



INAFERM 2011

XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos

Realização:

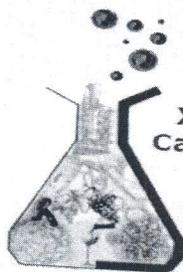


ABEQ Associação Brasileira de Engenharia Química

ISSN 2236-5184

Universidade de Caxias do Sul
Cidade Universitária - Bloco M - UCS Teatro
Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil
24 a 27 de julho de 2011

Todos os direitos reservados - Desenvolvido por Adaltech Soluções para Eventos



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

Sistema Automatizado para Processos de Fermentação em Estado Sólido: Produção de Enzimas pelo Fungo *Trichoderma harzianum*

Victor Bertucci-Neto¹, Rafael Frederico Fonseca², Rosangela D. P. Buzon Pirota³,
Cristiane Sanchez Farinas¹

¹ Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, Brasil.
E-mail: victor@cnpdia.embrapa.br; cristiane@cnpdia.embrapa.br

² Escola de Engenharia de São Carlos – USP, Depto. De Engenharia Elétrica, São Carlos, SP, Brasil.
Brasil. E-mail: rfrederico@gmail.com

³ Universidade Federal de São Carlos (UFSCar); Rod. Washington Luís, Km 235, 13565-905,
São Carlos, SP, Brasil. E-mail: rosa_angelapirota@hotmail.com

RESUMO

*Processos de Fermentação em Estado Sólido (FES) podem ser descritos como o crescimento de microorganismos em substratos sólidos na ausência de água livre. A FES possui um futuro promissor, em particular na valorização de produtos agroindustriais, biodegradação de resíduos sólidos, na atenuação de poluentes orgânicos em solos, e na redução da poluição atmosférica por biofiltração. Por sua vez, existem poucos trabalhos envolvendo a automação de processos de FES e produção de enzimas. Neste trabalho é apresentado um reator de FES automatizado e instrumentado de forma a medir e controlar variáveis fundamentais ao processo. São apresentados experimentos com o fungo *Trichoderma harzianum* (P34P9), isolado da região Amazônica e os resultados relativos à produção de xilanase e CMCase são comparados em condições impostas com o reator e em frascos sem aeração forçada. Observa-se um comportamento crescente entre a produção de biomassa, enzimas e a umidade inicial do substrato.*

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido, reator, automação, instrumentação, enzima.

INTRODUÇÃO

Um processo de Fermentação em Estado Sólido (FES) pode ser descrito como o crescimento de microorganismos em substratos sólidos na ausência de água livre. Os processos de FES possuem um futuro promissor, em particular na valorização de produtos agroindustriais e na biodegradação de resíduos sólidos. Entretanto, os processos de FES raramente são realizados em grande escala, a despeito de algumas vantagens em relação aos processos de Fermentação Submersa (FS). Dentre estas vantagens podem ser citadas a possibilidade de bioconversão de resíduos sólidos, menor uso de água, e menor quantidade de dejetos produzidos. O uso de FES também se mostra particularmente vantajoso para a produção de enzimas, possibilitando maior produtividade quando comparada ao processo de FS, e menor custo (Zhuang, *et al.* 2007). Atualmente existe um renovado interesse em processos de FES no que diz respeito à produção de enzimas para produzir açúcares a partir



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

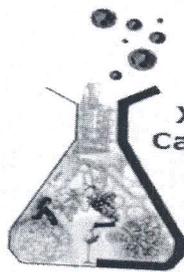
de bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, e produzir Etanol, no que tem sido chamado de Etanol de Segunda Geração. Dessa forma, o interesse pelo desenvolvimento de FES para produção de enzimas em grande escala tem se tornado crescente.

Cada processo necessita de caracterização segundo propriedades físicas e biológicas, partindo de escalas de bancada até escalas maiores. As limitações de produtividade se devem à grande variabilidade espacial, no que diz respeito aos parâmetros físicos, que ocorre no substrato. As soluções encontradas para crescimento da biomassa são variadas, incluindo reatores de bandeja, colunas, e tambor rotativo (Lonsane, 1985). Por sua vez, a instrumentação necessária para cada processo se reveste cada vez mais de importância dada a rapidez com que a tecnologia de sensores, aquisição de dados, e programação de dados, avança nos dias atuais. 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 e instrumentação são imprescindíveis para o controle do processo sendo úteis, também, para compreensão dos fenômenos físicos que interagem com os biológicos.

