

## Capítulo 7

# Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial

Cristiane Sanchez Farinas, Rosangela Donizete Perpetua Buzon Pirola, Rafael Frederico Fonseca, Victor Bertucci Neto

### 1. Introdução

Os processos de fermentação têm sido de grande relevância prática e econômica para a humanidade há milhares de anos, notadamente para a produção de alimentos e bebidas, como pães e vinho. Atualmente, o cultivo de microrganismos em processos fermentativos para a obtenção de produtos de interesse comercial tem sido aplicado em diversos ramos industriais, como o setor farmacêutico, de alimentos e bebidas, têxtil, na agricultura, entre outros (COUTO; SANROMAN, 2006; SINGHANIA et al., 2009; SANCHEZ; DEMAIN, 2011). Entre esses bioprodutos, se destaca a produção microbiana de enzimas. As enzimas possuem diversas aplicações e seu mercado está em crescente evolução, sendo uma alternativa importante aos processos químicos convencionais.

Os processos fermentativos para a produção de enzimas podem ser conduzidos tanto no estado líquido, chamado de fermentação submersa (FSm), quanto no estado sólido, a fermentação em estado sólido (FES). A FES é definida como o processo de cultivo de microrganismos em um substrato sólido, contendo umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, isto é, isento de água livre (RAGHAVARAO et al., 2003; HOLKER et al., 2004; SINGHANIA et al., 2009). Já na FSm o meio é constituído basicamente por água e nutrientes nela dissolvidos. As técnicas de cultivo submerso tem se beneficiado dos avanços da instrumentação e controle de processos e são bastante utilizadas para o cultivo de microrganismos. Aproximadamente 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por FSm, frequentemente com a utilização de microrganismos geneticamente modificados (HOLKER et al., 2004). No entanto, a maioria dessas enzimas poderia ser produzida por FES, utilizando-se microrganismos selvagens.

O uso da FES tem se mostrado particularmente vantajoso para o cultivo de fungos filamentosos, uma vez que simula o *habitat* natural desses microrganismos. Essa vantagem é estendida à produção de enzimas, proporcionando uma maior produtividade quando comparada ao processo de fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos suscetíveis a problemas de inibição por substrato e também possuem uma estabilidade maior a variações de temperatura e pH (HOLKER; et al., 2004). Sob o ponto de vista ambiental, a vantagem da FES está relacionada ao menor volume de efluente produzido. Outra vantagem de destaque da FES é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato sólido, servindo estes como fontes de carbono e energia (RAIMBAULT, 1998).

Apesar de todas essas vantagens da FES em relação à FSm, a FES esbarra em uma desvantagem limitante de sua aplicação de uma forma mais ampla e direta em processos industriais: a dificuldade de monitoramento e controle das diversas variáveis envolvidas no processo. Enquanto na FSm pode-se considerar muitas vezes o leito do reator de forma homogênea, na FES existem gradientes diversos de umidade e temperatura, os quais podem influenciar negativamente na produção dos metabólitos. Na FES, o controle da temperatura, umidade e troca de gases são fundamentais para o crescimento microbiano e a conseqüente produção de metabólitos.

Existe, portanto, uma demanda para o desenvolvimento de instrumentação que permita a implantação de um sistema de controle e automação no processo de FES. Essa é uma etapa fundamental para o desenvolvimento desses biorreatores em escala industrial, uma vez que a FES, apesar de gerar elevados rendimentos para a produção de enzimas em relação à FSm, apresenta uma série de limitações operacionais que dificultam seu escalonamento.

Nesse capítulo serão abordadas as principais variáveis que influenciam no processo de FES, os avanços e oportunidades no desenvolvimento de instrumentação para automação e controle dos biorreatores de FES, alguns exemplos de aplicação da FES para o agronegócio e, para concluir, será detalhado um exemplo de desenvolvimento de processo para produção de enzimas por FES utilizando o biorreator de colunas instrumentado desenvolvido na Embrapa Instrumentação.

## 2. Fermentação em Estado Sólido (FES)

Como descrito anteriormente, na FES o cultivo de microrganismos ocorre em um substrato sólido, contendo uma umidade suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo. Assim, a eficiência do processo de FES na obtenção dos produtos de interesse é dependente tanto do tipo de microrganismo utilizado, como das variáveis ambientais e

operacionais selecionadas durante o cultivo, e também do tipo de biorreator utilizado. Fatores como temperatura, pH, umidade, aeração, concentração de nutrientes, tipo e características do substrato estão entre as principais variáveis do processo de FES e serão detalhadas a seguir.

### *2.1 Temperatura*

Entre as variáveis envolvidas no processo de FES, o controle da temperatura é particularmente importante. Isso ocorre porque o crescimento microbiano em condições aeróbias resulta em uma conseqüente liberação de calor, podendo este gerar efeitos deletérios ao microrganismo e aos metabólitos produzidos. Como a FES ocorre na ausência de água livre, o calor produzido é difícil de ser removido devido à limitada condutividade térmica do substrato sólido e à baixa capacidade térmica do ar. Essa dificuldade na manutenção e controle da temperatura em FES se torna ainda mais acentuada na ampliação de escala do processo. Conseqüentemente, a caracterização de cada microrganismo em particular, em termos da influência da temperatura na cinética de crescimento e formação de produto, é essencial para o desenvolvimento de bioprocessos de FES. A maioria dos estudos sobre a influência da temperatura na produção de enzimas está focada em encontrar uma temperatura ideal para o crescimento de fungos e produção da enzima. Este tipo de caracterização é interessante para permitir a previsão dos efeitos do aumento da temperatura na produtividade enzimática em biorreatores de FES.

### *2.2 Umidade do meio*

A quantidade de água em um bioprocessos está diretamente relacionada à difusão de nutrientes no meio reacional e à absorção destes pelos agentes microbianos, bem como à manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos (GERVAIS; MOLIN, 2003). Em relação ao cultivo de microrganismos, a limitação de água pode causar a desnaturação de enzimas-chave do metabolismo das células, reduzindo a taxa de crescimento microbiano e a formação dos produtos de interesse. Os fungos filamentosos, que são os microrganismos que se desenvolvem melhor em FES, precisam de um ambiente úmido para seu crescimento. Por isso, um nível de umidade ideal do meio sólido tem que ser mantido.

Nos processos de FES, o teor de água é um dos parâmetros operacionais mais importantes que afetam a eficiência do processo. Se o teor de umidade é muito elevado, os espaços entre os sólidos são preenchidos com água, limitando a difusão gasosa. No outro extremo, se o teor de umidade

for baixo, o crescimento do microrganismo será prejudicado (RAGHAVARAO; et al., 2003). Conseqüentemente, a identificação do conteúdo de umidade ótimo para cada conjunto substrato-microrganismo é crucial para promover condições de crescimento favoráveis e maximizar a produção de metabólitos de interesse.

### 2.3 Aeração

No processo de FES, a aeração do meio atende a quatro funções principais: manter as condições aeróbias, remover o dióxido de carbono gerado, regular a temperatura do substrato e regular o nível de umidade do meio. O ambiente gasoso que se instala em um cultivo de FES pode afetar de forma significativa os níveis de crescimento celular e a produção enzimática. Nos cultivos aeróbios em FSm, o fornecimento de oxigênio é muitas vezes o fator limitante de crescimento devido à baixa solubilidade do oxigênio na água. Em contraste, o processo de FES permite ao microrganismo o acesso livre ao oxigênio do ar. Assim, a aeração em FES pode ser mais fácil do que nos cultivos em FSm, devido à rápida taxa de difusão de oxigênio na película de água em torno das partículas de substrato (RAIMBAULT, 1998).

### 2.4 pH

Similar à importância das demais variáveis em FES, o pH utilizado nos cultivos possui grande influência na eficiência global do processo. Isso ocorre devido ao fato do pH de um meio de cultivo mudar em resposta às atividades metabólicas sendo ali realizadas. Essa mudança pode ocorrer devido à secreção de ácidos orgânicos tais como ácido cítrico, acético ou láctico, que vai fazer que o pH diminua. Por outro lado, a assimilação de ácidos orgânicos que podem estar presentes em certos meios nutrientes pode levar a um aumento do pH (RAIMBAULT, 1998). A atividade enzimática é fortemente influenciada pelo pH, uma vez que os sítios ativos de enzimas são frequentemente constituídos por grupos iônicos, os quais, a fim de catalisar a reação, devem estar na forma iônica adequada para manter sua conformação, permitindo uma eficiente ligação ao substrato. No entanto, o monitoramento e o controle do pH em FES não são simples – a maioria dos trabalhos de FES mostra apenas o pH sendo ajustado no início do cultivo.

### 2.5 Substrato

O custo e a viabilidade de uso são os fatores primordiais a serem analisados na escolha do substrato mais adequado para a FES (PANDEY et al., 2000). A possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais como substrato

em FES é uma das principais vantagens deste processo, já que estes resíduos são subprodutos de outras atividades industriais e normalmente são gerados em grande quantidade e não possuem valor comercial significativo. Além disso, sua destinação, muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento, pode levar à geração de problemas ambientais.

Diversos resíduos agroindustriais, como os farelos de cereais, bagaço de cana-de-açúcar, mandioca e laranja, polpa de café, entre outros, podem ser utilizados como substratos para FES. As estruturas básicas desses materiais (celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina, proteínas, fibras) fazem que estes substratos sólidos sirvam de fontes de carbono e energia para o desenvolvimento do microrganismo. Quando o microrganismo é cultivado em um substrato sólido que não fornece a quantidade necessária de nutrientes, uma suplementação deve ser realizada. As concentrações e a seleção das fontes de carbono e nitrogênio e a presença dos indutores devem ser consideradas para a suplementação do meio, a fim de se obter o máximo desenvolvimento e rendimento do microrganismo produtor de enzimas.

