

SIAGRO

Ciência, Inovação e Mercado - 2014

Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Instrumentação

São Carlos, SP - Brasil



Editores:

Carlos Manoel Pedro Vaz

Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

Silvio Crestana

Embrapa

Instrumentação



AVANÇOS NO DESENVOLVIMENTO DA INSTRUMENTAÇÃO E CONTROLE DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

R. F. Fonseca^{1,2}, C. B. Melo², C. S. Farinas^{1,2}, W. H. Kwong², V. Bertucci-Neto¹

(1) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, rfrederico@gmail.com

(2) Departamento de Engenharia Química, UFSCar, Rodovia Washington Luiz, km 235, 13565-905, São Carlos, SP

Resumo: A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica importante para a produção de enzimas para hidrólise de biomassa vegetal. No entanto, a FES apresenta uma série de dificuldades técnicas para se tornar viável em escala industrial. Nesse trabalho são apresentados alguns dos avanços na automação de biorreatores e um estudo da cinética de produção enzimática realizados no Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação que visam superar essas dificuldades. Demonstra-se aqui a possibilidade do aumento da quantidade de enzimas produzidas através da otimização da dinâmica do processo.

Palavras-chave: fermentação em estado sólido, desenvolvimento de processo, hidrólise enzimática, controle robusto.

ADVANCES IN SOLID STATE FERMENTATION DEVELOPMENT

Abstract: Solid state fermentation (SSF) is an important technique for the production of enzymes to hydrolyze vegetable biomass. However, SSF presents a number of technical issues to become feasible on an industrial scale. In this paper it is presented some of the advances achieved in bioreactors automation and a study in the enzymatic production kinetic made in the Laboratório de Agroenergia of Embrapa Instrumentação in order to overcome these issues. Here it is demonstrated the possibility of increasing the amount of enzymes produced by the process dynamics optimization.

Keywords: solid state fermentation, process development, enzymatic hydrolysis, robust control.

1. Introdução

Os primeiros registros dos processos fermentativos estão datados por volta de 6000 a.C. e descrevem a produção de cerveja, vinhos e pães na Babilônia e no Egito. A cerca de 3000 a.C. iniciou-se a fabricação de shoyu na China e no Japão, de queijos e iogurtes nos Balcãs e na Ásia Central. Hoje em dia, esses processos fermentativos são utilizados para a obtenção de produtos de interesse comercial em diversos ramos industriais, como o setor farmacêutico, de alimentos e bebidas, têxtil, na agricultura, dentre outros (Shaechter, 2004). Dentre esses bioprodutos se destaca a produção microbiana de enzimas, por possuírem diversas aplicações e cujo mercado está em crescente evolução, sendo uma alternativa importante aos processos químicos convencionais.

O crescimento microbiano para a produção de enzimas pode ser conduzido através da fermentação submersa (FSm), na qual o meio é constituído basicamente por água e nutrientes nela dissolvidos, ou da fermentação em estado sólido (FES), que é definida como um processo de cultivo de microrganismos em substrato sólido, contendo uma quantidade de água suficiente apenas para manter o crescimento e o metabolismo do microrganismo, caracterizado pela ausência de água livre (Raghavarao, Ranganathan e Karanth, 2003; Holker, Hofer e Lenz, 2004; Singhania *et al.*, 2009).

Atualmente, cerca de 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por FSm. Por outro lado, os processos de FES apresentam vantagens quando comparados aos de FSm, pois são capazes de utilizar resíduos agroindustriais sólidos e em alguns casos dispensam esterilização por causa da baixa quantidade de água necessária no processo. Constata-se também uma maior produtividade enzimática quando comparada aos processos de FSm, e, além disso, as enzimas produzidas pela FES são menos susceptíveis a problemas de inibição por substrato e possuem uma maior estabilidade térmica e a variações do pH do meio (Holker, Hofer e Lenz, 2004).

Apesar de apresentar vantagens, a FES ainda não é aplicada em escala industrial devido às dificuldades de controle e monitoração das variáveis durante o processo, sendo algumas das principais: a temperatura, o pH do meio, e a quantidade de água disponível para os microrganismos. Essas dificuldades ocorrem devido à ausência de água livre, a baixa condutividade térmica e heterogeneidade dos substratos sólidos (Sargantanis *et al.*, 1993; Holker e Lenz, 2005).

