

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
LABORATÓRIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS**

**AVALIAÇÃO CINÉTICA E MODELAGEM MATEMÁTICA DA
PRODUÇÃO DE INULINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO
SÓLIDO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO**

Marcio Antonio Mazutti

Mestre em Engenharia de Alimentos (URI – Campus de Erechim, RS – 2007)

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Orientador (DEA/FEA/UNICAMP)

Profa. Dra. Helen Treichel

Co-Orientadora (URI – Campus de Erechim)

Tese de Doutorado submetida à comissão examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos pela Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

CAMPINAS, NOVEMBRO DE 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M459a Mazutti, Marcio Antonio
Avaliação cinética e modelagem matemática da produção de inulinase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo / Marcio Antonio Mazutti. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Co-orientador: Helen Treichel
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Fermentação em estado sólido. 2. Inulinase. 3. *Kluyveromyces marxianus*. 4. Leito fixo. 5. Modelos matemáticos. I. Maugeri Filho, Francisco. II. Treichel, Helen. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Título em inglês: Kinetic evaluation and mathematical modeling of the inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor

Palavras-chave em inglês (Keywords): Solid-state fermentation, Inulinase, *Kluyveromyces marxianus*, Packed-bed, Mathematical models

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Francisco Maugeri Filho

Beatriz Vahan Kilikian

David Alexander Mitchell

Aline Carvalho da Costa

Marco Di Luccio

Data da defesa: 09/11/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

COMISSÃO JULGADORA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Marcio Antonio Mazutti e aprovado pela Comissão Julgadora em 09 de novembro de 2009.

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho – Orientador

Prof. Dr. David Alexander Mitchell – Membro

Prof. Dr. Marco Di Luccio – Membro

Profª. Dra. Aline Carvalho da Costa – Membro

Profª. Dra. Beatriz Vahan Kilikian – Membro

Dr. Alfredo Eduardo Maiorano – Membro Suplente

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho – Membro Suplente

Dr. Daniel Imbraim Pires Atala – Membro Suplente

*“Sem sonhos a vida não tem brilho.
Sem metas os sonhos não têm alicerces.
Sem prioridades os sonhos não se tornam reais.”*
Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Ao sentar para escrever estes agradecimentos passou um filme em minha cabeça. No início dos anos 90, em plena guerra do Golfo, eu assistia aos noticiários e ficava imaginando possuir um laboratório subterrâneo, para poder me proteger dos ataques aéreos, onde seria possível extrair compostos de plantas e testá-los em ratos. Nesse período eu tinha oito anos de idade e já alimentava o sonho de um dia ser pesquisador. Porém, por ser de uma família pobre e morar “distante” do mundo, isso era apenas um sonho de criança. Com o passar dos anos, a realidade foi mudando e aquele velho sonho de criança começou a tornar-se realidade. Primeiro, com o início do curso de engenharia de alimentos, depois com a iniciação científica, mestrado e por fim o doutorado. No entanto, toda essa trajetória foi marcada por muitas dificuldades, principalmente financeira, e esforços gigantescos da minha parte e das pessoas que estavam ao meu redor, pois todos sabiam do meu sonho e que sozinho eu não teria como realizar. Por isso, hoje eu me sinto na obrigação de agradecer todas aquelas pessoas que me ajudaram a concretizar esse sonho, que é ser professor e pesquisador.

Aquele que acredita não pode deixar de agradecer a DEUS, pois sem Ele não teríamos os dons, as condições e a vida para realizarmos nosso trabalho.

Não posso nunca esquecer de agradecer aos meus pais Darci e Cleudes. Sem o amor incondicional e o suporte em toda a minha vida eu com certeza não estaria aqui. Quando eu olho para trás, percebo o quão importante vocês foram para o meu crescimento profissional e pessoal, pois sem o vosso apoio eu não seria ninguém. Queridos pais, vocês são exemplos de fé, força e coragem, pois não foram poucos os obstáculos superados ao longo da vida. Por isso, lhes dedico este título, o qual é o troféu que entrego a vocês como reconhecimento por todas as dificuldades vencidas para que eu pudesse estudar e vencer na vida.

Ao meu irmão Cleovane pela amizade e compreensão em momentos difíceis que passamos juntos. Saiba do meu reconhecimento a você, por muitas vezes abrir mão de

algumas coisas que pudessem lhe favorecer, para que eu pudesse estudar. Agora chegou o momento de eu retribuir tudo o que fizestes por mim.

Ao Beloni e Mariza Zardo, por me acolherem em sua família durante os cinco anos da graduação, sem nunca ter me cobrado um centavo por isso. Saibam da minha admiração, respeito e reconhecimento pela vossa atitude.

Ao professor Francisco Maugeri Filho, pela amizade, incentivo, e confiança depositada ao longo do doutorado. Agradeço-lhe pela orientação e pela oportunidade de compartilhar comigo parte da sua experiência profissional. Quero que saibas da minha admiração pela sua postura ética e que o tenho como exemplo a ser seguido em minha vida profissional.

À professora Helen Treichel pela orientação, confiança, incentivo, dedicação, ensinamentos e, principalmente, pela amizade cultivada ao longo dos anos. Saibas da minha admiração e respeito pelo trabalho que desenvolves, pela sua postura ética e pela garra de vencer sempre.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial à Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela oportunidade da realização de mais esse projeto profissional.