## 2.6 Biorreatores de FES

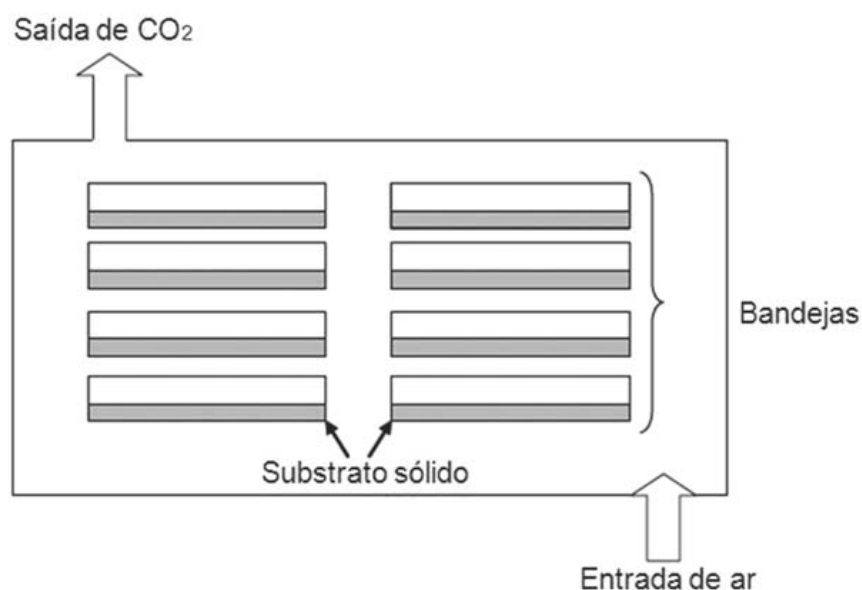
Diferentes configurações de biorreatores são empregadas nos processos de FES, incluindo os do tipo bandeja, leite empacotado, tambor rotativo, leite fluidizado, entre outros. Os biorreatores de FES comumente utilizados podem ser distinguidos pelo tipo de aeração (forçada e não forçada) ou sistema de agitação empregado (com e sem misturador). A seguir são apresentados de forma mais detalhada os principais tipos de biorreatores de FES.

### 2.6.1 Biorreatores do tipo bandeja

Os biorreatores de FES do tipo bandeja (Figura 1), como o próprio nome diz, são compostos por várias bandejas nas quais o meio sólido é colocado (COUTO; SANROMAN, 2006). Essas bandejas são normalmente mantidas em uma câmara com temperatura constante na qual o ar úmido é circulado.

A utilização dos biorreatores do tipo bandeja é certamente uma das formas mais simples e antigas de se conduzir o processo de FES, sendo que provavelmente diferentes civilizações antigas já usavam essa tecnologia para a fermentação de diversos produtos agrícolas (DURAND, 2003). Em relação à obtenção de bioprodutos de interesse comercial, os biorreatores do tipo bandeja vêm sendo utilizados para a produção de enzimas por FES, sendo que vários trabalhos já foram reportados na literatura. Como exemplo, podemos citar o trabalho de XIA e CEN (1999), no qual foi estudada a produção das enzimas celulasas pelo fungo filamentosso *Trichoderma reesei* ZU-02 em biorreator de bandeja utilizando o sabugo de milho como substrato sólido.

Brijwani et al. (2010) também estudaram a produção de celulasas em um biorreator de bandeja utilizando casca de soja e farelo de trigo como substrato. Dhillon et al. (2011) avaliaram o potencial dos resíduos agrícolas para produção das enzimas celulasas e hemicelulasas em frascos e em biorreator de bandeja usando cultivos individuais e misto dos fungos filamentosos *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*. Soni et al. (2010) compararam a produção de celulasas pelo fungo *Aspergillus* sp em frascos e biorreator de bandeja, e obtiveram resultados semelhantes entre as diferentes condições de fermentação utilizadas.



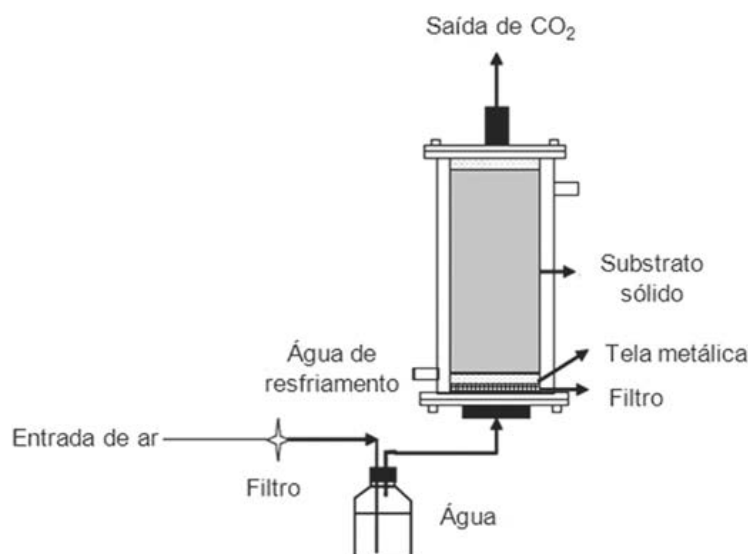
**Figura 1.** Esquema de um biorreator de bandeja adaptado de Couto e Sanroman (2006).

Embora a produção de enzimas em biorreatores de bandejas seja expressiva, o elevado número de bandejas necessárias para o processo fermentativo faz que esse tipo de biorreator seja pouco atraente para a produção em larga escala.

### 2.6.2 Biorreatores do tipo leito empacotado

Outra configuração de biorreatores de FES são os do tipo leito empacotado. Esses biorreatores são compostos por colunas nas quais o substrato sólido é retido sobre uma base perfurada, e o ar úmido é forçado através do leito de substrato. Esse tipo de biorreator é bastante apropriado para os processos de FES em que não é desejável agitar o substrato, devido aos efeitos deletérios sobre o crescimento microbiano ou sobre a estrutura física do produto final. O biorreator de leito empacotado pode ser revestido com uma "jaqueta" para a circulação da água e controle da temperatura durante a

fermentação (Figura 2). Entretanto, alguns inconvenientes estão associados a esse biorreator, como o crescimento não uniforme do microrganismo, a dificuldade na remoção de calor e, conseqüentemente, a ampliação de escala (COUTO; SANROMAN, 2006).



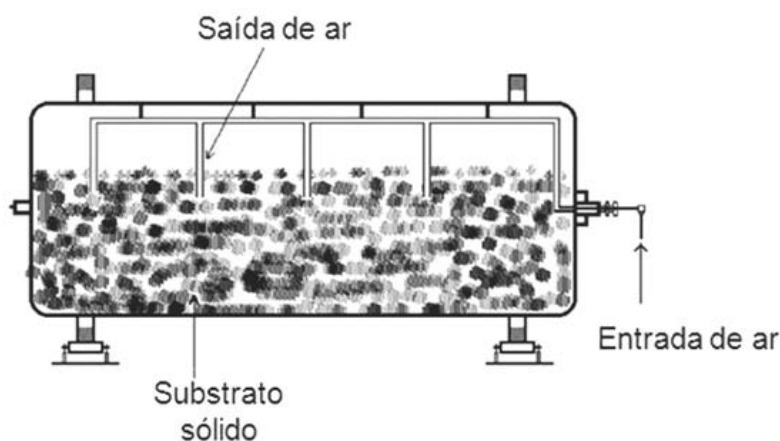
**Figura 2.** Esquema de um biorreator de leito empacotado adaptado de Couto e Sanroman (2006).

Os biorreatores do tipo leito empacotado vem sendo também utilizados para a produção de enzimas. Zanelato et al. (2012) compararam a produção da enzima endoglucanase por FES em sacos plásticos e em biorreator de leito empacotado usando o fungo *Myceliophthora sp* e farelo de trigo e bagaço de cana como meios de cultivo. A atividade de endoglucanase obtida em ambos os sistemas de cultivo foram semelhantes. Abdeshahian et al. (2011) avaliaram o uso dos resíduos da torta de dendê na produção de endoglucanase pelo cultivo de *Aspergillus niger* em biorreator de leito empacotado. Assamoi et al. (2008) avaliaram a produção da enzima xilanase pelo *Penicillium canescens* utilizando-se torta de óleo de soja como substrato para FES em biorreator de leito empacotado. Farinas et al. (2011) avaliaram os efeitos do fluxo de ar, da umidade relativa do ar e da umidade inicial do substrato (farelo de trigo) na produção da enzima endoglucanase pelo *Aspergillus niger* em biorreator de coluna instrumentado. Rodriguez-Zuniga et al. (2013) otimizaram as variáveis “taxa de fluxo de ar” e “umidade relativa do ar” para a produção das enzimas endoglucanase, FPase e xilanase pelo *Aspergillus niger* cultivado em bagaço de cana e farelo de soja. Pirola et al. (2013) compararam a produção da enzima xilanase pelo *Aspergillus oryzae* em frascos Erlenmeyer e em biorreator de coluna instrumentado em diferentes umidades de substrato e temperaturas. Em condições aprimoradas de umidade do substrato e

temperatura, a produção de xilanase pelo *A. oryzae* no biorreator de coluna instrumentado foi significativamente mais elevada quando comparada ao cultivo em frascos. Apesar desse tipo de biorreator ser bastante apropriado para o estudo de caracterização de processo em escala de bancada, seu escalamento é dificultado pelas razões descritas anteriormente.

### 2.6.3 Biorreatores do tipo tambor rotativo

Os biorreatores do tipo tambor rotativo pertencem a uma categoria diferente, na qual o substrato é constantemente agitado (Figura 3). Os biorreatores de tambor horizontal podem ser projetados de várias formas: rotativo, perfurado ou com pás (DURAND, 2003). O tambor horizontal rotativo consiste de um cilindro, com ou sem "jaqueta", de água para controle de temperatura, que gira lentamente misturando o material fermentado auxiliado por defletores na parede interna do tambor. Entretanto, a mistura nesse tipo de reator é pouco eficiente, devido à aglomeração das partículas de substrato durante o crescimento do micélio, o que aumenta a dificuldade de regulação da temperatura do meio sólido. Por outro lado, o tambor rotativo com pás é mais eficiente na transferência de oxigênio e diminui a aglomeração de partículas de substrato durante o crescimento microbiano. Entretanto, a mistura contínua, mesmo que suave, pode modificar a estrutura do meio sólido para uma textura pastosa, pois dependendo da natureza da partícula, a mistura pode ser abrasiva e prejudicial para o micélio (DURAND, 2003). A principal desvantagem desse tipo de biorreator é que o tambor é cheio com aproximadamente 30% da sua capacidade; de outro modo a mistura torna-se ineficiente, devido à má transferência de calor em grandes volumes de substrato (COUTO; SANROMAN, 2006).



**Figura 3.** Esquema de biorreator de tambor rotativo adaptado de Durand (2003).



Kalogeris et al. (2003) estudaram a produção das enzimas celulases e hemicelulases pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* com palha de trigo em biorreator de tambor rotativo por FES. Panagiotou et al. (2003) avaliaram em condições otimizadas o rendimento da produção das enzimas endoglucanases, celobiohidrolases,  $\beta$ -glicosidases, xilanases e  $\beta$ -xilosidases com o uso do fungo mesofílico *Fusarium oxysporum* sob FES do sabugo de milho em biorreator de tambor rotativo. Diaz et al. (2009) avaliaram o efeito do tipo de agitação (sem agitação, intermitente, com agitação) sob diferentes taxas de fluxo de ar na produção das enzimas pectinases, xilanases e celulases pelo fungo *Aspergillus awamori* em biorreator de tambor rotativo. O fluxo de ar influenciou significativamente na produção de xilanase, pectinase e endoglucanase pelo fungo. A aeração forneceu oxigênio suficiente para a produção de enzimas, sendo desnecessária a agitação do meio.

