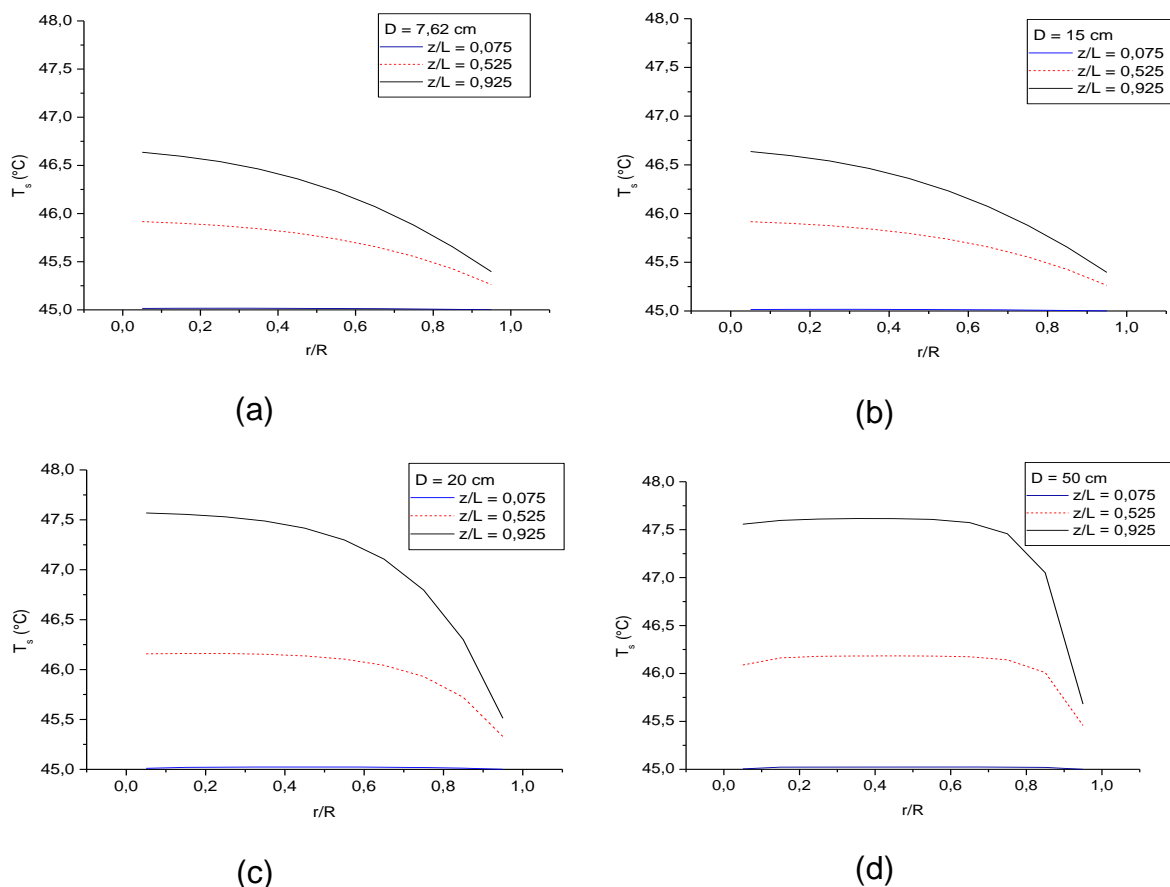


Figura 5.10. Predições de temperatura da fase sólida (T_s) após 48 horas de fermentação em biorreatores com diâmetros: a) 7,62; b) 15; c) 20; d) 50 cm.

Exceto para $z/L = 0,075$, o efeito do aumento do diâmetro foi pronunciado. Para o biorreator de menor diâmetro (7,62 cm), a remoção de calor pela camisa mostrou-se efetiva, resultando em diferença de apenas 1,5 $^{\circ}\text{C}$ entre o centro e a parede do leito de (Figura 5.10a). Conforme o diâmetro aumentou para 15 e 20 cm, a remoção de calor radial pela camisa tornou-se menos efetiva e perfis radiais de temperatura mais intensos foram preditos (Figuras 5.10b e 5.10c), enquanto para o maior diâmetro, 50 cm, a remoção de calor radial se tornou praticamente desprezível (Figura 5.10d) e os perfis de temperatura preditos foram influenciados pela temperatura da parede do tubo somente na região muito próxima da parede ($r/R > 0,75$). No entanto, até mesmo para o maior diâmetro, a máxima temperatura prevista a ser atingida foi de poucos graus acima da temperatura ideal do processo,

sugerindo que, para este sistema fermentativo (microrganismo, substrato e condições operacionais), o sobreaquecimento provavelmente não será um fator limitante para a ampliação de escala.

Sangsurasak e Mitchell (1995a, 1995b) avaliaram o efeito de razões L/D sobre as predições de temperatura usando um modelo 2-D. Os autores mantiveram constante o volume total do biorreator, bem como a velocidade superficial do ar. Ao decrescer a razão L/D, os gradientes de temperatura preditos se tornavam menos pronunciados e o crescimento microbiano era ótimo. No entanto, deve ser considerado que esses autores variaram L/D mantendo o volume total do biorreator constante, supondo que o aumento do comprimento resultaria o mesmo efeito que o aumento do diâmetro.

Aumentar o comprimento e manter o diâmetro constante significa uma redução na taxa de aeração volumétrica, afetando o coeficiente convectivo de transferência de calor, um efeito não considerado por Sangsurasak e Mitchell. Portanto, a seleção das dimensões apropriadas do leito dependerá da razão entre a área superficial da seção transversal do leito por seu volume total.

Para aumentar a escala deste processo, também deve ser considerada a possível fluidização devido à elevada taxa de aeração, bem como os efeitos deletérios da alta velocidade do ar no metabolismo e fisiologia do fungo. Outro aspecto a ser considerado é a compactação do recheio para leitos muito longos, além do efeito indesejável de secagem mediante o aumento da taxa de aeração.

5.11.5 Verificação com dados experimentais

Dados experimentais para verificar os resultados simulados pelo modelo 2-D foram obtidos também nesta tese. No Capítulo 6, se reporta uma série de experimentos de cultivo do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em BC:FT 7:3 (m/m) em biorreator de leito empacotado com 7,62 cm de diâmetro e 1,0 m de comprimento total, sendo 0,8 m de seção fermentativa. A temperatura foi monitorada ao longo do processo para várias posições axiais no centro do leito e o conteúdo de umidade da matriz sólida foi medido ao longo do comprimento do biorreator ao final da fermentação. As Figuras 5.11a e 5.11b mostram os valores preditos e experimentais de temperatura em função do tempo no eixo central nas proximidades

da meia altura do leito ($r/R = 0,05$ e $z/L = 0,525$) sob taxas de aeração 60 e 240 L/h ($u_0 = 0,0037$ e $0,0146$ m/s, respectivamente).

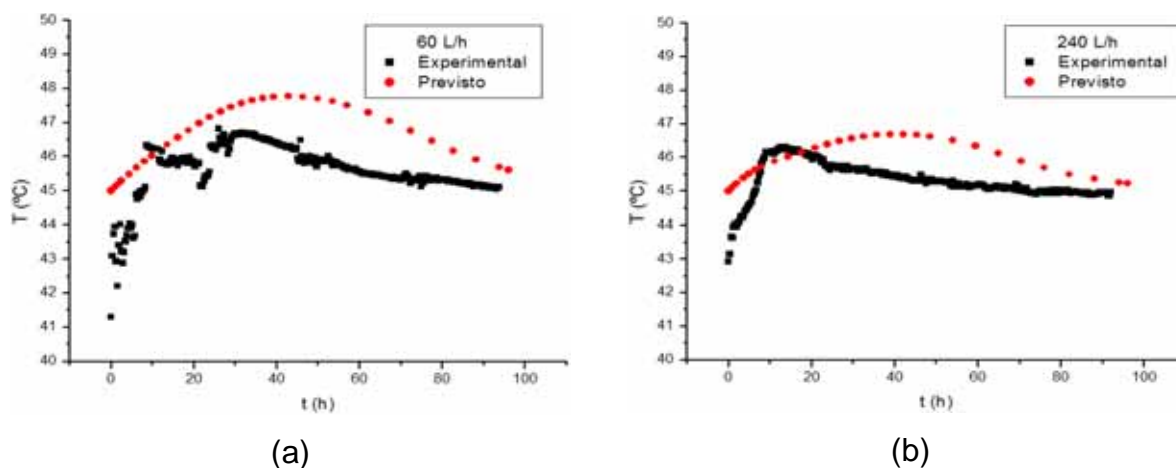


Figura 5.11. Perfis temporais de temperatura no eixo central e nas proximidades da meia altura do leito obtidos experimentalmente e preditos pelo modelo 2-D sob taxas de aeração saturada: a) 60 L/h; b) 240 L/h.

Para as duas taxas de aeração, razoável concordância entre as temperaturas previstas e experimentais pode ser observada. Apesar de o pico de temperatura experimental ter sido menor para 60 L/h (Figura 5.11a) e antecipado para 240 L/h (Figura 5.11b), de um modo geral, as diferenças entre as temperaturas medidas e simuladas foram aproximadamente de $1,0$ °C, de modo que esses resultados podem ser considerados satisfatórios para verificação das predições do modelo.

As Figuras 5.12a e 5.12b mostram os conteúdos de umidade final da matriz sólida (em porcentagem de umidade em base úmida, % b.u.) ao longo do comprimento do biorreator de leito empacotado obtidos experimentalmente e simulados para taxas de aeração saturada de 60 e 240 L/h, respectivamente. Experimentalmente, os módulos fermentativos foram os módulos de 2 a 9; portanto, os resultados simulados foram tomados também nas posições equivalentes a estes módulos do biorreator.

Observaram-se concordâncias razoáveis entre os perfis axiais preditos e experimentais de umidade final da fase sólida, embora os conteúdos de umidade experimentais tenham sido superiores aos previstos para as duas taxas de aeração. Uma explicação para tal resultado pode ser que o modelo não é capaz de prever que o vapor d'água pode condensar nas partes superiores do biorreator enquanto o

ar escoar em direção à saída do leito, mas tal fenômeno é possível de ocorrer experimentalmente, haja vista a diferença de temperatura entre o interior e o exterior do biorreator (ZANELATO, 2011). Considerando-se que o ar esteja saturado e que as temperaturas interna e externa sejam 45 e 25 °C, respectivamente, pode haver condensação de até aproximadamente 225 e 890 mL de água ao longo do processo sob aeração de 60 e 240 L/h, respectivamente. Como o bagaço seco do último módulo não tem capacidade de retenção de água suficiente para absorver todo esse volume retornado (CASCIATORI et al., 2015), o condensado escoar para os módulos abaixo e é absorvido pelo substrato contido nestes.

Além disso, o ar pode ter carregado água líquida das colunas de umidificação, acarretando um arraste de água líquida posteriormente absorvida pela matriz sólida. Do ponto de vista microbiológico, tal fato pode ser interessante, uma vez que ajudará a evitar a secagem do substrato, que por sua vez poderia prejudicar o crescimento fúngico e conseqüentemente a secreção de enzimas. Por outro lado, a condensação de umidade na saída do leito pode levar a diluição dos metabólitos de interesse, resultando em menores atividades enzimáticas dos extratos obtidos dos módulos mais próximos do topo.

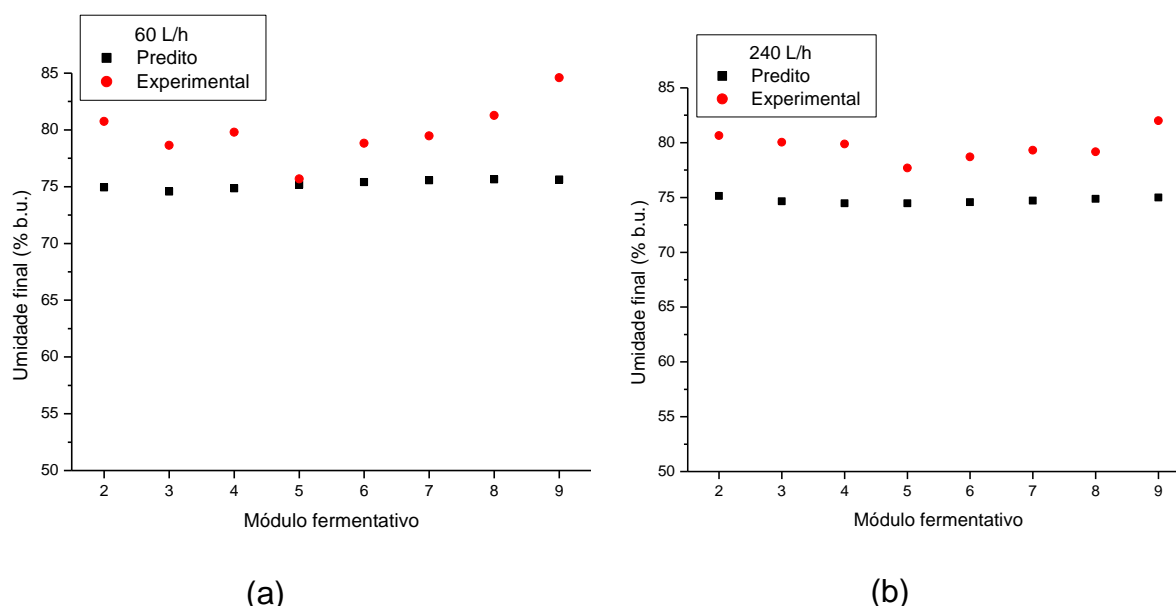


Figura 5.12. Conteúdos finais de umidade experimentais e preditos (em base úmida, % b.u.) da matriz sólida ao longo do comprimento do biorreator de leito empacotado para taxas de aeração: a) 60 L/h; b) 240 L/h.

5.11.6 Influência dos valores dos parâmetros nas predições do modelo 2-D

Alguns cálculos adicionais foram feitos a fim de avaliar a influência dos parâmetros microbianos (μ_{opt} , b_{max} , b_0 , R_Q and R_W), propriedades térmicas e de transporte da fase sólida (C_{p_s} , λ_s and D_s) e propriedades estruturais do leito (ϵ_0) sobre as predições dos perfis temporais do modelo 2-D para a temperatura e o conteúdo de umidade da fase sólida. O objetivo desses cálculos foi identificar os parâmetros cujas variações poderiam influenciar significativamente as predições do modelo, encorajando pesquisadores no campo experimental a determinar os parâmetros de maior influência. A temperatura da fase sólida (T_s) foi predita próximo à saída do leito ($z/L = 0,925$), e o conteúdo de umidade próximo à entrada ($z/L = 0,075$), mantendo-se constantes a taxa de aeração (240 L/h), a umidade relativa do ar (85 %), o diâmetro do biorreator (7,62 cm) e a posição radial ($r/R = 0,05$).

A taxa específica de crescimento ótima (μ_{opt}) é um parâmetro chave do crescimento fúngico, uma vez que está embutida nos termos de reação para geração de calor e de água nas equações (5.2) e (5.4), respectivamente. Uma larga faixa de valores de μ_{opt} é possível de ocorrer em FES, dependendo do microrganismo, do substrato e das condições experimentais (VICCINI et al., 2001). Os valores testados foram 0,03, 0,06 e 0,12 h^{-1} , escolhidos com base no valor de μ_{opt} obtido neste trabalho. As predições de T_s mostraram-se bastante sensíveis a μ_{opt} (Figura 5.13a), uma vez que no valor mais alto deste parâmetro um aumento de temperatura acentuado foi observado, enquanto para o valor mais baixo de μ_{opt} o aumento de temperatura foi muito sutil, menos de 1,0 °C acima da temperatura de processo. Para a taxa de crescimento fúngico mais elevada, a temperatura aumentou abruptamente até 47 °C no topo do leito dentro das primeiras 20 h, sendo reduzida a 45 °C depois disso, após a fração máxima de biomassa fúngica (b_{max}) ter sido rapidamente atingida.

A máxima fração de biomassa possível (b_{max}) também pode variar largamente entre sistemas de FES (VICCINI et al., 2001). Simulações foram feitas para valores de b_{max} iguais a 16,4, 32,7 e 65,4 g-biomassa / kg-sólidos-totais, escolhidos com base nos resultados obtidos neste trabalho. As predições de T_s mostraram-se também bastante sensíveis a b_{max} (Figura 5.13b), aumentando com o aumento de b_{max} , já que mais biomassa fúngica no sistema gera mais calor metabólico. O tempo

de ocorrência do pico de temperatura foi retardado para o valor mais alto de b_{max} , uma vez que se levava mais tempo para atingir a fração máxima de biomassa.

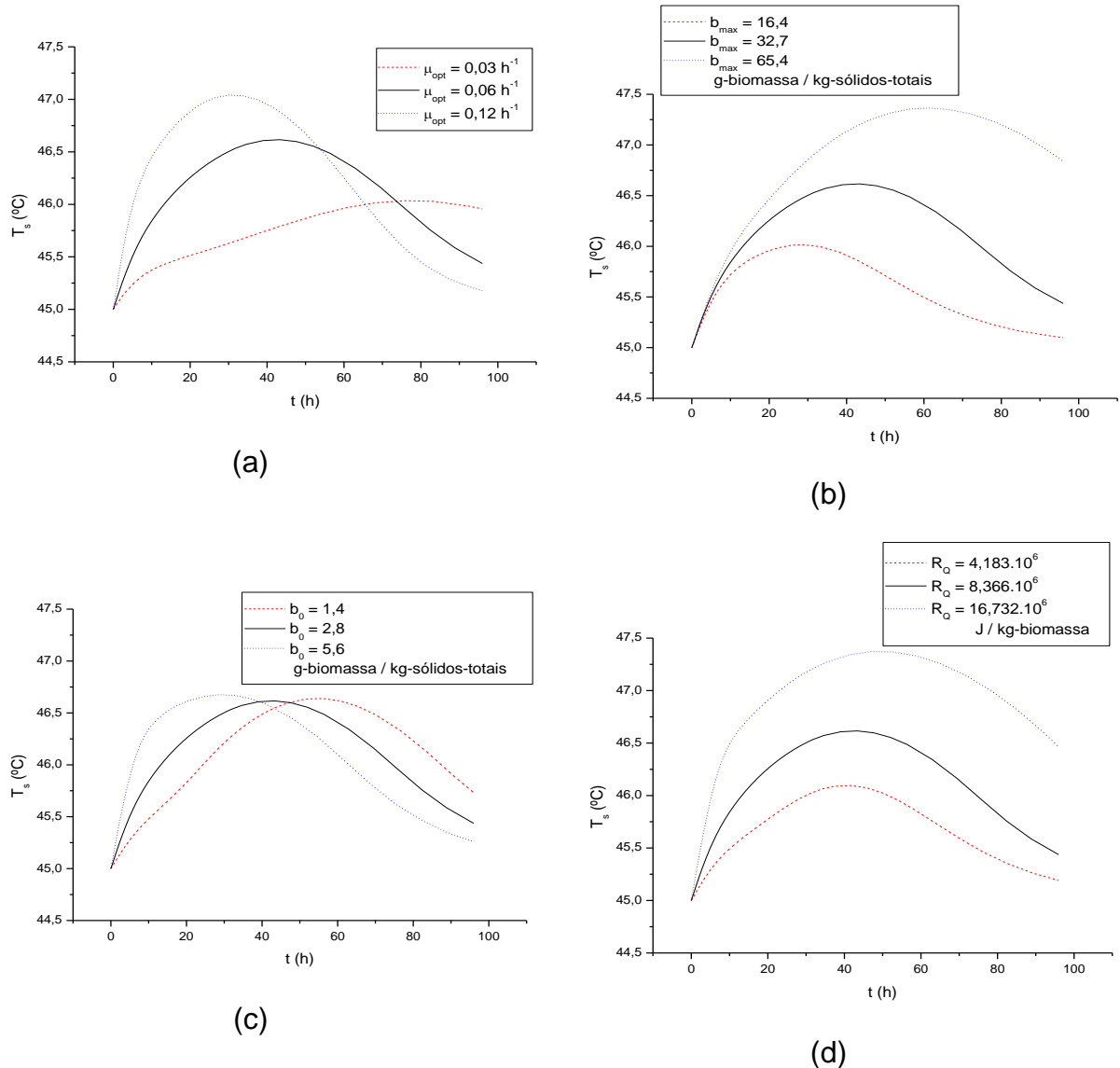


Figura 5.13. Efeito dos valores dos parâmetros microbianos nas predições do modelo 2-D ($z/L = 0,925$ e $r/R = 0,05$) para perfis temporais de T_s : (a) μ_{opt} ; (b) b_{max} ; (c) b_0 ; (d) R_Q . Demais parâmetros dados na Tabela 5.1; condições de referência.

A fração de biomassa inicial nos sólidos secos totais (b_0) depende da etapa de inoculação e usualmente é definida com base em testes preliminares em escala de frascos. Simulações foram feitas com valores de b_0 iguais a 1,4, 2,8 e 5,6 g-biomassa / kg-sólidos-totais. As predições de T_s mostraram-se também sensíveis a b_0 , já que b_0 afetou significativamente o instante no qual o pico de temperatura foi

previsto a ser atingido, apesar de não ter afetado a magnitude da temperatura máxima no interior do biorreator (Figura 5.13c). Quanto mais alto b_0 , mais breve a taxa máxima de geração de calor foi atingida, antecipando o pico de temperatura. Uma vez que a taxa máxima de crescimento ocorre para $b = \frac{1}{2} b_{\max}$, quanto mais alto b_0 , mais breve $\frac{1}{2} b_{\max}$ será atingido para os mesmos μ_{opt} e b_{\max} , assim mais cedo será atingida a taxa máxima de crescimento. Entretanto, a quantidade total de calor gerado pela população microbiana não depende de b_0 , desde que μ_{opt} e b_{\max} sejam mantidos constantes.

Os rendimentos de calor em diferentes fontes de energia aumentam com o grau de redução dos vários compostos orgânicos; no entanto, há poucas estimativas confiáveis do rendimento estequiométrico de calor em sistemas de FES (SANGSURASAK; MITCHELL, 1998). O valor de referência usado no presente trabalho foi obtido de Saucedo-Castañeda et al. (1990), $R_Q = 8,366 \cdot 10^6$ J/kg-biomassa. Portanto, simulações foram feitas empregando também os valores $\frac{1}{2} R_Q$ e $2 R_Q$. Os resultados mostraram que R_Q desempenhou efeito significativo sobre os perfis temporais previstos de T_s (Figura 5.16d). Para altos valores de R_Q , observou-se um aumento da temperatura máxima atingida, apesar de o instante no qual o pico de temperatura foi atingido não tenha sido alterado.

A condutividade térmica do sólido (λ_s) é um importante parâmetro de transporte que se refere à dispersão de calor em ambas as direções axial e radial na equação (5.4). Uma larga faixa de valores de λ_s pode ocorrer em FES, dependendo do tipo de substrato e de seu conteúdo de umidade (CASCIATORI et al., 2013). Os valores testados para λ_s foram 0,0065, 0,065 e 0,65 W/m/K, sendo $\lambda_s = 0,065$ W/m/K o valor experimental inicialmente adotado para o estudo de caso. A Figura 5.14a mostra que, embora os mecanismos de transferência de calor por convecção e evaporação sejam já sabidos dominantes, os valores de λ_s influenciaram a evolução da temperatura predita pelo modelo 2-D, sendo mais alta a temperatura atingida para valores mais baixos de λ_s . Por outro lado, para predições pelo modelo 1-D, não houve diferença notável nos perfis preditos de T_s empregando-se diferentes valores de λ_s para simulação, confirmando a influência desprezível do termo de condução axial no modelo 1-D. Uma vez que o mecanismo de condução axial tenha sido considerado desprezível na literatura clássica de transferência de calor em leitos empacotados (DIXON; CRESSWELL; PATERSON, 1978; THOMÉO; FREIRE, 2012), o efeito de λ_s nas predições de T_s pelo modelo 2-D deve ser atribuído à alta

dissipação radial de calor. Assim, para biorreatores estreitos, o termo de condução deve ser incluído nos modelos 2-D.

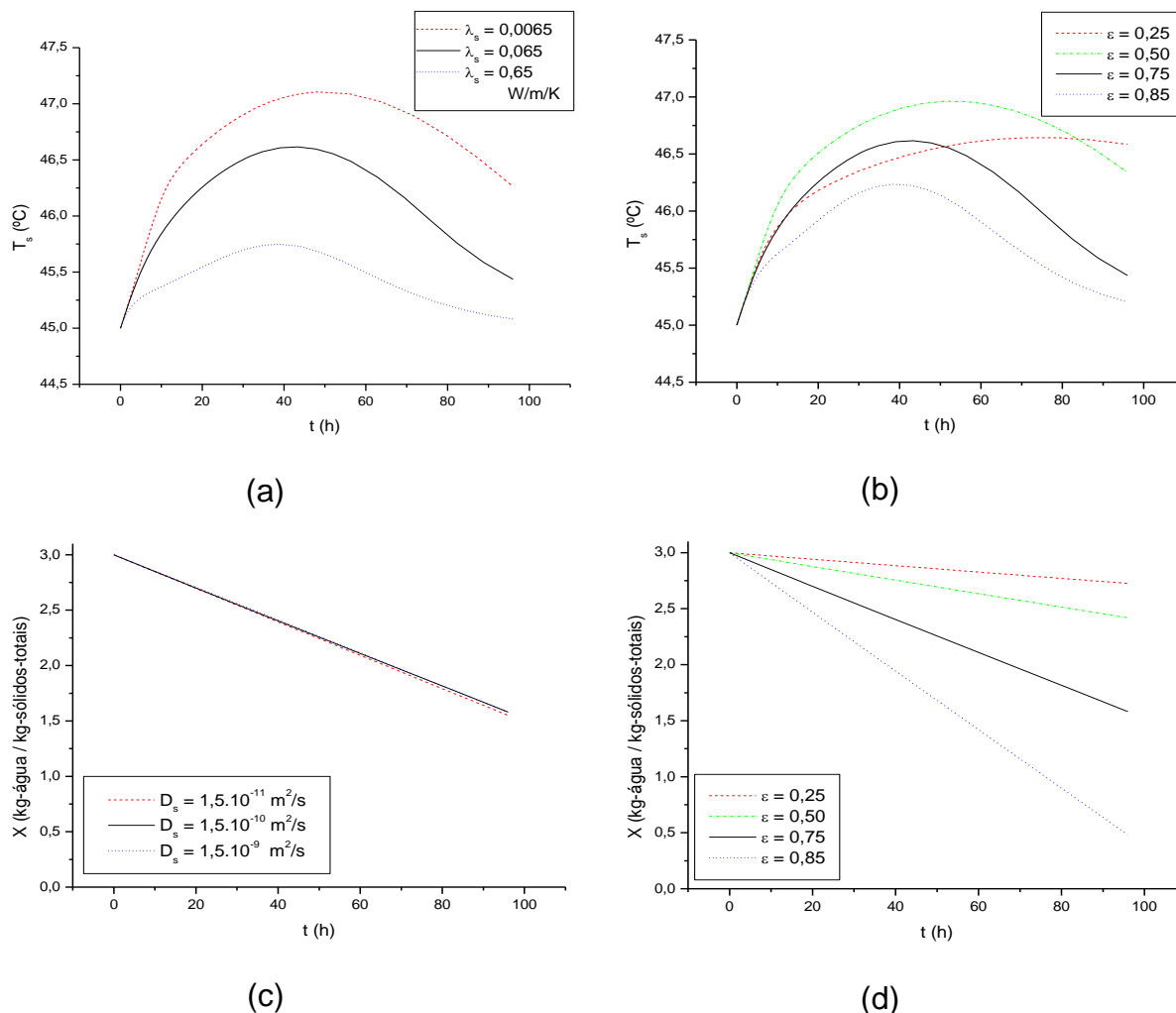


Figura 5.14. Efeito dos valores dos parâmetros de transporte (λ_s e D_s) e da porosidade do leito (ϵ_0) sobre as predições do modelo 2-D para: perfis temporais de T_s ($z/L = 0,925$ e $r/R = 0,05$): (a) λ_s ; (b) ϵ_0 ; e para perfis temporais de X ($z/L = 0,075$ e $r/R = 0,05$): (c) D_s ; (d) ϵ_0 . Demais parâmetros com valores dados na Tabela 5.1 sob as condições operacionais de referência.