À Uri – Campus de Erechim por disponibilizar a infra-estrutura para a realização da parte experimental da tese.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação do DEA/FEA/UNICAMP por contribuir para a minha formação e crescimento profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desse trabalho seria impossível.

À todos os meus amigos dos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos da Unicamp e da URI, pelo convívio e disposição de tornar nosso local de trabalho um ambiente agradável.

Aos meus colegas de doutorado, vindos dos mais diversos lugares, cada um com suas particularidades e costumes, obrigado por se fazerem presentes, com amizade, ajuda e companheirismo.

À Ana Paula Manera, pessoa pela qual eu tenho maior admiração e respeito, obrigado pela amizade, pela paciência, pelos inúmeros favores prestados. Saiba que pode contar sempre comigo.

Aos bolsistas de iniciação científica do laboratório de Engenharia de Bioprocessos da URI – Campus de Erechim: Giovani Zobot, Aline Skovronski e Gabriela Boni. De coração, obrigado por todo auxílio prestado durante a realização da parte experimental desta tese e, principalmente, pela amizade. Vocês foram simplesmente brilhantes.

Aos membros da banca examinadora, meus sinceros agradecimentos ao Dr. Daniel Atala, Dra Aline Costa, Dra. Beatriz Kilikian, Dr. David Mitchell, Dr. Marco Di Luccio e Dr. Alfredo Maiorano pelas correções e sugestões, as quais foram de fundamental importância para melhorar a qualidade desta tese.

Obrigado a todas essas pessoas que fazem a minha vida valer a pena. É por causa delas que eu tenho ânimo para dar cada passo adiante.

E que venham as disciplinas, os projetos, as orientações e, principalmente, os artigos!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO | 1 |
| CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 6 |
| II.1 Fermentação em Estado Sólido | 7 |
| II.2 Produção de Inulinase por FES | 9 |
| II.3 Biorreatores para FES | 11 |
| II.3.1 Biorreator Tipo Bandeja | 13 |
| II.3.2 Biorreator de Leito Fixo..... | 14 |
| II.3.3 Biorreator de Tambor Rotativo..... | 16 |
| II.3.4 Biorreator de Leito Fluidizado e de Leito Agitado..... | 18 |
| II.4 Modelagem Matemática de Biorreatores de Leito Fixo em FES | 19 |
| II.4.1 Modelos Cinéticos e/ou Microscópicos para FES | 21 |
| II.4.2 Modelos Macroscópicos em FES | 31 |
| CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO .. | 39 |
| III.1 Introdução | 40 |
| III.2 Material e Métodos | 41 |
| III.2.1 Microrganismo, Pré-inóculo e Substratos | 41 |
| III.2.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)..... | 42 |
| III.2.3 Atividade Enzimática | 44 |
| III.2.4 Umidade | 44 |
| III.3 Resultados e Discussão | 45 |
| III.4 Considerações Finais | 52 |
| CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR FES EM BIORREATOR DE LEITO FIXO | 53 |
| IV.1 Introdução..... | 54 |
| IV.2 Material e Métodos | 56 |
| IV.2.1 Fermentação em Estado Sólido (FES)..... | 56 |