Como visto anteriormente, a produção de enzimas em biorreatores de estado sólido é muito atrativa. Entretanto, todos os tipos de biorreatores sólidos, até mesmo os patenteados, apresentam algum tipo de dificuldade relacionada à automação, o que dificulta o aumento de escala (LONSANE et al., 1992). Dessa forma, pesquisas voltadas para o desenvolvimento da instrumentação de biorreatores de fermentação em estado sólido são necessárias para a obtenção de um avanço significativo da aplicação desta tecnologia no setor do agronegócio.

### 3. Automação e controle do processo de FES

Historicamente a humanidade pôde observar a formação de bolor em diversas situações naturais, sabendo tirar proveito disso para obter diferentes produtos, principalmente alimentícios. Aquele pedaço de pão esquecido em um canto da despensa muitas vezes apresenta um aspecto deteriorado e pode ter diferentes cores. Esse é um típico processo de fermentação em estado sólido (FES). Alguma espécie de fungo se depositou na fatia de pão para se alimentar e se reproduzir desse alimento. A definição mais comum para esse fenômeno é de que um processo de FES se refere ao crescimento de microrganismos sobre material sólido sem a presença de líquido livre no meio. Na verdade, podem coexistir as três fases (sólida, gasosa, e líquida) em um processo de FES e a redução, ou o excesso de cada uma, pode determinar o nível de sucesso no final.

Outra característica importante em processos de FES é a quantidade de calor metabólico gerado. Rathbun e Shuler (1983) reportaram gradiente de até 3,2 °C/cm de profundidade do meio com espessura de 6,5 cm. A germinação de fungos é afetada diretamente pela quantidade de calor gerada, além do crescimento celular e esporulação. O excesso de calor pode

secar o meio e diminuir drasticamente a atividade de água, ou seja, diminuir a disponibilidade de água aos microrganismos. A remoção de calor gerado pode ser feita em ambientes de temperatura controlada, no caso de escala muito pequena de laboratório (frascos ou placas), ou em banhos com controle de temperatura, mas torna-se impraticável quando se aumenta a escala do processo, mesmo em escala de bancada de laboratório. Neste caso deve-se usar a aeração forçada no meio de fermentação. Esse método permite retirar, por convecção, o excesso de calor gerado, além de facilitar a remoção de CO<sub>2</sub> do meio. Se o leito for fixo, como no caso de colunas, ou bandejas de fermentação, pode haver a ocorrência de caminhos preferenciais do fluxo de ar no meio, diminuindo a eficiência do processo.

### *3.1 Sensores para o processo de FES*

Segundo descrito no trabalho de revisão de Bellon-Maurel et al. (2003), as medidas de temperatura no processo FES são usualmente feitas na camada sólida e na entrada e saída de gás do processo por meio de variados tipos de sensores, tais como termorresistores, termossensores, termopares, ou sondas metálicas com Pt100, ou Pt1000. Nesse mesmo trabalho são descritos os esforços para medir a atividade de água no processo de FES. Usualmente o conteúdo de água pode ser medido por pesagem da matéria seca, mas neste caso não há diferenciação entre a água disponível para a atividade biológica e a água existente no substrato. Vários métodos já foram propostos, tais como o que determina o ganho em peso de um papel-filtro em equilíbrio com o substrato; ou um sensor capacitivo que mede a umidade relativa do gás em uma célula separadamente da fase sólida, mas com medidas com grande tempo de resposta (cerca de 20 minutos); baseado em absorvância ótica por espelho para atingir o ponto de orvalho; adsorção de água obtida por elemento resistivo etc., mas praticamente ainda não existe um método definitivo, com medida em linha (on-line) e com baixo tempo de resposta.

Medidas de pH em processos de FES também apresentam fatores críticos devido à impossibilidade de se medir em meio sólido na ausência de água livre. Em algumas situações a capacidade de tamponamento de certos substratos ajuda a eliminar o controle de pH no processo, ou em outros casos pode-se evitar a acidificação com sais de amônia como fonte de nitrogênio, mas em geral ocorrem variações locais em aglomerados sólidos que não podem ser medidas e acompanhadas. Em alguns processos procura-se controlar o pH do meio através da adição de soluções ácidas, ou básicas, adicionadas com a água aspergida para resfriamento.

Medidas relacionadas à respirometria em processos de FES podem auxiliar no acompanhamento do crescimento microbiano. Em FES a fonte de carbono é aerobiamente transformada em biomassa, metabólitos, CO<sub>2</sub>

e água, e o monitoramento do O<sub>2</sub> produzido e do CO<sub>2</sub> consumido indica o comportamento do crescimento microbiano (BELLON-MAUREL et al., 2003). Sensores de medida direta de O<sub>2</sub> são geralmente mais caros do que os sensores de CO<sub>2</sub>, e ambas as medidas podem ser feitas por colunas em cromatografia gasosa, técnica mais custosa ainda. De qualquer forma, ainda não existem sensores adequados para a medida do crescimento de biomassa em processos de FES de maneira ampla. Existem trabalhos relacionados à aplicação de medidas de aromas (nariz eletrônico) em sistemas em linha, mas que são dedicados ao processo em questão, além do infravermelho próximo (NIR, refletância e transmitância), médio (MIR), Transformada de Fourier em Infravermelho (FT-IR), técnica de fotoacústica e técnicas de visão artificial. As medidas nesses casos são feitas após amostragem manual, ou técnica de coleta automatizada.

A gama de técnicas existentes para medir variáveis em processos de FES indica que cada processo pode ter particularidades exclusivas que permitem o uso, ou não, de cada ação de medida e monitoramento. Esses são desafios tecnológicos constantes. De todo modo é preciso conhecer profundamente as características de cada processo desde a menor escala possível e tentar prever e validar o processo em escalas maiores. No caso de fermentação submersa é possível escalonar superiormente um processo em cerca de 100 vezes o volume (STANBURY; WHITAKER, 1993). Mas no caso de FES cada processo é muito particular neste quesito, principalmente devido ao tipo do reator escolhido em cada situação. Os principais parâmetros que podem ser medidos e controlados em processos de FES são: temperatura do meio, aeração, pH, e conteúdo de água no leito. Medidas relacionadas à respirometria dão indicações indiretas sobre o crescimento de biomassa e também podem ser úteis na análise do processo.

### 3.2 Controle do processo de FES

Segundo Fonseca (2012), os algoritmos de controle mais amplamente utilizados na literatura são os *On/Off* (Liga/Desliga) e o PID (Proporcional, Integrativo e Derivativo). Esses algoritmos têm sido aplicados principalmente na aeração do biorreator, na qual controlam tanto a temperatura, quanto a umidade relativa do ar de entrada. Outro algoritmo que tem sido empregado é o Modelo Preditivo, sendo aplicados no controle de biorreatores de grande porte.

Podemos ressaltar a utilidade do controle da aeração em duas situações distintas:

- Controle da aeração em biorreatores tipo coluna

A precisão do sistema de aeração permite a realização de estudos que conduzem a um conhecimento mais profundo do processo (desenvolvimento

de modelos mais próximos da realidade). Pode-se fazer um levantamento estatístico da influência das condições ambientais na fermentação.

- Controle da aeração em biorreatores de maior porte

A qualidade da aeração permite uma remoção de calor mais eficiente, melhor estimativa do balanço de massa de água, melhor estimativa do calor produzido e temperatura média global no interior do biorreator, e também melhor estimativa do crescimento microbiano.

Saucedo-Castaneda et al. (1994) consideraram que a aeração de um processo de FES é um dos fatores críticos do processo, pois além de ajudar na remoção do calor gerado pela colônia, retira o CO<sub>2</sub> produzido pela respiração microbiana e provê oxigênio para ela, juntamente com outros gases. Por isso, desenvolveram um sistema de controle baseado na concentração de CO<sub>2</sub> no ambiente. O sistema é constituído por quatro válvulas solenoides (abre/fecha) controladoras de linhas de ar capazes de prover respectivamente: 100 mL•min<sup>-1</sup>, 200 mL•min<sup>-1</sup>, 400 mL•min<sup>-1</sup> e 800 mL•min<sup>-1</sup>, sendo capaz de realizar qualquer combinação de fluxo entre elas e injetar no fermentador um fluxo máximo de 1500 mL•min<sup>-1</sup>. Com esse sistema, os autores conseguiram manter um nível de referência de CO<sub>2</sub> residual no interior do biorreator, aumentando o fluxo de ar conforme se aumentava a concentração de CO<sub>2</sub> na saída do biorreator.

Prosseguindo com o desenvolvimento dos biorreatores do tipo tambor rotativo, Nagel et al. (2001) trabalharam com um biorreator cujo volume interno era 35 litros, sendo suas dimensões de 30 cm de diâmetro interno e 50 cm de comprimento. Nesse biorreator, um sistema com seis pás giratórias, fixas ao eixo central foi utilizado para revolver o substrato. Esse método foi adotado para permitir trocas com base na homogeneização espacial que causa. Para evitar acúmulo de substrato nas laterais do biorreator, duas dessas pás foram dispostas na forma de uma chapa inclinada no sentido de arrastar o substrato das laterais para o centro do conjunto. Para efeitos comparativos, a temperatura no leito do biorreator foi controlada por essa técnica e também pela de resfriamento evaporativo. Segundo os autores, o ar composto nesse sistema possuía umidade relativa de 100%, mas, ao passar pelo filtro de ar (para manutenção das condições estéreis no processo), esse valor caía para 45,5%. Como consequência, houve perda de água durante o processo, que era repostada por borrifos periódicos de água. Para o controle da temperatura do leito do biorreator foi utilizado um controlador tipo PI (proporcional-integral).

Mesmo considerando o atual desenvolvimento da tecnologia de sensores, ainda não existem medidas diretas de umidade e crescimento de biomassa em estado sólido, e até medidas de pH neste meio são difíceis de serem obtidas. Dessa forma, a instrumentação deve ser usada de forma a prever fenômenos físicos e biológicos através de medidas diretas e indiretas,

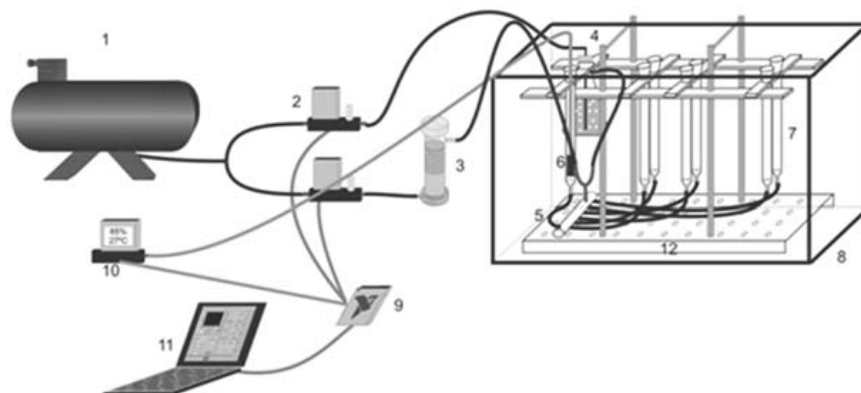
fornecendo também os dados necessários para automatizar um processo. A aplicação de novos conceitos de reatores, e de instrumentação para controle e monitoração de processos é indispensável para o avanço do conhecimento existente em busca de escalonamento. A automação é imprescindível para o controle do processo, sendo útil também para a caracterização dos fenômenos que ocorrem no processo, quando aliado à modelagem. Dessa forma, podem ser interligados vários sensores coletando dados ao mesmo tempo, que serão usados para tomar decisões de controle do sistema de forma manual ou automática.