Baseado nisto foi desenvolvido um reator de colunas aeradas dotado de sensores e atuadores de forma que se possam medir muitas variáveis do processo e controlar automaticamente outras de acordo com as necessidades do usuário (Bertucci-Neto, *et al.* 2009). Com o uso desse sistema foi possível obter um conjunto de resultados, apresentados neste trabalho, referentes ao cultivo do microorganismo *Trichoderma harzianum* (P34P9), coletado na região Amazônica, em frascos e em colunas aeradas (reator automatizado). Em ambos os casos foram considerados diferentes valores de umidade inicial do substrato, e após o término de cada processo foram medidas as atividades de xilanase e CMCase. A análise dos resultados permitiu mostrar que o objetivo do trabalho, mostrar que a instrumentação e automação de processos de FES podem ser essenciais para a compreensão dos mesmos, foi alcançado em relação a algumas condições particulares, no caso, mostrar que a umidade inicial do substrato pode ser preponderante para o resultado final de crescimento da biomassa, e por sua vez na concentração de enzimas.

MATERIAL E MÉTODOS

O princípio de funcionamento do reator automatizado de processos de FES é manter uma razão entre fluxo de ar seco com outro de ar saturado com água de forma a obter um fluxo de ar constante com umidade também constante, conforme a necessidade do operador. O sistema é composto de uma entrada de ar saturado de água e outra de ar seco. Cada uma dessas linhas de entrada possui um controlador de fluxo de massa, (marca Aalborg, EUA), que é comandado por sinal elétrico entre 0 e 5 volts DC. Os controladores possuem saída elétrica referente à medida de fluxo e são garantidos de fábrica com erro não maior do que $\pm 1,5\%$ do fundo de escala. As tubulações de ar seco e úmido são ligadas entre si para fazer a mistura ajustada pelos comandos. Um conjunto sensor (marca Vaisala, Finlândia), com erro menor do que $\pm 1,5\%$ mede a umidade relativa e a temperatura do ar resultantes dessa mistura. Um segundo conjunto sensor (marca Vaisala, Finlândia), com erro menor que $\pm 1\%$, mede a concentração de CO_2 na saída de cada coluna aerada. O sistema pode comportar até 16 colunas aeradas (2,5 cm de diâmetro e 20 cm de comprimento) com o mesmo valor de fluxo, umidade, e temperatura do ar. Todos os componentes relacionados ao fluxo de ar (colunas de fermentação e tubulação) são imersos em banho com temperatura controlada. Os controladores de fluxo de massa controlam o fluxo de ar entre 0 e 1 litro/minuto, de acordo com o comando elétrico. Um sistema mecânico divide a taxa de fluxo igualmente para todas



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

as colunas. As medidas são armazenadas através de uma placa de aquisição de dados, a qual possui, entre outras características, 16 canais de entradas analógicas (ou oito entradas diferenciais) e quatro canais de saídas analógicas para acionamento externo. A seqüência de medidas, armazenamento de dados, desenhos de gráficos em tempo real, e acionamento dos controladores de fluxo de massa, é feita com auxílio de um programa de computador baseado em interface gráfica, chamado *LabView*, versão 8.2, da *National Instruments*. Este programa permite o desenvolvimento de instrumentos virtuais que fazem interface com placas de aquisição de dados, a exemplo do que foi usado no sistema. As medidas e acionamentos são feitas em intervalos de tempo escolhidos pelo operador (Bertucci-Neto *et al.* 2009; Farinas *et al.* 2011).

Na Figura 1 é mostrado o diagrama em blocos do sistema automatizado. Os valores desejados de fluxo de ar e umidade são impostos via interface com computador nas entradas FS e RHS respectivamente. A entrada RHS subtraída do valor de umidade medido, M2, resulta no sinal que será enviado ao bloco do controlador de umidade, CRH, formando uma realimentação negativa. O sinal referente à proporção de umidade, P, é multiplicado pelo valor de fluxo desejado para o ar seco, e o sinal complementar, $P' = 100\% - P$ é multiplicado também por FS. Os sinais resultantes, u1, e u2, são usados para controlar os fluxos de ar úmido e seco, respectivamente, por meio dos controladores de fluxo de massa GFC1, e GFC2.