| | | |
|--|--|------------|
| IV.2.2 | Determinação da Concentração de Açúcares Redutores Totais (ART) | 58 |
| IV.2.3 | Determinação da temperatura, umidade relativa do ar e calor metabólico ... | 59 |
| IV.2.4 | Metabolismo microbiano..... | 59 |
| IV.3 | Resultados e Discussão..... | 62 |
| IV.3.1 | Coeficientes de Rendimento..... | 62 |
| IV.3.2 | Avaliação cinética do processo | 64 |
| IV.4 | Considerações Finais..... | 77 |
| CAPÍTULO V - MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DA | | |
| LEVEDURA <i>Kluyveromyces marxianus</i> EM FES | | 78 |
| V.1 | Introdução | 79 |
| V.2 | Material e Métodos | 80 |
| V.3 | Formulação do Modelo Matemático | 81 |
| V.4 | Resultados e Discussão | 82 |
| V.4.1 | Taxas Experimentais..... | 82 |
| V.4.2 | Modelagem Matemática | 87 |
| V.4.2.1 | Topologia e avaliação da performance de treinamento da RNA..... | 89 |
| V.4.2.2 | Simulação do Processo | 91 |
| V.5 | Considerações Finais | 92 |
| CAPÍTULO VI - MODELAGEM MATEMÁTICA DOS PERFIS DE | | |
| TEMPERATURA E BIOMASSA NO INTERIOR DO BIORREATOR DE LEITO | | |
| FIXO | | 93 |
| VI.1 | Introdução..... | 94 |
| VI.2 | Materiais e Métodos..... | 95 |
| VI.2.1 | Caracterização física dos substratos | 95 |
| VI.3 | Modelagem Matemática | 97 |
| VI.4 | Resultados e Discussão..... | 101 |
| VI.4.1 | Caracterização do leito sólido | 101 |
| VI.4.2 | Modelagem matemática dos perfis de temperatura ao longo do biorreator | 102 |
| VI.4.3 | Modelagem matemática dos perfis de biomassa ao longo do biorreator | 106 |
| VI.5 | Considerações Finais..... | 110 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES | 112 |
| VII.1 Avaliação do Processo de Produção de Inulinase por FES..... | 113 |
| VII.2 Avaliação Cinética do Processo de Produção de Inulinase por FES | 113 |
| VII.3 Modelagem Matemática do Crescimento da Levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> em FES | 114 |
| VII.4 Modelagem Matemática dos Perfis de Temperatura e Biomassa no Interior do Biorreator de Leito Fixo | 114 |
| CAPÍTULO VIII - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS..... | 116 |
| CAPÍTULO IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 118 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela II.1. Resumo dos principais modelos empíricos reportados na literatura para descrever o crescimento microbiano em FES (MITCHELL <i>et al.</i> , 2004)..... | 21 |
| Tabela III.1. Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática após 24h de fermentação | 46 |
| Tabela III.2: Análise dos efeitos dos termos do modelo sobre a produção de inulinase. | 47 |
| Tabela III.3: ANOVA para a atividade enzimática como resposta para o DCCR | 48 |
| Tabela III.4: Validação experimental do modelo apresentado na Eq. III.2 | 52 |
| Tabela IV.1: Variáveis investigadas no estudo cinético do processo de produção de inulinase por FES | 58 |
| Tabela IV.2: Coeficientes estequiométricos e de rendimento calculados para o processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo | 62 |
| Tabela IV.3: Massa total produzida e/ou consumida dos compostos avaliados durante o estudo cinético, bem como a produção de calor metabólico..... | 69 |
| Tabela VI.1: Valores dos parâmetros usados na simulação dos gradientes de temperatura no biorreator de leito fixo através da equação de transferência de calor..... | 100 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura II.1: Diagrama esquemático do biorreator tipo bandeja (Adaptado de MITCHELL, KRIEGER e BEROVIC, 2006)..... | 14 |
| Figura II.2: Diagrama esquemático da configuração padrão de biorreatores leito fixo: a) Distribuição axial de ar dentro do biorreator; b) Distribuição radial de ar dentro do biorreator (DURAND, 2003)..... | 14 |
| Figura II.3: Diagrama esquemático dos fenômenos de transferência de massa e energia que ocorrem em biorreatores leito fixo em FES (Adaptado de MITCHELL <i>et al.</i> , 2000)..... | 15 |
| Figura II.4: Diagrama esquemático dos fenômenos de transferência de massa e energia que ocorre nos biorreatores do tipo tambor rotativo em FES (Adaptado de MITCHELL <i>et al.</i> , 2000)..... | 17 |
| Figura II.5: Diagrama esquemático dos biorreatores tipo leito agitado (a) e leito fluidizado (b) em FES (Adaptado de MITCHELL <i>et al.</i> , 2000)..... | 18 |
| Figura II.6: Diagrama esquemático dos fenômenos macroscópicos e microscópicos que ocorrem em FES (Adaptado de VICCINI <i>et al.</i> , 2001)..... | 19 |
| Figura II.7: Diagrama esquemático da estrutura básica de um modelo matemático para FES (Adaptado de MITCHELL, von MEIEN e KRIEGER, 2003)..... | 20 |
| Figura II.8: Diagrama esquemático dos fenômenos considerados no desenvolvimento dos modelos de Rajagopalan e Modak (1995) (Adaptada de MITCHELL <i>et al.</i> , 2004)..... | 27 |
| Figura II.9: Diagrama esquemático dos fenômenos considerados no desenvolvimento do modelo de Nopharatana, Howes e Mitchell (1998) (Adaptada de MITCHELL <i>et al.</i> , 2004)..... | 30 |
| Figura II.10: Diagrama esquemático do modelo proposto por Sahir, Kumar e Kumar (2007).... | 37 |

| | |
|--|----|
| Figura III.1: Diagrama esquemático do biorreator leito de fixo empregado neste estudo: a- compressor; b- umidificador; c – controle de vazão, temperatura e umidade; d – sensores de temperatura; e – medidor de CO ₂ , temperatura e umidade..... | 43 |
| Figura III.2: Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo: Efeito de TxV (A e B); efeito de MCxT (C e D); efeito de MCxV (E e F). O valor da terceira variável foi mantido no ponto central | 50 |
| Figura IV.1: Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo empregado nesta etapa do trabalho: a- compressor; b- umidificador; c – controle de vazão, temperatura e umidade; d – sensores de temperatura; e – medidor de CO ₂ , temperatura e umidade | 57 |
| Figura IV.2: Perfis experimentais para temperatura obtidos na avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES. De baixo para cima: temperaturas do ar na entrada (T0), à 10, 20 e 30 cm do leito (T1, T2 e T3, respectivamente) e na saída do biorreator (T4)..... | 66 |
| Figura IV.3: Perfis experimentais para umidade obtidos nos experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES para cada uma das quatro zonas dentro do biorreator..... | 68 |
| Figura IV.4: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos dos perfis de células, ART e calor metabólico..... | 70 |
| Figura IV.5: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos dos perfis de CO ₂ , H ₂ O metabólica, etanol e O ₂ | 74 |
| Figura IV.6: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos da atividade enzimática em cada uma das quatro zonas dentro do biorreator..... | 75 |
| Figura V.1: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos das taxas experimentais (e/ou calculadas – Pontos discretos) e simuladas (linas contínuas) para CO ₂ , H ₂ O metabólica, ART e etanol..... | |