### *3.3 Exemplo de automação e controle do processo de FES*

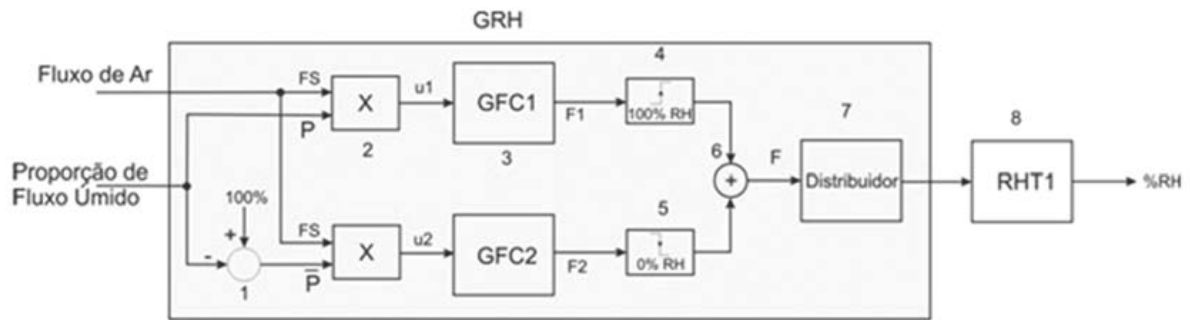
No sistema de FES desenvolvido na Embrapa Instrumentação, um reator de colunas aeradas mostra-se particularmente útil na análise e otimização de processos fermentativos (FARINAS et al., 2011; VITCOSQUE et al., 2012; PIROTA et al., 2013; RODRIGUEZ-ZUNIGA et al., 2013). Com o avanço das pesquisas realizadas chegou-se a um protótipo de um reator instrumentado e automatizado de FES, específico para caracterização de novos processos, ou verificação e certificação dos existentes, que tem sido requisitado inclusive por outros grupos de pesquisa para testes e experimentos. O sistema, na forma que foi desenvolvido, permite estudos de cinética de crescimento de produção de enzimas, otimização de parâmetros de crescimento de biomassa e atividade enzimática relacionados à umidade, fluxo e temperatura do ar que aera as colunas, além da influência de diferentes substratos usados, em diferentes condições físicas e químicas.

Basicamente, o sistema é composto de até 16 colunas de vidro, preenchidas com um substrato (por exemplo, farelo de trigo, cana-de-açúcar, resíduos de açaí, resíduos vegetais em geral) enriquecido energeticamente, submersas em um banho térmico. Um sistema automático controla o fluxo de ar fornecido por um compressor, dosando ar seco e ar saturado de água, de forma que a umidade escolhida pelo operador do sistema seja alcançada. O controlador implementado é do tipo PI (proporcional-integral) clássico com ajuste de ganhos feito da maneira clássica, ou seja, valores próximos daqueles sugeridos como ótimo por Ziegler e Nichols. O fluxo de ar é dividido igualmente para todas as colunas. Durante o tempo de fermentação (que pode durar de algumas horas a alguns dias), dados do sistema são registrados, tais como fluxo de ar seco, saturado e total, temperatura do banho térmico, temperatura do ar que adentra as colunas e da umidade do ar que é distribuído. Na saída do sistema são amostradas as medidas de concentração de CO<sub>2</sub> (que aumenta conforme a atividade biológica aumenta), umidade e temperatura do ar. Na Figura 4 é mostrado um diagrama esquemático da montagem, enquanto na Figura 5 vê-se o diagrama em blocos do sistema de controle de fluxo de ar úmido para o sistema.

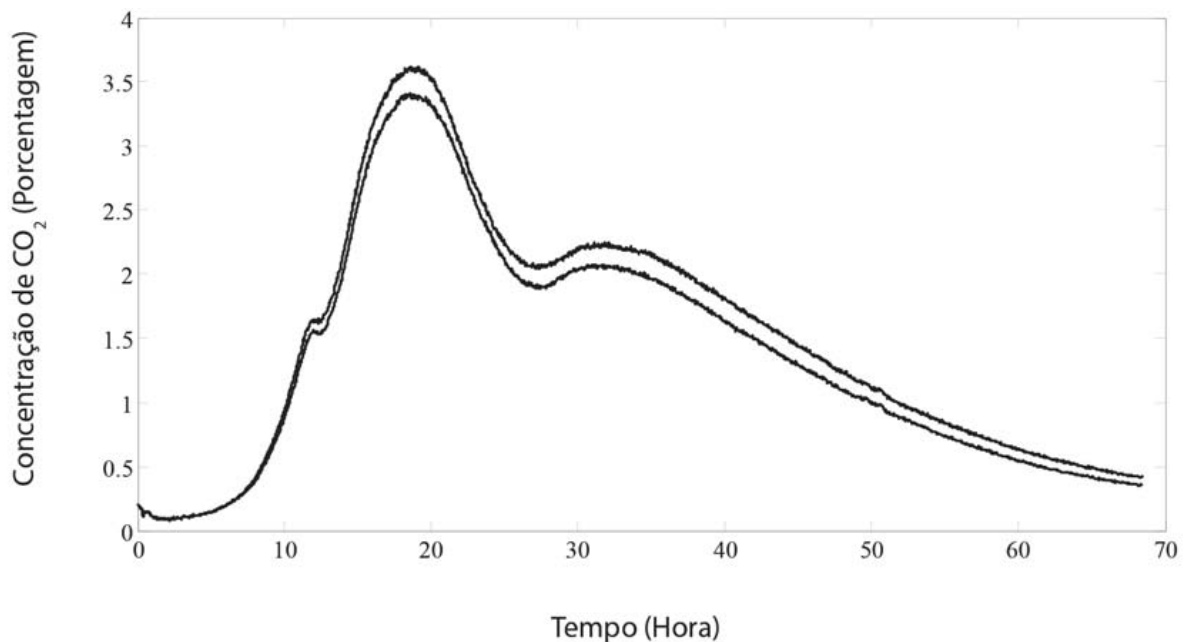
Alguns dos resultados experimentais podem ser vistos em Bertucci Neto et al. (2010), que descrevem a importância da instrumentação e automação em processos de FES para produção de enzimas, de forma a obter resultados relativamente repetitivos em sistemas biológicos, ou seja, obter resultados de produção de CO<sub>2</sub> em duas colunas montadas de forma idêntica (mesma umidade inicial do substrato, mesma concentração do inóculo, mesma aeração durante todo o processo), tais como o mostrado na Figura 6. Por sua vez, na Figura 7 observa-se que quando se varia a quantidade de ar que flui nas colunas preparadas de forma idêntica, a coluna que recebeu menor aeração (curva 1, 12 mL/min.) tem maior porcentagem de CO<sub>2</sub> que a coluna que recebeu maior aeração (curva 2, 36 mL/min.). Em ambos os casos a umidade inicial do substrato foi igual a 80%, e a umidade do ar de aeração foi de 60%. Também neste segundo experimento, a extração das enzimas mostrou que a atividade de endoglucanase foi igual a 66,5 U/g de substrato no caso da curva 1 e 54,2 U/g de substrato no caso da curva 2.



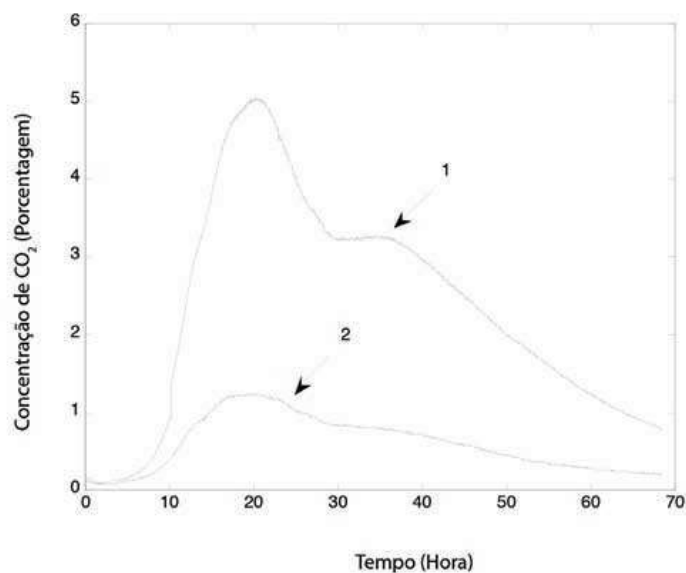
**Figura 4.** Diagrama de partes constituintes do sistema de aeração do biorreator de FES. 1 - Compressor de ar, 2 - Controladores de Fluxo de Massa, 3 - Coluna de Secagem de Ar, 4 - Coluna de Umidificação de Ar, 5 - Distribuidor de Fluxo de Ar, 6 - Sensor de Umidade Relativa e Temperatura, 7 - Colunas de Fermentação, 8 - Banho Termostatizado, 9 - Placa de Aquisição da National Instruments, 10 - Placa de Leitura do Sinal do Sensor (6), 11 - Computador Pessoal e Software Labview.



**Figura 5.** Diagrama de blocos do sistema de aeração do biorreator em malha aberta. 1 - Proporção de Fluxo Seco (subtrai do fluxo total a quantidade de fluxo de ar úmido), 2 - Multiplicadores de Fluxo por Razão de Fluxo (seco ou úmido), 3 - Controladores de Fluxo de Massa, 4 - Umidificador de Ar, 5 - Secador de ar, 6 - Somador de Fluxos, 7 - Distribuidor de Fluxo, 8 - Sensor de Umidade Relativa e Temperatura do Ar. Ainda se têm a referência de fluxo (Fluxo de Ar), a referência de umidade relativa,  $u_1$  e  $u_2$  - tensão de controle do controlador de fluxo de massa,  $F_1$  e  $F_2$  - fluxo de ar nas linhas úmida e seca, respectivamente,  $F$  - fluxo de ar misturado, %RH - umidade relativa do ar na saída do distribuidor.