Por outro lado, as predições de X mostraram-se praticamente insensíveis a μ_{opt} , b_{max} , b_0 , R_Q e λ_s , já que os perfis temporais foram inalterados para quaisquer dos valores testados. Embora as temperaturas na saída do leito tenham sido notavelmente alteradas para os diferentes valores dos parâmetros, as temperaturas nas proximidades da entrada do leito foram mantidas sempre constantes em torno de 45 °C devido à intensa evaporação naquela parte do leito sob as condições de

referência, de modo que X não foi afetado pelas variações dos parâmetros na base do leito. Além disso, alguns parâmetros não influenciaram T_s no topo nem X na base do leito, como o coeficiente estequiométrico relacionado a produção de água ao crescimento (R_w) e o calor específico do substrato (C_{p_s}).

Em relação a R_w , a máxima quantidade possível de água gerada metabolicamente ($1,5 \cdot 10^{-6}$ kg-água/ m^3/s) é desprezível em comparação com a máxima quantidade possível de água removida dos sólidos por evaporação nas proximidades da entrada do leito sob as condições de referência ($9 \cdot 10^{-4}$ kg-água/ m^3/s). Similarmente, em relação a C_{p_s} , a máxima quantidade de energia armazenada no leito de substrato (aproximadamente 40 W/ m^3) foi desprezível em comparação com a máxima quantidade de calor que poderia ser removida por evaporação (mais que 2 kW/ m^3) e por convecção (mais que 1 MW/ m^3).

A difusividade de água na fase sólida (D_s) é outro importante parâmetro de transporte que representa a dispersão de água por capilaridade em ambas as direções axial e radial na equação (5.3). Similarmente a λ_s , há uma larga faixa de valores de D_s na literatura de FES, dependendo do substrato escolhido e de suas propriedades como tamanho de partícula, porosidade e tortuosidade do leito e temperatura do sistema (SATTERFIELD, 1970). Assim, uma ampla faixa de D_s foi testada, de $1,5 \cdot 10^{-11}$ a $1,5 \cdot 10^{-9}$ m^2/s . A Figura 5.14c mostra que, como a secagem convectiva é o fenômeno mais importante afetando os perfis de X , os valores de D_s têm pouca, embora não desprezível, influência sobre os perfis temporais de X preditos pelo modelo 2-D. Até metade do tempo total de fermentação, nenhuma influência de D_s sobre X foi observada; entretanto, após as 40 h de processo, o aumento de D_s provocou um decréscimo de X para o modelo 2-D, enquanto nenhuma influência foi observada para o modelo 1-D. Portanto, tal efeito de D_s sobre os perfis de X preditos pelo modelo 2-D deve ser associado ao perfil radial de temperatura. Provavelmente tal associação pode ser explicada pelo efeito Soret, definido como a migração de água induzida pelo gradiente de temperatura (PARK; ITO; LEITE, 2002). Por outro lado, T_s não foi sensível a D_s , sugerindo que o efeito Dufour, definido como a transferência de calor induzida pelo gradiente de umidade (PARK; ITO; LEITE, 2002), seria de fato desprezível no sistema adotado como estudo de caso.

A porosidade do leito (ϵ_0) é uma das mais importantes propriedades estruturais que afeta os processos de FES, uma vez que o crescimento microbiano e

as atividades metabólicas ocorrem nos interstícios. Ao passo que ϵ_0 decresce, a quantidade de substrato por unidade de volume do biorreator aumenta, então isso afetará a transferência de calor e de água em ambas as fases sólida e gasosa. Os valores de ϵ_0 dependerão principalmente do substrato (forma e tamanho das partículas), seu conteúdo de umidade e técnica de empacotamento (CASCIATORI et al., 2014). Os valores testados foram 0,25, 0,50, 0,75 e 0,85, sendo 0,75 o valor experimental. Os resultados mostraram que T_s e X preditos são muito sensíveis a ϵ_0 (Figuras 5.14b e 5.14d, respectivamente). Para baixos valores de ϵ_0 , um aumento de temperatura considerável foi observado (Figura 5.14c), já que o calor gerado metabolicamente por unidade de volume aumentou. Sangsurasak e Mitchell (1998) já haviam sugerido que “avolumar” o substrato com algum material inerte poderia ser uma estratégia útil para ajudar a reduzir a severidade do problema de sobreaquecimento no interior de biorreatores de FES em leito empacotado.

Similarmente, os perfis preditos de X pelo modelo 2-D mostraram-se fortemente influenciados por ϵ_0 , sendo observado que altos valores de ϵ_0 causaram decréscimo do conteúdo de umidade do leito (Figura 5.14d), uma vez que a remoção de água aumenta devido ao aumento da área de transferência de água da fase sólida para a fase gasosa por unidade de volume. Assim, a escolha da composição do substrato deve levar em conta não somente os aspectos nutricionais do microrganismo, mas também a estrutura do leito, representada por ϵ_0 , além dos efeitos opostos de ϵ_0 sobre T_s e X , possíveis de serem preditos pelo modelo 2-D.

Deve-se salientar que os cálculos realizados pretenderam mostrar a influência dos valores dos parâmetros nas predições do modelo, mas não devem ser interpretados como um estudo de sensibilidade paramétrica do modelo proposto. Se tal análise for de interesse, vide, por exemplo, Sklivaniotis, Castro e McGreavy (1988). De acordo com esses autores, a sensibilidade do estado de um sistema a um conjunto de parâmetros é definida como a variação no valor da variável de estado causada por uma pequena variação dos valores dos parâmetros. Assim, se Y_i é uma variável i do vetor de estado Y ($i = 1, \dots, N$) e b_j é o parâmetro j do sistema paramétrico b ($j = 1, \dots, N$), então a sensibilidade $\gamma_{i,j}$ de Y_i a b_j é dada matematicamente por:

$$Y_{i,j} = \frac{\partial Y_i}{\partial b_j} \quad (5.13)$$

Aplicar a equação (5.13) é a única forma viável de determinar a sensibilidade paramétrica propriamente dita. Entretanto, tal análise não estava no escopo do presente capítulo, mas pode ser explorada em estudos futuros empregando-se o modelo aqui proposto.

CAPÍTULO 6. RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE AMPLIAÇÃO DE ESCALA

Os ensaios experimentais aqui reportados tiveram como objetivo avaliar o desempenho dos processos fermentativos estudados em diferentes escalas dos biorreatores para várias taxas de aeração. A correção para a escala ampliada mediante aumento do comprimento e do diâmetro e conseqüentemente do volume dos leitos foi feita por similaridade geométrica, buscando-se aumentar a vazão proporcionalmente ao aumento do volume do equipamento. No entanto, algumas variações foram também aplicadas, conforme julgado conveniente.

6.1 Fermentação com *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em biorreator com 7,62 cm de diâmetro interno

6.1.1 Biorreator com comprimento total 1,0 m e substrato BC:FT 7:3

Nas Figuras 6.1a a 6.1d, são apresentadas, respectivamente, as atividades CMCase, xilanase, papel de filtro (FPA) e β -glicosidase dos extratos obtidos empregando o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em substrato BC:FT 7:3 (m/m) no biorreator com 1,0 m de comprimento total (módulos de 2 a 9 como fermentativos), em função do comprimento e para três taxas de aeração. As linhas horizontais referem-se às atividades médias no biorreator, dadas a partir da média das atividades obtidas em cada um dos 8 módulos fermentativos.

Como se observa, há uma tendência de que as atividades enzimáticas fiquem abaixo da média no módulo 9, independentemente da taxa de aeração. Resultado similar já havia sido reportado por Zanelato et al. (2012) para suas atividades de endoglucanase, que também foram mais baixas no módulo mais próximo da saída do leito. Com exceção deste módulo, de um modo geral, a distribuição de atividades ao longo do comprimento do biorreator foi relativamente homogênea, o que foi confirmado por análise de variância ($\alpha = 0,05$) tendo como fontes de variação a taxa de aeração e o módulo do biorreator. Tendência similar também foi reportada por Derakhti et al. (2012) a respeito da produção da enzima α -amilase por *Bacillus sp.* KR-8104 em farelo de trigo em biorreator de leito empacotado. Os autores tiveram

bons rendimentos, mas a produção da enzima decrescia do fundo para o topo do biorreator.

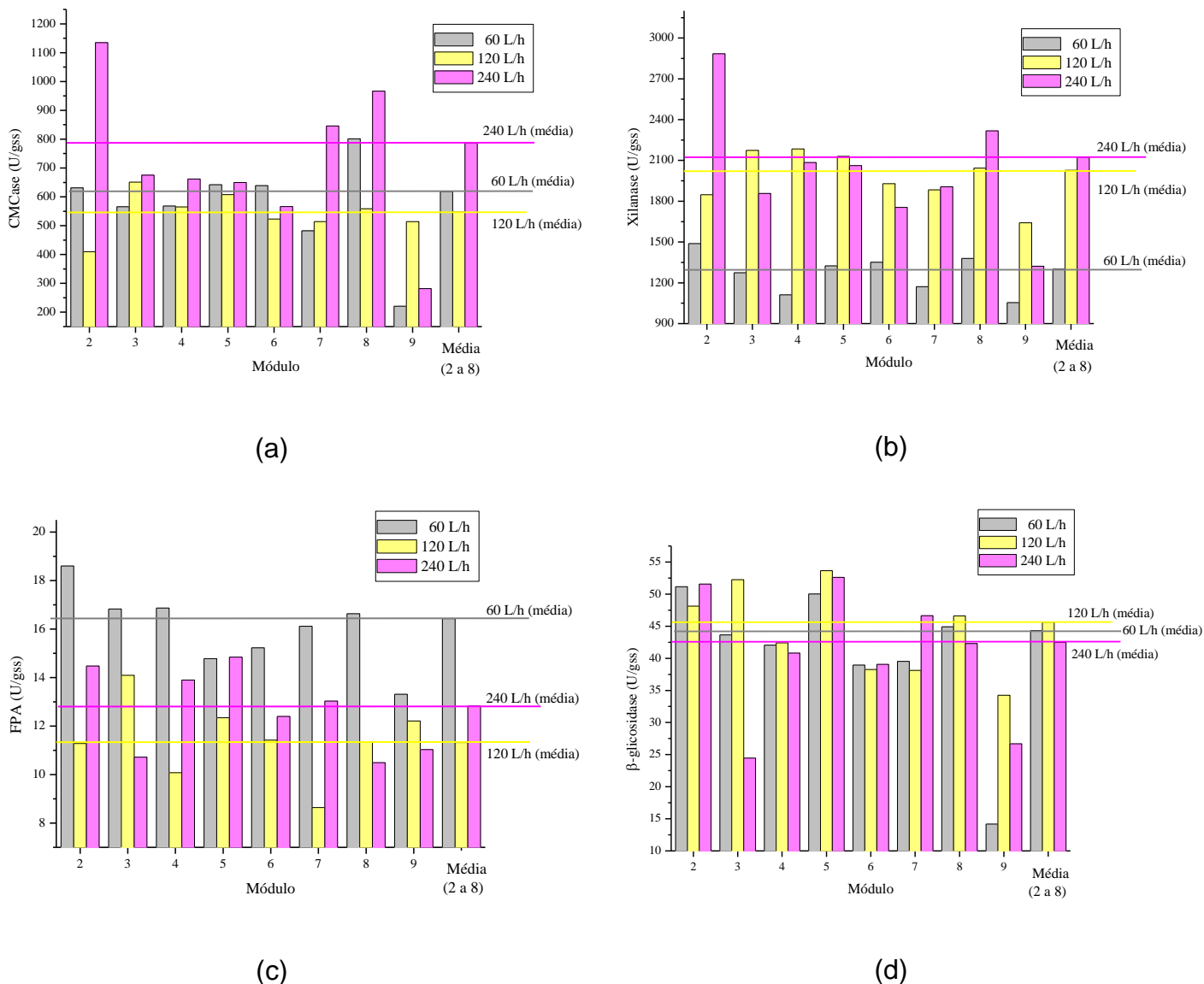


Figura 6.1. Atividades enzimáticas dos extratos obtidos a partir dos módulos de 2 a 9 do biorreator com 1,0 m de comprimento empregando o fungo *Myceliophthora thermophila* em BC:FT 7:3 (a) CMCase; (b) xilanase; (c) FPA; (d) β-glicosidase.

Para fins de avaliação do efeito da taxa de aeração sobre a atividade enzimática de cada fermentação, foram consideradas as médias das atividades dos extratos obtidos a partir dos módulos fermentativos 2 a 8. Apenas as atividades do extrato obtido do módulo 9 não foram consideradas para cálculo das médias, uma

vez que, como já comentado, as atividades deste extrato foram sistematicamente menores que as dos demais.

Para as quatro diferentes enzimas quantificadas (CMCase, xilanase, FPA e β -glicosidase), a análise de variância ($\alpha = 0,05$) indica que a variável taxa de aeração do biorreator tem efeito significativo sobre a variável resposta. No entanto, a comparação de médias por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) mostra que não há proporcionalidade direta entre a vazão e a atividade de cada enzima quantificada. Por outro lado, Zanelato et al. (2012) não haviam encontrado efeito significativo ($\alpha = 0,05$) da taxa de aeração sobre a atividade de endoglucanase produzida pelo mesmo fungo *M. thermophila* I-1D3b em BC:FT 7:3 em biorreator de leito fixo com 0,5 m de comprimento, provavelmente em função de terem trabalhado com faixa de vazão mais estreita, variando apenas de 80 a 120 L/h.

Na Tabela 6.1, são apresentados os resultados do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), bem como os intervalos de confiança (IC) para as médias das atividades obtidas no biorreator para as três taxas de aeração, expressas em L/h e em vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). Observa-se que as diferentes atividades foram influenciadas de formas distintas pela taxa de aeração do biorreator, o que pode estar relacionado a fatores biológicos e/ou bioquímicos, cuja investigação foge ao escopo de engenharia dado ao presente trabalho.

Como pode ser visto na Tabela 6.1, a amplitude dos ICs é inversamente proporcional à taxa de aeração, ou seja, amplitude do IC para $60 < 120 < 240$ L/h. Tal resultado sugere que o reator possa ser mais estável, ou mais homogêneo, quando percolado por vazão de ar mais baixa. A atividade CMCase média, que expressa a atividade das endoglucanases contidas no extrato obtido da fermentação, foi significativamente maior para a taxa de aeração de 240 L/h, tendo sido estatisticamente iguais para 60 e 120 L/h. Por outro lado, a atividade média de β -glicosidase, enzima responsável por clivar os dímeros de glicose e evitar o acúmulo de celobiose, foi estatisticamente igual entre 60 e 120 e entre 60 e 240 L/h, diferindo significativamente apenas entre 120 e 240 L/h. Já a atividade média de FPA, que expressa a atividade conjunta do complexo de enzimas celulolíticas, foi significativamente maior para 60 L/h e estatisticamente igual para taxas de aeração de 120 e 240 L/h. Como a β -glicosidase é a enzima limitante da cadeia de degradação da celulose, os resultados obtidos para FPA reiteram que a ação sinérgica das diferentes celulasas é mais importante que a alta atividade de uma

enzima específica do complexo celulolítico. Ademais, pode ser interessante avaliar a cinética de produção enzimática com variação de velocidades superficiais do ar ao longo do processo, de modo a induzir a produção de cada enzima em estágios diferentes do processo.

Por fim, a atividade de xilanase, enzima do complexo hemicelulolítico, foi significativamente menor para 60 L/h e estatisticamente equivalente para taxas de aeração de 120 e 240 L/h. Milagres et al. (2004), em seu estudo de produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 cultivado em bagaço de cana em reator de coluna com aeração forçada, também observaram que a taxa de aeração da coluna teve efeito significativo sobre a atividade de xilanase. O maior nível de atividade xilanásica foi obtido com taxa de aeração 6 L/h por grama de substrato, que por sua vez foi 22 vezes maior que o nível obtido na estagnação.

Tabela 6.1. Teste de Tukey e intervalos de confiança (IC) para as atividades enzimáticas médias produzidas por *M. thermophila* no biorreator com 1,0 m ($\alpha = 0,05$).

Taxa de aeração (L/h)	Taxa de aeração (vvm)	CMCase		Xilanase	
		Média*	IC	Média*	IC
60	0,27	618,5 ^b	(560,3; 676,6)	1300,1 ^b	(1207,3; 1393,0)
120	0,55	547,0 ^b	(488,8; 605,2)	2027,4 ^a	(1934,5; 2120,2)
240	1,10	785,7 ^a	(727,6; 843,9)	2123,9 ^a	(2031,0; 2216,7)
Taxa de aeração (L/h)	Taxa de aeração (vvm)	FPA		β -glicosidase	
		Média*	IC	Média*	IC
60	0,27	16,4 ^a	(15,4; 17,5)	44,3 ^{ab}	(43,3; 45,4)
120	0,55	11,3 ^b	(10,3; 12,4)	45,6 ^a	(44,5; 46,7)
240	1,10	12,8 ^b	(11,8; 13,9)	42,5 ^b	(41,4; 43,6)

* Letras minúsculas diferentes numa mesma coluna indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da taxa de aeração; letras minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da taxa de aeração.

Nas Figuras 6.2 e 6.3 são dados, respectivamente, os perfis de temperatura em três posições longitudinais no centro da seção fermentativa do biorreator e os perfis de vazão de gás carbônico na corrente de saída do biorreator com 1,0 m de comprimento total ao longo da fermentação com o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em substrato BC:FT 7:3 (m/m), sob três taxas de aeração.

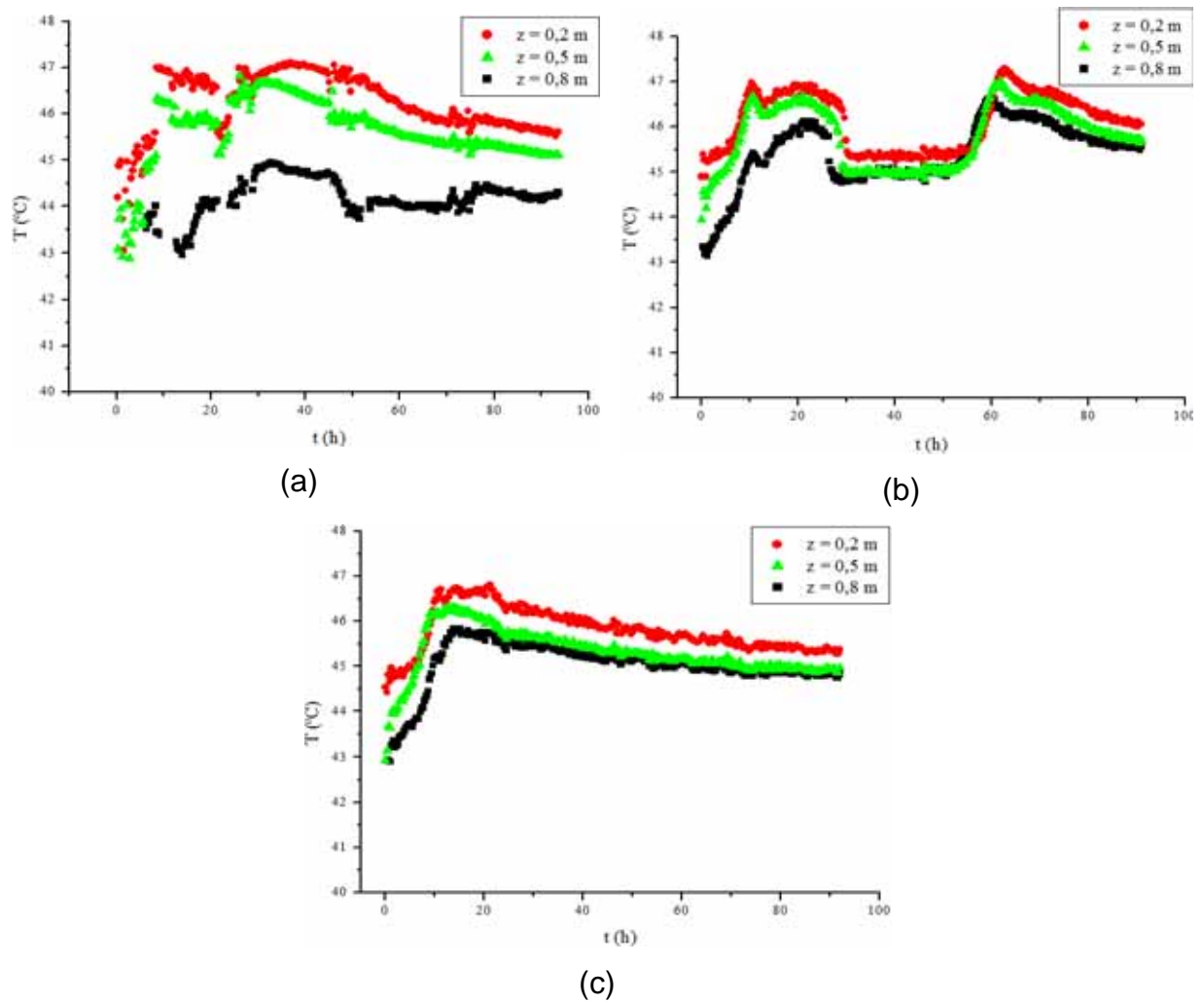


Figura 6.2. Temperatura ao longo da fermentação com *M. thermophila* em BC:FT 7:3 no centro do biorreator com 1,0 m de comprimento total: (a) 60 L/h; (b) 120 L/h; (c) 240 L/h.

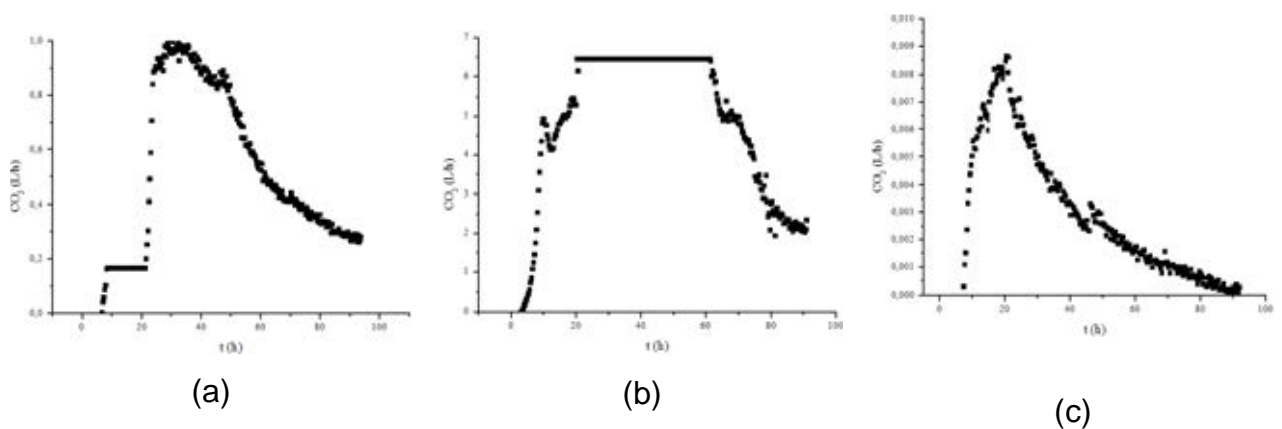


Figura 6.3. Vazão de CO_2 na corrente de saída ao longo da fermentação com *M. thermophila* em BC:FT 7:3 no biorreator com 1,0 m de comprimento: (a) 60 L/h; (b) 120 L/h; (c) 240 L/h.

Nas Figuras 6.2a a 6.2c, é possível observar que as temperaturas registradas ao longo da fermentação mantiveram-se em torno de 45,0 °C, estabelecida como temperatura de processo. A máxima temperatura registrada foi em torno de 47,0 °C, não havendo, portanto, ocorrido superaquecimento considerável no interior do biorreator, nem mesmo quando fora empregada a menor taxa de aeração, 60 L/h.

Os ruídos observados nos sinais fornecidos pelos termopares (Figura 6.2) são típicos deste tipo de experimento, para o qual não se deve esperar precisão maior que 0,5 °C (THOMÉO; ROUILLER; FREIRE, 2004). Ademais, a variação de temperatura ao longo do comprimento do biorreator foi baixa, indicando boa homogeneidade térmica, um atributo industrial muito interessante. O mesmo fato fora previamente observado por Zanelato et al. (2012), o que por sua vez contradiz boa parte da literatura, em que muito se fala sobre o problema de superaquecimento em biorreatores de FES em leite empacotado [vide, por exemplo, Ghildyal et al. (1994) e Mitchell, Krieger e Berovic (2006)]. No entanto, sabe-se que o controle térmico do biorreator depende de uma série de fatores, tais como: fisiologia e taxa de crescimento do microrganismo; propriedades físicas do meio sólido; dimensões do equipamento; condições operacionais adotadas. Acredita-se que, no presente trabalho, a combinação escolhida para esses fatores foi tal que favoreceu o controle a homogeneidade térmica no biorreator ao longo da fermentação.

Simulações do processo empregando o modelo heterogêneo bidimensional apresentado no Capítulo 5 desta tese também indicaram, para as três taxas de aeração, que não ocorreria superaquecimento no leite. As máximas temperaturas previstas pelo modelo com taxas de aeração de 60, 120 e 240 L/h foram, respectivamente, 47,7, 47,2 e 46,7 °C, empregando-se os parâmetros do microrganismo e as propriedades físicas e térmicas do leite e do substrato conforme Tabela 5.1. Por outro lado, se for desprezada a dispersão radial de calor no modelo, as máximas temperaturas previstas com taxas de aeração de 60, 120 e 240 L/h passam a ser, respectivamente, 55,0, 51,3 e 49,3 °C, indicando que a remoção de calor pela camisa é significativa no biorreator com 7,62 cm de diâmetro, podendo ser o principal fator responsável pela não ocorrência de superaquecimento ao longo da fermentação.

Outro fator que pode ter sido determinante para a homogeneidade térmica do biorreator foi a escolha de um fungo termofílico como agente fermentativo. Além do estudo de Zanelato et al. (2012) com o mesmo fungo *M. thermophila* I-1D3b, outros

trabalhos com fungos termofílicos encontrados na literatura indicam que o problema de superaquecimento nos biorreatores de FES possa ser menos grave para estes microrganismos. Em seus experimentos de produção de pectinases pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N-31 a 45 °C em meio composto por bagaço de cana, bagaço de laranja (BL) e farelo de trigo (BC:BL:FT 1:2:2 m/m), Umsza-Guez (2009) observou que as temperaturas ao longo do leito atingiram um pico em torno de 48 °C, mantendo-se constantes nesta faixa nas primeiras 24 horas de processo e decaindo após esse período. Kalogeris et al. (2003) também já haviam reportado elevações de temperatura tênues em seus ensaios fermentativos em biorreator com agitação intermitente utilizando o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* em palha de trigo nas temperaturas de 45, 49 e 53 °C. Esses autores observaram que a variação da temperatura do leito foi de $44,3 \pm 1,1$; $48,4 \pm 0,9$ e $52,2 \pm 1,3$ °C, reforçando a hipótese de que a elevação da temperatura devido à geração de calor metabólico quando se utilizam cepas termofílicas é inferior à de quando se empregam fungos mesofílicos.