| | |
|---|-----|
| e simuladas (linas contínuas) para CO ₂ , H ₂ O metabólica, ART e etanol..... | 84 |
| Figura V.2: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos das taxas experimentais (e/ou calculadas – Pontos discretos) e simuladas (linas contínuas) para células, O ₂ e calor metabólico..... | 85 |
| Figura V.3: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos dos valores experimentais para atividade enzimática nas 4 zonas dentro do biorreator (pontos discretos) e os valores simulados (linha contínua) correspondendo ao valor médio entre as 4 zonas..... | 86 |
| Figura V.4: Análise comparativa da performance de treinamento da RNA entre as diversas topologias de rede testadas, considerando os dois algoritmos de otimização..... | 90 |
| Figura VI.1: Diagrama esquemático da estrutura do modelo híbrido proposto neste trabalho..... | 101 |
| Figura VI.2: Distribuição granulométrica das partículas do leito..... | 102 |
| Figura VI.3: Perfis experimentais (Pontos discretos) e simulados (Linhas contínuas) para temperatura obtidos na avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo..... | 105 |
| Figura VI.4: Comportamento dinâmico do crescimento microbiano em diferentes posições do leito no interior do biorreator leito fixo obtido através da simulação numérica (Linhas contínuas) e através da equação estequiométrica (Pontos discretos)..... | 107 |
| Figura VI.5: Comportamento dinâmico do crescimento microbiano em cada uma das quatro zonas dentro do biorreator leito fixo obtido através da simulação numérica..... | 109 |

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: Marcio Antonio Mazutti

TÍTULO: Avaliação cinética e modelagem matemática da produção de inulinase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo

ORIENTADOR: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (DEA/FEA/UNICAMP)

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Helen Treichel (URI – Campus de Erechim)

RESUMO

Nas últimas duas décadas houve um aumento considerável no emprego de fermentação em estado sólido (FES) para a obtenção de enzimas de interesse em alimentos, incluindo a inulinase. No entanto, todos os trabalhos reportados na literatura abordam a produção de inulinase em escala de bancada, usando poucos gramas de substrato. Essa estratégia de condução do processo é muito importante na etapa de seleção dos substratos e triagem dos microrganismos produtores. Porém, não permite a avaliação do desempenho do processo em escalas maiores. O objetivo desse trabalho foi investigar a produção de inulinase por FES num biorreator de leito fixo com capacidade para 3kg (base seca) usando a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Inicialmente, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimizar a massa inicial de células, a temperatura e a vazão do ar de entrada do biorreator. A partir dos resultados obtidos na otimização, foram realizados 7 experimentos em torno da região otimizada, visando a avaliação cinética do processo. Foram monitorados experimentalmente o consumo de açúcar redutor total (ART), a produção de dióxido de carbono (CO₂) e a geração de calor metabólico. A produção de água metabólica, massa de células e etanol, além do consumo de oxigênio, foram calculados a partir de uma equação estequiométrica, tomando como base a produção de CO₂ e o consumo de ART. Os dados obtidos na avaliação cinética

foram usados para a geração de um modelo de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES. Este modelo é baseado em redes neurais artificiais (RNA), onde são usadas como entradas para a rede a massa inicial de ART, temperatura do ar de entrada do biorreator, temperatura do ar de saída do biorreator e tempo de fermentação. Como respostas têm-se as taxas associadas com o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus*, como a produção de CO₂, calor metabólico, etanol, água metabólica, atividade da inulinase e massa celular, além das taxas de consumo de oxigênio (O₂) e ART. Por fim, o modelo de crescimento microbiano foi acoplado ao balanço macroscópico de energia no biorreator com o objetivo de prever os perfis de temperatura ao longo do processo. Entre os resultados obtidos no DCCR tem-se que a máxima produção de inulinase obtida foi de 437±36 unidades por grama de substrato seco (U.gds⁻¹) (produtividade de 18,2 U.gds⁻¹.h⁻¹) quando a temperatura do ar de entrada, vazão volumétrica de ar e massa de células foram 30°C, 2,2 m³.h⁻¹ e 22 g, respectivamente. Na avaliação cinética do processo, foram verificadas diferenças nas taxas associadas ao crescimento microbiano entre as condições experimentais. O aumento da temperatura do ar de entrada mostrou ter influência no tempo onde as taxas máximas foram verificadas, sendo que quanto mais alta a temperatura menor foi esse tempo. A temperatura máxima obtida na corrente de ar na saída do biorreator atingiu valores próximos a 50°C, não afetando o teor de umidade do substrato, o qual se manteve acima de 65%. A produção de inulinase mostrou variações significativas com a altura do biorreator. As maiores taxas associadas com o crescimento microbiano foram verificadas quando a temperatura do ar de saída atingiu valores compreendidos entre 30–38°C, o que corresponde a 4-9 horas de fermentação. O modelo matemático baseado em redes neurais empregado para prever as principais taxas associadas ao crescimento da levedura *K. marxianus* em FES mostrou desempenho satisfatório na representação dos dados experimentais e ao acoplar esse modelo à equação de balanço de energia macroscópico do processo obteve-se uma representação satisfatória dos perfis de temperatura ao longo do biorreator.