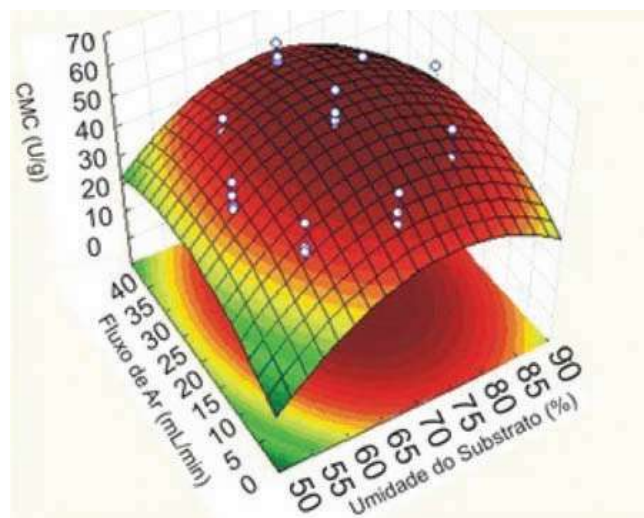


**Figura 6.** Concentração de  $CO_2$  medida na saída de duas colunas durante o experimento de fermentação. Ambos os frascos foram preparados com a mesma condição inicial e foram aerados com fluxo de 24 mL/min., e 70% de umidade relativa.



**Figura 7.** Respostas da concentração de CO<sub>2</sub>. Curva 1: fluxo de ar de 12 mL/min. Curva 2: fluxo de ar de 36 mL/min. Ambos os experimentos foram iniciados com umidade relativa do ar de entrada igual a 60% e umidade inicial do substrato igual a 80%.

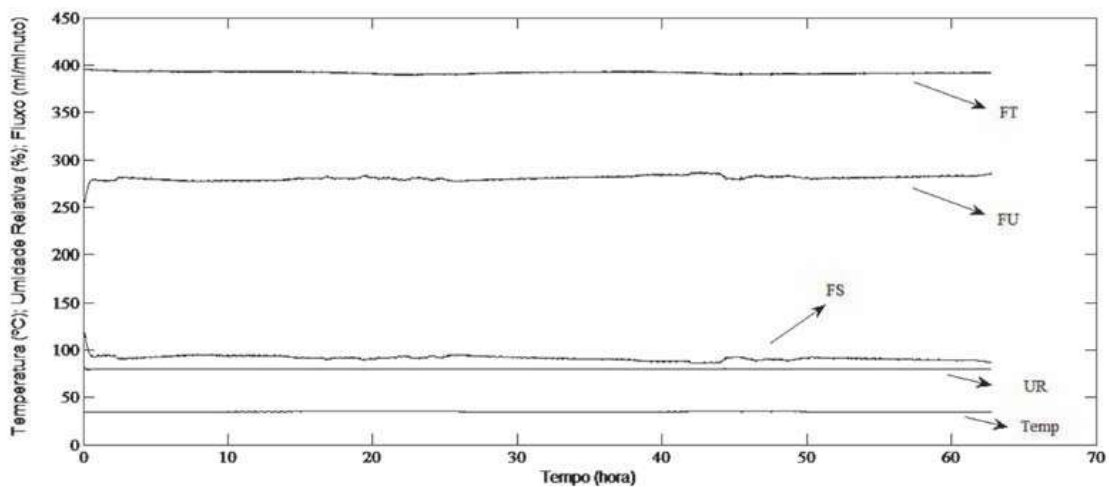
O sistema permite que se procure por faixas ótimas de produção de enzimas, conforme mostrado por Farinas et al. (2011), Vitcosque et al. (2012), Rodriguez-Zuniga et al. (2013). É possível variar a umidade do ar e a umidade inicial do substrato de forma a se buscar faixas de maior produção de uma enzima específica, no caso mostrado na Figura 8, uma enzima celulolítica, a CMCase. Esta enzima é uma das que promovem a hidrólise da celulose para que se possa produzir etanol celulósico.



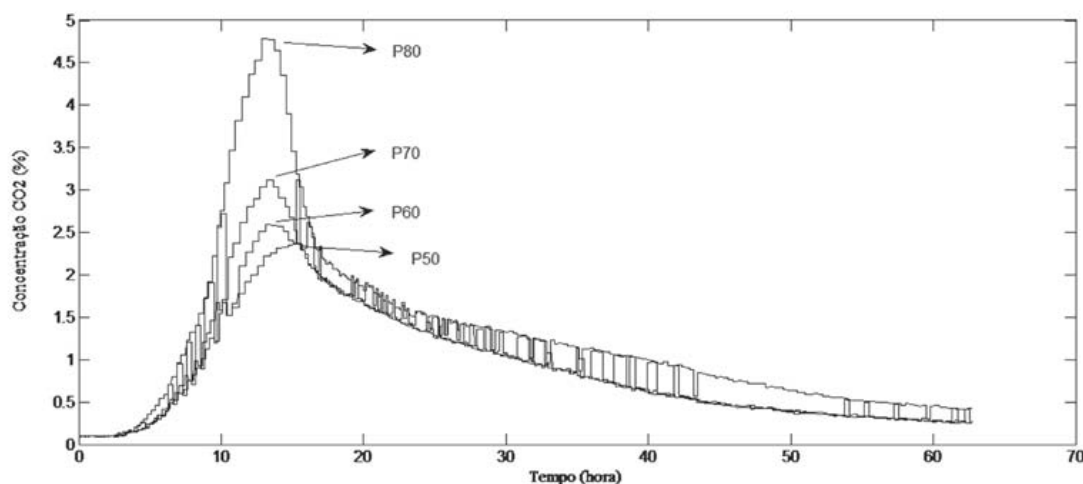
**Figura 8.** Superfície de resposta para o efeito da variação da umidade inicial do substrato e da variação do fluxo e umidade de ar nas colunas sobre a atividade da enzima celulolítica CMCase.



Na Figura 9 vê-se o comportamento ao longo do tempo das variáveis controladas do sistema automatizado durante um processo de FES (BERTUCCI NETO et al., 2010). Observa-se o comportamento do sistema em relação ao controle automático que garante o fluxo de ar, umidade relativa, e temperatura desejados. A curva FT é o fluxo total de ar igual a 400 mL/min que deve ser dividido, neste caso, em 20 linhas, uma para cada coluna, embora tenham sido usadas 12 (4 experimentos em triplicata). A curva FU refere-se ao comportamento do fluxo de ar úmido, enquanto que FS refere-se ao ar seco. A soma de FU com FS ao longo do tempo deve ser igual a FT. A curva Temp é a temperatura do sistema e a curva UR é a umidade relativa do ar que deve se manter, neste caso, igual a 80%. Observa-se que, a despeito da variação observada em FU e FS, o fluxo total e a umidade relativa mantêm-se no valor imposto com erro de  $\pm 1,5\%$ . O mesmo comportamento é verificado em relação à temperatura do ar em cada coluna. Na Figura 10 observa-se o comportamento da produção de CO<sub>2</sub> em cada coluna (neste caso foi usada a medida de somente uma das colunas de cada triplicata para efeito de simplificação do gráfico). O gráfico mostra que a umidade relativa inicial do substrato é determinante na produção de biomassa, ou seja, quanto maior a umidade, maior a produção de biomassa. A questão colocada no trabalho é se essa produção também se correlaciona com a atividade enzimática medida, o que foi verificado, ou seja, as atividades medidas das enzimas xilanase e da CMCase são correlacionadas também com a umidade inicial do substrato, ou seja, maior a umidade inicial, maior a produção enzimática.

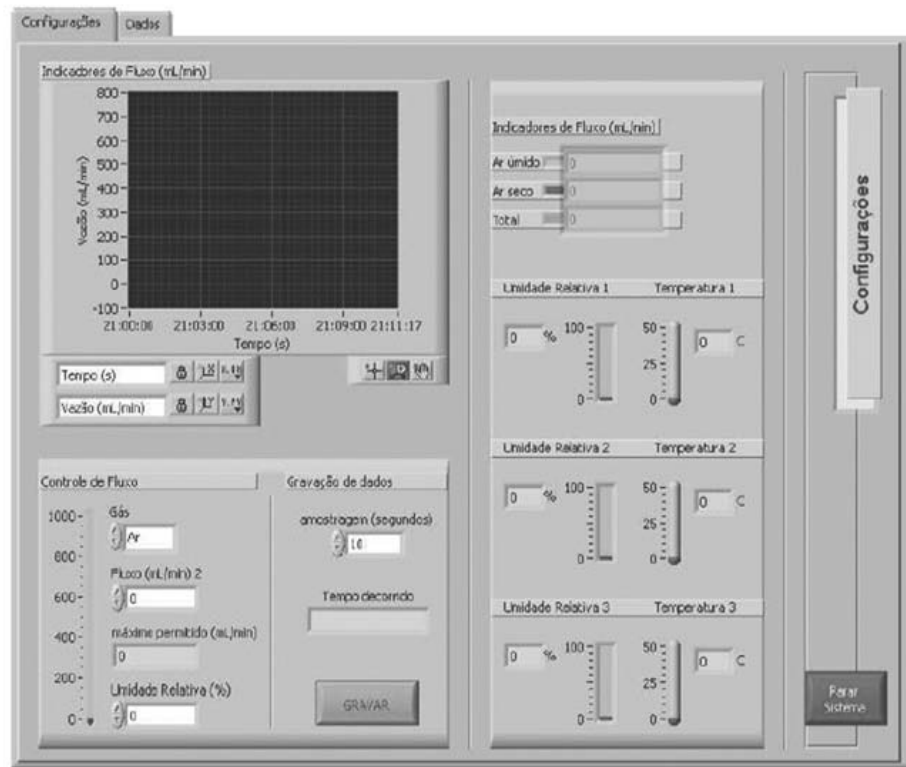


**Figura 9.** Comportamento do sistema automatizado durante o processo de FES. FT: fluxo total de ar; FU: fluxo de ar úmido; FS: fluxo de ar seco; UR: umidade relativa do ar que alimenta as colunas; Temp: temperatura do ar.



**Figura 10.** Medida de concentração de CO<sub>2</sub> em cada coluna de FES. P50, P60, P70, e P80: picos de concentração referentes à umidade relativa inicial do substrato igual a 50%, 60%, 70%, e 80%, respectivamente.

O sistema em colunas desenvolvido na Embrapa Instrumentação foi aperfeiçoado para controlar a aeração em uma faixa de temperatura entre 20 °C e 37 °C de forma eficiente. Para isso foi usado um algoritmo LMI (*Linear Matrix Inequalities*), ou Desigualdades Lineares Matriciais, através das restrições elaboradas no algoritmo iterativo V-K para ajustar os parâmetros do controlador PI nessa faixa, conforme o trabalho de Fonseca (2012). Na Figura 11 vê-se a interface gráfica de um instrumento virtual desenvolvido no trabalho usado para aquisição e armazenamento de dados, e o acionamento dos controladores de fluxo de massa para o biorreator de colunas. As medidas e acionamentos são feitos em intervalos de tempo escolhidos pelo operador, bastando para isto acionar o botão de amostragem de dados. Este sistema de programação permite grande versatilidade na implementação de novos controladores que deverão responder satisfatoriamente em maiores faixas de temperatura.