Comparando-se as Figuras 6.2 e 6.3, nota-se que as elevações de temperatura foram coincidentes com os picos de concentração de gás carbônico na corrente de ar na saída do biorreator, como ficou bastante claro para as taxas de aeração de 60 e de 240 L/h. Para 120 L/h, o registro dos dados de temperatura e de concentração de CO₂ no período de 20 a 60 h pode ter sofrido algum tipo de interferência elétrica ou de outros fatores externos desconhecidos, resultando nos perfis anômalos vistos nas Figuras 6.2b e 6.3b, a partir das quais foi observada queda da temperatura a partir do momento em que a concentração de CO₂ atingiu o limite máximo de detecção da sonda. Além da possibilidade de problema de aquisição dos dados, uma hipótese para explicar tais resultados seria baseada em que, enquanto a concentração de CO₂ foi maior que 5 % (v/v), as temperaturas mantiveram-se em torno da temperatura de processo, tendo voltado a subir depois que a concentração de CO₂ começou a cair. Sugere-se que, enquanto a concentração de CO₂ no meio manteve-se muito elevada, o fungo possa ter reduzido sua taxa de respiração e sua produção de calor metabólico, o que deve ter levado à simultânea redução da temperatura nesta fase. Depois de a concentração de CO₂ ter caído novamente, pode ter ocorrido que o fungo voltou a respirar intensamente e a liberar calor normalmente, justificando-se o restabelecimento da temperatura.

Na Figura 6.4, são apresentadas as umidades finais do material BC:FT 7:3 (m/m) fermentado por *M. thermophila* com três taxas de aeração, ao longo do biorreator com 1,0 m ou 10 módulos de comprimento total, lembrando que os módulos de 2 a 9 são fermentativos e que o módulo 1 foi empacotado com bagaço de cana grosso inicialmente com umidade 75 % (b.u.) e o módulo 10 com bagaço grosso inicialmente seco.

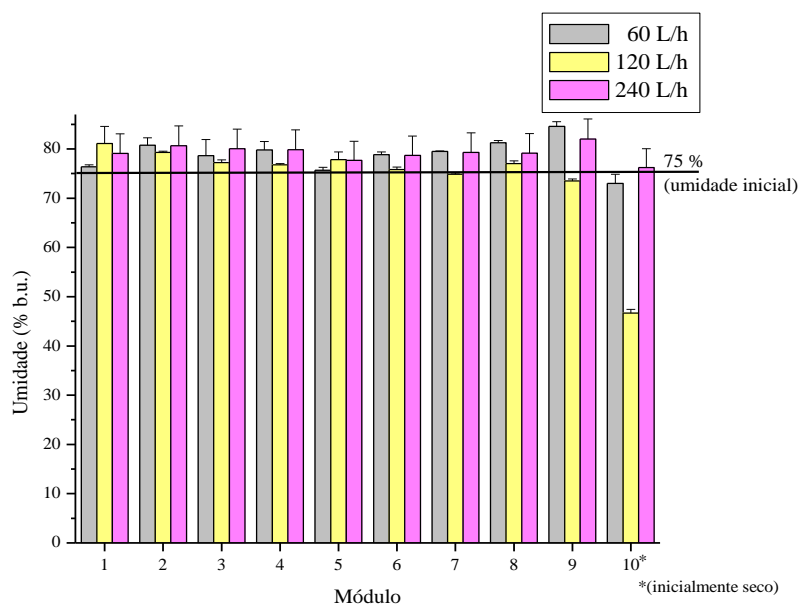
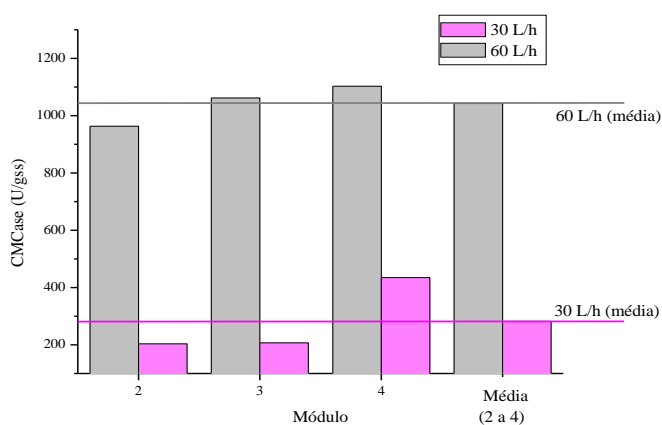


Figura 6.4. Umidade final do material (BC:FT 7:3) fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator com 1,0 m de comprimento para três taxas de aeração.

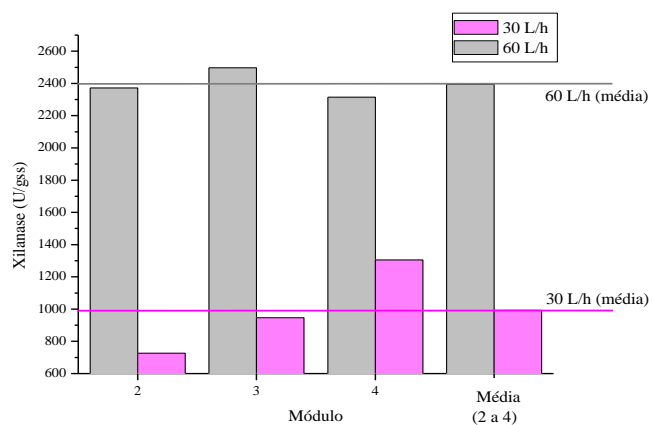
Tendo em vista que foram adotadas medidas de reposição frequente da água na coluna de umidificação do ar e de imersão da coluna, das mangueiras do ar umidificado e da seção entrada do biorreator em um mesmo banho termostático, pode-se dizer que o ar foi mantido constantemente saturado ao longo da fermentação, provavelmente tendo até mesmo arrastado água líquida para o biorreator, já que o conteúdo de umidade final ao longo do comprimento foi ainda superior à umidade inicial, conforme visto na Figura 6.4. De todo modo, assume-se que o problema de secagem, anteriormente observado por Umsza-Guez (2009) e Zanelato et al. (2012) e previsto por simulação com aeração insaturada como prejudicial ao rendimento de enzimas, fora contornado, independentemente da taxa de aeração empregada.

6.1.2 Biorreator com comprimento total 0,5 m e substrato BC:FT 7:3

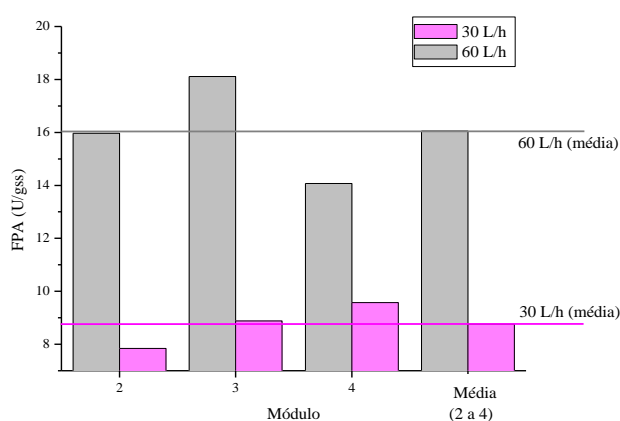
Ensaio adicionais para avaliação do efeito da taxa de aeração sobre o desempenho do processo fermentativo foram feitos no biorreator com 0,5 m de comprimento total (5 módulos, sendo os 3 centrais os fermentativos). Nas Figuras 6.5a a 6.5d, são apresentadas, respectivamente, as atividades CMCase, xilanase, papel de filtro (FPA) e β -glicosidase, em função do comprimento e para duas taxas de aeração. As linhas horizontais indicam as atividades médias, dadas pela média das atividades dos 3 módulos.



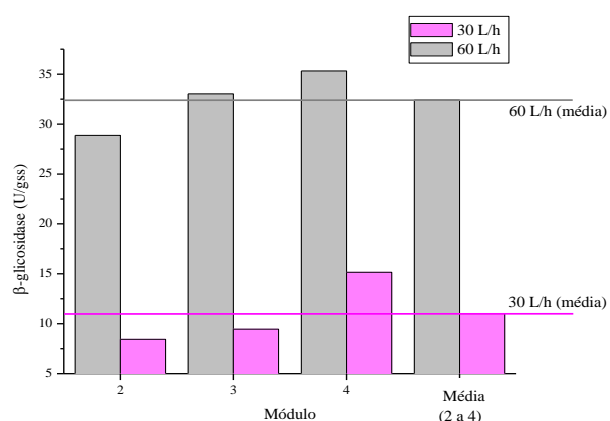
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 6.5. Atividades enzimáticas dos extratos obtidos a partir dos módulos de 2 a 4 do biorreator com 0,5 m de comprimento empregando o fungo *Myceliophthora thermophila* em BC:FT 7:3 (a) CMCase; (b) xilanase; (c) FPA; (d) β -glicosidase.

Como se observa, as atividades xilanase e FPA foram homogêneas ao longo do comprimento do biorreator, não diferindo significativamente ($\alpha = 0,05$) entre os módulos. Para este leito curto, não se observou tendência sistemática de as atividades no topo serem mais baixas.

Quanto ao efeito da taxa de aeração, foram consideradas as médias das atividades dos extratos obtidos dos três módulos fermentativos do biorreator com 0,5 m de comprimento. Neste caso, para as quatro atividades enzimáticas analisadas, a taxa de aeração teve efeito significativo e bem definido sobre as variáveis de resposta, de acordo com análise de variância e comparação de médias por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os resultados da comparação estatística das médias e os respectivos ICs estão sumarizados na Tabela 6.2, onde se vê que as atividades médias CMCase, β -glicosidase, FPA e xilanase obtidas com taxa de aeração de 30 L/h foram significativa e sistematicamente menores que as obtidas com 60 L/h.

Tabela 6.2. Teste de Tukey e intervalos de confiança (IC) para as atividades enzimáticas médias produzidas por *M. thermophila* no biorreator com 0,5 m ($\alpha = 0,05$).

		CMCase		Xilanase	
Taxa de aeração (L/h)	Taxa de aeração (vvm)	Média	IC	Média	IC
30	0,37	281,9 ^b	(235,4; 328,4)	992,3 ^b	(875,0; 1109,7)
60	0,73	1042,4 ^a	(996,0; 1088,9)	2394,6 ^a	(2277,3; 2512,0)
		FPA		β -glicosidase	
Taxa de aeração (L/h)	Taxa de aeração (vvm)	Média	IC	Média	IC
30	0,37	8,8 ^b	(7,5; 9,9)	11,0 ^b	(10,1; 11,9)
60	0,73	16,1 ^a	(14,8; 17,3)	32,4 ^a	(31,5; 33,3)

* Letras minúsculas diferentes numa mesma coluna indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da taxa de aeração; letras minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da taxa de aeração.

Tal resultado sugere que pode ter havido privação do suprimento de oxigênio ao microrganismo, ou ainda que o desenvolvimento do fungo possa ter sido prejudicado por acúmulo de gás carbônico no interior do meio fermentativo. No entanto, a confirmação de tais hipóteses somente seria possível por meio de investigações biológicas e/ou bioquímicas mais aprofundadas, que fogem ao escopo

desta tese, mas, por outro lado, dão margem à realização de novos trabalhos, envolvendo a cooperação de pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento.

Em termos de engenharia, a vazão de 30 L/h resulta em velocidade superficial igual a 0,002 m/s no biorreator com 7,62 cm de diâmetro interno. Em comparação à velocidade superficial de 0,015 m/s, resultante da vazão de 240 L/h, pode-se considerar que o leito aproximou-se da estagnação quando submetido à taxa de aeração de 30 L/h. Tal condição, como já demonstrado por Milagres et al. (2004), é desfavorável à produção de enzimas xilanólíticas por fungos em biorreatores de leito empacotado.

Ressalte-se que, como critério de ampliação de escala para definição da taxa de aeração, foi considerado o aumento do volume total do biorreator ao invés do aumento do volume de material em fermentação. Como foi mantida a sistemática de se empacotar apenas um módulo na base com bagaço úmido não inoculado e apenas um no topo com bagaço seco, independentemente do número de módulos fermentativos que seriam adicionados entre a entrada e a saída, para 0,5 m de comprimento total, têm-se 3 módulos fermentativos, ao passo que para 1,0 m, são 8 módulos fermentativos. Deste modo, se for considerada a taxa de aeração dada em termos de volume de ar por volume de meio em fermentação por minuto (vvm), 30 e 60 L/h no biorreator com 0,5 m de comprimento total equivalem, respectivamente, a 0,37 e 0,73 vvm, enquanto que 60 e 120 L/h no biorreator com 1,0 m de comprimento total equivalem, respectivamente, a 0,27 e 0,55 vvm. Considerando, portanto, os valores em vvm, o emprego de 30 L/h no reator com 0,5 m resulta no fornecimento de mais ar que o de 60 L/h no reator com 1,0 m, indicando que vvm não é um bom critério de ampliação de escala para biorreatores de FES em leito empacotado. Se, ao início do processo, tem-se menos ar e a atividade respiratória é intensa, ao final tem-se maior concentração de CO₂.

No entanto, de acordo com comparação de médias por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), as atividades CMCase, β -glicosidase, FPA e xilanase foram significativamente menores para a fermentação com taxa de aeração 30 L/h no biorreator com 0,5 m de comprimento total do que para a fermentação com taxa de aeração 60 L/h no biorreator com 1,0 m, embora o vvm tenha sido maior para o primeiro caso. Além disso, as atividades FPA obtidas com taxa de aeração 60 L/h foram estatisticamente iguais para 0,5 e 1,0 m de comprimento total ou 0,73 e 0,55 vvm, respectivamente.

Com base nesses resultados, conclui-se que o parâmetro volume de ar por volume do biorreator por minuto (vvm), comumente aplicado para fermentação submersa (NIELSEN; VILLADSEN; LIDEN, 2003), não é o mais adequado para cálculos de ampliação de escala de biorreatores de FES em leite empacotado, dando margem a que sejam propostas novas estratégias de como representar essa importante variável de ampliação. Propõe-se o emprego de uma combinação de duas variáveis: L/D , que é um fator geométrico definido como a razão entre o comprimento do biorreator e seu diâmetro; e $\dot{\rho}$ [$\text{kg m}^{-3} \text{h}^{-1}$], que é um fator operacional definido como a velocidade superficial do ar multiplicada por sua densidade e dividida pelo comprimento do biorreator, aqui denominada como taxa de escoamento de ar por unidade de volume do biorreator ou densidade de escoamento. Manter a combinação L/D e $\dot{\rho}$ constante pode ser mais interessante que manter o parâmetro vvm constante, uma vez que as novas variáveis de ampliação definidas ponderam o efeito do aumento de escala e da taxa de escoamento de ar.

Na Figura 6.6, são dados os perfis de temperatura em três posições longitudinais no centro do biorreator com 0,5 m de comprimento ao longo da fermentação com *M. thermophila* em BC:FT 7:3 (m/m), para taxas de aeração 30 e 60 L/h. Novamente é possível observar que não houve superaquecimento, uma vez que o aumento de temperatura ficou entre 2,0 e 3,0 °C ao longo do processo, não sendo prejudicial ao desenvolvimento do fungo.

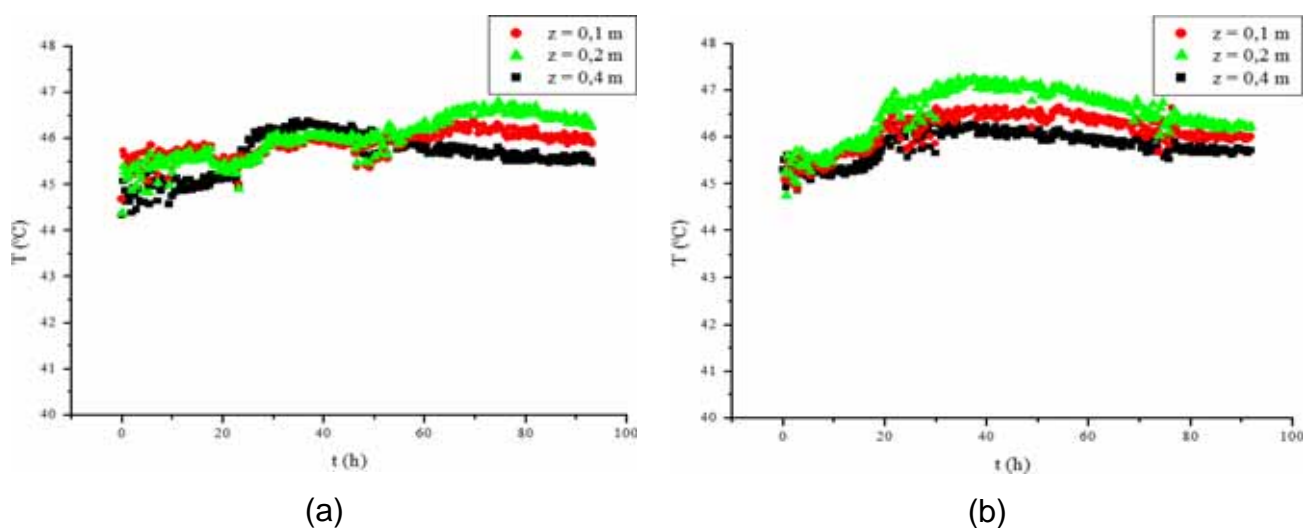


Figura 6.6. Temperatura ao longo da fermentação com *M. thermophila* em BC:FT 7:3 no centro do biorreator com 0,5 m de comprimento total: (a) 30 L/h; (b) 60 L/h.

Observou-se apenas um retardamento do pico de temperatura no processo com taxa de aeração de 30 L/h em comparação ao processo com 60 L/h. Ainda assim, não se acredita que a diferença de atividades enzimáticas obtidas para cada vazão de ar esteja associada ao comportamento térmico do processo, uma vez que a elevação de temperatura foi desprezível em ambos os casos.

Na Figura 6.7, são apresentadas as umidades finais do material BC:FT 7:3 (m/m) fermentado por *M. thermophila*, com taxas de aeração 30 e 60 L/h, ao longo do biorreator com 0,5 m. Similarmente ao observado no biorreator com 1,0 m de comprimento, o perfil de umidade foi homogêneo ao longo da posição axial, para ambas as taxas de aeração empregadas. Nota-se que a condensação de umidade na saída do leito variou com a taxa de aeração, uma vez que o módulo 5, inicialmente seco, tornou-se mais úmido ao final do processo para 60 que para 30 L/h. Tal resultado é termodinamicamente consistente, uma vez que a razão de umidade do ar é constante quando expressa na forma de gramas de água por grama de ar seco. Conseqüentemente, quanto maior a massa de ar numa corrente de ar saturado, maior a massa de água que pode ser transportada por essa corrente.

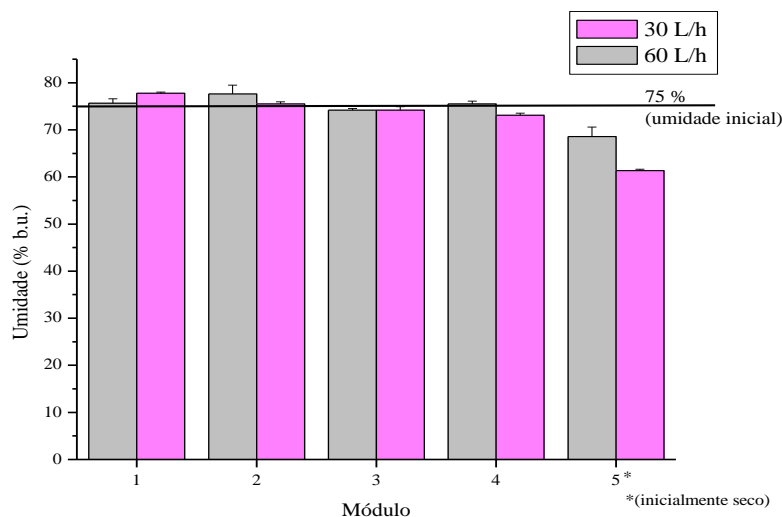
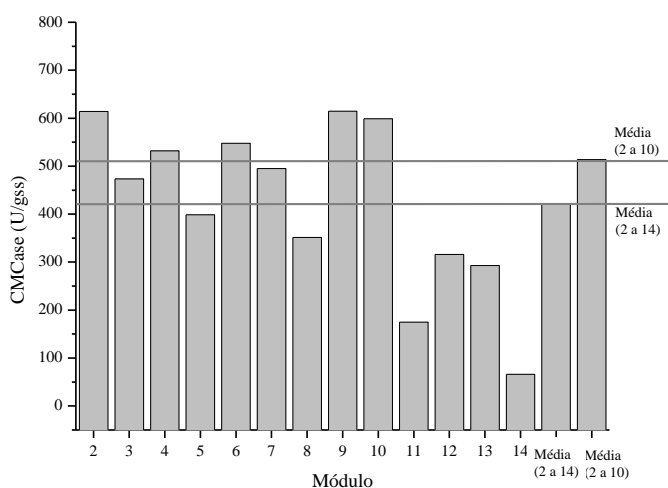


Figura 6.7. Umidade final do material (BC:FT 7:3) fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator com 0,5 m de comprimento total para duas taxas de aeração.

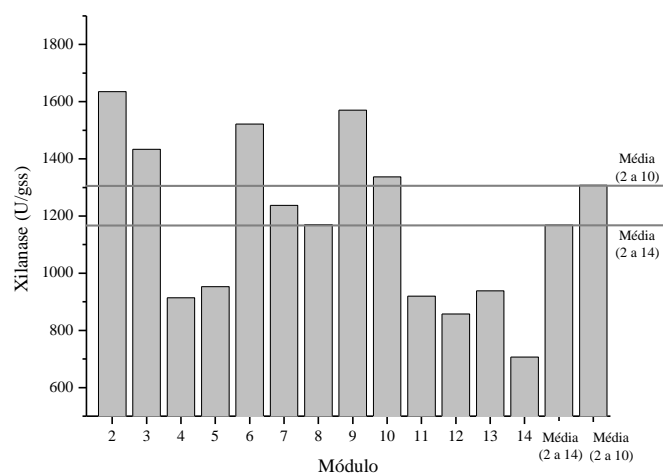
6.1.3 Biorreator com comprimento total 1,5 m e substrato BC:FT 7:3

O comprimento do biorreator foi finalmente aumentado para 1,5 m, mediante adição de 15 módulos consecutivos, atingindo o limite de altura do laboratório. Nas

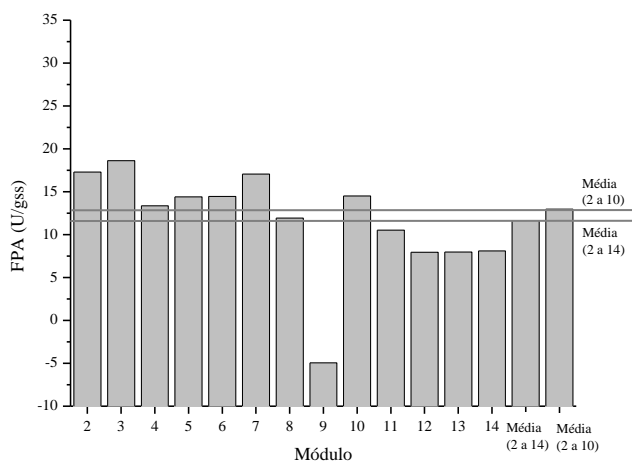
Figuras 6.8a a 6.8d, são apresentadas, respectivamente, as atividades CMCase, xilanase, papel de filtro (FPA) e β -glicosidase dos extratos obtidos empregando o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em substrato BC:FT 7:3 (m/m) no biorreator com 1,5 m de comprimento total (módulos de 2 a 14 como fermentativos e média dos módulos), em função do comprimento e com taxa de aeração de 360 L/h.



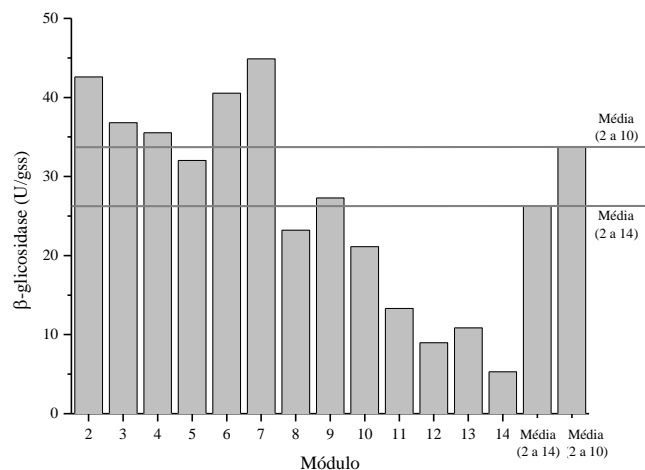
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 6.8. Atividades enzimáticas dos extratos obtidos a partir dos módulos de 2 a 14 do biorreator com 1,5 m de comprimento empregando o fungo *Myceliophthora thermophila* em BC:FT 7:3 sob taxa de aeração 360 L/h: (a) CMCase; (b) xilanase; (c) FPA; (d) β -glicosidase.

É possível observar decréscimo expressivo das atividades enzimáticas a partir do 11º módulo do biorreator, sobretudo para CMCase e xilanase, o que foi

confirmado por meio de comparação de médias por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Tal resultado foi atribuído à dificuldade de controle da temperatura da camisa nos módulos mais superiores do biorreator, como será apresentado e discutido adiante, quando se apresentam os perfis de temperatura ao longo do tempo e da posição axial no biorreator com 1,5 m de comprimento.

Apesar disso, de acordo com novo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), foi possível observar que as médias das atividades FPA ao longo do biorreator foram muito próximas das médias obtidas no biorreator com 1,0 m de comprimento com taxa de aeração 240 L/h, volumetricamente equivalente aos 360 L/h para 1,5 m de comprimento, embora as médias das demais atividades tenham sido menores. No entanto, se forem desconsideradas as atividades a partir do 11º módulo, o rendimento em termos de atividades enzimáticas obtidas no biorreator com 1,5 m se aproxima mais do obtido com 1,0 m, sendo as médias das atividades FPA estatisticamente iguais ($\alpha = 0,05$). Considerando que a atividade FPA expressa a atividade conjunta das celulasas, tal resultado denota que a ampliação de escala do biorreator por aumento de seu comprimento até o limite máximo de altura imposto pela sala de processo atual pode ser bem sucedida, sobretudo se contornado o problema de controle axial da temperatura da camisa.

Nas Figuras 6.9a e 6.9b, são apresentados os perfis de temperatura ao longo da fermentação com o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em substrato BC:FT 7:3 (m/m) em três posições longitudinais abaixo e uma acima de 1,0 m de comprimento no centro do biorreator, sendo o comprimento total 1,5 m e a taxa de aeração 360 L/h. Na Figura 6.10, é apresentado o perfil de vazão de gás carbônico na corrente de ar na saída deste biorreator.

Na Figura 6.9a, nota-se um perfil de temperatura similar aos observados anteriormente para 0,5 e 1,0 m de comprimento. As temperaturas em três posições longitudinais medidas no centro do leito mantiveram-se em torno dos 45,0 °C, tendo-se observado um pico em torno de 35 horas de fermentação. No entanto, a elevação máxima de temperatura foi inferior a 1,5 °C, podendo ser considerada desprezível.