Palavras Chave: Inulinase; *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571; Fermentação em estado sólido; Avaliação cinética; Modelagem matemática.

DOCTORAL THESIS

AUTHOR: Marcio Antonio Mazutti

TITLE: Kinetic evaluation and mathematical modeling of the inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor.

ADVISORS: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho and Profa. Dra. Helen Treichel

ABSTRACT

In the last two decades there has been a considerable increase in the interest of using solid-state fermentation (SSF) for the development of several bioprocesses and products, including enzyme production, as the inulinase. Nevertheless, all works related in the literature regarding the inulinase production were conducted in small scales, using few grams of substrate. This strategy is interesting to select the most promising substrate and microorganisms, which are able to produce the desired product, but this scale is not appropriated for the evaluation of process performance in larger scales. This work evaluate the inulinase production by SSF in a packed-bed bioreactor with available capacity of 3 kg (dry basis) using the yeast *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Initially, it was evaluated the technical viability to produce inulinase by SSF in the packed-bed bioreactor. To optimize the operational conditions, such as temperature and flow rate of inlet air and the initial mass of cells, a central composite rotational design (CCRD) for three independent variables was carried out. Starting from the results obtained in the CCRD, seven new experimental runs were carried out within the range investigated for the independent variables to evaluate the kinetics of cell growth and inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 in the packed-bed bioreactor. A stoichiometry correlation between CO₂, ethanol, metabolic water, O₂ and total reducing sugar was determined. Besides, the metabolic heat production was estimated by a proper energy balance in the inlet and outlet air stream. The data obtained during the kinetic evaluation of the process were employed on the development of a mathematical model based on artificial

neural networks (ANN) to predict the above mentioned microbial rates associated with the microbial growth in function of the fermentation time, initial total reducing sugar concentration, inlet and outlet air temperatures. In the last step of the work, the model related to the microbial growth was coupled to the macroscopic energy balance in the bioreactor to predict the temperature profile through the substrate bed. The results obtained in the CCRD showed that the optimum inulinase production was $436.7 \pm 36.3 \text{ U.gds}^{-1}$ at 24 h of fermentation (productivity of $18.2 \text{ U.gds}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) when SSF was carried out at 30°C of air inlet temperature, $2.2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ of air flow rate and 22 g of cells. During the kinetic evaluation of the process it was verified that the manipulated variables affected the process performance. The maximum temperature reached in the outlet air stream was about 50°C , however not affecting the moisture content of the substrates that was higher than 65% (w/w) inside the bioreactor. The inulinase production showed significant variations in different bed heights inside the bioreactor. The highest microbial rates were verified when the mean temperature of moist substrate reached values in the range of 30 to 38°C that leads to a fermentation time between 4 to 9 hours. The model developed to predict the main microbial rates of the yeast *K. marxianus* grown in solid-state fermentation showed a good performance during both training and validation steps. The framework developed showed to be an interesting alternative to substitute the simple empirical microbial model in the macroscopic balance of energy in the bioreactor, since the proposed hybrid model predicted efficiently the temperature profiles through the bioreactor.

Key words: Inulinase; *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571; Solid-state fermentation; Kinetic evaluation; Mathematical modeling.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Há vários anos o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da FEA/UNICAMP vem pesquisando a produção e a aplicação da inulinase. Historicamente, a inulinase é obtida por fermentação submersa, usando meios sintéticos e resíduos agroindustriais como substratos. Os microrganismos do gênero *Kluyveromyces* sp. destacam-se como os maiores produtores, sendo que a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 apresenta elevada produção, principalmente em meios contendo resíduos agroindustriais. Recentemente, começaram a surgir trabalhos de produção de inulinase por Fermentação em Estado Sólido (FES).

Apesar do processo de produção da inulinase por FES apresentar uma boa perspectiva de aplicação industrial, todos os trabalhos foram conduzidos em frascos plásticos, usando poucos gramas de substrato. Sendo assim, para ocorrer a transição entre as escalas bancada→piloto→indústria, faz-se necessário um aprofundado estudo do comportamento do processo em cada estágio de desenvolvimento. Até o momento, as informações disponíveis são referentes à produção de inulinase em mini-reatores, onde os gradientes de massa e temperatura são minimizados. A transição das escalas bancada→piloto requer, num primeiro momento, a seleção de uma configuração de biorreator eficiente.