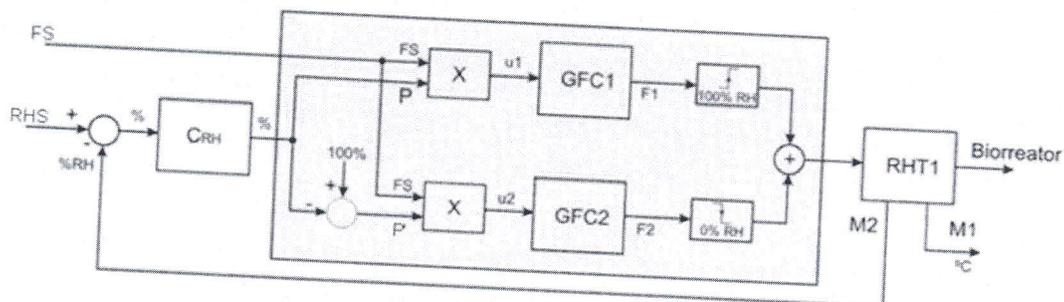
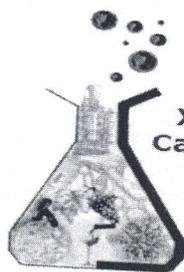


Figura 1. Diagrama em blocos do sistema de controle de umidade e fluxo.

Os controladores vão dosar em cada linha o fluxo com os valores calculados que depois resultam na soma de F1 e F2, após passarem pelo umidificador (100%RH) e pelo secador (0%RH), respectivamente. O fluxo resultante da soma dos dois fluxos (seco e úmido) é amostrado por sensores de umidade e temperatura (bloco RHT1) antes de seguirem para as colunas do biorreator. O sinal M2 é usado para a realimentação negativa do controle de umidade, resultando em um sinal de erro em umidade que é a entrada do bloco controlador CRH. Neste bloco foi implementada, via programação de computador, a lei de controle do sistema equivalente à soma de ganhos que multiplicam o sinal de erro, a integral do erro, e a derivada do erro. Esse controlador é conhecido como PID (Proporcional+Integral+Derivativo) e os ganhos podem ser ajustados manualmente, ou a partir de métodos clássicos como, por exemplo, os propostos por Ziegler e Nichols. Os ajustes dos ganhos PID foram feitos para a temperatura de operação de fermentação (35° C) de forma a se manterem na faixa de erro do sensor de umidade ($\pm 1,5\%$) em regime estacionário. Também foram ajustados para que ocorresse sobressinal inferior a 7% do valor em regime estacionário.



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

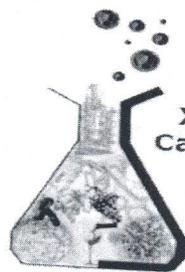
INAFERM 2011

Para os experimentos de FES foi utilizado o fungo *Trichoderma harzianum* (P34P9), isolado da região Amazônica (Delabona, 2011), o qual pertence à coleção do laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação – São Carlos/SP. A cultura foi mantida em tubos em meio PDA a temperatura ambiente, sob fina camada de óleo mineral. A FES foi conduzida em biorreator de colunas com 2,5 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento, contendo 10 g de farelo de trigo lavado. Após a inoculação dos esporos (10^7 esporos/g) foi adicionada solução nutriente (Meio de Mandels e Weber, 1969) até a obtenção de umidade de 50, 60, 70 e 80%. A vazão de ar utilizada foi de 20 mL/min e a umidade do ar foi de 80%. A incubação foi feita a 35°C, por 72h. Visando a comparação entre condições dinâmicas (biorreator) e estáticas foram realizadas FES em erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de substrato sólido suplementado com o meio de cultivo nas mesmas condições de umidade inicial aos experimentos em biorreator. Após o período de cultivo, foram adicionados ao material fermentado tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,8 na relação de 1:10 (m:v), sendo homogeneizado e posteriormente agitado por 30 min, a 100 rpm. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000 rpm durante 20 min, a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