Por outro lado, na Figura 6.9b, é possível observar que a temperatura manteve-se praticamente constante e em torno de 44,0 °C no centro do leito e na posição longitudinal $z = 1,0$ m. No entanto, a temperatura exibiu comportamento anômalo na posição $z = 1,4$ m, tendo ficado abaixo de 40,0 °C e oscilando em torno de uma média de 35,0 °C durante a maior parte da fermentação.

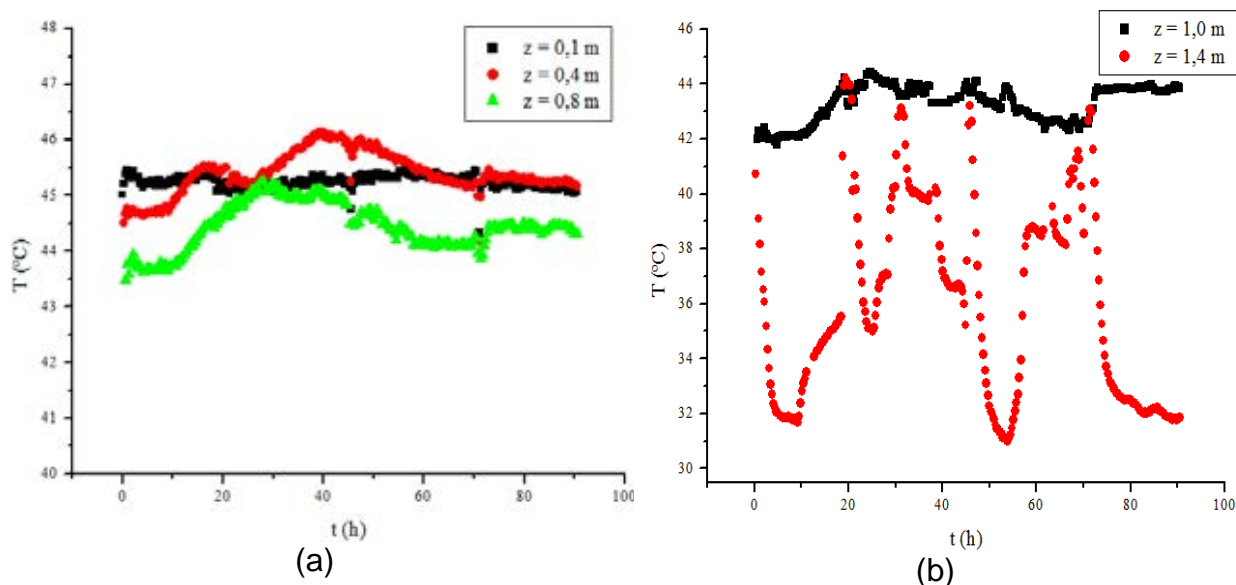


Figura 6.9. Temperatura ao longo da fermentação com *M. thermophila* no centro do biorreator com 1,5 m de comprimento total e taxa de aeração 360 L/h: (a) posições longitudinais abaixo de 1,0 m; (b) posições longitudinais acima de 1,0 m.

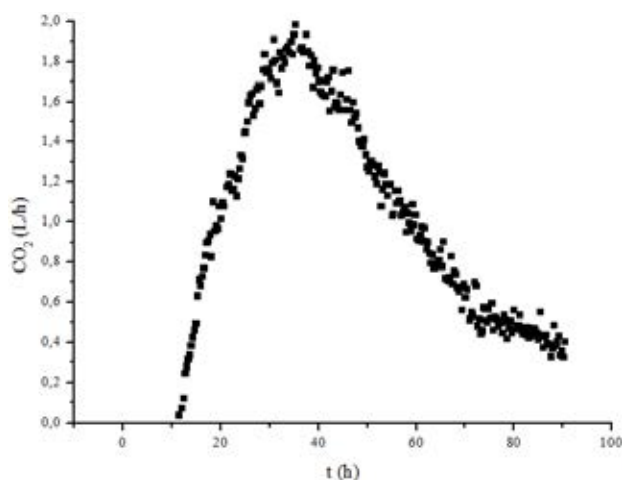


Figura 6.10. Vazão de CO₂ na corrente de saída ao longo da fermentação com *M. thermophila* no biorreator com 1,5 m de comprimento com taxa de aeração 360 L/h.

O perfil de temperatura visto na Figura 6.9b deu-se em decorrência de uma dificuldade experimental em fazer com que a água da camisa de aquecimento chegasse aos módulos mais elevados do leito. Deste modo, a água circulou pela camisa dos módulos mais próximos da base, até cerca de 1,0 m de altura, porém não chegou a circular continuamente pelos módulos superiores.

Como a temperatura na zona superior do biorreator manteve-se muito abaixo da temperatura ótima de desenvolvimento de *M. thermophila* durante a maior parte

do processo fermentativo, infere-se que a secreção de enzimas celulolíticas pelo fungo foi comprometida. Portanto, essa dificuldade experimental de controle térmico justifica as menores atividades enzimáticas encontradas para os extratos obtidos a partir dos módulos 11 a 14 do biorreator com 1,5 m de comprimento total.

Comparando-se as Figuras 6.9a e 6.10, novamente nota-se que as elevações de temperatura foram coincidentes com a elevação da concentração de gás carbônico na corrente de ar na saída do biorreator. Tal observação reitera que a máxima geração de calor metabólico pelo fungo, que levou ao pico de temperatura no sistema, se deu durante sua fase de crescimento acelerado, na qual sua taxa de respiração foi máxima.

Ressalte-se que os valores negativos de vazão de CO₂ no início da curva da Figura 6.10, referentes aos instantes iniciais da fermentação, apenas indicam que a concentração de CO₂ na corrente de ar na saída do biorreator é ainda muito baixa, sendo inferior ao limite mínimo de detecção da sonda.

Na Figura 6.11, são apresentadas as umidades finais do material BC:FT 7:3 (m/m) fermentado por *M. thermophila* com taxa de aeração 360 L/h, em função do comprimento do fermentador com 1,5 m de comprimento total.

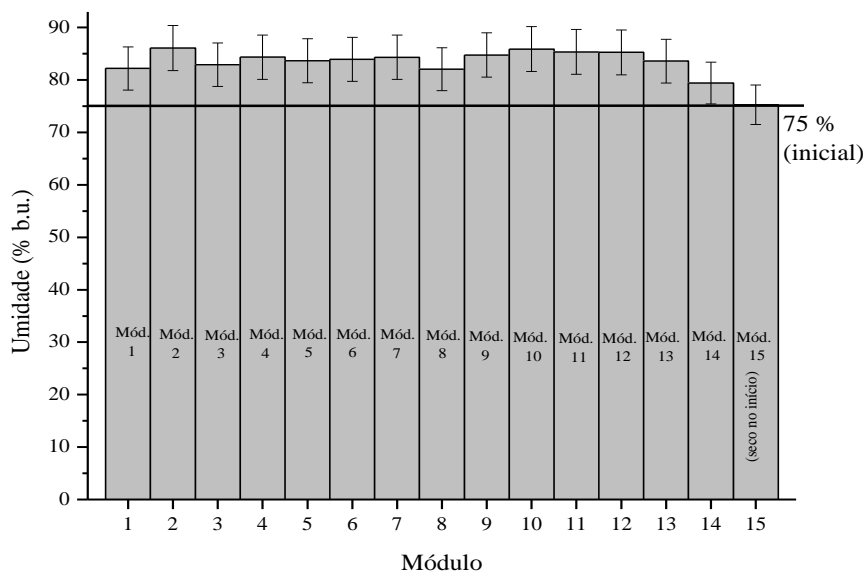


Figura 6.11. Umidade final do material (BC:FT 7:3) fermentado por *M. thermophila* ao longo do comprimento do biorreator com 1,5 m de comprimento total e taxa de aeração 360 L/h.

Apesar da heterogeneidade térmica ao longo do comprimento do biorreator, o perfil axial de umidade foi homogêneo. Ademais, em todos os módulos, a umidade final do material fermentado foi maior que a inicial, denotando a não ocorrência de secagem, mas, ao contrário, de arraste de água líquida pela corrente de ar ou, ainda, de considerável refluxo de água na saída do biorreator.

6.1.4 Biorreator com comprimento total 0,4 m e substrato FT e FT:BC_{fino} 1:1

Considerando que as propriedades estruturais dos leitos empacotados com diferentes rejeitos agroindustriais pode afetar o desempenho dos processos de FES (CASCIATORI et al., 2014), foram feitos dois testes fermentativos empregando como substratos FT puro e FT:BC_{fino} 1:1 (m/m). Esses testes foram realizados em biorreator com 0,4 m de comprimento e a taxa de aeração foi definida com base nos experimentos de Ghildyal et al. (1994). Escolheu-se uma vazão de ar tal que resultou no mesmo valor de velocidade superficial por unidade de comprimento da seção fermentativa correspondente à vazão de percolação empregada por aqueles autores e que provocou maior superaquecimento em seu biorreator de coluna. A umidade do substrato também foi a mesma que a empregada por Ghildyal et al. (1994).

Nas Figuras 6.12a e 6.12b são fornecidos, respectivamente, os perfis de temperatura em três posições longitudinais no centro do biorreator e o perfil de vazão de gás carbônico na corrente de saída do biorreator ao longo da fermentação com o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em farelo de trigo puro, com umidade inicial 65 % (b.u.) e taxa de aeração 45 L/h.

Um aumento de temperatura expressivo no interior do biorreator pode ser visualizado na Figura 6.12a, sobretudo na posição axial $z = 0,2$ m, entre os dois módulos fermentativos, em cujo ponto central do leito a temperatura superou 52 °C. Quando do cultivo em BC:FT 7:3 (m/m), a temperatura não ultrapassara 47,0 °C nem mesmo para taxas de aeração inferiores à empregada neste cultivo em FT puro. Observe-se ainda, comparando-se as Figuras 6.12a e 6.12b, que o aumento da vazão de CO₂ na corrente de saída do biorreator foi simultâneo ao aumento das temperaturas no interior do leito. Tal resultado denota que o aquecimento do leito deu-se durante a fase de crescimento acelerado do fungo, durante a qual tanto a taxa de respiração quanto a de geração de calor metabólico foram mais intensas.

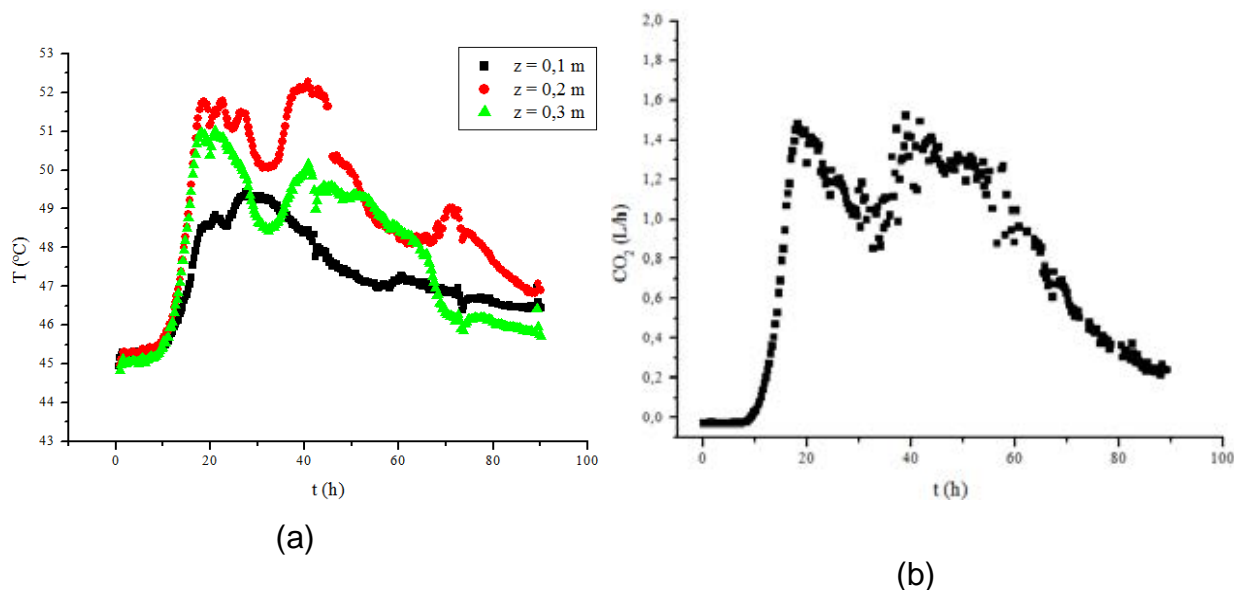


Figura 6.12. (a) Temperaturas em três posições longitudinais medidas no centro do biorreator; (b) Vazão de CO_2 na corrente de saída, ao longo da fermentação com *M. thermophila* em farelo de trigo com 0,4 m de comprimento e taxa de aeração 45 L/h.

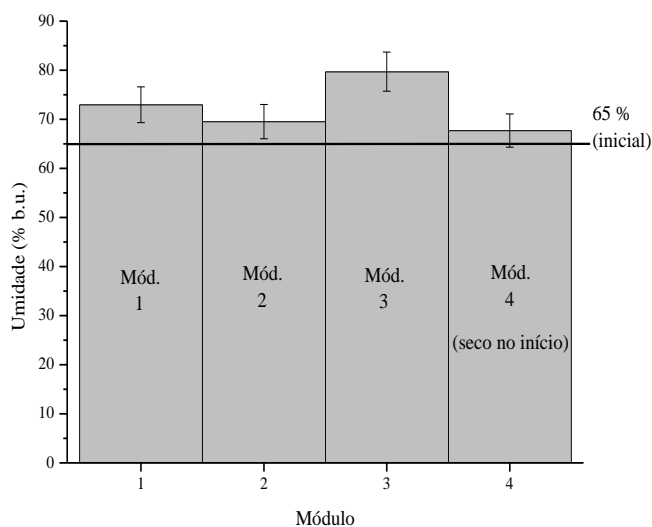
Com base nos resultados da Figura 6.12a e tendo em vista que FT puro constitui leito mais denso, compacto e com porosidade muito menor quando comparado a um leito composto por BC:FT 7:3 (m/m) (CASCIATORI et al., 2014), pode-se inferir que a remoção do calor metabólico gerado pelo fungo ao longo do processo deve ter sido comprometida neste cultivo. Como se sabe, a porosidade de um leito empacotado afeta diretamente as propriedades fluidodinâmicas no interior do meio poroso, bem como as propriedades efetivas de transferência de calor e de massa no leito, tais como permeabilidade e condutividade térmica e difusividade mássica efetivas (TSOTSAS, 2010a; 2010b). Em termos de fluidodinâmica, infere-se que o ar encontrou maior dificuldade para percolar o meio compacto, de modo que deve ter escoado preferencialmente através da região da parede, de maior porosidade (ZOTIN, 1985). Assim, a remoção de calor da região central foi prejudicada, ocasionando a elevação de temperatura. De acordo com Casciatori et al. (2013), a condutividade térmica efetiva na estagnação também é menor no leito de FT que no de BC, sendo os valores calculados iguais a 0,384 e 0,444 W/m/K, respectivamente, de modo que a remoção de calor por condução também foi prejudicada no leito de FT puro em comparação ao meio contendo as fibras de BC.

Portanto, os resultados do presente trabalho reforçam a hipótese de que a matriz porosa ideal para biorreatores de FES é aquela capaz de suprir as

necessidades nutricionais do microrganismo e, ao mesmo tempo, de prover adequada estrutura física para a percolação de ar, a fim de garantir eficiente transferência dos gases respiratórios e de facilitar a remoção de calor metabólico (CASCIATORI et al., 2014).

Nas Figuras 6.13a e 6.13b, são apresentadas as umidades finais do farelo fermentado por *M. thermophila* com taxa de aeração 45 L/h, em função do comprimento do fermentador, bem como o aspecto do material ao final da fermentação.

Apesar do aumento de temperatura ocorrido no interior do leito, não ocorreu secagem do substrato ao longo da fermentação, de modo que o perfil axial de umidade final do fermentado foi homogêneo, como visto na Figura 6.13a. Provavelmente devido ao arraste de água líquida pelo ar saturado a partir do módulo 1, empacotado somente com BC grosso e úmido, a umidade do material ao final da fermentação foi ainda maior que a inicial em todos os módulos do biorreator.



(a)

(b)

Figura 6.13. (a) Umidade final do material (farelo de trigo como substrato) fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator com 0,4 m de comprimento e taxa de aeração 45 L/h; (b) Aspecto do fermentado.

Por fim, na fotografia apresentada na Figura 6.13b, observa-se que a colonização do substrato pelo fungo deu-se preferencialmente no contorno do leito, em contato com a parede do tubo. Nesta região, sabe-se que a temperatura foi

mantida em torno de 45,0 °C devido à circulação de água pela camisa e que a disponibilidade de ar é maior, devido ao escoamento preferencial, o que favoreceu o crescimento do fungo.

No entanto, cogitou-se ainda que o sobreaquecimento do biorreator quando FT puro fora empregado como substrato poderia ter sido associado a um efeito biológico e não apenas a efeitos de fenômenos de transporte. Como o farelo de trigo é considerado um substrato ideal para a FES, por conta de fornecer fontes bem balanceadas de carbono facilmente disponível, além de nitrogênio e fósforo (PANDEY, 2003), o cultivo do fungo neste substrato poderia ter permitido maior liberação de calor metabólico devido ao crescimento mais facilitado e acelerado, o que por sua vez poderia ter sido o fator determinante para o sobreaquecimento.

Por isso, optou-se por realizar o teste de cultivo do fungo em outro substrato com baixa porosidade, porém com composição nutricional menos favorável. O substrato foi então composto por FT:BC_{fino} 1:1 (m/m), sendo BC_{fino} a fração de BC composta por partículas de BC menores que 0,84 mm. As fibras de BC normalmente utilizadas nos meios compostos têm diâmetro médio 3 mm, enquanto o diâmetro médio das partículas de FT é de 0,44 mm.

Nas Figuras 6.14a e 6.14b são fornecidos, respectivamente, os perfis de temperatura em três posições longitudinais medidas no centro do biorreator e o perfil de vazão de gás carbônico na corrente de saída do biorreator com 0,4 m de comprimento total ao longo da fermentação com o fungo *M. thermophila* I-1D3b em FT:BC_{fino} 1:1 (m/m), com umidade inicial 65 % (b.u.) e taxa de aeração 45 L/h.

De acordo com a Figura 6.14a, o aumento de temperatura no interior do biorreator foi similar ao observado na Figura 6.12a quando do cultivo em FT puro, com pico novamente próximo a 52,0 °C. Tal resultado demonstra que o efeito de superaquecimento está, de fato, mais associado a fenômenos de transporte envolvidos no processo, conforme já discutido, que à composição nutricional do substrato. Novamente, comparando-se as Figuras 6.14a e 6.14b, observa-se que o aumento da vazão de CO₂ na corrente de saída do biorreator foi simultâneo ao aumento de temperatura, reiterando que o aquecimento foi associado à intensa geração de calor metabólico durante a multiplicação acelerada do fungo. O sobreaquecimento do leito deu-se durante a fase de crescimento acelerado do fungo, durante a qual tanto a taxa de respiração quanto a de geração de calor metabólico foram mais intensas.

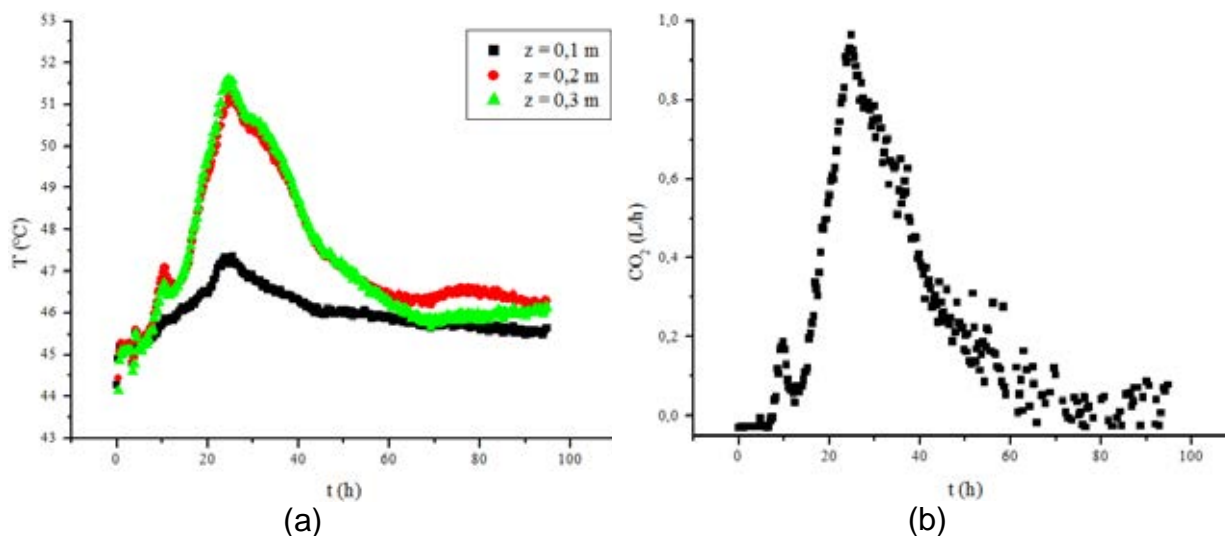


Figura 6.14. (a) Temperaturas em três posições longitudinais medidas no centro do biorreator; (b) Vazão de CO₂ na corrente de saída do biorreator, ao longo da fermentação com *M. thermophila* em FT:BC_{fino} 1:1 (m/m) com 0,4 m de comprimento e taxa de aeração 45 L/h.

Na Figura 6.15, são apresentadas as umidades finais do material fermentado por *M. thermophila* com taxa de aeração 45 L/h, em função do comprimento do fermentador, bem como o aspecto do fermentado ao final do processo.

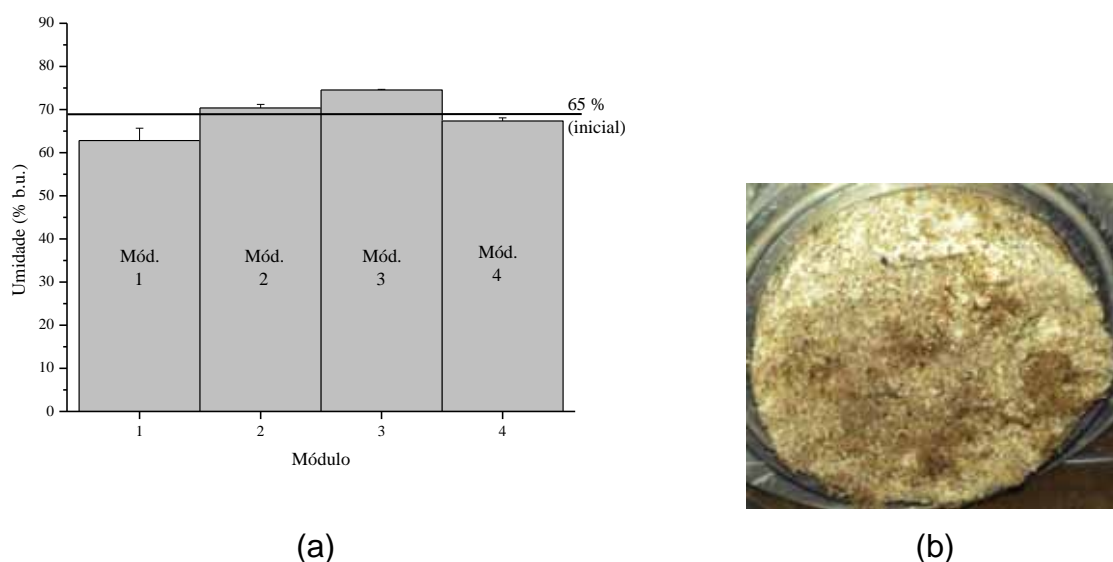


Figura 6.15. (a) Umidade final do material (FT:BC_{fino} 1:1) fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator com 0,4 m de comprimento total e taxa de aeração 45 L/h; (b) Aspecto do fermentado.

Similarmente à fermentação em FT puro, apesar do aumento de temperatura, novamente não ocorreu ressecamento do substrato, sendo o perfil axial de umidade final do fermentado homogêneo, como visto na Figura 6.15a. Na fotografia da Figura 6.15b, também observa-se que o fungo colonizou preferencialmente o contorno do leito de substrato. No entanto, neste caso, como o tamanho de partícula foi maior, foi possível observar certo desenvolvimento micelial mais ao centro do leito. Assim, mais uma vez pôde ser evidenciado o efeito das propriedades estruturais do leito de substrato sobre o desempenho dos processos de FES em leito empacotado.

6.2 Fermentação com *Trichoderma reesei* QM-9414 em biorreator com 7,62 cm de diâmetro interno

6.2.1 Biorreator com comprimento total 1,0 m e substrato BC:FT 9:1

Nas Figuras 6.16a a 6.16d, são apresentadas, respectivamente, as atividades CMC_{case}, xilanase, papel de filtro (FPA) e β -glicosidase dos extratos obtidos empregando o fungo *Trichoderma reesei* QM-9414 em substrato BC:FT 9:1 (m/m) no biorreator com 1,0 m de comprimento total (módulos de 2 a 9 como fermentativos e média dos módulos), em função do comprimento e para três taxas de aeração. As linhas horizontais referem-se às atividades médias no biorreator, dadas a partir da média das atividades obtidas em cada um dos 8 módulos fermentativos.

Claramente se observa que as atividades enzimáticas obtidas empregando-se o fungo mesofílico *T. reesei* foram muito inferiores às obtidas quando empregado o termofílico *M. thermophila* no mesmo equipamento, mesmas taxas de aeração e respectivas temperaturas ótimas de crescimento, o que reitera a afirmação de que normalmente os fungos termofílicos secretam naturalmente enzimas mais ativas para substratos complexos (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BATH, 2000).

Pinto (2010), quando avaliou a produção de enzimas celulolíticas por FES empregando os fungos termofílicos *Thermoascus aurantiacus* e *Thermomyces lagunosus* e pelos mesofílicos *T. reesei* e *Penicillium viridicatum* em substrato composto por BC:FT 1:1 (m/m) com 80 % de umidade (b.u.), também já havia reportado que os microrganismos termofílicos estudados renderam, em sua maioria, melhores resultados de atividades CMC_{case} e xilanase em comparação aos resultados fornecidos pelo emprego dos fungos mesofílicos.

Com relação ao desempenho do processo, diferentemente dos resultados apresentados para o fungo *M. thermophila* em biorreator de 1,0 m, não houve uma clara tendência de que as atividades enzimáticas fossem mais baixas no último módulo. Tal resultado provavelmente decorre de o refluxo de água ser menor ou mesmo não ocorrer quando do cultivo do fungo mesofílico, já que, neste caso, a diferença entre as temperaturas no interior e no exterior do biorreator é menor. A distribuição de atividades ao longo do comprimento do biorreator foi aleatória e houve variação significativa entre os módulos ($\alpha = 0,05$), à exceção da FPA.