Entre os biorreatores usados em FES, a configuração leito fixo com injeção de ar forçado é muito atraente, devido as suas características de fácil construção e operação, além do baixo custo. No entanto, pela característica de operação, onde o substrato permanece estático durante o processo, os gradientes de massa e temperatura são inevitáveis. O maior desafio no projeto de biorreatores leito fixo é a remoção do calor metabólico gerado pelo crescimento microbiano, onde a temperatura do meio pode atingir valores entre 15 e 20°C superiores à ótima para o desenvolvimento dos microrganismos. Além de causar danos às células, as temperaturas elevadas contribuem para a secagem do leito. O processo de secagem é indesejável por duas razões: primeiro, o conteúdo de água disponível para os microrganismos diminui, prejudicando o crescimento; segundo, a secagem provoca a

retração das partículas, diminuindo o volume do leite, criando caminhos preferenciais para a passagem do ar, podendo ocasionar zonas de anaerobiose.

Como pode ser visto, o sucesso na utilização de biorreatores de leite fixo em escalas piloto e industrial, vai depender do projeto de uma configuração eficiente para a redução dos gradientes, principalmente o gradiente de temperatura. Nesse contexto, os modelos matemáticos são ferramentas indispensáveis no projeto, otimização e controle do processo. Na etapa de modelagem matemática, um dos aspectos-chaves é investigar como as condições do processo influenciam o crescimento microbiano. A literatura reportando o comportamento microbiano em FES é exclusivamente dedicada aos fungos e, na grande maioria dos casos, esse comportamento é aproximado por expressões matemáticas totalmente empíricas em função da temperatura do processo.

O presente trabalho é parte integrante do projeto “Obtenção de enzimas de interesse para a indústria de alimentos”, o qual foi aprovado pelo Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD/CAPES). As instituições participantes são a Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), o Departamento de Química da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e o Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Campus de Erechim (URI – Campus de Erechim).

Dentro deste contexto, o objetivo desse trabalho foi a avaliação do desempenho do processo de produção de inulinase por fermentação em estado sólido em biorreator de leite fixo e a geração de um modelo metabólico capaz de prever as principais taxas associadas ao crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Para que tais objetivos sejam alcançados, o presente trabalho foi desenvolvido de acordo com as etapas descritas a seguir.

O Capítulo II apresenta uma breve revisão da literatura acerca dos principais assuntos abordados nesse trabalho. São discutidos aspectos como a produção de inulinase por fermentação em estado sólido (FES), as principais configurações de biorreatores utilizados em FES, o emprego de biorreatores de leite fixo para FES, modelagem matemática

de biorreatores leito fixo, incluindo o desenvolvimento de modelos considerando os fenômenos de transferência de massa e calor, além do desenvolvimento de modelos de crescimento microbiano em FES.

O Capítulo III apresenta a avaliação do processo de produção de inulinase por FES em um biorreator de leito fixo com capacidade de 3kg (base seca). A investigação do processo foi realizada através da realização de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar o efeito da massa inicial de células, temperatura e vazão do ar de entrada no biorreator de leito fixo.

O Capítulo IV apresenta a avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo. A partir dos dados apresentados no Cap III, foram realizados 7 novos experimentos, cujas condições experimentais foram definidas em torno da região otimizada, visando avaliar o comportamento cinético do processo. Foram monitorados experimentalmente o consumo de açúcar redutor total (ART), a produção de dióxido de carbono (CO_2) e a geração de calor metabólico. A produção de água metabólica, massa de células e etanol, além do consumo de oxigênio foram calculados a partir de uma equação estequiométrica, tomando como base a produção de CO_2 .

O Capítulo V apresenta o desenvolvimento de um modelo matemático visando à predição das principais taxas associadas com o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES usando os dados experimentais obtidos no Cap IV. Este modelo é baseado em redes neurais artificiais (RNA), onde são usadas como entradas para a rede as seguintes variáveis: massa inicial de ART, temperatura do ar de entrada do biorreator, temperatura do ar de saída do biorreator e tempo de fermentação. Como respostas têm-se as taxas de produção de CO_2 , calor metabólico, etanol, água metabólica, inulinase e massa celular, além das taxas de consumo de oxigênio (O_2) e ART.

O Capítulo VI apresenta o desenvolvimento de um modelo matemático, visando a predição dos gradientes de temperatura envolvidos durante a operação do biorreator leito fixo para a produção de inulinase por FES, onde as taxas referentes ao crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 foram substituídas pelo modelo

proposto no Cap V, o qual é baseado no emprego de redes neurais artificiais. Sendo assim, o modelo final do processo de produção de inulinase será um modelo híbrido, composto pela equação de balanço de energia ao longo do biorreator e a rede neural validada no capítulo V.

Os Capítulos VII, VIII e IX apresentam as conclusões obtidas com a realização desse trabalho, as sugestões para trabalhos futuros e as referências bibliográficas, respectivamente.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O processo de Fermentação em Estado Sólido (FES) é definido como sendo o crescimento de microrganismos na superfície de materiais sólidos, os quais podem atuar como suporte físico inerte ou como fonte de nutrientes, na ausência de água livre (PANDEY, 2003; COUTO e SANROMÁN, 2006). No entanto, o conteúdo de água necessário para o crescimento encontra-se absorvido na matriz porosa do substrato, o que favorece a transferência de oxigênio no meio, pois o microrganismo permanece em contato direto com uma corrente de ar (RAGHAVARAO *et al.*, 2003).