**Figura 11.** Detalhe do instrumento virtual desenvolvido para o sistema de aquisição de dados e controle de fluxo de ar.

Sobre a descrição feita acima a respeito do estado da arte desses fermentadores podem ser feitos comentários de forma resumida. Houve um avanço considerável nas técnicas de cultivo de fungos para a produção de enzimas por fermentação sólida a partir dos anos 1970, sendo a maior parte em estudos de cultivo, seleção de microrganismos, tecnologia de fermentação, e escalonamento. Entretanto, observa-se que há poucas citações a respeito da instrumentação e automação de biorreatores. Com o sistema de colunas desenvolvido na Embrapa Instrumentação foi possível produzir vários estudos inéditos. Alguns trabalhos publicados já são relatos da aplicação do biorreator em colunas (FARINAS et al., 2011; VITCOSQUE et al., 2012; PIROTA et al., 2013; RODRIGUEZ-ZUNIGA et al., 2013).

#### 4. Potencial de aplicação da FES para solução de problemas do agronegócio

Os processos de fermentação em estado sólido (FES) têm um enorme potencial para aplicações no setor agrícola, ainda a ser explorado através da bioconversão de resíduos agroindustriais em biocombustíveis e outros produtos de elevado valor agregado. Em um país como o Brasil, onde a agricultura é a principal atividade econômica, resíduos agrícolas e florestais são extremamente abundantes (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). Estes materiais são geralmente subutilizados, sendo que uma fração é usada para gerar eletricidade, enquanto outra grande fração é queimada ou permanece no campo, muitas vezes tornando-se um problema ambiental. A conversão da biomassa vegetal em produtos de maior valor comercial pode, além de contribuir para a remoção de poluentes ambientais, trazer dividendos importantes para a economia.

Assim, uma das alternativas promissoras de usar esses materiais lignocelulósicos é sua conversão em bioprodutos, dentro do conceito de biorrefinarias (KAMM; KAMM, 2004). Entre a enorme variedade de bioprodutos que podem ser obtidos por meio de processos de FES, deve-se destacar a produção microbiana de enzimas industriais.

As enzimas microbianas têm uma importante aplicação no setor agrícola, na utilização de biomassa vegetal para a produção de biocombustíveis, como o etanol celulósico e o biodiesel. Além disso, os processos de FES também encontram uso especial em áreas como a biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais e na produção de produtos de maior valor agregado, tais como biofertilizantes, ração animal e metabólitos secundários biologicamente ativos (PANDEY et al., 2000; SINGHANIA et al., 2009; THOMAS et al., 2013).

O uso de enzimas é uma realidade cada vez mais presente nos diferentes setores industriais e consiste em uma alternativa importante aos processos químicos convencionais. As enzimas catalisam as reações de forma específica, minimizando a geração de subprodutos indesejáveis, e atuam em temperaturas amenas, o que reduz o custo energético do processo. Estas características distinguem positivamente estas biomoléculas em relação aos catalisadores químicos.

O uso de enzimas para a produção de ração animal, tanto para aves, suínos e ruminantes, é uma aplicação de grande importância no setor do agronegócio. As enzimas xilanases, juntamente com as glucanases, pectinases, celulases, proteases, amilases, fitase, galactosidases e lipases, são usadas para quebrar as estruturas de arabinoxilanas presentes nos ingredientes das rações animais. O arabinoxilano é encontrado nas paredes celulares dos grãos e tem um efeito antinutrientes para as aves. De forma geral, as enzimas podem também melhorar a digestão dos nutrientes presentes na ração, resultando em um melhor uso de sua energia (POLIZELI et al., 2005).

Na indústria de polpa e papel, as enzimas são aplicadas no processo de branqueando da polpa de celulose, reduzindo a quantidade de produtos químicos necessários e diminuindo a poluição ambiental (POLIZELI et al., 2005). Na indústria têxtil, as enzimas atuam modificando as fibras de celulose de forma desejada e controlada sem danificar o tecido, e nas lavanderias melhoram a eficiência do sabão de modo que, pequenas fibras difusas da superfície do tecido são removidas e a aparência é melhorada (BHAT, 2000). Na formulação de vinho, vinagre e cerveja as enzimas tem um papel importante melhorando a qualidade, estabilidade, clarificação e aroma dessas bebidas (GALANTE et al., 1998). Na produção de suco de fruta, as enzimas podem ser aplicadas para melhorar a estabilidade e textura, facilitando a concentração do néctar, além de diminuir sua viscosidade rapidamente (GRASSIN; FAUQUEMBERGUE, 1996). Outro exemplo de aplicação das enzimas na agricultura é no auxílio ao processo de germinação dos grãos de café (VAN ZYL et al., 2010).

Na área da agroenergia, a utilização das enzimas tem relevante aplicação na produção de biocombustíveis, tanto no processo para a obtenção do biodiesel, como para o etanol celulósico. No caso do biodiesel, as enzimas empregadas no processo são as lipases. As lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. A produção de biodiesel por catálise enzimática tem despertado grande interesse nos setores produtivo e acadêmico, pois além de ocorrer em condições suaves de temperatura, apresenta melhores resultados com álcool etílico hidratado e biomassas contendo alto conteúdo de ácidos graxos livres (HWANG et al., 2014). Devido à alta seletividade das lipases, biodiesel e glicerina puros são obtidos e, ainda, trabalhando-se com enzimas imobilizadas, tem-se a possibilidade da reutilização do biocatalisador e o desenvolvimento de processos contínuos de produção de biodiesel.

No processo de produção do etanol celulósico, também chamado de etanol de segunda geração, a sacarificação da biomassa vegetal pode ser realizada através da hidrólise química ou enzimática. Por ocorrer em condições mais amenas e não gerar resíduos tóxicos, a rota enzimática apresenta potencial de destaque no que se refere à sustentabilidade do processo. No entanto, essa rota requer a utilização de coquetéis enzimáticos altamente específicos para a sacarificação da biomassa, e o alto custo das enzimas limita seu uso industrial. Esse complexo de enzimas é necessário devido à elevada recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, sendo que esses coquetéis enzimáticos possuem celulases, hemicelulases, pectinases e outras enzimas acessórias atuando de forma sincronizada e sinérgica no processo de degradação da biomassa (LYND et al., 2002). O desenvolvimento de processos eficientes e aprimorados para a produção de enzimas é fundamental para garantir a viabilidade econômica da aplicação da rota enzimática na

produção de etanol celulósico. Nesse sentido, a FES se destaca como uma promissora alternativa de processo, podendo trazer soluções para a implantação da produção eficiente de enzimas e sua aplicação na área da agro-energia.

## 5. Produção de enzimas por FES para aplicação na produção do etanol celulósico

A discussão dominante sobre a conversão da biomassa lignocelulósica em combustível líquido é relacionada à sua viabilidade econômica. Assim, a comercialização do etanol a partir de biomassa lignocelulósica é dificultada principalmente pelos atuais custos proibitivos das preparações enzimáticas usadas na etapa de sacarificação da celulose em açúcares fermentescíveis que serão convertidos em etanol pelas leveduras. Algumas estratégias que podem ser adotadas para a redução do custo das enzimas utilizadas na degradação da biomassa incluem a seleção de microrganismos altamente produtores de celulases e hemicelulases e estratégias de eficientes de cultivo, como a fermentação em estado sólido (FES).

As celulases e hemicelulases são um complexo de enzimas que apresentam ação sinérgica durante a degradação das cadeias poliméricas de celulose e hemicelulose, respectivamente. O mecanismo de hidrólise enzimática da celulose mais aceito atualmente descreve a ação sinérgica de pelo menos três classes de enzimas: as endoglucanases, as exoglucanases e as  $\beta$ -glicosidases ou celobiasas. Estudos relacionados à produção de celulases e hemicelulases, em especial as xilanases (principal responsável pela degradação da xilana, principal componente das hemiceluloses) são de fundamental importância devido ao impacto significativo dessas enzimas nos custos do processo de conversão de biomassa em combustíveis e outros produtos químicos. A ação das xilanases, bem como de outras enzimas auxiliares, é relatada no favorecimento da conversão da celulose, removendo a hemiceluloses e, conseqüentemente, aumentam a acessibilidade ao substrato de celulose pelas celulases. Muitas celulases e xilanases comerciais são produzidas por fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus*. Entre os gêneros *Aspergillus*, o *A. niger*, juntamente com *A. oryzae* são os dois fungos mais importantes mundialmente para aplicações biotecnológicas.

Em um estudo utilizando o biorreator desenvolvido na Embrapa Instrumentação foram avaliados os efeitos das condições operacionais na produção de celulases e xilanases por uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* isolado da Floresta Amazônica (PIROTA et al., 2013). O fungo foi cultivado por fermentação em estado sólido (FES), utilizando-se um biorreator de escala de laboratório equipado com um monitoramento automatizado on-line e sistema de controle. Os efeitos do teor de umidade inicial do substrato e da

temperatura na produção de celulases (em termos de FPase, de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase) e xilanases foram avaliados e comparados com as condições estáticas. Foi notável o efeito positivo sobre a produção de celulases e xilanases dos cultivos de FES sob condições controladas. A melhor produção enzimática foi conseguida com um teor de umidade inicial do substrato de 70%, a 28 °C e uma umidade do ar de entrada de 80%, e taxa de fluxo de ar de 20 mL/min. Esta condição selecionada foi utilizada para caracterização em termos de perfil de cinética e estudos de análise respirométrica. Os resultados desse estudo estão detalhados nos itens a seguir.