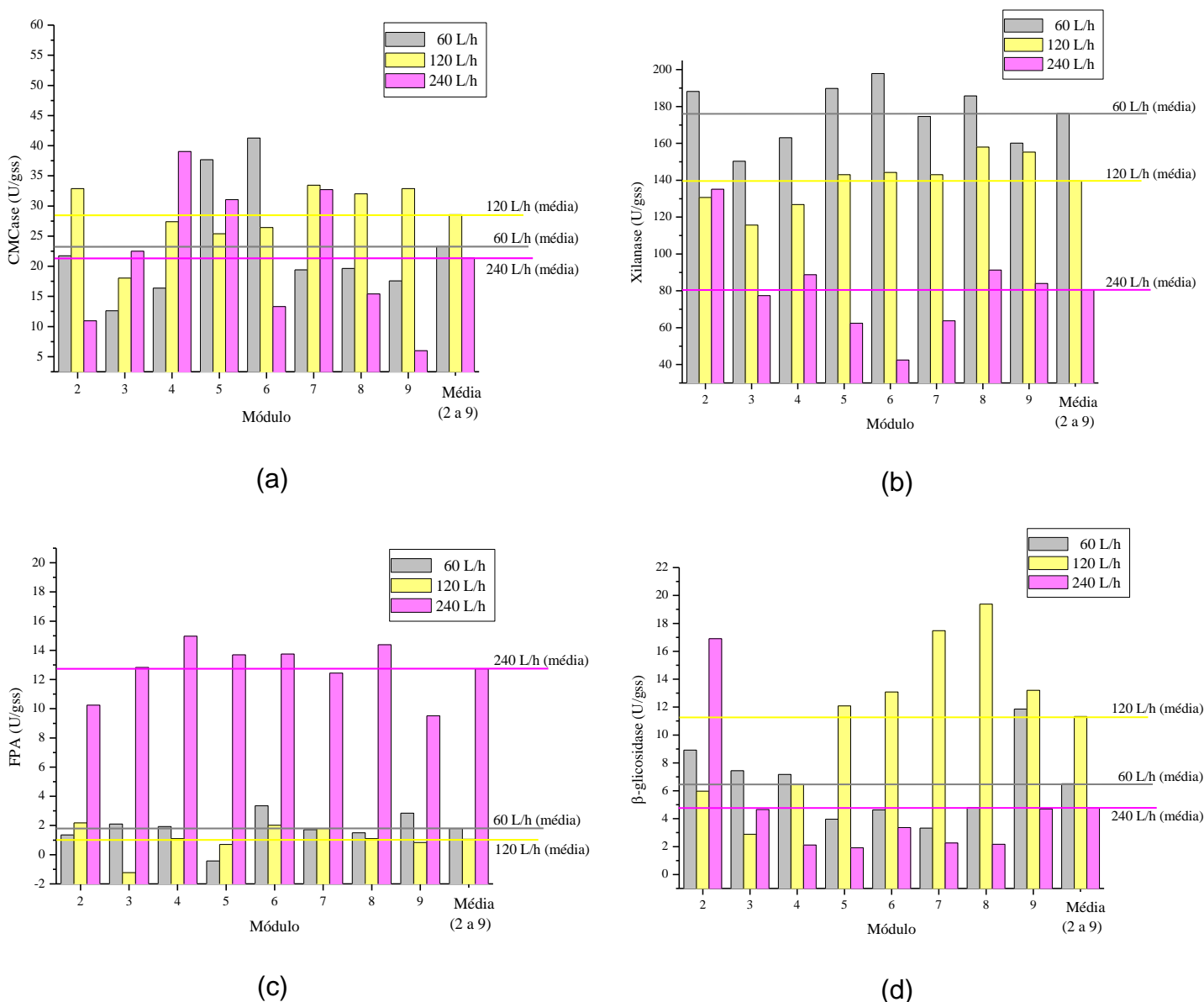


Figura 6.16. Atividades enzimáticas dos extratos obtidos a partir dos módulos de 2 a 9 do biorreator com 1,0 m de comprimento empregando o fungo *Trichoderma reesei* em BC:FT 9:1 (a) CMC_{Case}; (b) xilanase; (c) FPA; (d) β -glicosidase.

Para avaliação do efeito da taxa de aeração sobre as atividades enzimáticas obtidas de cada fermentação, foram consideradas as médias das atividades dos extratos obtidos a partir dos 8 módulos fermentativos do biorreator. Similarmente ao já pontuado para o fungo termofílico, a taxa de aeração é indicada pela análise de variância ($\alpha = 0,05$) como um fator significativo sobre as atividades das quatro enzimas (CMCase, xilanase, FPA e β -glicosidase), porém a comparação de médias por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) mais uma vez indica que as diferentes enzimas respondem de forma diferente ao aumento da vazão de ar.

Na Tabela 6.3, são apresentados os resultados do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), bem como os intervalos de confiança (IC) para as médias das atividades obtidas no biorreator para as três taxas de aeração, expressas em L/h e em vvm. Observe-se que as diferentes atividades foram influenciadas de formas distintas pela taxa de aeração do biorreator. Neste caso, as amplitudes dos ICs foram baixas para as três taxas de aeração, não sendo possível estabelecer uma relação de maior estabilidade do processo para vazões de ar maiores ou menores.

Tabela 6.3. Teste de Tukey e intervalos de confiança (IC) para as atividades enzimáticas médias produzidas por *T. reesei* no biorreator com 1,0 m ($\alpha = 0,05$).

Taxa de aeração (L/h)	Taxa de aeração (vvm)	CMCase		Xilanase	
		Média*	IC	Média*	IC
60	0,27	23,3 ^b	(21,1; 25,5)	176,2 ^a	(168,0; 184,5)
120	0,55	28,6 ^a	(26,3; 30,8)	139,6 ^b	(131,3; 147,8)
240	1,10	21,4 ^b	(19,1; 23,6)	80,6 ^c	(72,4; 88,9)
Taxa de aeração (L/h)	Taxa de aeração (vvm)	FPA		β -glicosidase	
		Média*	IC	Média*	IC
60	0,27	1,8 ^b	(1,1; 2,5)	6,5 ^b	(6,1; 6,9)
120	0,55	1,0 ^b	(0,4; 1,7)	11,3 ^a	(10,9; 11,7)
240	1,10	12,7 ^a	(12,0; 13,4)	4,7 ^c	(4,4; 5,1)

* Letras minúsculas diferentes numa mesma coluna indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da taxa de aeração; letras minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da taxa de aeração.

De acordo com a Tabela 6.3, a atividade CMCase média foi significativamente maior para a vazão de 120 L/h, tendo sido estatisticamente igual para 60 e 240 L/h. Similarmente, a atividade média de β -glicosidase também foi significativamente

maior para 120 L/h, e, respectivamente, intermediária e mínima para 60 e 240 L/h, ao passo que a atividade FPA foi significativamente maior para 240 L/h e estatisticamente igual para 60 e 120 L/h. Por fim, a atividade de xilanase foi significativamente maior para 60 L/h e, respectivamente, intermediária e mínima para 120 e 240 L/h. Acredita-se que as causas desses resultados, por sua vez, estejam mais associadas a fatores bioquímicos e microbiológicos que aos fenômenos de transferência de calor e de massa estudados neste projeto.

Nas Figuras 6.17 e 6.18 são apresentados, respectivamente, os perfis de temperatura em três posições longitudinais no centro do biorreator e os perfis de vazão de gás carbônico na corrente de saída do biorreator.

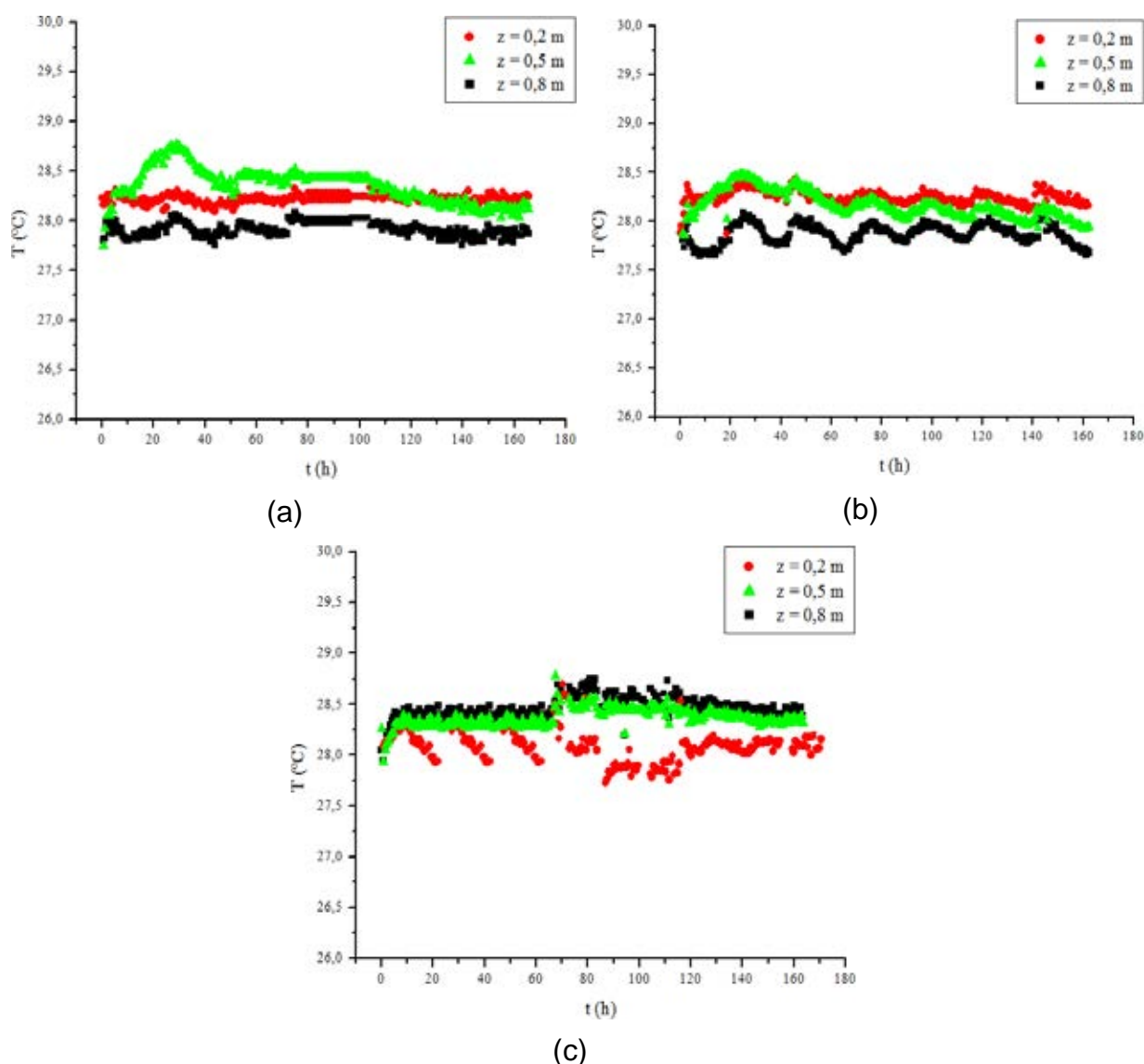


Figura 6.17. Temperatura ao longo da fermentação com *T. reesei* em BC:FT 9:1 no centro do biorreator com 1,0 m de comprimento: (a) 60 L/h; (b) 120 L/h; (c) 240 L/h.

Nas Figuras 6.17a a 6.17c, é possível observar que as temperaturas registradas ao longo da fermentação mantiveram-se em torno de 28,0 °C estabelecida como temperatura de processo para a fermentação empregando o fungo mesofílico *T. reesei*. A máxima temperatura registrada foi em torno de 28,5 °C, também neste caso não tendo ocorrido superaquecimento no interior do biorreator nem mesmo para a menor taxa de aeração. Ademais, neste caso, a variação de temperatura ao longo do comprimento do biorreator foi ainda menor que a observada na fermentação empregando o fungo termofílico. Tal resultado reforça a hipótese de que as propriedades estruturais do substrato e as condições operacionais e geométricas do biorreator favoreceram a boa dissipação do calor metabólico gerado pelo fungo mesofílico ao longo do processo, evitando o sobreaquecimento, fenômeno comumente reportado na literatura, sobretudo quando do emprego de microrganismos mesofílicos em biorreatores de FES em leito empacotado (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

Simulações do processo empregando o modelo heterogêneo bidimensional apresentado no Capítulo 5 desta tese também indicaram, para as três taxas de aeração saturada, que não ocorreria superaquecimento no leito. As máximas temperaturas previstas com taxas de aeração de 60, 120 e 240 L/h foram, respectivamente, 28,5, 28,3 e 28,2 °C, empregando-se os parâmetros do microrganismo determinados neste trabalho (Tabela 4.2) e as propriedades físicas e térmicas do leito e do substrato específicos para o sistema fermentativo em questão (Tabela 5.1) e as condições operacionais adotadas experimentalmente para o processo com este fungo, com os dados termodinâmicos corrigidos para a temperatura inicial de 28 °C. Por outro lado, se for desprezada a dispersão radial de calor no modelo, as máximas temperaturas previstas com taxas de aeração de 60, 120 e 240 L/h passam a ser, respectivamente, 40,0, 35,0 e 32,5 °C, novamente confirmando que a remoção de calor pela camisa é significativa no biorreator com 7,62 cm de diâmetro, confirmando-se como um dos principais fatores responsáveis pela não ocorrência de superaquecimento.

Mazzutti et al. (2010), em seu estudo sobre a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em biorreator de leito empacotado, tendo como substrato bagaço de cana-de-açúcar e farelo de soja embebidos com melaço e licor de maceração de milho, também investigaram o efeito da taxa de aeração sobre a dinâmica do processo. Similarmente ao observado no presente trabalho, aqueles

autores também observaram que o aumento da taxa de aeração volumétrica não afetou significativamente o perfil de temperaturas no biorreator ao longo do processo, devido à baixa capacidade calorífica do ar.

Quanto aos perfis de vazão de CO_2 (Figuras 6.18a a 6.18c), para a taxa de aeração 240 L/h (Figura 6.18c), por exemplo, os valores de vazão de CO_2 se mantiveram negativos ao longo de todo o processo, o que não quer dizer que o fungo não cresceu, mas que a concentração volumétrica do gás carbônico produzido esteve abaixo do limite de detecção da sonda. Ainda assim, foi possível visualizar um perfil temporal. No entanto, como as elevações de temperatura foram muito sutis, fica mais difícil relacionar os picos de concentração de gás carbônico com os picos de temperatura, embora os mesmos tenham parecido ocorrer por volta de 30 horas de fermentação sob taxas de aeração de 60 e 120 L/h (Figuras 6.18a e 6.18b, respectivamente) e mais tardiamente, por volta de 90 horas de cultivo, para vazão de 240 L/h (Figura 6.18c).

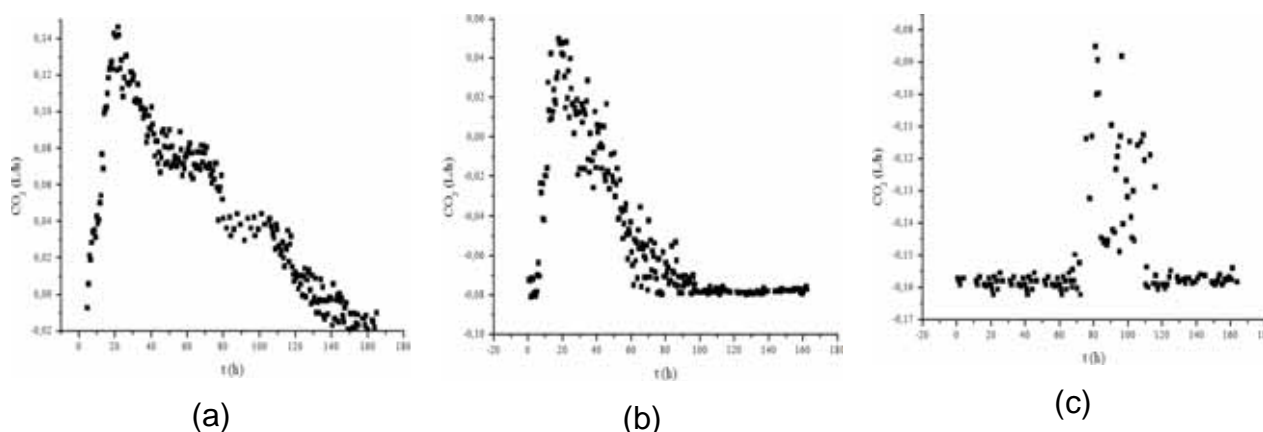


Figura 6.18. Vazão de CO_2 na corrente de saída na fermentação com *T. reesei* em BC:FT 9:1 no biorreator com 1,0 m: (a) 60 L/h; (b) 120 L/h; (c) 240 L/h.

Na Figura 6.19, são apresentadas as umidades finais do material fermentado por *T. reesei* nas três taxas de aeração empregadas. À exceção do ensaio com taxa de aeração 240 L/h, o perfil axial de umidade foi homogêneo. A secagem do substrato ocorreu somente para a maior taxa de aeração, o que pode ter sido decorrente de uma deficiência na saturação do ar. De todo modo, a produção de enzimas não foi prejudicada por essa secagem, como pode ser visto na Figura 6.16.

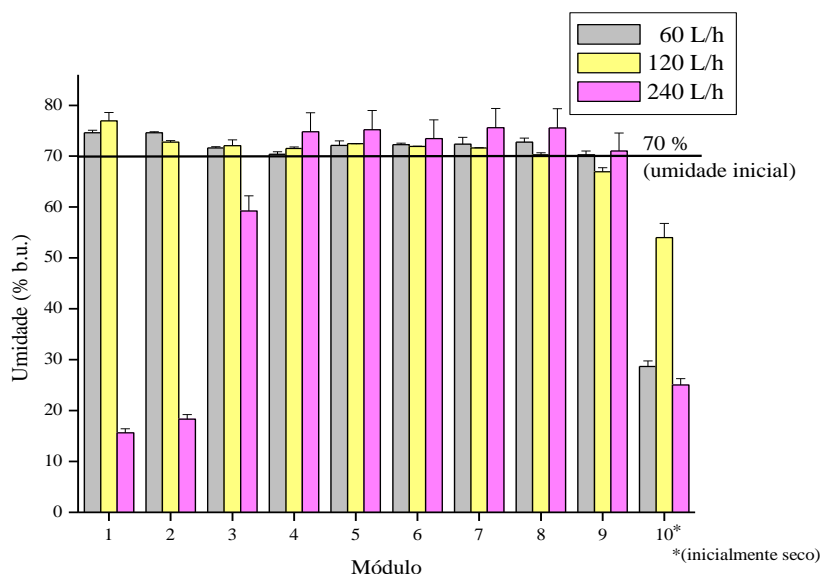


Figura 6.19. Umidade final do material (BC:FT 9:1) fermentado por *T. reesei* ao longo do biorreator com 1,0 m de comprimento e três taxas de aeração.

6.2.2 Biorreator com comprimento total 0,4 m e substrato FT puro

Um teste fermentativo empregando como substrato FT puro também foi feito empregando-se como agente fermentativo o fungo mesofílico *Trichoderma reesei* QM-9414, a fim de se avaliar o efeito da porosidade do meio no controle térmico do biorreator. Da mesma forma que para *M. thermophila*, esse teste foi realizado em biorreator com 0,4 m de comprimento total, sendo 0,2 m de seção fermentativa, taxa de aeração 45 L/h e umidade inicial do substrato 65 % (b.u.). Nestas condições, Ghildyal et al. (1994), estudando a produção de amiloglucosidase pelo fungo também mesofílico *Aspergillus niger* CFTRI 1105 em biorreator de coluna com 0,35 m de comprimento total e 15 cm de diâmetro, tiveram grave problema de superaquecimento. A temperatura máxima atingida foi de 52,0 °C ao longo da fermentação, ao passo que a temperatura ideal do processo deveria ser de 35,0 °C. O problema fora resolvido mediante aumento da taxa de aeração em cinco vezes.

Nas Figuras 6.20a e 6.20b são fornecidos, respectivamente, os perfis de temperatura em três posições longitudinais no centro do biorreator e o perfil de vazão de gás carbônico na corrente de saída do biorreator.

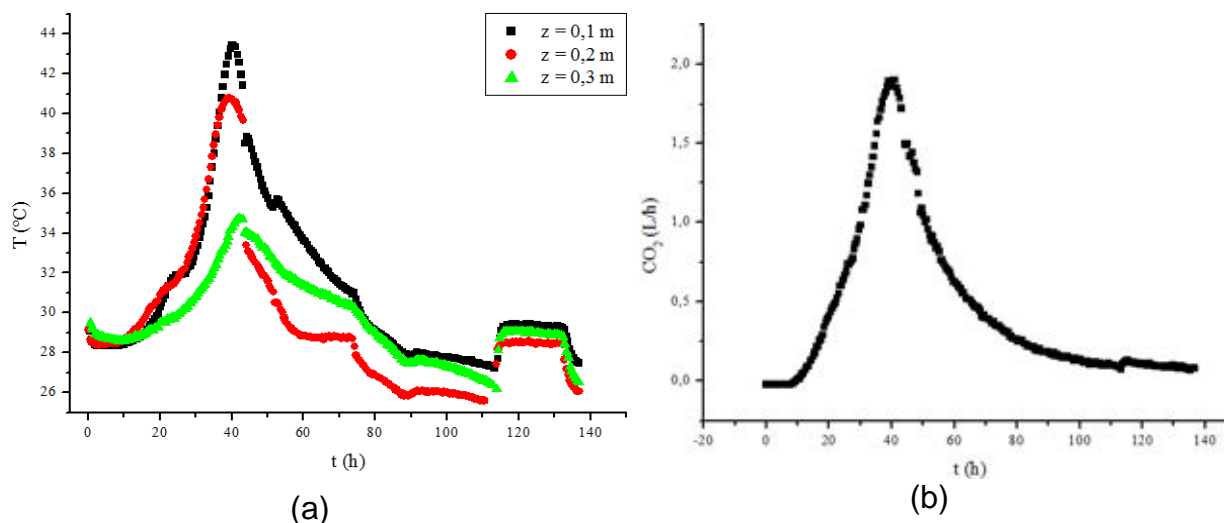


Figura 6.20. (a) Temperaturas em três posições longitudinais medidas no centro do biorreator; (b) Vazão de CO_2 na corrente de saída, ao longo da fermentação com *T. reesei* em farelo de trigo com 0,4 m de comprimento e taxa de aeração 45 L/h.

Diferentemente dos cultivos em BC:FT 9:1, um aumento de temperatura muito intenso no interior do biorreator pôde ser visualizado na Figura 6.20a, sobretudo nas posições axiais $z = 0,1$ e $0,2$ m. No ponto central do leito, a temperatura superou 43,0 $^{\circ}\text{C}$, cerca de 15,0 $^{\circ}\text{C}$ acima da temperatura ótima do processo. Quando do cultivo em BC:FT 9:1 (m/m), a temperatura não ultrapassara 29,0 $^{\circ}\text{C}$ nem mesmo para taxa de aeração de 60 L/h em biorreator com comprimento total 1,0 m. Portanto, pode-se inferir que a porosidade do substrato é fator determinante para a homogeneidade térmica do biorreator, sobretudo para agente fermentativo mesofílico, uma vez que a elevação de temperatura em FT foi mais elevada que para o fungo termofílico. Pode-se afirmar que o substrato contendo alta proporção de fibras de bagaço de cana propicia a remoção do calor gerado metabolicamente ao longo do processo, não requerendo taxas de aeração tão elevadas.

Observe-se ainda, comparando-se as Figuras 6.20a e 6.20b, que o aumento da vazão de CO_2 na corrente de saída do biorreator foi novamente simultâneo ao aumento de temperatura no interior do leito, indicando que o aquecimento do sistema deu-se em consequência do aumento da geração de calor metabólico na fase de crescimento acelerado do fungo. Porém, no caso do cultivo em farelo puro, o aumento da vazão de CO_2 na corrente de saída do biorreator foi muito mais intenso que quando do cultivo em BC:FT 9:1 (m/m).

Na Figura 6.21, são apresentadas as umidades finais do farelo fermentado por *T. reesei*, bem como o aspecto do material ao final da fermentação.

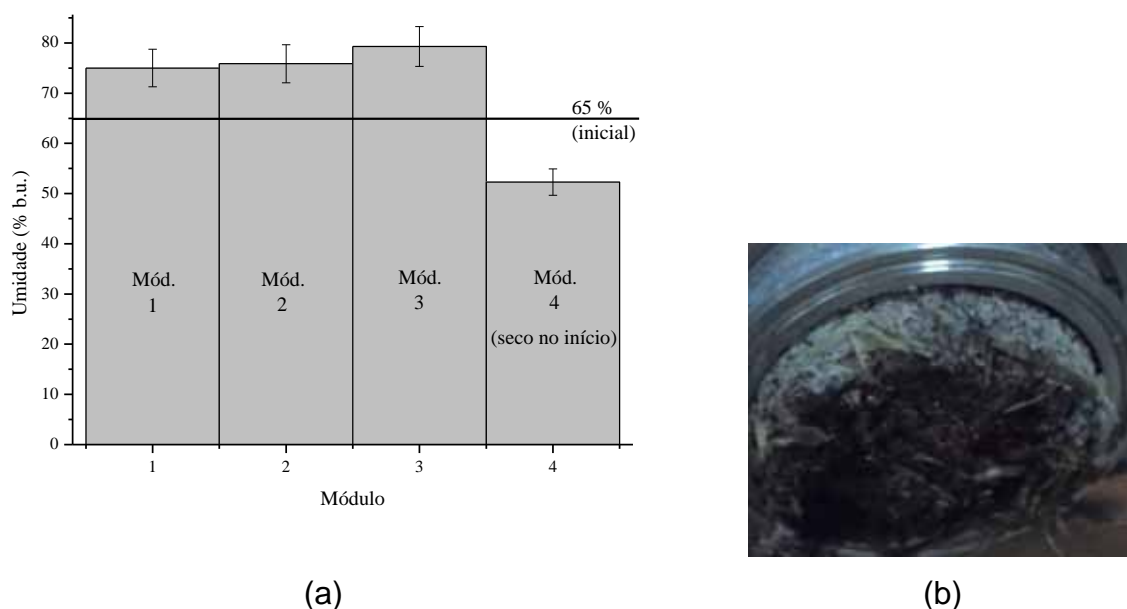


Figura 6.21. (a) Umidade final do material (farelo de trigo como substrato) fermentado por *T. reesei* ao longo do biorreator com 0,4 m de comprimento e taxa de aeração 45 L/h; (b) Aspecto do fermentado.

Também neste caso, embora o aumento de temperatura no centro do leito tenha sido muito elevado, o perfil axial de umidade final do fermentado foi homogêneo, como visto na Figura 6.21a, indicando a não ocorrência de secagem do substrato ao longo da fermentação. Pode-se supor que, dentro de um mesmo módulo, a concentração de água não foi alterada. Se, por um lado, houve remoção de umidade do substrato localizado no centro do módulo, deve ter ocorrido condensação de umidade nas proximidades da parede, onde a temperatura manteve-se próxima dos 28,0 °C. Ademais, o refluxo de água no topo do leito pode ter aumentado, haja vista a maior diferença de temperatura estabelecida entre o interior e o exterior do fermentador mediante sobreaquecimento ao longo do processo.

Por fim, na fotografia apresentada na Figura 6.21b, observou-se o mesmo comportamento já observado anteriormente na Figura 6.13b. Também para o fungo mesofílico cultivado em FT puro, a colonização do substrato deu-se somente no contorno do leito, pelos mesmos motivos já discutidos anteriormente para o fungo

termofílico. Os resultados expostos reiteram a importância de se encontrar uma boa combinação microrganismo, substrato e condições operacionais que propiciem um bom desempenho global dos processos de FES em biorreatores de leite empacotado.