A atividade da xilanase foi medida em mistura de reação contendo 0,1 mL do extrato enzimático bruto e 0,9 ml de uma solução de 1% de xilana em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 5,0. Após incubação a 50 °C por 10 minutos, os açúcares redutores foram quantificados pelo método DNS (Miller, 1959). O mesmo procedimento foi utilizado para a atividade de CMCase, exceto que o substrato utilizado foi 4% de CMC em tampão citrato de sódio 50mM e pH 4,8. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de substância redutora por minuto nas condições de ensaio, utilizando curvas padrão de xilose e glicose.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 2 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 em 16 linhas, 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%. Apesar da temperatura do banho térmico se manter constante em $35^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$, o que garante que todas as tubulações e colunas estejam sob a mesma temperatura, conforme mostrado na Figura 2, na curva Temp, o conjunto composto pelos controladores de umidade, secador e umidificador é externo ao banho, ou seja, fica sob temperatura ambiente. Além disso, o ar que alimenta o sistema até a entrada do banho também é exposto à variação da temperatura ambiente. Entretanto, o controlador do sistema consegue dosar a variação de fluxo de ar seco e ar úmido de forma que a soma total FT se mantenha constante, e mais que isso, a umidade final, medida na tubulação dentro do banho se mantenha constante, conforme o valor comandado pelo operador. Dessa forma, todas as colunas de fermentação ficaram sob a mesma temperatura, mesmo valor de fluxo de ar, e umidade relativa durante todo o tempo do processo, respeitadas as margens de erro de medida.



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

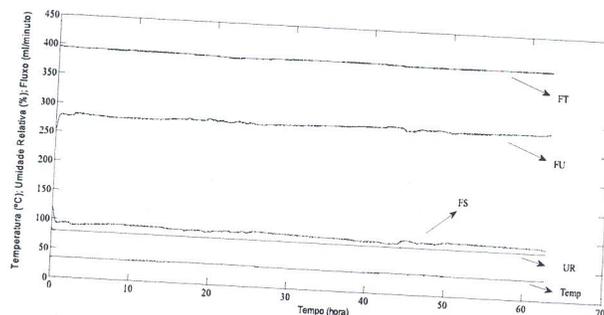


Figura 2. Comportamento do sistema automatizado durante o processo de FES. FT: fluxo total de ar; FU: fluxo de ar úmido; FS: fluxo de ar seco; UR: umidade relativa do ar que alimenta as colunas; Temp: temperatura do ar.

Na Figura 3 observa-se o comportamento da produção de CO_2 em cada coluna (neste caso foi usada a medida de somente uma das colunas de cada triplicata para efeito de simplificação do gráfico). Os índices P50, P60, P70, e P80, referem-se aos picos de produção de CO_2 ao longo do processo, respectivamente aos valores de umidade inicial do substrato iguais a 50%, 60%, 70%, e 80%. 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.

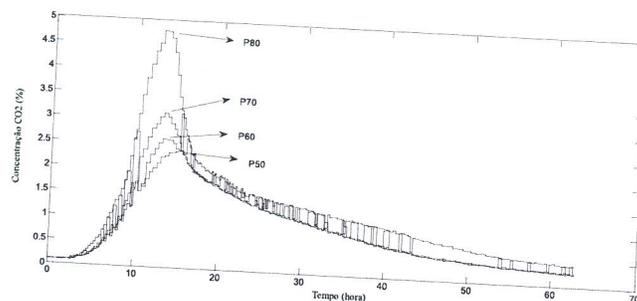
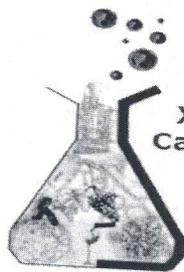


Figura 3. Medida de concentração de CO_2 em cada coluna de FES. P50, P60, P70, e P80: picos de concentração referentes às umidades relativas iniciais do substrato iguais a 50%, 60%, 70%, e 80%, respectivamente.

Apesar de não se dispor de amostragem de medida de umidade do substrato ao longo do processo, ou seja, tem-se uma variável não observável, este resultado é interessante, pois é de se esperar que todas as colunas apresentem condições muito próximas de acúmulo de água após aeração com umidade relativa igual a 80% durante mais de 60 horas.