O objetivo deste trabalho é apresentar como alguns dos avanços realizados pelos colaboradores do Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação contribuem para o desenvolvimento da fermentação em estado sólido - FES. Nesse trabalho será abordada a importância do desenvolvimento da instrumentação, da automação e do controle dos biorreatores de coluna e tambor rotativo.

2. Materiais e Métodos

O desenvolvimento de um sistema de controle preciso para o biorreator de colunas adaptado de (Raimbault e Alazard, 1980) tem sido peça chave no desenvolvimento dos processos de FES. O uso desse tipo de biorreator é particularmente útil, pois é possível realizar estudos com diferentes condições de processo. Com isso, através de planejamentos experimentais criteriosamente realizados, muitas informações a respeito de quais são as melhores condições para a realização do processo são obtidas (Farinas *et al.*, 2011; Vitcosque *et al.*, 2012; Pirota *et al.*, 2013).

Esse biorreator conta atualmente com um sistema de distribuição de fluxo para cada uma das 12 colunas admitidas por vez. Essas colunas apresentam volume máximo de 20mL e têm sido utilizadas para fermentação de cerca de 5 gramas de biomassa. Também conta com um sistema de controle robusto da umidade relativa do ar, do fluxo de ar e da temperatura do processo. A Figura 1 mostra o esquema de controle da umidade relativa do ar.

Atualmente está sendo desenvolvido um biorreator de tambor rotativo (BTR), com capacidade útil aproximadamente 50 vezes maior do que as colunas de fermentação. As soluções técnicas utilizadas no biorreator de colunas, conforme apresentadas na Figura 1, tiveram de ser reelaboradas para que fossem eficientes nesse biorreator. Os principais fatores de mudanças foram o fato das colunas estarem imersas em um banho térmico controlado, enquanto o BTR encontra-se em uma cuba com ar aquecido, além disso, a taxa de fluxo de ar necessária para alimentação desse é proporcional ao aumento da escala, o que gerou dificuldades nas soluções dos problemas de transferências da água para o ar.

Dentre os desafios previstos para o desenvolvimento do BTR encontram-se a elaboração de pás eficientes para agitação e metodologias de aeração que melhorem a eficiência da troca de calor do meio fermentativo. Também será necessário o desenvolvimento de um sistema de otimização e controle do processo em tempo real que considere as variações de temperatura e umidade do meio fermentativo.

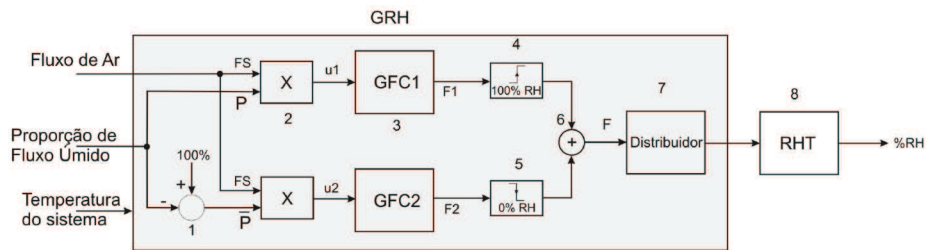


Figura 1: Diagrama de blocos do sistema de aeração do biorreator de FES em malha aberta. 1- Proporção de Fluxo Seco (subtrai do fluxo total a quantidade de fluxo de ar úmido), 2- Multiplicadores de Fluxo por Razão de Fluxo (seco ou úmido), 3- Controladores de Fluxo de Massa, 4- Umidificador de Ar, 5- 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 e a temperatura do sistema, 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.