6.3 Fermentação com *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em biorreator com 20 cm de diâmetro interno

6.3.1 Biorreator com comprimento total 1,0 m e substrato BC:FT 7:3

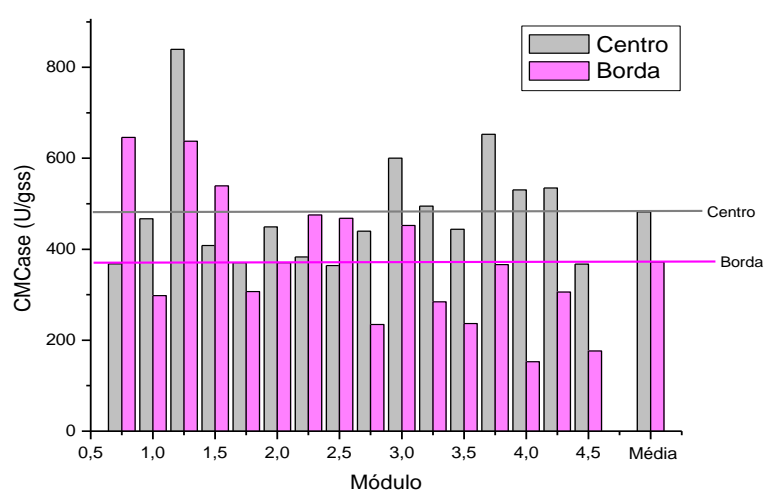
Nas Figuras 6.22a e 6.22b, são apresentadas, respectivamente, as atividades CMCase e xilanase dos extratos obtidos empregando-se o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em substrato BC:FT 7:3 (m/m) no biorreator com 1,0 m de comprimento total (porção fermentativa a partir da metade da altura do módulo 1, indicada na figura como módulo 0,5, até metade da altura do módulo 5, indicada como módulo 4,5), em função do comprimento, para centro e borda do leite e com taxa de aeração 900 L/h. As linhas horizontais referem-se às atividades médias no biorreator, dadas a partir da média das atividades obtidas, para centro e borda, em cada uma das 16 divisões axiais da seção fermentativa.

Em média, para CMCase, foram observadas atividades mais elevadas nos extratos obtidos do centro que nos obtidos da borda do leite. Ao contrário, para xilanase, as atividades dos extratos obtidos da borda foram maiores que dos obtidos do centro. Longitudinalmente, as atividades xilanase e CMCase foram aproximadamente homogêneas, tendo-se observado valores abaixo da média apenas nas proximidades da entrada e da saída do leite. Tais resultados podem estar associados aos perfis de temperatura e de umidade estabelecidos ao longo da fermentação, como será visto adiante.

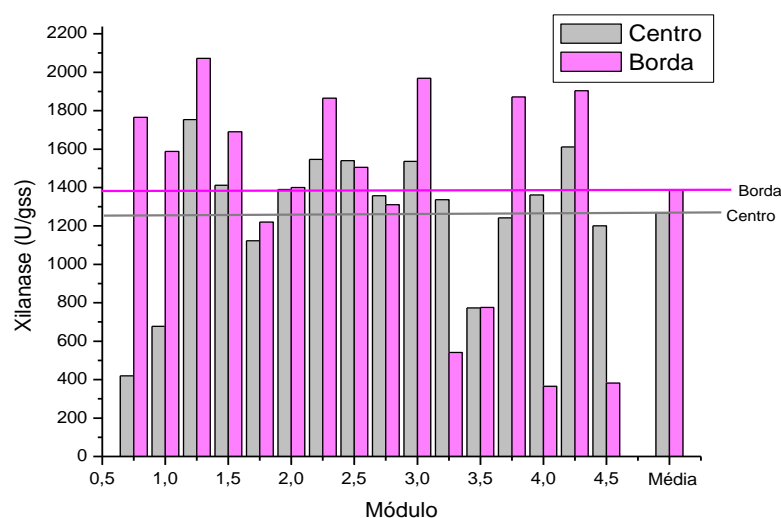
Essas tendências da distribuição das atividades enzimáticas no biorreator foram confirmadas por análise de variância e por comparação de médias por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) tendo como fontes de variação as posições radial e axial no leite. O resultado de comparação das médias está sumarizado na Tabela 6.4.

Considerando-se as médias por módulo, a atividade CMCase foi significativamente maior para a porção de material fermentado obtida do centro do leite. Por outro lado, a atividade de xilanase não foi influenciada pela posição radial.

A posição axial não teve efeito significativo sobre as atividades, indicando que os rendimentos em termos de CMCCase e xilanase foram homogêneos ao longo do comprimento do biorreator. No entanto, ressalve-se que a certa aleatoriedade de alguns pontos pode estar associada a efeitos de amostragem, uma vez que a divisão do leito para tomada do material fermentado para extração foi arbitrária, estando sujeita a variações, com maior ou menor diluição das enzimas extraídas. No fermentador com 7,62 cm de diâmetro interno, todo o conteúdo do módulo era utilizado para extração, reduzindo a interferência da amostragem.



(a)



(b)

Figura 6.22. Atividades enzimáticas dos extratos obtidos a partir dos módulos 0,5 a 4,5 do biorreator com 20 cm de diâmetro e 1,0 m de comprimento total empregando o fungo *Myceliophthora thermophila* em BC:FT 7:3 (a) CMCCase; (b) xilanase.

Tabela 6.4. Teste de Tukey para as atividades enzimáticas produzidas por *M. thermophila* no biorreator com 5 módulos (D = L = 20 cm cada módulo) ($\alpha = 0,05$).

Módulo	CMCase			Xilanase		
	Posição radial			Posição radial		
	Centro (r = 0 – 5 cm)	Borda (r = 5 – 10 cm)	Média (radial) ←	Centro (r = 0 – 5 cm)	Borda (r = 5 – 10 cm)	Média (radial) ←
1	417,5	471,9	444,7 ^a	547,9	1676,2	1112,1 ^a
2	516,8	463,5	490,1 ^a	1419,2	1595,6	1507,4 ^a
3	446,8	407,4	427,1 ^a	1495,1	1662,3	1578,7 ^a
4	530,4	260,2	395,3 ^a	1178,4	888,3	1033,3 ^a
5	451,0	241,3	346,2 ^a	1405,8	1143,2	1274,5 ^a
Média (axial) ↑	472,5 ^A	368,9 ^B		1209,3 ^A	1393,1 ^A	

* Letras maiúsculas diferentes numa mesma linha indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da posição radial, para média das posições axiais; letras minúsculas diferentes numa mesma coluna indicam que há diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da posição axial, para média das posições radiais; letras maiúsculas iguais numa mesma linha e minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido aos efeitos das posições radial (para média das posições axiais) e axial (para média das posições radiais), respectivamente.

Comparando-se as atividades médias atingidas nos reatores com 7,62 e 20 cm de diâmetro interno, observa-se que a ampliação de escala não prejudicou significativamente o rendimento em CMCase, embora a atividade xilanase se tenha reduzido. No reator estreito, foram obtidas atividades CMCase e xilanase médias de 547 e 2027 U/gss sob taxa de aeração 120 L/h, respectivamente; no largo, essas atividades foram 421 e 1301 U/gss sob taxa de aeração 900 L/h. O aumento da taxa de aeração de 120 para 900 L/h corresponde ao aumento de volume do biorreator estreito para o largo, mantendo o parâmetro vvm e a velocidade superficial do ar aproximadamente constantes. De todo modo, o resultado obtido pode ainda ser considerado promissor, tendo em vista a escala semi-piloto do equipamento e a possibilidade de otimização mediante aumento da taxa de aeração e melhoria do controle térmico do sistema.

Nas Figuras 6.23a a 6.23c, são dados os perfis de temperatura em várias posições radiais e longitudinais da seção fermentativa do biorreator com 1,0 m de comprimento total ao longo da fermentação com o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em substrato BC:FT 7:3 (m/m), sob taxa de aeração 900 L/h. Na Figura 6.23d, é apresentada uma fotografia do interior de um módulo ao final do processo, com intuito de ilustrar a distribuição do crescimento do fungo no material fermentado.

Nas Figuras 6.23a a 6.23c, é possível observar que ocorreram perfis térmicos radiais (Figura 6.23a) e axiais (Figuras 6.23b e 6.23c) consideráveis no fermentador com 20 cm de diâmetro. As temperaturas registradas ao longo da fermentação mantiveram-se entre 45 e 54 °C. A máxima temperatura foi registrada no eixo central radial e entre os módulos fermentativos. Neste caso, portanto, diferentemente do caso do biorreator com 7,62 cm de diâmetro, o aumento da distância do eixo central ao contorno resfriado, no caso do biorreator com 20 cm de diâmetro, acarretou sobreaquecimento não desprezível no interior do leito.

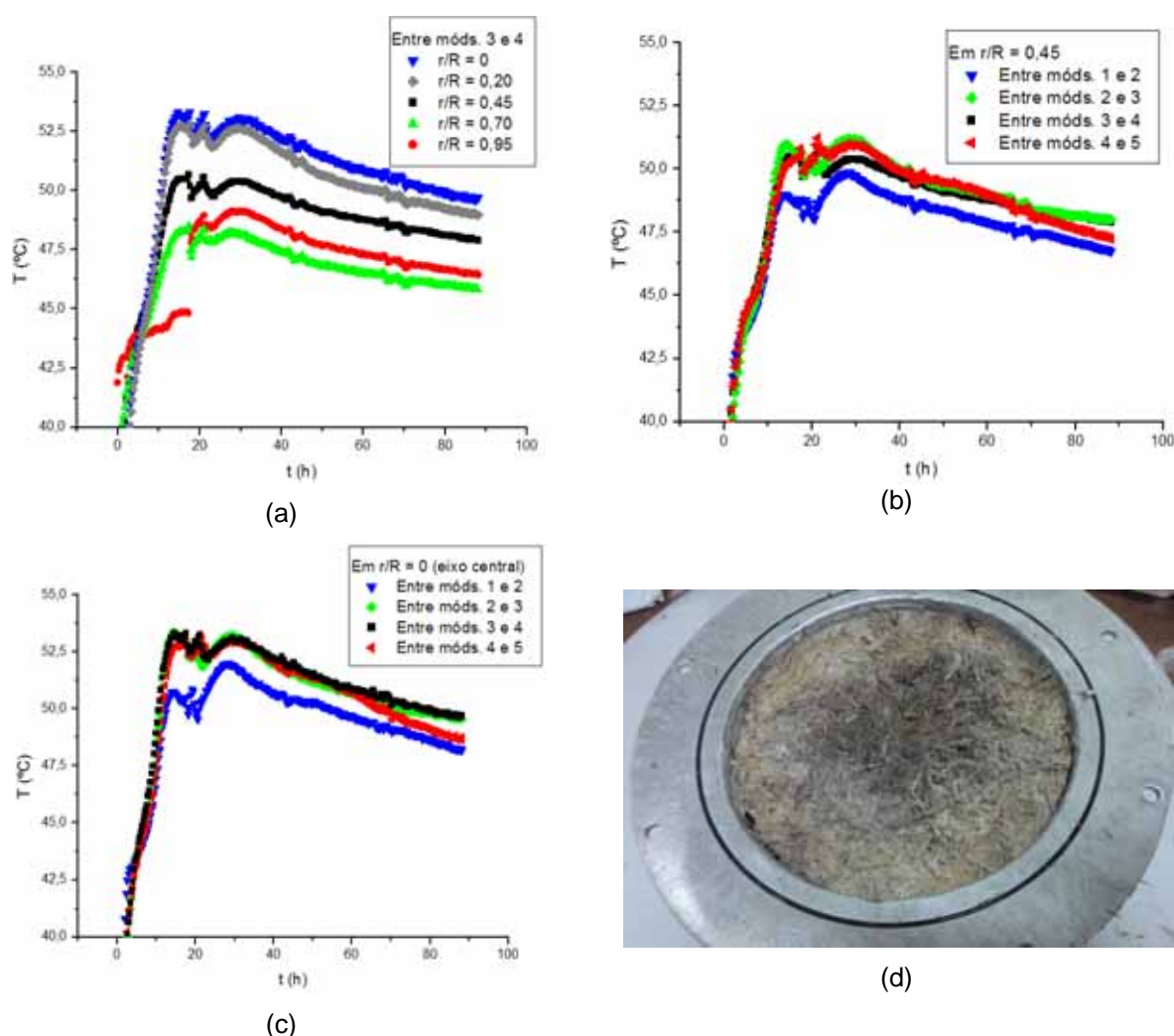


Figura 6.23. Fermentação com *M. thermophila* em BC:FT 7:3 no biorreator com 20 cm de diâmetro e 1,0 m de comprimento: (a) temperatura ao longo do tempo em várias posições radiais, entre módulos 3 e 4; (b) temperatura ao longo do tempo em várias posições axiais, em $r/R = 0,45$; (c) temperatura ao longo do tempo em várias posições axiais, em $r/R = 0$ (eixo central); (d) módulo ao final da fermentação.

A variação de temperatura ao longo do comprimento do biorreator, por sua vez, foi relativamente baixa, indicando uma boa homogeneidade térmica axial, à exceção do primeiro ponto axial após a entrada do leito, entre os módulos 1 e 2. Nesta região, devido à proximidade da entrada do ar, a secagem do meio sólido faz com que sua temperatura seja mantida próxima à de bulbo úmido, portanto menor que as temperaturas nas zonas mais distantes da entrada. A não variação axial da temperatura pode indicar que a taxa de aeração empregada é suficientemente alta para que a remoção de calor por convecção seja eficiente, apesar da baixa capacidade calorífica do ar. Também pode indicar que, embora a influência da camisa não seja capaz de resfriar até o centro do leito, ela contribui para com o não sobreaquecimento excessivo módulo a módulo do biorreator, uma vez que a circulação de água é independente ao longo do comprimento.

Na Figura 6.23d, é possível observar que houve maior colonização do substrato pelo fungo no contorno da matriz porosa, denotada pela coloração branca do fermentado, conferida pela alta concentração de micélio fúngico. No centro do leito, a coloração do material fermentado ao final do processo foi mais escura, devido à menor concentração de micélio fúngico. O menor grau de colonização do centro do leito pode ser atribuído ao maior sobreaquecimento ocorrido naquela região, em comparação às regiões mais próximas do contorno resfriado.

Simulações do processo empregando o modelo heterogêneo bidimensional apresentado no Capítulo 5 desta tese também indicaram que deveria ocorrer sobreaquecimento no leito para o biorreator mais largo. A máxima temperatura prevista pelo modelo foi 50,0 °C, empregando-se os parâmetros do microrganismo e as propriedades físicas e térmicas do leito e do substrato, mediante as condições operacionais adotadas experimentalmente. Se for desprezada a dispersão radial de calor no modelo, a máxima temperatura prevista passa a ser 51,0 °C, indicando que a remoção de calor pela camisa é bem menos significativa no biorreator com 20 cm de diâmetro, podendo ser um dos principais fatores responsáveis pela ocorrência de superaquecimento ao longo da fermentação. Ainda assim, o rendimento em termos de atividade de endoglucanase e xilanase pode ser considerado satisfatório.

Na Figura 6.24, são apresentadas as umidades finais do material BC:FT 7:3 (m/m) fermentado por *M. thermophila* em função do comprimento do biorreator com 1,0 m ou 5 módulos de comprimento total.

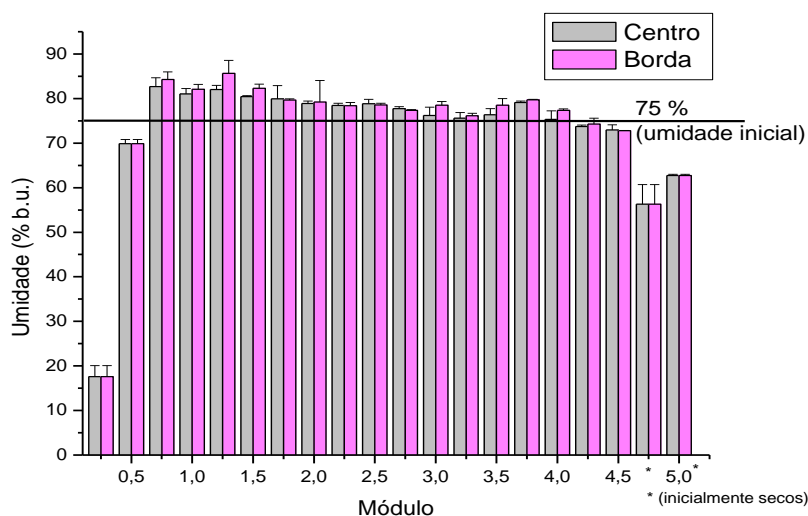


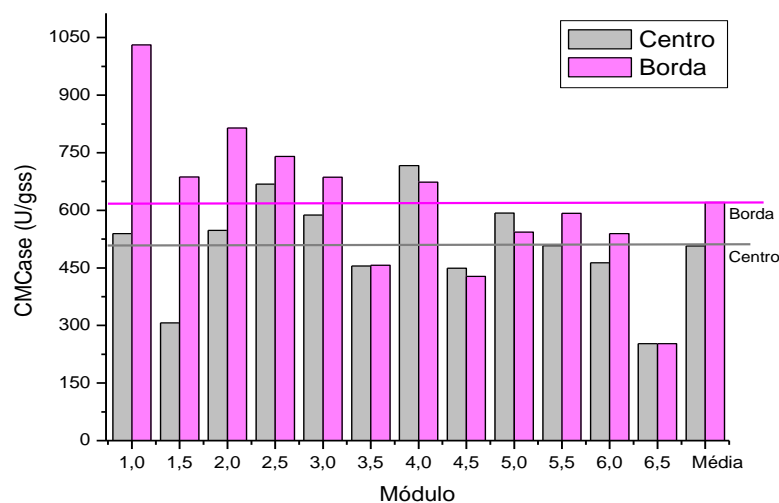
Figura 6.24. Umidade final do material (BC:FT 7:3) fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator com 20 cm de diâmetro, 1,0 m de comprimento, sob taxa de aeração 900 L/h.

Lembre-se que a seção fermentativa foi compreendida entre a metade superior e a metade inferior dos módulos 1 e 5, respectivamente. A metade inferior e a metade superior dos módulos 1 e 5, por sua vez, foram empacotadas, respectivamente, com bagaço de cana grosso com umidade inicial 75 % (b.u.) e com bagaço grosso inicialmente seco. Apesar da reposição frequente da água na coluna de umidificação, encamisada juntamente com a seção de entrada, houve remoção de água do módulo da base, mais próximo da entrada do ar, provavelmente devido à não saturação do ar na entrada do leito. De todo modo, não houve secagem nas porções fermentativas do leito, de modo que tal remoção de umidade não prejudicou o rendimento de atividade enzimática. No topo do leito, houve condensação da água transportada pelo ar, devido à diferença de temperatura entre o interior da seção de saída do leito e o ambiente externo, o que aumentou o conteúdo de umidade do bagaço inicialmente seco utilizado próximo à saída do biorreator, como já havia sido observado no biorreator de menor diâmetro.

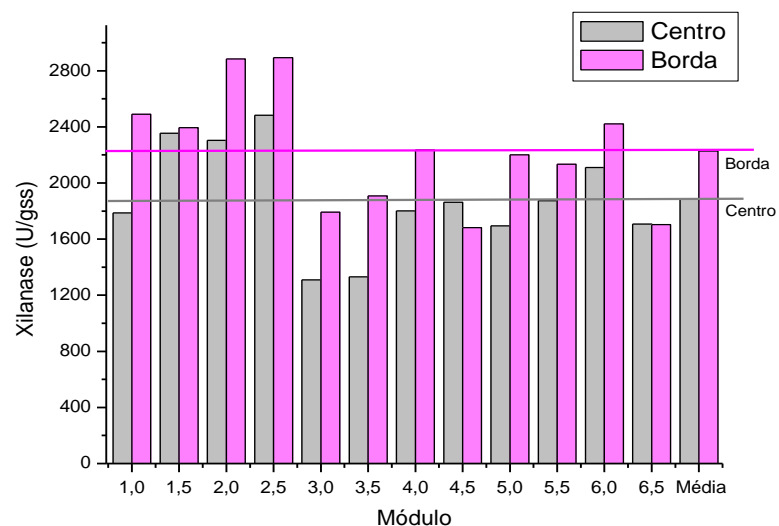
6.3.2 Biorreator com comprimento total 1,4 m e substrato BC:FT 7:3

Nas Figuras 6.25a e 6.25b, são apresentadas, respectivamente, as atividades CMCase e xilanase dos extratos obtidos empregando o fungo *Myceliophthora*

thermophila I-1D3b em substrato BC:FT 7:3 (m/m) no biorreator com 1,4 m de comprimento total (porção fermentativa a partir da metade da altura do módulo 1 até metade da altura do módulo 7), em função do comprimento, para centro e borda do leito e com taxa de aeração 1500 L/h. As linhas horizontais referem-se às atividades médias no biorreator, dadas a partir da média das atividades obtidas, para centro e borda, em cada uma das 12 divisões axiais da seção fermentativa.



(a)



(b)

Figura 6.25. Atividades enzimáticas dos extratos obtidos a partir dos módulos 0,5 a 6,5 do biorreator com 20 cm de diâmetro e 1,4 m de comprimento total empregando o fungo *Myceliophthora thermophila* em BC:FT 7:3 (a) CMCCase; (b) xilanase.

Em média, tanto para CMCase quanto para xilanase, foram observadas atividades mais elevadas nos extratos obtidos da borda que nos obtidos do centro do leito. Longitudinalmente, as atividades de xilanase foram homogêneas, ao passo que as de CMCase variaram mais significativamente ao longo do comprimento. Essas tendências da distribuição das atividades enzimáticas no biorreator foram confirmadas por análise de variância e por comparação de médias por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) tendo como fontes de variação as posições radial e axial do fermentado no leito.

O resultado de comparação das médias está sumarizado na Tabela 6.5. Considerando-se as médias por módulo, ambas as atividades CMCase e xilanase foram estatisticamente maiores para a porção de material fermentado obtida da borda do leito. A posição axial teve efeito significativo sobre a atividade CMCase, indicando que, no caso do biorreator mais longo, é mais difícil obter atividades enzimáticas homogêneas ao longo do comprimento do leito. Novamente, os desvios podem estar associados aos efeitos de amostragem arbitrária do leito.

Tabela 6.5. Teste de Tukey para as atividades enzimáticas produzidas por *M. thermophila* no biorreator com 1,4 m ($\alpha = 0,05$).

Módulo	CMCase			Xilanase		
	Posição radial		Média (radial) ←	Posição radial		Média (radial) ←
	Centro (r = 0 – 5 cm)	Borda (r = 5 – 10 cm)		Centro (r = 0 – 5 cm)	Borda (r = 5 – 10 cm)	
1	539,3	1030,9	785,1 ^a	1785,7	2489,8	2137,8 ^a
2	427,2	750,5	588,8 ^{ab}	2329,3	2639,1	2484,2 ^a
3	627,9	713,2	670,6 ^b	1896,3	2342,9	2119,6 ^a
4	585,8	565,0	575,4 ^b	1566,0	2071,4	1818,7 ^a
5	521,0	485,3	503,2 ^b	1778,9	1941,8	1860,4 ^a
6	485,7	565,7	525,7 ^b	1991,5	2276,9	2134,2 ^a
7	252,5	252,3	252,4 ^c	1706,1	1702,7	1704,4 ^a
Média (axial) ↑	491,4 ^B	623,3 ^A		1864,8 ^B	2209,2 ^A	

* Letras maiúsculas diferentes numa mesma linha indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da posição radial, para média das posições axiais; letras minúsculas diferentes numa mesma coluna indicam que há diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da posição axial, para média das posições radiais; letras maiúsculas iguais numa mesma linha e minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido aos efeitos das posições radial (para média das posições axiais) e axial (para média das posições radiais), respectivamente.

Nas Figuras 6.26a a 6.26c, são dados os perfis de temperatura em várias posições radiais e longitudinais da seção fermentativa do biorreator. Na Figura 6.26d, é apresentada uma fotografia do interior de um módulo ao final do processo, com intuito de ilustrar a distribuição do crescimento do fungo no material fermentado. Nas Figuras 6.26a a 6.26c, é possível observar que, também para o maior comprimento do leito e com maior vazão de ar percolante, ocorreram perfis de temperatura radiais (Figura 6.26a) e axiais (Figuras 6.26b e 6.26c) consideráveis no fermentador com 20 cm de diâmetro e 1,4 m de comprimento total.

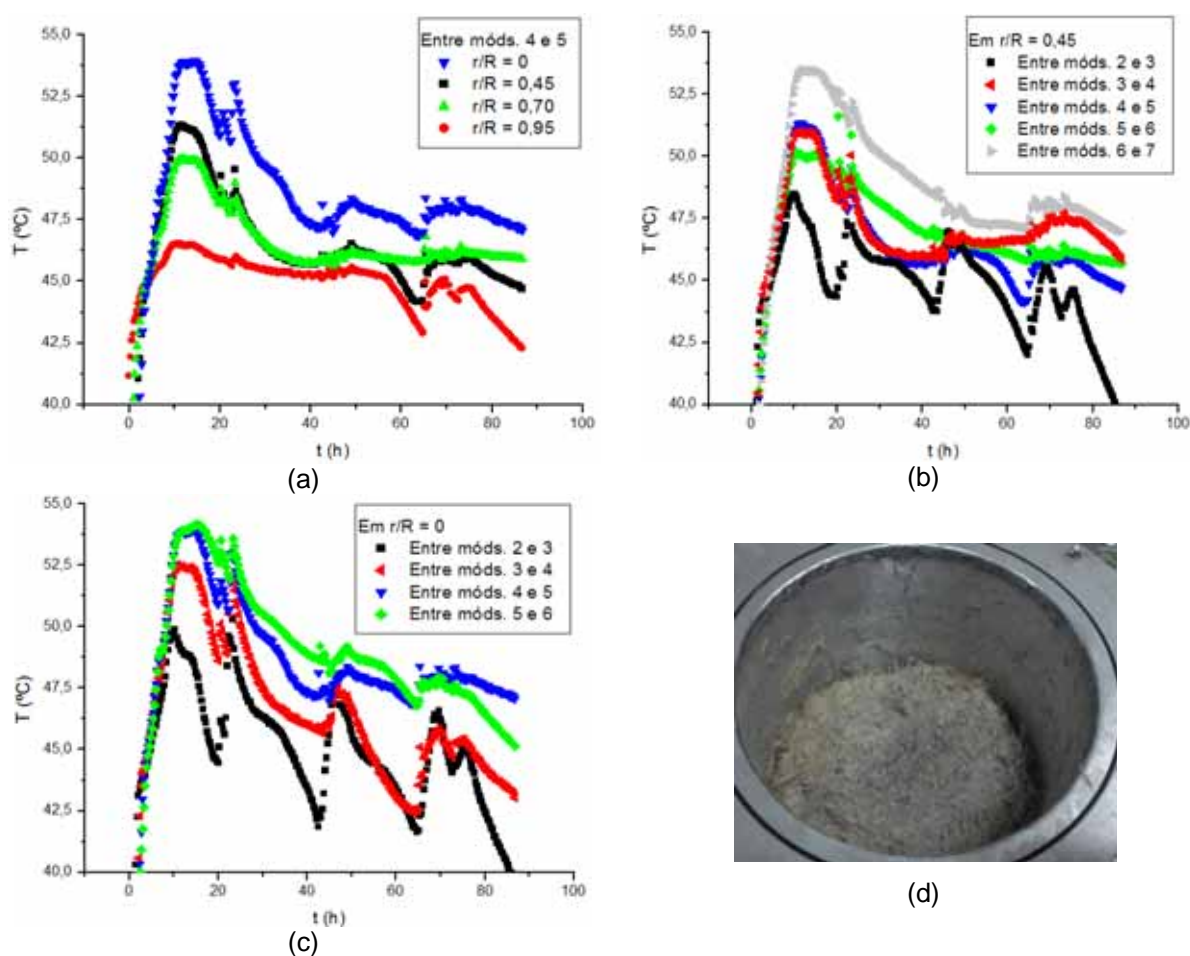


Figura 6.26. Fermentação com *M. thermophila* em BC:FT 7:3 no biorreator com 20 cm de diâmetro e 1,4 m de comprimento total: (a) temperatura ao longo do tempo em várias posições radiais, entre módulos 4 e 5; (b) temperatura ao longo do tempo em várias posições axiais, em $r/R = 0,45$; (c) temperatura ao longo do tempo em várias posições axiais, em $r/R = 0$ (eixo central); (d) módulo ao final da fermentação.