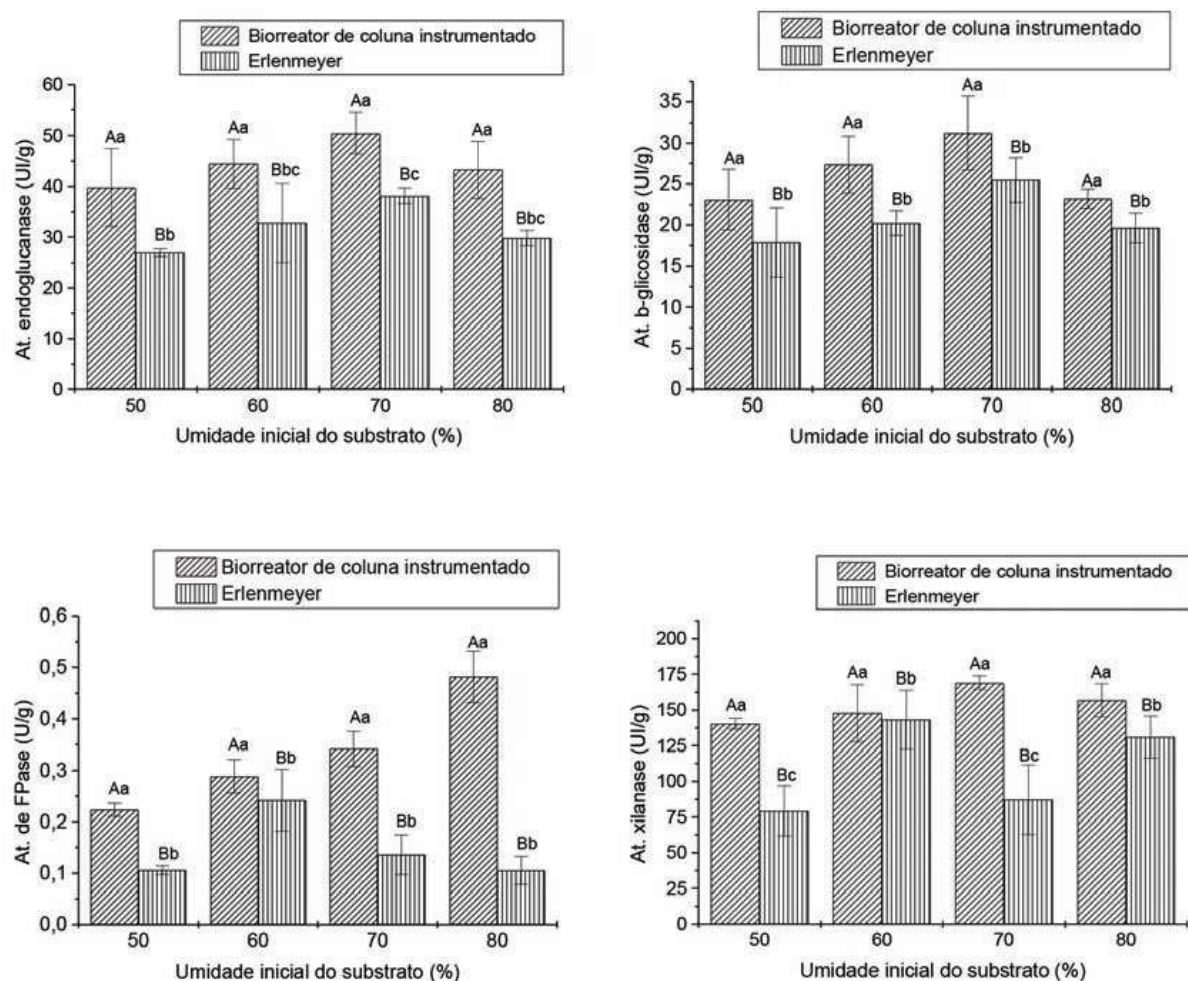
### *5.1 Efeito do teor de umidade inicial*

Estudos de caracterização da produção de celulases e xilanases por *A. oryzae* cultivados sob condições operacionais controladas de FES foram realizados num biorreator instrumentado de escala laboratorial. A fim de comparar a eficácia do sistema de biorreator utilizado, um conjunto semelhante de cultivos foi conduzido sob condições de aeração estática.

Inicialmente, o efeito do teor de umidade inicial na produção de celulases e xilanase foram investigados através do cultivo dos fungos por 72 h a 35 °C a diferentes teores de umidade iniciais (50, 60, 70, e 80%). Uma comparação do efeito do teor de umidade em termos de produção de endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, FPase e xilanases sob aeração forçada e estática é apresentado na Figura 12.

É notável o efeito positivo dos cultivos em condições controladas de aeração forçada, haja vista que a produção de celulases e xilanases foi significativamente mais elevadas do que em fermentações realizadas sob condições estáticas. Uma menor produção de enzimas em condições estáticas provavelmente está relacionada à limitação de oxigênio durante o crescimento de fungos, já que o O<sub>2</sub> é transferido principalmente por difusão. Além disso, a transferência de calor e dissipação de CO<sub>2</sub> são também favorecidas sob condições de aeração forçada.

Entre os vários parâmetros operacionais que afetam a eficiência do processo de FES, o teor de umidade é um dos mais importantes. Se o teor de umidade é muito alto, os espaços vazios nos sólidos são cheios com água, resultando na limitação de oxigênio. No outro extremo, se o teor de umidade for muito baixo, o crescimento do microrganismo é prejudicado (RAGHAVARAO et al., 2003). Consequentemente, a identificação da umidade ótima para cada substrato sólido é crucial para a promoção de condições favoráveis de crescimento, e para a produção satisfatória de metabólitos. No entanto, o valor do teor de umidade ótima depende tanto do substrato sólido quanto do microrganismo utilizado.



**Figura 12.** Efeito do teor de umidade inicial sob produção de endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, FPase e xilanases por *A. oryzae* cultivado em FES sob aeração forçada e estática. Letras minúsculas (a, b e c) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes umidades no biorreator e Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre cultivos no biorreator e no Erlenmeyer. Estas diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a, b, c ou A, B) difere significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

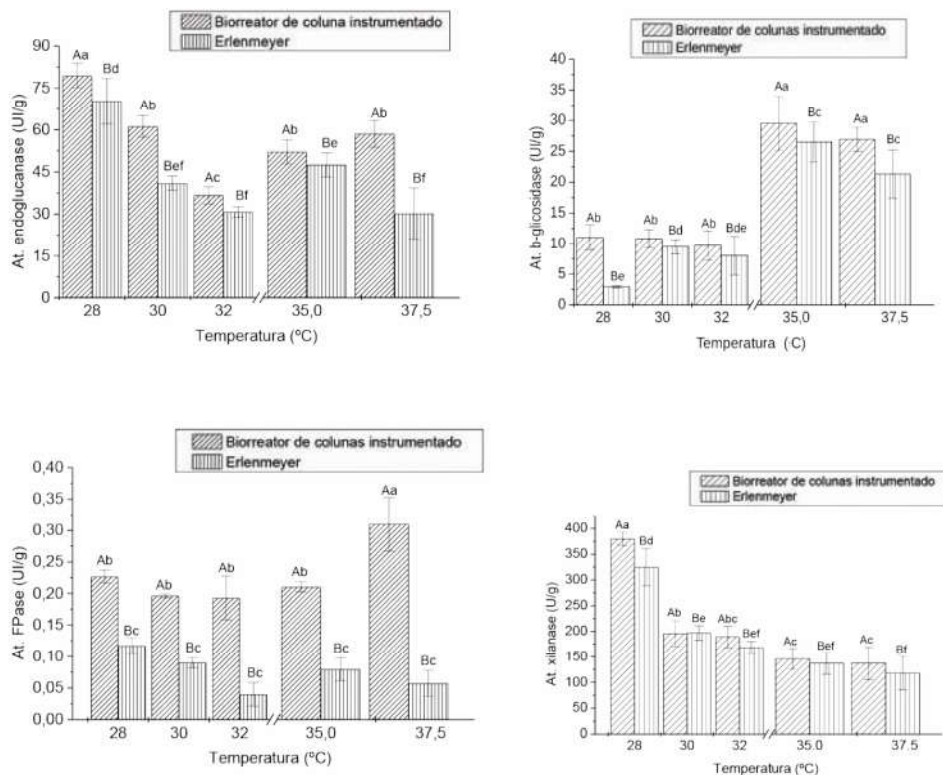
Os resultados obtidos demonstraram que o teor de umidade inicial desempenhou um papel importante na produção de celulases e xilanases pelo *A. oryzae* em cultivos realizados sob sistema de aeração estática. No entanto, o *A. oryzae* não foi muito sensível a variações no teor de umidade do substrato quando foi usado um sistema de biorreator com condições controladas de aeração forçada para produção de celulases e xilanases.



### 5.2 Efeito da temperatura

Nessa etapa do estudo, os cultivos foram realizados nas temperaturas de 28, 30, 32, 35, e 37 °C usando os sistemas de aeração estática e forçada em biorreator instrumentado, e o teor de umidade inicial de substrato foi fixado em 70%. Uma comparação do efeito da temperatura em termos de atividade de endoglucanase,  $\beta$ -glucosidase, FPase e xilanase sob os sistemas de aeração forçada e estática são apresentadas na Figura 13.

Para este conjunto de cultivos foi notável o efeito positivo sob condições controladas de aeração forçada, uma vez que a produção de celulases e xilanases foram significativamente maiores nas fermentações com aeração forçada do que nas realizadas sob condições estáticas. Isto pode ser explicado a partir das condições ambientais mais favoráveis obtidas no sistema de biorreator, como uma dissipação de calor eficiente, evitando-se gradientes de temperatura devido ao calor gerado como resultado da atividade microbiana.



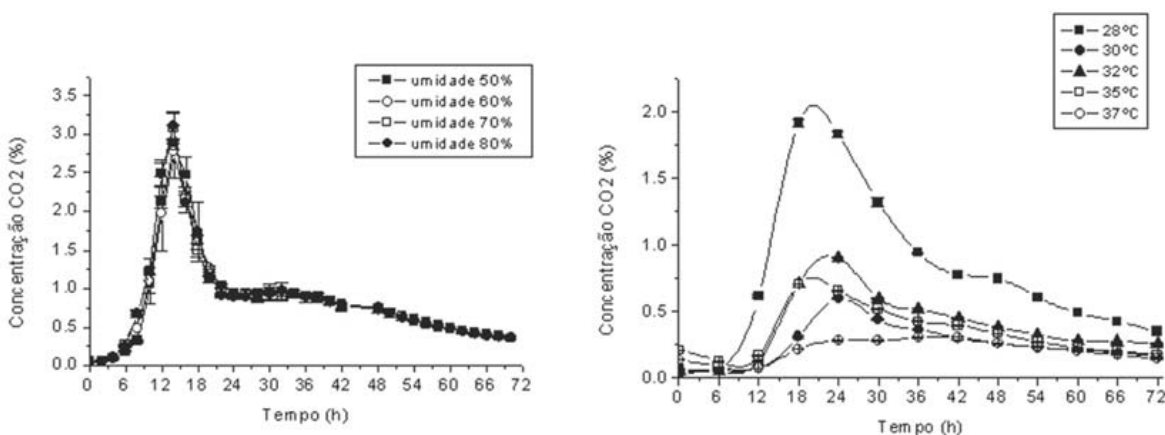
**Figura 13.** Efeito da temperatura sob (a), produção de endoglucanase, (b)  $\beta$ -glucosidase (c) FPase e (d) xilanase por *A. oryzae* cultivado em FES com aeração forçada e estática. Letras minúsculas (a, b, c, d, e, f) no gráfico indicam a comparação entre as diferentes temperaturas utilizadas para a fermentação no biorreator e Erlenmeyer. Letras maiúsculas (A e B) no gráfico indicam a comparação entre cultivos no biorreator e no Erlenmeyer. Estas diferenças foram calculadas pelo teste de Tukey quando o valor de F para a interação foi considerado significativo. As colunas que apresentam letras diferentes (a, b, c, d, e, f ou A, B) difere significativamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

É importante salientar que a temperatura é uma variável importante na FES e que afeta o crescimento microbiano e, por conseguinte, interfere na formação dos produtos de interesse. De forma semelhante ao efeito do teor de umidade, a caracterização particular de cada microrganismo, em termos de influência da temperatura na cinética de crescimento e formação de produto, é essencial para o desenvolvimento de bioprocessos para a FES. Com base nos resultados anteriores, o teor de umidade inicial de 70% e à temperatura de 28 °C foram selecionadas para a avaliação dos perfis de produção de celulasas e xilanases durante um período de 120 h de cultivo.