Outro fator importante para a viabilização da produção *in situ* é o aumento da produção das enzimas utilizando técnicas de otimização de processo. Para tal, foram estudadas e modeladas as cinéticas do crescimento microbiano e da produção dos metabólitos. O uso de tal modelo para otimização das condições do processo ao longo do tempo mostra a possibilidade de um aumento expressivo na produção das enzimas por quantidade de substrato utilizado. Nesse trabalho foi desenvolvido um algoritmo de busca simples para avaliar qual seria o melhor caminho de ambas as condições ambientais e qual seria a melhor condição inicial para prover a máxima produção possível para o modelo assumido. As Equações de (1) a (7) mostram o modelo utilizado, sendo que a Equação (6) descreve a produção da enzima CMCase enquanto a Equação 7 descreve a produção da enzima Xilanase.

$$\frac{dX_{V_1}}{dt} = \mu X_{V_1} \left(1 - \left(\frac{X_{T_1}}{X_{M_1}} \right)^n \right) - k_d X_{V_1} \quad (1)$$

$$\frac{dX_{T_1}}{dt} = \mu X_{T_1} \left(1 - \left(\frac{X_{T_1}}{X_{M_1}} \right)^n \right) \quad (2)$$

$$\frac{dX_{V_2}}{dt} = \mu X_{V_2} \left(1 - \left(\frac{X_{T_2}}{X_{M_2}} \right)^n \right) - k_d X_{V_2} \quad (3)$$

$$\frac{dX_{T_2}}{dt} = \mu X_{T_2} \left(1 - \left(\frac{X_{T_2}}{X_{M_2}} \right)^n \right) \tag{4}$$

$$CO_2(t) = Y_{XCO_2}(X_{V_1} + X_{V_2}) \tag{5}$$

$$\frac{dC}{dt} = \alpha_1 \frac{dX_{V_1}}{dt} + \alpha_2 \frac{dX_{V_2}}{dt} + \gamma - k_D P \tag{6}$$

$$\frac{dX}{dt} = \alpha \left(\frac{dX_{V_1}}{dt} + \frac{dX_{V_2}}{dt} \right) + \beta(X_{V_1} + X_{V_2}) - k_D P \tag{7}$$

4. Resultados

A Figura 2 mostra, como aplicação do biorreator de colunas desenvolvido, o estudo da cinética da produção enzimática em diversas condições ambientais. O estudo revela que existe uma região de condições ambientais mais apropriadas para fermentação em ambientes heterogêneos, mostrada em vermelho escuro. Nessa figura é mostrada a cinética do produto entre as enzimas Xilanase e CMCase respectivamente amostradas em 24, 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente (a), (b) e (c), pelo microrganismo *Aspergillus niger* 3T5B8.

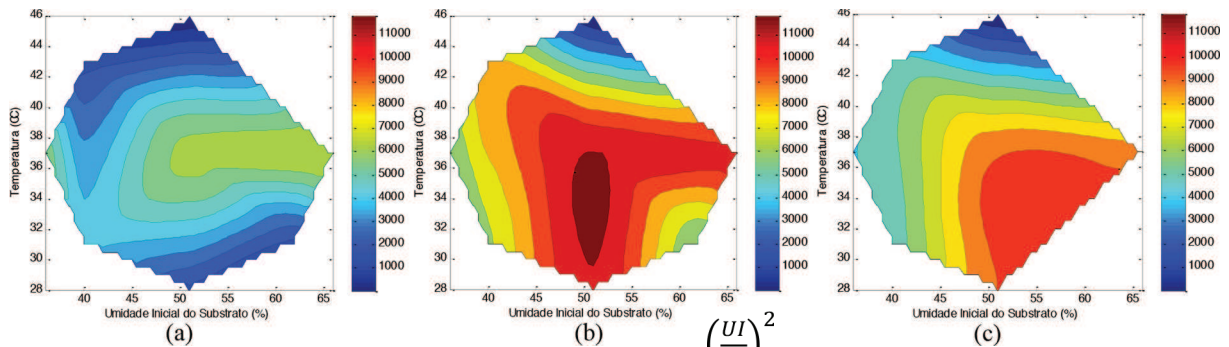


Figura 2. Gráfico do produto das atividades enzimáticas $\left(\frac{UI}{g}\right)^2$ x Temperatura (°C) x Umidade inicial do substrato em: 24h (a), 48h (b) e 72h (c) obtidos por FES em biorreator de colunas. A barra lateral das figuras indica a cor referente ao produto das atividades enzimáticas de cada nível da superfície de resposta.