Similarmente ao biorreator com 1,0 m de comprimento total sob taxa de aeração 900 L/h, as temperaturas registradas ao longo da fermentação mantiveram-se entre 45 e 54 °C também no biorreator com 1,4 m de comprimento total sob taxa de aeração 1500 L/h, mantendo-se ainda a observação de que a máxima temperatura foi registrada no eixo central radial e entre módulos fermentativos consecutivos. Como já discutido, o aumento da distância do eixo central ao contorno resfriado no leito com 20 cm de diâmetro acarretou sobreaquecimento no interior do meio fermentativo, em decorrência da geração de calor metabólico.

Neste caso, como a velocidade superficial do ar foi maior no biorreator com 1,4 m de comprimento (vazão de ar 1500 L/h), a temperatura máxima atingida até o módulo 5 foi menor que no caso do biorreator com 1,0 m de comprimento total (taxa de aeração 900 L/h). A temperatura superou 52,5 °C no eixo central do leito somente a partir de 0,8 m de altura. Em $r/R = 0,45$, a temperatura foi maior que 51,0 °C somente entre os 2 módulos fermentativos mais elevados do leito (6 e 7). Por outro lado, como o modelo prevê aumento da temperatura em direção à saída do leito, quanto mais longo for o leito, maior será a temperatura na saída. Conseqüentemente, a variação longitudinal de temperatura no biorreator foi mais expressiva, indicando maior heterogeneidade térmica em função da posição axial, o que pode explicar também a heterogeneidade axial de atividade CMCase.

Finalmente, na Figura 6.26d, é possível observar que, no caso do biorreator com 1,4 m sob taxa de aeração 1500 L/h, o crescimento fúngico foi radialmente mais homogêneo que no biorreator com 1,0 m sob 900 L/h. Observe-se que o material fermentado em toda a seção transversal apresentou coloração esbranquiçada, devido à colonização pelo fungo. Como os perfis radiais de temperatura foram similares, isso pode denotar que a transferência de oxigênio no interior do meio poroso foi mais favorável ao crescimento do microrganismo quando empregada a maior taxa de aeração, que resultara em maior vvm (0,568 vvm para 1500 L/h contra 0,477 vvm para 900 L/h) e também em maior velocidade superficial do gás. A taxa de aeração de 1500 L/h no leito com 20 cm de diâmetro interno resulta em velocidade superficial de 0,0133 m/s, próxima à equivalente à vazão de 240 L/h no equipamento com 7,62 cm de diâmetro, 0,0146 m/s, condição mais favorável à produção de enzimas CMCase e xilanase.

Simulações do processo empregando o modelo heterogêneo bidimensional apresentado no Capítulo 5 desta Tese novamente indicaram que deveria ocorrer

superaquecimento no leito para o biorreator mais longo, porém menos intenso que o caso anterior, devido à maior velocidade superficial do ar neste segundo teste. A máxima temperatura prevista pelo modelo foi 49,5 °C. Se desprezada a dispersão radial de calor, a máxima temperatura prevista passa a ser 51,0 °C, reiterando que a remoção de calor pela camisa é pouco significativa no biorreator com 20 cm de diâmetro, com relevante contribuição da velocidade superficial do ar percolante. Ainda assim, o rendimento do processo em termos de atividade de endoglucanase e xilanase foi bastante satisfatório.

Na Figura 6.27, são apresentadas as umidades finais do material BC:FT 7:3 (m/m) fermentado por *M. thermophila* em função do comprimento do biorreator. Novamente, apesar da reposição frequente da água na coluna de umidificação do ar, acredita-se que houve intervalos em que o ar entrou no biorreator abaixo da saturação, tendo em vista a secagem do material no módulo de entrada, conforme visto na Figura 6.27. Além disso, neste caso em que a velocidade superficial do ar foi mais alta, observou-se maior secagem do material da borda que do centro, o que pode ser explicado pelo escoamento preferencial de ar através dos canais junto à parede do leito. De todo modo, o conteúdo de umidade do fermentado nas seções fermentativas manteve-se por volta do valor ótimo inicial, tendo-se observado crescimento fúngico satisfatório em todo o leito.

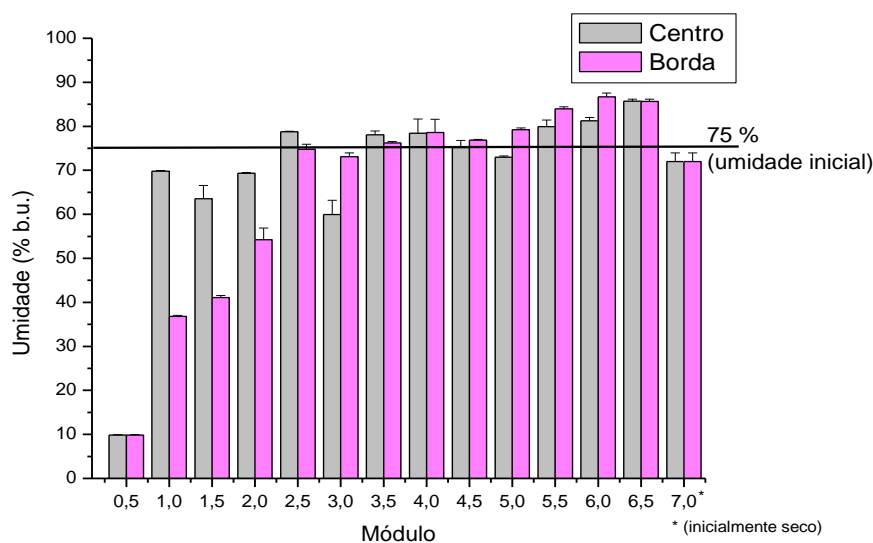
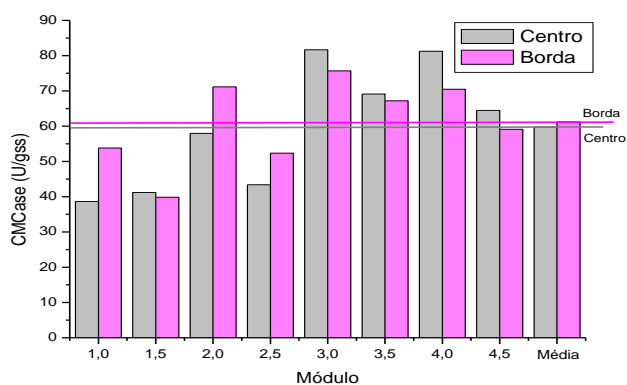


Figura 6.27. Umidade final do material (BC:FT 7:3) fermentado por *M. thermophila* ao longo do biorreator com 1,4 m de comprimento e taxa de aeração 1500 L/h.

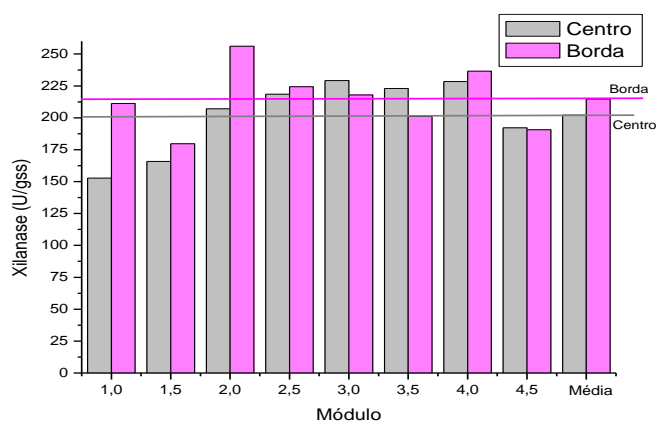
6.4 Fermentação com *Trichoderma reesei* QM9414 em biorreator com 20 cm de diâmetro interno

6.4.1 Biorreator com comprimento total 1,0 m e substrato BC:FT 9:1

Nas Figuras 6.28a e 6.28b, são apresentadas, respectivamente, as atividades CMCase e xilanase dos extratos obtidos empregando o fungo *Trichoderma reesei* QM9414 em substrato BC:FT 9:1 (m/m) no biorreator com 1,0 m de comprimento (porção fermentativa a partir da metade do módulo 1, indicada por módulo 0,5, até metade do módulo 5, indicada por módulo 4,5), em função do comprimento, para centro e borda do leito e com taxa de aeração 900 L/h. As linhas horizontais indicam as atividades médias, dadas pela média das atividades obtidas nas 8 divisões axiais.



(a)



(b)

Figura 6.28. Atividades enzimáticas dos extratos obtidos a partir dos módulos 0,5 a 4,5 do biorreator com 20 cm de diâmetro interno e 1,0 m de comprimento total empregando o fungo *T. reesei* QM 9414 em BC:FT 9:1 (a) CMCCase; (b) xilanase.

Em média, as atividades CMCase e xilanase, foram praticamente homogêneas no biorreator, tanto na direção radial quanto na axial. Atividades ligeiramente menores foram encontradas somente nas proximidades da entrada do leite, possivelmente devido à redução de umidade nesta região, como será visto adiante. Essas tendências da distribuição das atividades enzimáticas no biorreator foram confirmadas por análise de variância e por comparação de médias por teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) tendo como fontes de variação as posições radial e axial do fermentado no leite. Nenhuma das variáveis teve efeito significativo sobre as atividades enzimáticas, reiterando que a produção foi homogênea no biorreator de leite empacotado. O resultado de comparação das médias está sumarizado na Tabela 6.6.

Tabela 6.6. Teste de Tukey para as atividades enzimáticas produzidas por *T. reesei* no biorreator com 5 módulos (D = L = 20 cm cada módulo) ($\alpha = 0,05$).

Módulo	CMCase			Xilanase		
	Posição radial			Posição radial		
	Centro (r = 0 – 5 cm)	Borda (r = 5 – 10 cm)	Média (radial) ←	Centro (r = 0 – 5 cm)	Borda (r = 5 – 10 cm)	Média (radial) ←
1	38,7	53,8	46,2 ^a	152,8	211,2	182,0 ^a
2	49,6	55,5	52,5 ^a	186,4	217,9	202,2 ^a
3	62,5	64,0	63,3 ^a	223,8	221,1	222,4 ^a
4	75,2	68,8	72,0 ^a	225,7	218,8	222,2 ^a
5	64,5	59,1	61,8 ^a	192,2	190,6	191,4 ^a
Média (axial) ↑	58,1 ^A	60,2 ^A		196,2 ^A	211,9 ^A	

* Letras maiúsculas diferentes numa mesma linha indicam que há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da posição radial, para média das posições axiais; letras minúsculas diferentes numa mesma coluna indicam que há diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$) devido ao efeito da posição axial, para média das posições radiais; letras maiúsculas iguais numa mesma linha e minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) devido aos efeitos das posições radial (para média das posições axiais) e axial (para média das posições radiais), respectivamente.

Nas Figuras 6.29a a 6.29c, são fornecidos os perfis de temperatura em várias posições radiais e longitudinais da seção fermentativa do biorreator. Na Figura 6.29d, é apresentada uma fotografia do interior de um módulo fermentativo ao final do processo, com intuito de ilustrar a distribuição do crescimento do fungo no material fermentado. As oscilações periódicas observadas nas Figuras 6.29a a 6.29c podem ser decorrentes de efeitos de inibição/estímulo sucessivos sofridos pelo

fungo ao longo do processo, possivelmente relacionados à concentração de CO_2 no interior do biorreator.

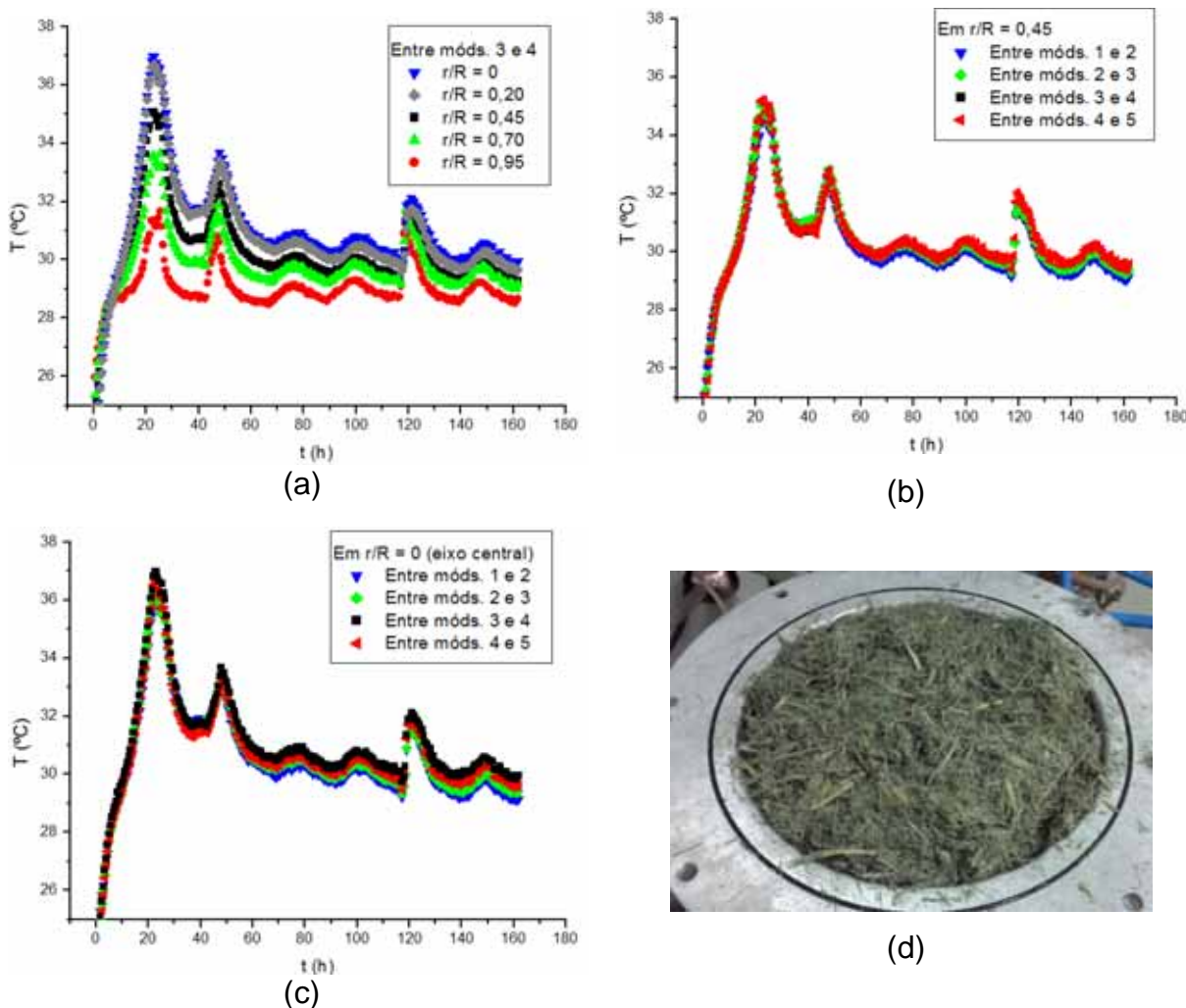


Figura 6.29. Fermentação com *T. reesei* em BC:FT 9:1 no biorreator com 20 cm de diâmetro e 1,0 m de comprimento total sob taxa de aeração 900 L/h: (a) temperatura ao longo do tempo em várias posições radiais, entre módulos 3 e 4; (b) temperatura ao longo do tempo em várias posições axiais, em $r/R = 0,45$; (c) temperatura ao longo do tempo em várias posições axiais, em $r/R = 0$ (eixo central); (d) módulo ao final da fermentação.

É possível observar que ocorreram perfis radiais de temperatura (Figura 6.29a) e axiais (Figuras 6.29b e 6.29c) consideráveis no fermentador com 20 cm de diâmetro, quando comparados ao biorreator com 7,62 cm de diâmetro interno. As temperaturas registradas ao longo da fermentação mantiveram-se entre 28 e 37 °C. A máxima temperatura foi registrada no eixo central radial e entre os módulos

fermentativos. Logo, o aumento de temperatura neste caso também foi em torno de 10 °C, similarmente ao processo empregando o fungo termofílico. Assim, opondo-se à hipótese de que microrganismos termofílicos tendem a gerar menos calor que mesofílicos em cultivo sólido, os resultados aqui encontrados sugerem que a geração de calor por ambos os fungos empregados foram aproximadamente iguais. Considerando que não houve sobreaquecimento quando do cultivo de ambos os fungos no biorreator com 7,62 cm de diâmetro e que o aumento de temperatura foi similar para o cultivo dos fungos termo e mesofílico no biorreator com 20 cm, sugere-se que o sobreaquecimento em ambos os cultivos no biorreator largo deu-se principalmente em decorrência do aumento da distância do eixo central ao contorno resfriado, independentemente do microrganismo cultivado.

Outro fator associado ao sobreaquecimento no cultivo dos fungos termo e mesofílico é o substrato, que para o fungo mesofílico contém maior fração de fibras de bagaço de cana (BC:FT 9:1 m/m), o que pode ter favorecido a transferência de calor em comparação à matriz empregada para o fungo termofílico (BC:FT 7:3 m/m). Assim, mesmo que a quantidade de calor gerado tenha sido maior no cultivo do fungo mesofílico, cuja velocidade específica de crescimento é maior que a do termofílico, a remoção do calor gerado pode também ter sido mais eficiente tanto no reator estreito quanto no largo, igualando os aumentos de temperatura em ambos os sistemas.

A variação de temperatura ao longo do comprimento do biorreator, por sua vez, foi relativamente baixa, indicando uma boa homogeneidade térmica axial. Na Figura 6.29d, é possível observar que houve boa colonização do substrato pelo fungo através de toda a seção transversal da matriz porosa, denotada pela coloração esverdeada do micélio bem distribuído. O crescimento radial homogêneo do fungo pode explicar a homogeneidade radial de atividades enzimáticas, aspecto positivo do processo.

Simulações do processo empregando o modelo heterogêneo bidimensional apresentado no Capítulo 5 desta tese também indicaram que deveria ocorrer sobreaquecimento no leito para o biorreator mais largo. A máxima temperatura prevista pelo modelo foi 36,0 °C, empregando-se os parâmetros do microrganismo e as propriedades físicas e térmicas do leito e do substrato, mediante as condições operacionais adotadas experimentalmente. Se for desprezada a dispersão radial de calor no modelo, a máxima temperatura prevista passa a ser 45,0 °C, o que indica

que a remoção de calor radial por condução ainda foi importante no cultivo de *T. reesei* em BC:FT 9:1 m/m mesmo no biorreator com 20 cm de diâmetro interno, podendo ter sido auxiliada pela composição do substrato mais poroso. Ademais, apesar do sobreaquecimento, o rendimento em termos de atividade de endoglucanase e xilanase pode ser considerado satisfatório, uma vez que superou as atividades obtidas no biorreator estreito. As atividades médias de CMCase e xilanase atingidas no biorreator com diâmetro interno 7,62 cm foram 28 e 175 U/gss, respectivamente; no biorreator com 20 cm de diâmetro, essas atividades atingiram 60 e 210 U/gss, respectivamente.

Na Figura 6.30, são apresentadas as umidades finais do material BC:FT 9:1 (m/m) fermentado por *T. reesei* em função do comprimento do biorreator. Apesar da reposição frequente da água na coluna de umidificação, encamisada juntamente com a seção de entrada, houve ligeira secagem do material contido no módulo da base, mas as seções fermentativas mantiveram umidade em torno de 70 % (b.u.). No topo do leito, houve condensação da água carregada pelo ar, a qual foi absorvida pelo bagaço inicialmente seco utilizado próximo à saída do biorreator; no entanto, como a diferença entre as temperaturas ambiente e interna do biorreator é menor no cultivo do fungo mesofílico, a umidade atingida no topo do leito foi de apenas 20 e 40 % (b.u.) na borda e no centro, respectivamente, havendo maior condensação no centro devido ao formato do módulo de saída, cuja parede interna é cônica.

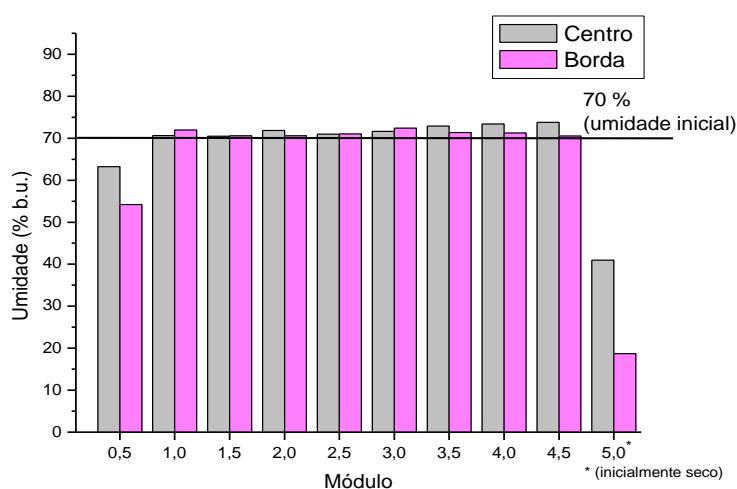


Figura 6.30. Umidade final do material (BC:FT 9:1) fermentado por *T. reesei* ao longo do biorreator com 20 cm de diâmetro, 1,0 m de comprimento, sob taxa de aeração 900 L/h.

6.5 Síntese das atividades enzimáticas obtidas nos biorreatores e discussão

Na Tabela 6.7, são apresentadas as atividades enzimáticas médias obtidas nos biorreatores em diferentes configurações e condições operacionais, empregando-se ambos os fungos meso e termofílico.

Tabela 6.7. Síntese das atividades enzimáticas obtidas nos biorreatores.

Fungo	Substrato	Diâmetro (cm)	Comprimento (m)	Taxa de aeração (L/h)	CMCase (U/gss)	Xilanase (U/gss)	FPA (U/gss)	β -glicosidase (U/gss)
<i>M. thermophila</i>	BC:FT	7,62	1,0	60	619	1300	16	44
				120	547	2027	11	46
				240	786	2124	13	43
	7:3 (m/m)	0,5	30	282	992	9	11	
			60	1043	2395	16	32	
			1,5	360	514	1308	13	34
	20	1,0	900	482	1267	NA	NA	
			1,4	1500	620	2228	NA	NA
<i>T. reesei</i>	BC:FT	7,62	1,0	60	23	176	2	7
				120	29	140	1	11
	9:1 (m/m)	20	1,0	240	21	81	13	5
				900	61	215	NA	NA

NA: não analisado.

Como observado na Tabela 6.7 e já discutido anteriormente, os rendimentos dos processos de FES em termos de atividades enzimáticas variam de acordo com as dimensões do fermentador, com as condições operacionais e com o tipo de microrganismo e substrato empregados. Apesar de já se esperarem atividades enzimáticas mais elevadas quando do emprego do fungo termofílico como agente fermentativo (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BATH, 2000), o emprego de fungos com preferências térmicas distintas prestou-se a avaliar a adequabilidade das alternativas de ampliação de escala dos biorreatores para processos conduzidos a maior ou menor temperatura e sujeitos a diferentes taxas de geração de calor.

O fungo *Trichoderma reesei* é reconhecido por sua notável capacidade sacarificante devido à produção de exoglucanases, quantificadas pela atividade papel de filtro (PINTO, 2010). No entanto, embora exoglucanases e endoglucanases somem juntas 90 % do coquetel enzimático produzido por *T. reesei*, as

endoglucanases, quantificadas pela atividade CMC_{Case}, representam apenas 20 % do total de celulases produzidas por este fungo, enquanto as β -glicosidades correspondem a menos de 1 % do extrato celulolítico produzido (LYND et al., 2002). A deficiência na expressão da enzima β -glicosidase por *T. reesei* ou sua inibição pela glicose durante a hidrólise resulta no acúmulo de celobiose, o que inibe a ação das demais celulases, reduzindo a taxa de hidrólise (KOVÁCS; SZAKACS; ZACCHI, 2009). Portanto, para a efetiva aplicação na sacarificação enzimática do bagaço de cana, a suplementação do extrato enzimático produzido por *T. reesei* com β -glicosidase se faz necessária. Ainda assim, o fungo mesofílico *Trichoderma reesei* está entre os microrganismos com maiores potenciais para a produção de celulases, além de ser o mais detalhadamente estudado e o mais empregado industrialmente para a produção de celulases e hemicelulases (FLORENCIO, 2011). Comparando-se as atividades enzimáticas do extrato produzido por *T. reesei* em biorreator de leite empacotado neste trabalho a trabalhos da literatura, os resultados foram satisfatórios. Basso, Gallo e Basso (2010) reportaram atividades CMC_{Case} e FPA de 6 e 4 U/gss quando do cultivo da mesma linhagem *Trichoderma reesei* QM9414 em bagaço de cana, enquanto valores muito superiores de CMC_{Case} foram obtidos no presente trabalho. Atividades CMC_{Case} próximas às obtidas no presente trabalho também foram reportadas por Gutierrez-Correa e Tengerdy (1998) quando do cultivo de *Trichoderma reesei* LM-UC4 em bagaço de cana. Deshpande et al. (2008) reportaram atividades xilanásicas de 165 U/gss quando do cultivo dessa mesma linhagem em farelo de trigo, valor próximo aos obtidos no presente trabalho tendo como substrato majoritariamente bagaço de cana, rejeito agroindustrial de menor custo e mais abundante no Brasil que o farelo de trigo.

Um importante ponto a ser destacado dentre os resultados do presente trabalho são os elevados níveis de atividade CMC_{Case} obtidos quando do emprego do fungo termofílico recentemente isolado *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. 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 cultivados em palha de arroz. As atividades reportadas de endoglucanase foram 31, 37 e 35 U/gss, respectivamente. Badhan et al. (2007) cultivaram o fungo *Myceliophthora sp.* IMI 387099 em vários substratos (palha de arroz, palha de trigo, bagaço de cana, sabugo de milho e farelo de trigo) para produzir enzimas das mesmas classes, e reportaram atividades CMC_{Case} variando

de 7 a 27 U/gss. Zanelato (2011) já havia previamente obtido altas atividades CMCase, da ordem de 800 U/g, cultivando *M. thermophila* I-1D3b em bagaço de cana e farelo de trigo (7:3 m/m) em escala de frascos e de reator de bancada. No presente trabalho, ainda com a ampliação de escala dos biorreatores em leito empacotado, as atividades CMCase obtidas foram superiores a 450 U/g, denotando o potencial de obtenção de endoglucanases a partir de processos de FES empregando este fungo em escala piloto e até mesmo industrial.

CAPÍTULO 7. CONCLUSÕES

Os objetivos da presente Tese de Doutorado, focados na produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido (FES) em biorreatores de leito empacotado, foram atingidos com sucesso. As etapas experimentais e de simulação se complementaram ao longo do desenvolvimento do projeto.

A primeira etapa, que consistiu na estimativa da biomassa fúngica com base no teor de proteínas totais do fermentado, permitiu obter experimentalmente os parâmetros cinéticos de crescimento dos fungos *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e *Trichoderma reesei* QM9414, agentes fermentativos empregados no presente trabalho para produção de celulases a partir de rejeitos agroindustriais em biorreatores de leito empacotado. Tais parâmetros foram posteriormente empregados para a simulação dos processos.