Historicamente, é creditado à FES o início do uso de fermentação para a produção de metabólitos. No entanto, em meados de 1940 ocorreu uma redução drástica dos estudos envolvendo FES, principalmente devido ao incentivo para a produção da penicilina por Fermentação Submersa (FS) em meio à Segunda Guerra Mundial. Nesse contexto, processos envolvendo Fermentação Submersa tornaram-se modelos em muitos bioprocessos, sendo extensivamente estudados ao longo dos anos. A partir dos anos 70 voltou-se a dar atenção para FES, devido à publicação de trabalhos referentes à produção de micotoxinas por fungos. Porém, a grande explosão do uso de FES ocorreu a partir dos anos 90 (PANDEY, 2003). No Brasil, a partir de 1986 iniciou-se uma série de pesquisas referentes à utilização de resíduos agroindustriais como substratos em FES para a produção de metabólitos de alto valor agregado como: etanol, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros (COUTO e SANROMÁN, 2006).

Atualmente há um grande número de patentes e publicações referentes aos fundamentos de FES, desenvolvimento de biorreatores, modelagem e produção de diversos bioprodutos (PANDEY, 2003). A maior atenção creditada à FES se deve ao fato de que os rendimentos de bioprodutos como enzimas, compostos aromáticos, corantes e outros compostos de interesse em alimentos são muito maiores quando comparados com os rendimentos obtidos por FS. As principais vantagens do emprego de FES são: altas produtividades, melhor circulação de oxigênio, utilização de resíduos agroindustriais, menores custos na etapa de recuperação e purificação dos metabólitos obtidos, baixo

consumo energético, o crescimento dos microrganismos é muito semelhante ao encontrado no seu habitat natural, entre outros (COUTO e SANROMÁN, 2006). No entanto, o uso de FES apresenta uma série de desvantagens: devido à natureza sólida dos substratos, é muito difícil homogeneizar uniformemente o leito e, como resultados, os gradientes de temperatura, água e metabólitos são inevitáveis (ASHLEY, MITCHELL, e HOWES, 1999); a ausência de água livre e a baixa condutividade dos substratos levam a dificuldades no controle da concentração de células, pH, temperatura e umidade (HAMIDI-ESFAHANI *et al.*, 2007); dificuldades de aumento de escala, principalmente associadas com a remoção do calor metabólico gerado pelo crescimento dos microrganismos (LEKANDA e PÉREZ-CORREA, 2004).

A seleção do substrato ou da combinação deles é um aspecto chave em FES, pois o substrato é um material não solúvel que atua como suporte físico inerte e fonte de nutrientes. Muito raramente é utilizado um suporte inerte umedecido com uma solução contendo nutrientes. Em relação à utilização de resíduos agroindustriais como substrato, devem ser feitas duas considerações: a primeira, o resíduo deve possuir um baixo valor agregado e estar disponível em grandes quantidades; a segunda, como a concentração de nutrientes não apresenta uniformidade ao longo do ano, é interessante selecionar uma faixa de concentração para cada resíduo onde os objetivos do trabalho são atingidos (PANDEY, 2003). No Brasil, a utilização de resíduos do processamento da cana de açúcar, milho e soja é altamente atrativa, devido às grandes quantidades processadas e riqueza de nutrientes presentes (MAZUTTI *et al.*, 2006).

Outros aspectos chave em FES são a seleção das variáveis do processo que possuem efeito sobre o mesmo, bem como a sua otimização. Nisso incluem-se os parâmetros físico-químicos e bioquímicos, tais como: tamanho de partícula, umidade inicial, pH, pré-tratamento dos substratos, umidade relativa, temperatura de incubação, agitação, aeração, idade e tamanho do inóculo, suplementação de nutrientes, extração do produto e purificação do mesmo, entre outros (PANDEY, 2003). Para a otimização dessas variáveis a utilização da metodologia de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta é uma

boa ferramenta e pode auxiliar na escolha das faixas apropriadas que levam à otimização do processo (RODRIGUES e IEMMA, 2005)

II.2 PRODUÇÃO DE INULINASE POR FES

Inulinases são 2,1- β -D-frutano-furohidrolases (EC 3.2.1.7), as quais hidrolisam a inulina, um polímero formado por moléculas de frutose com ligações β -2,1, liberando moléculas de frutose (ETTALIBI e BARATTI, 2001). A inulinase encontra aplicação na produção de xaropes com alta concentração de frutose e na produção de frutooligosacarídeos (FOS), os quais têm assumido grande importância como ingredientes funcionais, devido às suas características de estimular a microflora intestinal, a absorção de minerais, além de melhorar a vida de prateleira e qualidade nutricional dos alimentos (SANGEETHA, RAMESH e PRAPULLA, 2005).

Apesar da produção de inulinase ser extensivamente estudada em FS, o primeiro artigo reportando sua produção por FES foi publicado por Selvakumar e Pandey (1999), que investigaram a influência de diversos resíduos agroindustriais na produção de inulinase usando a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 52466 e uma nova bactéria do gênero *Staphylococcus*. Entre os resíduos testados encontram-se farelos de trigo e arroz, casca de arroz, farinha de milho e torta de coco. As atividades máximas obtidas para os microrganismos *Kluyveromyces marxianus* ATCC 52466 e *Staphylococcus* foram 123 U.gds⁻¹ (gds = grama de substrato seco) em 72 horas de fermentação e 108 U.gds⁻¹ em 48 horas de fermentação, respectivamente. Os dois microrganismos apresentaram melhor desempenho em meio contendo somente farelo de trigo a 37°C e 65% de umidade.