A Figura 3 (a) e (b) mostram respectivamente o resultado da simulação das condições ótimas para o processo ao longo do tempo e a simulação da produção das enzimas.

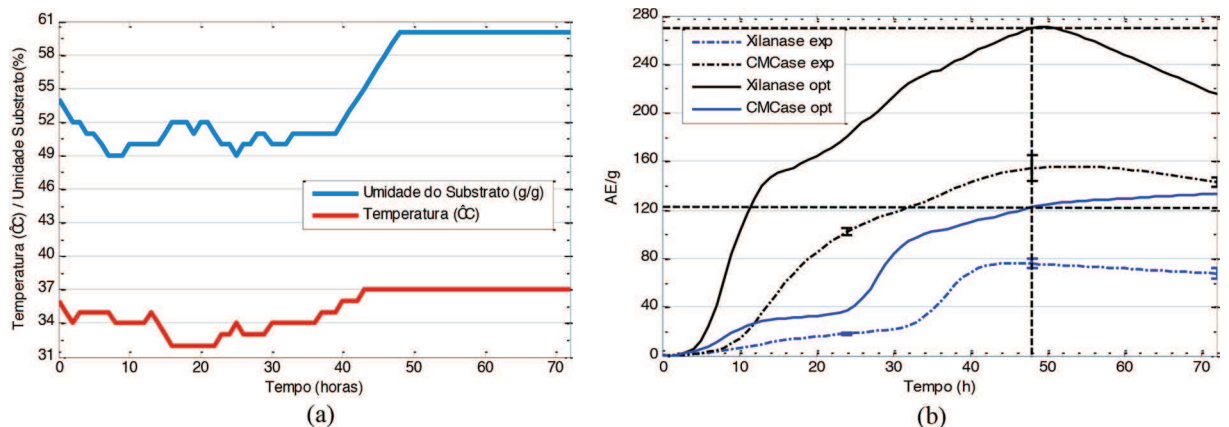


Figura 3. Resultado da otimização das condições ambientais do processo (a) e comparação entre a simulação do modelo nas condições experimentais de maior produção e produção enzimática nas condições otimizadas do processo (b).

5. Conclusões

Tanto o modelo ajustado, quanto a otimização da dinâmica das condições ambientais do processo ainda não foram validados, todavia, essas hipóteses mostram-se promissoras para o desenvolvimento da fermentação em estado sólido. Consequentemente, os avanços no conhecimento do processo são um passo a mais na direção de se tornar viável o uso da FES na produção em escalas maiores.

Agradecimentos

À CAPES e ao CNPq pelas bolsas e suporte à pesquisa. Ao ex-estagiário Flávio César Freire Baleeiro e aos técnicos Luís Aparecido de Godoy e Jorge Luiz Novi da Embrapa Instrumentação que deram o suporte da pesquisa.

Referências

- FARINAS, C. et al. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. *Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 1, p. 1186-1192, JUL 2011 2011. ISSN 0926-6690.
- HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, n. 2, p. 175-186, APR 2004 2004. ISSN 0175-7598.
- HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 301-306, Jun 2005. ISSN 1369-5274. PIROTA, R. D. P. B. 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*, v. 45, p. 6, 2013.
- RAGHAVARAO, K.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, n. 2-3, p. 127-135, MAR 2003 2003. ISSN 1369-703X.
- RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. CULTURE METHOD TO STUDY FUNGAL GROWTH IN SOLID FERMENTATION. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 9, n. 3, p. 199-209, 1980 1980. ISSN 0340-2118.
- SARGANTANIS, J. et al. EFFECT OF OPERATING-CONDITIONS ON SOLID SUBSTRATE FERMENTATION. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, n. 2, p. 149-158, Jun 1993. ISSN 0006-3592. SHAECHTER, M. *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Academic Press, 2004. 1169.
- SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n. 1, p. 13-18, Apr 2009. ISSN 1369-703X.
- VITCOSQUE, G. L. et al. Production of Biomass-Degrading Multienzyme Complexes under Solid-State Fermentation of Soybean Meal Using a Bioreactor. *Enzyme Research*, v. 2012, p. 9 p, 2012.