O modelo heterogêneo bidimensional, proposto na etapa realizada no exterior, descreve as transferências de calor e de umidade num processo de FES em biorreatores de leito empacotado encamisados, incluindo a maior parte dos mecanismos de transporte possíveis de ocorrerem no sistema. Portanto, o modelo permite fazer previsões confiáveis do desempenho do processo antes de se proceder à experimentação. Simulações do estudo de caso do cultivo do fungo *M. thermophila* em bagaço de cana e farelo de trigo mostram que a remoção de calor pela parede é relevante em biorreatores estreitos, bem como que a secagem do substrato na base do leito quando da percolação de ar não saturado é mais prejudicial ao crescimento fúngico que o sobreaquecimento no topo, concordando com dados experimentais obtidos em diferentes condições operacionais.

Na ampliação de escala através do aumento do comprimento do leito utilizando-se bagaço de cana e farelo de trigo como substratos em biorreator de leito empacotado encamisado com 7,62 cm de diâmetro interno, não ocorre sobreaquecimento do meio ao longo do processo independentemente do agente fermentativo, do comprimento do leito e da taxa de aeração empregada. No biorreator de leito empacotado encamisado com 20 cm de diâmetro interno, ocorrem variações radiais intensas de temperatura e considerável sobreaquecimento no centro do leito, devido ao afastamento do contorno resfriado, indicando a necessidade de aprimoramento do sistema.

Dos processos realizados em ambos os biorreatores com diâmetros 7,62 e 20 cm de diâmetro interno, foram obtidos rendimentos elevados de atividades de celulasas e xilanases. Diante do exposto e considerando a carência de equipamentos comercialmente disponíveis para produção de enzimas a partir de rejeitos agroindustriais por fermentação em estado sólido, conclui-se que o biorreator de leite empacotado está bem desenvolvido e que sua ampliação de escala, levando-se em conta os pontos levantados no presente trabalho, é viável e promissora, com o equipamento tendo potencial de aplicação em biorrefinarias.

CAPÍTULO 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- aprofundar os modelos de transferência de calor, massa e quantidade de movimento ao longo do processo fermentativo, de modo a incluir aspectos de fluidodinâmica, perda de carga, transporte de oxigênio e gás carbônico e cinética de liberação dos metabólitos de interesse, bem como efeito das variáveis de processo sobre o rendimento de bioproduto;

- adotar estratégias para minimizar os gradientes de temperatura e de umidade observados nos biorreatores em escala semi-piloto, tais como a inserção de tubos centrais para distribuição de ar ou circulação de água, buscando uniformizar e aumentar ainda mais os rendimentos de atividades enzimáticas;

- incrementar a instrumentação do equipamento com analisadores de gases e de umidade relativa, por exemplo, e aprimorar sua arquitetura de montagem;

- implementar sistemas de controle automático do processo em nível de simulação e de experimentação;

- desenvolver estratégias para operacionalizar as etapas de preparo e inoculação do substrato e de extração das enzimas ao final do processo;

- testar taxas de aeração diferentes em uma mesma batelada;

- pesquisar a respeito da possível destinação do resíduo formado;

- testar extração *in loco* por lixiviação com água destilada;

- testar desenvolvimento da cultura em meio enriquecido com celulose visando a diminuir a duração da fase lag;

- ampliar o equipamento para escala piloto e, futuramente, para escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDAESHAIAN, P.; SAMAT, N.; HAMID, A. A.; YUSOFF, W. M. W. Utilization of palm kernel cake for production of β - mannanase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 in solid state fermentation using an aerated column bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 103-109, 2010.

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. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 763-770, 2007.

AIDOO, K. E.; HENDRY, R.; WOOD, B. J. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 6-9, 1981.

ANISHA, G. S.; JOHN, R. P.; PREMA, P.; PANDEY, A. Investigation on α -galactosidase production by *Streptomyces griseoloalbus* in a forcefully aerated packed-bed bioreactor operating in solid-state fermentation condition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 421-427, 2010.

BABITHA, S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1554-1560, 2007.

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

BASSO, T. P.; GALLO, C. R.; BASSO L. C. Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 11, p. 1282-1289, 2010.

BON, E. P. S.; GÍRIO, F.; PEREIRA JUNIOR, N. Enzimas na produção de etanol. In: **Enzimas em Biotecnologia: Produções, Aplicações e Mercado**. Bon, E. P. S. et al. (Eds). Rio de Janeiro: Interciência Brasil, p. 241-271, 2008.

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

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1291-1296, 2002.

CASCIATORI, F. P. **Obtenção de parâmetros físicos e térmicos para projeto e simulação de biorreatores de fermentação em estado sólido em leito fixo**. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; LOPES, K. C. M.; SOUZA, A. G.; THOMÉO, J. C. Stagnant effective thermal conductivity of agro-industrial residues for solid state fermentation. **International Journal of Food Properties**, v. 16, n. 7, p. 1578-1593, 2013.

CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Cellulase production in packed bed bioreactor by solid-state fermentation. In: **European Biomass Conference and Exhibition Proceedings**, p. 1539-1546, 2013. DOI: 10.5071/21stEUBCE2013-3DV.1.13.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; TABOGA, S. R.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 255, p. 214-224, 2014.

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

CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Utilização de resíduos agro-industriais para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido. In: **Tópicos em tratamento de resíduos e meio ambiente**. FREIRE, F. B.; FREIRE, F. B.; FREIRE, J. T. (Eds.). São Carlos: Animeris, 2014. p. 99-128.

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*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 45-50, 2000.

CASTRO, M. F. P. M.; BRAGAGNOLO, N.; VALENTINI, S. R. T. The relationship between fungi growth and aflatoxin production with ergosterol content of corn grains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 22-26, 2002.

CHEN, D.; ZHENG, Y; ZHU, X. Determination of effective moisture diffusivity and drying kinetics for poplar sawdust by thermogravimetric analysis under isothermal condition. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 451-455, 2012.

CHURCHILL, S. W.; BERNSTEIN, M. A Correlation Equation for Forced Convection from Gases and Liquids to a Circular Cylinder in Cross Flow. **Journal of Heat Transfer, Transactions of ASME**, v. 94, p.300-306, 1977.

CORABI-ADELL, C.; LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M. Biodiversidade do gênero *Trichoderma* no estado de São Paulo – aspectos enzimáticos e potencial biocontrolador. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69 (supl.), p. 188-191, 2002.

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

COUTO, S. R.; RIVELA, I.; SANROMÁN, A. Design of different bioreactor configurations: application to ligninolytic enzyme production in semi-solid-state cultivation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, p. 78-82, 2001.

CUNHA, D. C. da; SOUZA, J. A.; ROCHA, L. A. O.; COSTA, J. A. V. Hexahedral modular bioreactor for solid state bioprocesses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 2173-2178, 2009.

CUNHA, F. M.; ESPERANÇA, M. N.; ZANGIROLAMI, T. C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 270-274, 2012.

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

DA SILVA, R.; 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* Miede. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005.

DATTA, A. K. Porous media approaches to studying simultaneous heat and mass transfer in food processes. I: Problem formulations. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 80-95, 2007.

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N.; NUCITA, F.; TRIPODO, M. M.; LO CURTO, R. B. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 2, p. 89-94, 2002.

DERAKHTI, S.; SHOJAOSADATI, S. A.; HASHEMI, M.; KHAJEH, K. Process parameters study of α -amylase production in a packed-bed bioreactor under solid-

state fermentation with possibility of temperature monitoring. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, p. 203-216, 2012.

DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation. 1. Manual biochemical methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 200-205, 1991.

DESHPANDE, S.K.; BHOTMANGE, M.G.; CHAKRABART, T.; SHASTRI, P.N. Production of cellulase and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM 9414 mutant), *Aspergillus niger* and mixed culture by SSF of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 15, n. 5, p. 449-456, 2008.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma* cellulases. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 11-21, 2004.

DINI, C. M. **Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado.** 2010. 128f. Tese (Doutorado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

DIXON, A. G.; CRESSWELL, D. L.; PATERSON, W. R. **Heat Transfer in Packed Beds of Low Tube/Particle Diameter Ratio.** Oxford: ACS Symposium Series, 1978.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of Soil Fungi. **Taxon**, v. 31, n. 3, 1982.

DUAN, Y.; WANG, L.; CHEN H. Digital image analysis and fractal-based kinetic modelling for fungal biomass determination in solid-state fermentation **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 60-67, 2012.

EDUARDO, M. P. Desempenho e homogeneidade de cultivos em meio sólido de *Monascus sp.* em biorreator do tipo tambor com agitação interna: efeitos do padrão

de agitação. 2010. 144f. Tese (Doutorado). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

EKBLAD, A.; NÄSHOLM, T. Determination of chitin in fungi and mycorrhizal roots by an improved HPLC analysis of glucosamine. **Plant and Soil**, v. 178, p. 29-35, 1996.

FANAEI, M. A.; VAZIRI, B. M. Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, p. 446-451, 2009.

FLORENCIO, C. **Microrganismos produtores de celulases: Seleção de isolados de *Trichoderma spp.*** 2011. 83f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R.; GONZÁLEZ, M.; AGOSIN, E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1227-1233, 2000.

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

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

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

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

GLENN, D. R.; ROGERS, P. L. A solid substrate process for an animal feed product: Studies on fungal strain improvement. **Australian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 50-57, 1988.

GOMES, E.; UMSZA-GUEZ, M. A.; MARTINS, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GOWTHAMAN, M. K.; RAGHAVA RAO, K. S. M. S.; GHILDYAL, N. P.; KARANTH, N. G. Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 611-620, 1993.

GRAJEK, W. Cooling aspects of solid-state cultures of mesophilic and thermophilic fungi. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66, n. 6, p. 675-679, 1988.

GUTARRA, M. L. E.; CAVALCANTI, E. D. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L. Lipase production by solid-state fermentation: cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 105-116, 2005.

GUTIERREZ-CORREA, M., TENDERDY, R. P.. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugarcane bagasse. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 1, p. 45-47, 1998.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 549-556, 2006.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews – Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43-56, 2004.

HUI, L. Direct microbial conversion of wheat straw into lipid by a cellulolytic fungus of *Aspergillus oryzae* A-4 in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7556-7562, 2010.

INCT. **Brasil vai produzir etanol de segunda geração em 2014**. Fonte: O Globo, 2013. Disponível em: <<http://www.inctdobioetanol.com.br>>. Acesso em: 15 de Dezembro de 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ed. São Paulo, 1985.

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

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. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 5654-5663, 2006.

KOUTINAS, A. A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 93-100, 2003.

KOVÁCS, K.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G.; Comparative enzymatic hydrolysis of pretreated spruce by supernatants, whole fermentation broths and washed mycelia of *Trichoderma reesei* and *Trichoderma atroviride*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1350-1357, 2009.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems – An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 1-30, 2005.

LATIFIAN, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; BARZEGAR, M. *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3634-3637, 2007.

LAURENTINO, C. L. **Transferência de calor em leitos fixos com aplicação em reatores de fermentação em estado sólido**. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2007.

LEAP. **Tips & Tricks: Convergence and Mesh Independence Study**. Australia Leading Engineering Application Providers, 2012. Disponível em: <<http://www.computationalfluidynamics.com.au>>. Acesso em: 27 Novembro 2013.

LI, C. H.; FINLAYSON, B. A. Heat transfer in packed beds: a reevaluation. **Chemical Engineering Science**, v. 32, p. 1055-1066, 1977.

LIENHARD IV, J. H.; LIENHARD V, J. H. **A heat transfer textbook**. 3ed. Cambridge: JH Lienhard V, 2000.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.

LYND, L. R.; ZHANG, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: Analytical framework and methodological approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 467-475. 2002.

MADEIRA JR, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. A new process for simultaneous production of tannase and phytase by *Paecilomyces variotii* in solid-state fermentation of orange pomace. **Bioprocesses and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 477-482, 2012.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: Abr. 2011.

MAZUTTI, M. A.; CORAZZA, M. L.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I.; CORAZZA, F. C.; TREICHEL, H. Inulinase production in a batch bioreactor using agroindustrial residues as the substrate: experimental data and modeling. **Bioprocesses and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 85-95, 2009.

MAZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H.; MAUGERI, F. Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Food Chemistry**, v. 120, p. 163-173, 2010.

MEDEIROS, A. B. P.; PANDEY, A.; CHRISTEN, P.; FONTOURA, P. S. G.; FREITAS, R. J. S. de; SOCCOL, C. R. Aroma compounds produced by *Kluyveromyces marxianus* in solid state fermentation on a packed bed column bioreactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 767-771, 2001.

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

MENDES, F. B.; GUTIERREZ, A. M. C. Efeito da umidade nas propriedades físicas e estruturais do bagaço de cana. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014, Florianópolis. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis, CD-Rom.

MENEZES, G. D. G. **Produção de Poligalacturonase pela Linhagem *Aspergillus niger* Mutante 3T5B8 por Fermentação Semi-Sólida em Biorreatores de Coluna.** 2006. 55f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

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

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

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. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2166-2172, 2006.

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

MITCHELL, D. A.; PANDEY, A.; SANGSURASAK, P.; KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed bed bioreactors for solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 167-178, 1999.

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

MITCHELL, D. A.; 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.

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.; DO, D. D.; GREENFIELD, P. F.; DOELLE, H. W. A semimechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, p. 353-362, 1991.

MORAES, R. J. Q.; ALMEIDA, C. A. A.; DILKIN, P.; KOWALSKI, C. H.; MÜRMAN, L.; MALLMANN, C. A. Dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em milho armazenado. **Arquivos do Instituto Biológico de São Paulo**, v. 70, n. 4, p. 483-489, 2003.

MORETTI, M. M. de S. **Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulases, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis**. 2010. 112f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

NAGEL, F. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. Temperature Control in a Continuously Mixed Bioreactor for Solid-State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 2, 219-230, 2001.

NAUMAN, E. B. **Chemical reactor design, optimization, and scale-up**. New York: McGraw-Hill, 2002.

NIELSEN, J. H.; VILLADSEN, J.; LIDEN, G. **Bioreaction engineering principles**. 2ed. New York: Springer, 2003.

NIGAM, P.; SINGH, D. Solid-State Substrate Fermentation System and their Applications in Biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 405-423, 1994.

NOVAKI, L. **Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus caseiellus***. 2009. 56f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2009.

OGIER, J. C.; BALLERINI, D.; LEYGUE, J. P.; RIGAL, L.; POURQUIE, J. Ethanol production from lignocellulosic biomass. **Oil and Gas Science and Technology / Revue de l'Institut Francais du Petrole**, v. 54, p. 67-94, 1999.

OLIVEIRA, S. L. R. **Aproveitamento da casca do coco verde (*Cocos nucifera L.*) para produção de celulases**. 2010. 81f. Dissertação (Mestrado). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

OSWIN, C. R. The kinetics of package life. III. The isotherm. **Journal of the Society of Chemical Industry**, v. 65, n. 12, p.419-421, 1946.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 169f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

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

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

PARIS, L. D. (2008) **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional**. 2008. 115f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

PARK, K. J.; ITO, A. P.; LEITE, J. T. C. Influência da granulometria, do diâmetro e do comprimento de amostras de grãos triturados de soja na determinação de coeficientes simultâneos de transferência. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 136-142, 2002.

PERRY, R. H.; BENSCHOW, L. R.; BEIMESCH, W. E.; HECHT, J. P.; KEMP, I.; LANGRISH, T.; SCHWARTZBACH, C.; SMITH, F. L. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**. 8ed. New York: McGraw-Hill, 2008.

PETROVA, S. D.; BAKALOVA, N. G.; KOLEV, D. N. Properties of two endoglucanases from a mutant strain *Trichoderma* sp. M7. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 2104-2111, 2002.

PINTO, T. O. P. **Produção de Enzimas Celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e Aplicação na sacarificação do bagaço de cana de açúcar com diferentes pré-tratamentos**. 2010. 91f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2010.

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

PRIETO, M. G. S. **Alternativas de cogeração na indústria sucro-alcooleira: estudo de caso**. 2003. 282 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

REID, R. C.; PRAUSNITZ, J. M.; SHERWOOD, T. K. **Properties of Gases and Liquids**. 3ed. New York: McGraw-Hill, 1977.

ROCHE, N.; VENAGUE, A.; DESGRANGES, C.; DURAND, A. Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid-state fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 11, p. 677-683, 1993.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRÍGUEZ, R.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; AGUILAR, C. N. Optimization of tannase production by *Aspergillus niger* in solid-state packed-bed bioreactor. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 960-967, 2011.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; CARVALHO, J. C. de; KARP, S. G.; STURM, W.; PARADA, J. L.; SOCCOL, C. R. Influence of airflow intensity on phytase production by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 603-606, 2012.

SAKURAI, Y.; LEE, T. H.; SHIOTA, H. On the convenient method for glucosamine estimation in koji. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 619-624, 1977.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, p. 246-291, 2005.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. The investigation of transient multidimensional heat transfer in solid state fermentation. **Chemical Engineering Journal**, v. 60, p. 199-204, 1995a.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Incorporation of death kinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 64, p. 253-260, 1995b.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A. Validation of a model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 739-749, 1998.

SANTOS, S. F. M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007. 151f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SARGANTANIS, J.; KARIM, M. N.; MURPHY, V. G.; RYOO, D.; TENGEDY, R. P. Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p.149-158, 1993.

SATTERFIELD, C. N. **Mass transfer in heterogeneous catalysis**. Cambridge: MIT Press, 1970.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; BACQUET, G.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 802-808, 1990.

SCOTTI, C. T.; VERGOIGNAN, C.; FERON, G.; DURAND, A. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, p. 1-5, 2001.

SHOJAOSADATI, S. A.; BABARIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid state bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 909-914, 2002.

SILVA FILHO, R. C. **Produção de quitosanase por *Aspergillus ochraceus* em cultivo descontínuo submerso**. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

SKLIVANIOTIS, M.; CASTRO, J. A. A.; MCGREAVY, C. Characteristic features of parametric sensitivity in a fixed-bed heat exchanger. **Chemical Engineering Science**, v. 43, n. 7, p. 1517-1522, 1988.

SMITS, J. P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; VAN SONSBECK, H. M.; KNOL, W. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 46, p. 489 – 498, 1996.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA B. S.; SAINI, H. S. Novel sources of fungal cellulases for efficient deinking of composite paper wast. **Bioresources**, v. 3, n. 1, p. 234-246, 2008.

SRIVASTAVA, V. K.; JOHN, J. Deep bed grain drying modelling. **Energy Conversion Management**, v. 43, p. 1689-1708, 2002.

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

THOMÉO, J. C.; FREIRE, J. T. Experimental and modeling aspects of heat transfer in packed beds. In: Freire, J. T., Silveira, A. M., Ferreira, M. C. (Eds.), **Transport Phenomena on Particulate Systems**. Bentham Science Publication: Oak Park, e-book, 2012.

THOMÉO, J. C.; ROUILLER, C. O.; FREIRE, J. T. Experimental analysis of heat transfer in packed beds with air flow. **Industrial Engineering Chemical Research**, v. 43, p. 4140-4148, 2004.

TSOTSAS, E. Heat and mass transfer in packed beds with fluid flow. In: **VDI Heat Atlas**, Abschnitt M7, 2. Auflage. Springer Verlag: Berlin, 2010a.

TSOTSAS, E. Thermal conductivity of packed beds. In: **VDI Heat Atlas**, Abschnitt D6.3, 2. Auflage. Springer Verlag: Berlin, 2010b.

TSUJI, A.; KINOSHITA, T.; HOSINO, M. Analytical-chemical studies of amino sugars – Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone-hydrazone hydrochloride. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, p. 1505-1510, 1969.

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

UNICA. **Relatório final da safra 2013/2014.** Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em: 04 de Março de 2015.

VICCINI, G.; MITCHELL, D. A.; BOIT, S. D.; GERN, J. C.; ROSA, A. S. da; 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, p. 271-294, 2001.

VIGNON, C.; PLASSARD, C.; MOUSAIN, D.; SALSAC, L. Assay of fungal chitin and estimation of mycorrhizal infection. **Physiol Ve´ge´tale**, v. 24, n. 2, p. 201-207, 1986.

VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (editors). **Advances in solid state fermentation.** Kluwer Academic: Dordrecht, 1997.

VIRTANEN, V.; NYSSÖLÄ, A.; VUOLANTO, A.; LEISOLA, M.; SEISKARI, P. Bioreactor for solid state cultivation of *Phlebiopsis gigantea*. **Biotechnological Letters**, v. 30, p. 253-258, 2008a.

VIRTANEN, V.; NYSSÖLÄ, A.; LEISOLA, M.; SEISKARI, P. A aseptically operable static solid state bioreactor consisting of two units. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 594-597, 2008b.

VON MEIEN, O. F.; MITCHELL, D. A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, p. 416-428, 2002.

VORTMEYER, D.; HAIDEGGER, E. Discrimination of three approaches to evaluate heat fluxes for wall-cooled fixed bed chemical reactors. **Chemical Engineering Science**, v. 46, p. 2651-2660, 1991.

WEN, D.; DING, Y. Heat transfer of gas flow through a packed bed. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 3532-3542, 2006.

WILSON, D. B. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1125, n. 1, p. 289-297, 2008.

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

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

ZANPHORLIN, L. M. **Caracterização Bioquímica de uma Serino-Protease produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora sp.*** 2010. 82f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2010.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n.5, p. 452-481, 2006.

ZHAO, S. Cost-effective production of *Bascillus licheniformis* using simple netting bag solid bioreactor. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2859-2863, 2008.

ZOTIN, F. M. Z. **O efeito parede em colunas de recheio**. 1985. 85f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1985.

APÊNDICE A

Relações de cinéticas de reação

A reação de consumo de substrato é complexa e envolve vários mecanismos bioquímicos desconhecidos. Assim, uma aproximação bem generalizada é aqui aplicada, representando-se a conversão global de substrato em biomassa fúngica, o que pode ser dado por:



onde η é a eficiência global, aqui assumida igual a 0,33 (VON MEIEN; MITCHELL, 2002). A conversão de substrato em biomassa não é integral devido à liberação de vários metabólitos primários e secundários, água e CO_2 pelo metabolismo fúngico.

Portanto, a equação cinética de reação do consumo de substrato é relacionada à produção de biomassa como segue:

$$\frac{\partial \text{Sub}}{\partial t} = -\frac{1}{\eta} \frac{\partial \text{B}}{\partial t} \quad (\text{A.2})$$

Por definição, no presente trabalho:

$$b = \frac{\text{B}}{\text{S}} = \frac{\text{B}}{\text{B} + \text{Sub}} \quad (\text{A.3})$$

o que resulta em:

$$\text{B} = \frac{b \text{ Sub}}{(1-b)} = \left(\frac{b}{1-b} \right) \text{Sub} \quad (\text{A.4})$$

Assim, o termo de reação $\partial \text{B} / \partial t$ pode então ser escrito como segue:

$$\frac{d\text{B}}{dt} = \frac{d}{dt} \left[\left(\frac{b}{1-b} \right) \text{Sub} \right] = \left(\frac{b}{1-b} \right) \frac{d\text{Sub}}{dt} + \frac{d}{dt} \left[\left(\frac{b}{1-b} \right) \right] \text{Sub} \quad (\text{A.5})$$

$$\frac{dB}{dt} = \left(\frac{b}{1-b} \right) \frac{dSub}{dt} + \frac{1}{(1-b)^2} \frac{db}{dt} Sub \quad (A.6)$$

Da definição de eficiência global, segue:

$$\left[1 + \left(\frac{b}{1-b} \right) \left(\frac{1}{\eta} \right) \right] \frac{dB}{dt} = \frac{Sub}{(1-b)^2} \frac{db}{dt} \quad (A.7)$$

Substituindo a equação logística:

$$\frac{db}{dt} = \mu b \left(1 - \frac{b}{b_m} \right) \quad (A.8)$$

e a equação (A.3) na equação (A.7), finalmente resulta em:

$$\frac{dB}{dt} = \left\{ 1 + \left[\frac{\left(\frac{B}{B+Sub} \right)}{1 - \left(\frac{B}{B+Sub} \right)} \right] \left(\frac{1}{\eta} \right) \right\}^{-1} \frac{Sub}{\left[1 - \left(\frac{B}{B+Sub} \right) \right]^2} \left\{ \mu \left(\frac{B}{B+Sub} \right) \left[1 - \frac{\left(\frac{B}{B+Sub} \right)}{b_{max}} \right] \right\} \quad (A.9)$$

A equação (A.9) segue as convenções da engenharia de reações tradicional (NIELSEN; VILLADSEN; LIDEN, 2003) e não depende de b . Além disso, ao realizar a simulação do processo fermentativo, valores de B podem ser obtidos instantaneamente de ($B = S.b$), bem como valores de Sub ($Sub = S - B$).

APÊNDICE B

Razão área de transferência por volume total do biorreator

Os cálculos da razão entre a área total de transferência no biorreator e o volume total do biorreator ($a = A_{TT}/V_R$, m^2/m^3) foram feitos considerando-se o seguinte:

- Uma fibra foi assumida como um cilindro de comprimento e diâmetro conhecidos, de modo que o volume de uma única fibra ($V_{1-fibra}$) foi calculado por:

$$V_{1-fibra} = \pi \frac{D_{fibra}^2}{4} L_{fibra} \quad (B.1)$$

- A porosidade do leito (ϵ_0) foi previamente obtida para uma larga faixa de conteúdos de umidade (CASCIATORI et al., 2014). Considerando um elemento de volume como uma fatia de seção transversal (A_{pp}) com comprimento dz , o volume total de sólidos nesta fatia ($V_{fibras-fatia}$) será dado por:

$$V_{fibras-fatia} = (1 - \epsilon_0) dV \quad (B.2)$$

- O número de fibras em uma fatia ($N_{fibras-fatia}$) foi então computador por:

$$N_{fibras-fatia} = \frac{V_{fibras-fatia}}{V_{1-fibra}} \quad (B.3)$$

- A área de uma única fibra ($A_{1-fibra}$) é dada por:

$$A_{1-fibra} = \pi (D_{fibra} L_{fibra}) \quad (B.4)$$

- A área superficial total das fibras contidas em uma fatia ($A_{fibras-fatia}$) é então calculada como:

$$A_{\text{fibras-fatia}} = N_{\text{fibras-fatia}} A_{1\text{-fibra}} \quad (\text{B.5})$$

$$A_{\text{fibras-fatia}} = \frac{V_{\text{fibras-fatia}}}{V_{1\text{-fibra}}} A_{1\text{-fibra}} = \frac{(1 - \varepsilon_0) dV}{V_{1\text{-fibra}}} A_{1\text{-fibra}} = (1 - \varepsilon_0) A_{\text{app}} \frac{A_{1\text{-fibra}}}{V_{1\text{-fibra}}} dz \quad (\text{B.6})$$

$$A_{\text{fibras-fatia}} = (1 - \varepsilon_0) A_{\text{app}} \frac{\pi (D_{\text{fibra}} L_{\text{fibra}})}{\frac{\pi}{4} (D_{\text{fibra}}^2 L_{\text{fibra}})} dz = (1 - \varepsilon_0) A_{\text{app}} \frac{4}{D_{\text{fibra}}} dz \quad (\text{B.7})$$

- Portanto, para um elemento de volume ou fatia do leite, a razão normalizada $a = A_{\text{TT}}/V_{\text{R}}$ foi finalmente calculada por:

$$a = \frac{A_{\text{fibras-fatia}}}{V_{\text{fatia}}} = \frac{(1 - \varepsilon_0) A_{\text{app}} \frac{4}{D_{\text{fibra}}} dz}{A_{\text{app}} dz} = (1 - \varepsilon_0) \frac{4}{D_{\text{fibra}}} \quad (\text{B.8})$$