A questão que se coloca é se a produção de biomassa também se relaciona com a atividade enzimática medida. Isto pode ser verificado na Figura 4. As atividades medidas da xilanase e da CMCase são comparadas com a produção obtida em Erlenmeyers, neste caso sem a aeração controlada, mas sob a mesma temperatura de 35°C , e mesmos valores de umidade inicial do substrato. Observa-se que sem aeração, a maior variação ocorreu na produção de endoglucanase com umidade inicial de substrato igual a 80%, enquanto nos outros casos a variação é pequena, inclusive na produção de xilanase. Por sua vez, ocorreu uma variação mais expressiva na produção de xilanase, e menos expressiva na produção de endoglucanase, no caso de colunas aeradas.



XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos
Caxias do Sul/RS - 24 a 27 de julho de 2011

INAFERM 2011

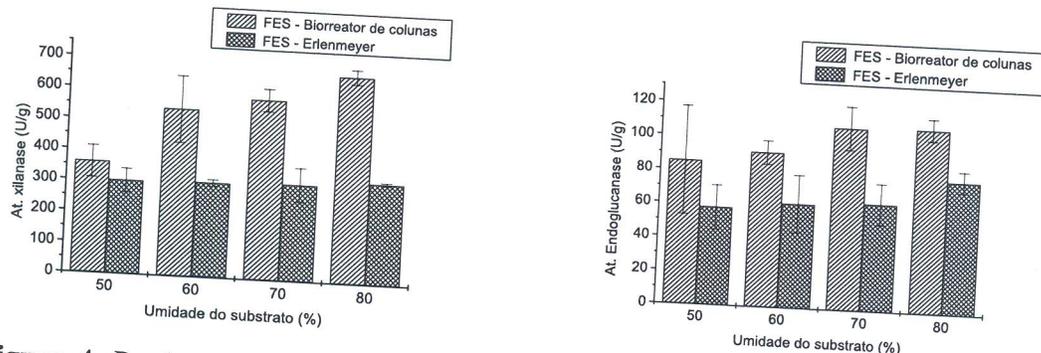


Figura 4. Produção de xilanase e endoglucanase pelo *T. harzianum* (P34P9) por FES em biorreator de colunas e em erlenmeyer utilizando como substrato farelo de trigo lavado.

CONCLUSÕES

O sistema automatizado para processos de FES demonstrou ser útil na observação do comportamento do crescimento de biomassa segundo a variação de apenas um dos parâmetros, ou seja, da umidade inicial do substrato. Apesar da relativamente longa duração do processo as variáveis de interesse mantiveram-se constantes conforme a imposição do operador. O comportamento devido à produção de CO₂ mostrou-se diretamente relacionado com a umidade inicial do substrato, e também com a produção enzimática. Verificou-se que a produção de enzimas com aeração forçada foi superior à obtida em frascos, mesmo no caso de umidade inicial do substrato mais baixa. Desta forma, com a capacidade verificada pelo sistema automatizado, prevê-se a possibilidade de trabalhar com mais faixas de atuação do sistema, seja no fluxo total, umidade relativa, e temperatura do ar de alimentação de cada coluna, procurando-se, assim, regiões mais próximas de alta produção de enzimas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bertucci-Neto, V.; Fonseca, R. F.; Francisco, R. A.; Farinas, C. S. e Couri, S. (2009), Controle automático de fluxo e ajuste de umidade do ar de alimentação em reatores de fermentação sólida. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos SINAFERM 2009, 2009, Natal. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.
- Delabona, P.S. (2011), Bioprospecção de fungos produtores de celulasas da região amazônica para a produção de etanol celulósico. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.
- Farinas, C. S.; Vitcosque, G. L.; Fonseca, R. F.; Bertucci-Neto, V. e Couri, S. (2011), Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor, *Industrial Crops and Products*, v. 34, p. 1186-1192.
- Lonsane, B. K. (1985), Engineering aspects of solid state fermentation, *Review Enzyme Microbiology and Technology*, v.7, p. 258-265.
- Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*, v. 31, p. 426-428.
- Mandels, M. e Weber, J. (1969), The production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, v. 95, p. 391-414.
- Zhuang J.; Marchant M. A.; Nokes S. E. e Strobel H. J. (2007), Economic analysis of Cellulase production methods for Bio-Ethanol. *Applied Engineering*, v. 23, p. 679-687.