### 5.3 Análise respirométrica

A evolução do CO<sub>2</sub> durante o processo de fermentação foi monitorado através de um sensor ligado à corrente de gás que sai das colunas do sistema de biorreator instrumentado. Dados de CO<sub>2</sub> podem fornecer elementos importantes para a compreensão das relações entre o crescimento dos fungos e a produção de enzimas, uma vez que é difícil medir a biomassa microbiana em FES, devido à dificuldade de separar a biomassa do substrato utilizado para a fermentação. A Figura 14 apresenta a evolução do CO<sub>2</sub> sob as fermentações realizadas para avaliar os efeitos do teor de umidade inicial e temperatura.

Pode-se observar que as curvas de evolução do CO<sub>2</sub> representadas na Figura 14 são muito semelhantes. Isso pode implicar que o crescimento do fungo não foi afetado pelos diferentes teores de umidade utilizados, o que está de acordo com a observação anterior de que a produção de celulasas e xilanases não foram significativamente afetadas pela umidade inicial ao se utilizar um sistema de biorreator com aeração controlada e condições de umidade relativa do ar.



**Figura 14.** Evolução de CO<sub>2</sub> durante a produção de celulasas e xilanases pelo *A. oryzae* cultivado sob diferentes teores de umidade iniciais e diferentes temperaturas.

Em termos do efeito da temperatura sobre o crescimento dos fungos, pode-se observar que as curvas de evolução de CO<sub>2</sub> representadas na Figura 34b são muito distintas, apresentando um crescimento notável quando o cultivo foi realizado a 28 °C. Este crescimento significativamente favorável a 28 °C está de acordo com a condição de maior produção de endoglucanase e xilanase.

A caracterização de uma nova linhagem de *Aspergillus oryzae* isolado da Floresta Amazônica para produção de celulases e xilanases com o uso da fermentação em estado sólido sob condições operacionais controladas foi estudada em um biorreator de coluna instrumentado. Os resultados obtidos nesse estudo permitiram a seleção de variáveis que podem ser ajustadas de modo a melhorar a produção de celulases e xilanases. Esses resultados têm grande importância e potencial de aplicação na ampliação de escala do processo de FES.

## 6. Considerações finais

Apesar de todas as vantagens da fermentação em estado sólido (FES), esse processo ainda esbarra em uma desvantagem limitante de sua aplicação de uma forma mais ampla e direta em processos industriais: a dificuldade de monitoramento e controle das diversas variáveis envolvidas no processo. Na FES, o controle da temperatura, umidade, pH e troca de gases são fundamentais para o crescimento microbiano e a consequente produção de metabólitos de interesse. Fazer isso em um meio sólido e heterogêneo é um desafio.

Portanto, existe uma demanda para o desenvolvimento de instrumentação e sensores que permitam a implantação de um sistema de controle e automatização no processo de FES. Essa é uma etapa fundamental para o desenvolvimento destes biorreatores em escala industrial, uma vez que a FES, apesar de gerar elevados rendimentos para a produção de enzimas, impõe uma série de limitações operacionais que dificultam seu escalonamento.

Esse processo em escala industrial poderá gerar um impacto bastante representativo, pois está diretamente relacionado à viabilização de uma rota tecnológica que permite o aproveitamento do material celulósico proveniente de resíduos agroindustriais, tornando possível a diversificação das fontes de matéria-prima para a produção de biocombustíveis e outros produtos de interesse para o agronegócio.

## Referências

ABDESHAHIAN, P. et al. Solid Substrate Fermentation for Cellulase Production Using Palm Kernel Cake as a Renewable Lignocellulosic Source in Packed-bed Bioreactor. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** [s. l], v. 16, n. 2, p. 238-244, 2011. ISSN

Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura

1226-8372. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000290070800004 >. Acesso em: 05 fev. 2015.

ASSAMOI, A. A. et al. Solid-state fermentation of xylanase from *Penicillium canescens* 10-10c in a multi-layer-packed bed reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 145, n. 1-3, p. 87-98, mar. 2008. ISSN 0273-2289. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000255112300011 >. Acesso em: 05 fev. 2015.

BELLON-MAUREL, W.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 38, n. 6, p. 881-896, jan. 2003. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000181199400007 >. Acesso em: 05 fev. 2015

BERTUCCI NETO, V. et al. Sistema automatizado para processo de fermentação em estado sólido: produção de enzimas pelo fungo *Trichoderma harzianum*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS – SINAFERM, 18., 2010, Caxias do Sul. [S. l.: s.n], 2010.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 355-383, 2000. ISSN 0734-9750. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975000000410 >. Acesso em: 05 fev. 2015.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 120-128, jan. 2010. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274071200018 >.

COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - a review. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 291-302, out. 2006. ISSN 0260-8774. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237770200004 >.

DHILLON, G. S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 1160-1167, jul. 2011. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000293320100052 >.

DIAZ, A. B. et al. Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes. **Icheap-9: 9<sup>th</sup> International Conference on Chemical and Process Engineering**, [S. l.], v. 17, n. 1-3, p. 1041-1046, 2009. ISSN 1974-9791. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000270930200174 >.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 13, n. 2-3, p. 113-125, mar. 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180950500005 >.

FARINAS, C. et al. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 1186-1192, jul. 2011. ISSN 0926-6690.

FONSECA, R. F. **Sistema de controle de fluxo, temperatura e umidade relativa do ar para processos de fermentação em estado sólido**. 2012. 110 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

GALANTE, Y.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of Trichoderma enzymes in food and feed industries. In: HARMAN, G. F.; KUBICEK, C. P. (Org.). **Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications**. v. 2. Londres: Taylor & Francis, 1998. p. 327-342.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, [S. I.], v. 13, n. 2-3, p. 85-101, mar. 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180950500003>.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. W. (Org.). **Industrial Enzymology**, [S. I.]: Macmillan, p. 226-234, 1996.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. I.], v. 64, n. 2, p. 175-186, abr. 2004. ISSN 0175-7598.

HWANG, H. T. et al. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: protein engineering and lipase production. **Biotechnology and bioengineering**, [S. I.], v. 111, n. 4, p. 639-653, abr. 2014. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000332008500001>. Acesso em: 05 fev. 2015.

KALOGERIS, E. et al. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, [S. I.], v. 86, n. 3, p. 207-213, fev. 2003. ISSN 0960-8524. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180080100001>.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiological Biotechnology**, [S. I.], v. 64, n. 2, p. 137-145, 2004.

LONSANE, B. K. et al. Scale-up strategies for solid-state fermentation systems. **Process Biochemistry**, [S. I.], v. 27, n. 5, p. 259-273, set. 1992. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992JN35300001>.

LYND, L. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. I.], v. 66, n. 3, p. 506-577, set. 2002. ISSN 1092-2172.

NAGEL, F. et al. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. I.], v. 72, n. 2, p. 219-230, jan. 2001. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166233500010>.

PANAGIOTOU, G. et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, [S. I.], v. 18, n. 1, p. 37-45, jul. 2003. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000183480200005>.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, [S. I.], v. 35, n. 10, p. 1153-1169, jul. 2000. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088155200010>.

Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura

PIROTA, R. et al. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, [S. I.], v. 45, p. 465-471, fev. 2013. ISSN 0926-6690. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000316832000067>.

POLIZELI, M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. I.], v. 67, n. 5, p. 577-591, jun. 2005. ISSN 0175-7598. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000229722400001>.

RAGHAVARAO, K.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, [S. I.], v. 13, n. 2-3, p. 127-135, mar. 2003. ISSN 1369-703X.

RAIMBAULT, R. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S. I.], v. 1, p. 3-45, 1998.

RATHBUN, B. L.; SHULER, M. L. Heat and mass-transfer effects in static solid-substrate fermentations - design of fermentation chambers. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. I.], v. 25, n. 4, p. 929-938, 1983. ISSN 0006-3592. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1983QL43400004>.

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F. et al. Integrated strategies to enhance cellulolytic enzyme production using an instrumented bioreactor for solid-state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioenergy Research**, [S. I.], v. 6, n. 1, p. 142-152, mar. 2013. ISSN 1939-1234. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000314518300014>.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research & Development**, [S. I.], v. 15, n. 1, p. 224-230, jan./fev. 2011. ISSN 1083-6160. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000286306100025>.

SAUCEDO-CASTANEDA, G. et al. Online automated monitoring and control-systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, [S. I.], v. 29, n. 1, p. 13-24, 1994. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994MM38400003>.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal** [S.I.], v. 44, n. 1, p. 13-18, abr. 2009. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264643300003>.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal** [S.I.], v. 13, n. 2-3, p. 205-218, mar. 2003. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180950500014>.

SONI, S. et al. Bioconversion of sugarcane bagasse into second generation bioethanol after enzymatic hydrolysis with in-house produced cellulases from *aspergillus* sp S(4)B(2)F. **Bioresources**, [S. I.], v. 5, n. 2, p. 741-757, 2010. ISSN 1930-2126.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A. **Principles of fermentation technology**. Oxford: Pergamon, 1993.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state

fermentation. **Biochemical Engineering Journal** [S.l.], v. 81, p. 146-161, dez. 2013. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000329772500018 >.

VAN ZYL, W. H. et al. Fungal beta-mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 45, n. 8, p. 1203-1213, ago. 2010. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000280382800001>.

VITCOSQUE, G. L. et al. Production of biomass - degrading multienzyme complexes under solid-state fermentation of soybean meal using a bioreactor. **Enzyme Research** [S.l.], p. 9, 2012.

XIA, L. M.; CEN, P. L. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 34, n. 9, p. 909-912, out. 1999. ISSN 1359-5113. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000083546800006>.

ZANELATO, A. I. et al. Endoglucanase production with the newly isolated myceliophthora sp I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology** [S.l.], v. 43, n. 4, p. 1536-1544, out./dez. 2012. ISSN 1517-8382. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315286400038>.