Bender *et al.* (2006) usaram bagaço de cana para a produção de inulinase usando o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Foram investigados os efeitos da temperatura de fermentação, umidade inicial do bagaço, concentração de melaço de cana e concentração de água de maceração de milho (AMM), através do uso da metodologia de planejamento de experimentos. A máxima atividade encontrada foi de 445 U.g⁻¹ em 72

horas de fermentação com 23,4% de AMM (p/p – base seca), 40°C e umidade inicial de 65% (base seca). A adição de melão de cana apresentou efeito negativo para o processo, diminuindo a atividade final. Os autores associam essa queda na atividade à presença de compostos inibidores no melão de cana, uma vez que esse não foi pré-tratado antes do seu uso na fermentação. Mazutti *et al.* (2006) otimizaram a concentração de AMM e a temperatura do processo de produção de inulinase. Na condição otimizada foi atingida uma atividade de 392 U.gds⁻¹ a 36°C e verificou-se que a concentração de AMM não apresentou influência na faixa entre 13 e 27,1% em 96 horas de fermentação.

Xiong, Jinhua e Dongsheng (2007) otimizaram a concentração da suplementação do farelo de trigo para a produção de inulinase por FES usando uma linhagem nova de *Kluyveromyces* S120. Na condição otimizada, contendo 12,7% de inulina, 10,8% de AMM e 1,6% de (NH₄)₂SO₄, foi possível a obtenção de 410 U.gds⁻¹ de atividade enzimática. Todos os experimentos foram realizados a 30°C por 72 horas, onde a umidade inicial dos substratos foi corrigida para 80%. Ayyachamy *et al.* (2007) avaliaram o efeito de diversas fontes de carbono na produção de inulinase por FES usando a bactéria *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli*. Os melhores resultados foram obtidos com o emprego de alho, onde a máxima produção de enzima foi 117 U.gds⁻¹ após 72 horas de fermentação.

Mazutti *et al.* (2007) avaliaram os efeitos dos parâmetros de processo sobre a produção de inulinase pelo microrganismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 usando bagaço de cana como substrato. Foram investigados os efeitos de tamanho de partícula, densidade de inóculo, concentração de AMM e concentração de farelo de soja. Todos os experimentos foram realizados a 36°C e 65% de umidade. A máxima atividade obtida foi de 250 U.gds⁻¹ em meio contendo 20% de AMM e 5% de farelo de soja. Além disso, a granulometria dos substratos ficou na faixa de 9/32 mesh e a densidade de inóculo 1x10¹⁰ células.mL⁻¹. O uso de farelo de soja reduziu o tempo máximo de fermentação de 96 para 24 horas, o que permitiu um aumento de 2 vezes na produtividade do processo quando comparado com o trabalho de Mazutti *et al.* (2006), mesmo com a atividade atingindo valores menores (MAZUTTI *et al.*, 2007).

Guo *et al.* (2009) investigaram a produção de inulinase por FES usando a levedura *Pichia guilliermondii*, a qual foi isolada de uma alga. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para a otimização do meio de cultura e das condições operacionais. Após a otimização, foi possível obter uma atividade enzimática de 455.9 U.gds⁻¹ após 24h de fermentação. As condições operacionais foram definidas como sendo: 60,5% de umidade inicial dos substratos, 2,5% de volume de inóculo, 0,42 a razão farelo de trigo/farelo de arroz, 30°C de temperatura e pH 6,5.

Sheng *et al.* (2009) otimizaram a produção de inulinase por FES usando a levedura *Cryptococcus aureus*, a qual também foi isolada de uma alga. Após o processo de otimização, onde foi empregada a metodologia de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta, foi possível a obtenção de uma atividade enzimática de 420,9 U.gds⁻¹ após 120h de fermentação. As condições operacionais foram definidas como sendo: 60,5% de umidade inicial dos substratos, 2,5% de volume de inoculo, 0,42 a razão farelo de trigo/farelo de arroz, 29°C de temperatura e pH 5,5.

Apesar da literatura reportar alguns trabalhos referentes à produção de inulinase por FES, é importante ressaltar que todos os trabalhos foram realizados empregando alguns gramas de substrato em biorreatores tipo bandeja, onde as únicas variáveis controladas foram a umidade relativa do ambiente e a temperatura da câmara de incubação. Este tipo de sistema é fácil de ser usado, permitindo avaliar vários experimentos simultaneamente, sendo particularmente interessante para selecionar substratos e/ou microrganismos, numa etapa preliminar de pesquisa (DURAND, 2003). No entanto, não há nenhum trabalho sistemático reportando o aumento de escala do processo de produção de inulinase ou a utilização de outros tipos de biorreatores.

II.3 BIORREACTORES PARA FES

O sucesso da aplicação em escala industrial de um bioprocesso baseado em FES depende, obrigatoriamente, do bom desenvolvimento deste em escala de laboratório e,

principalmente, da escolha certa da configuração de biorreator, que é dependente dos seguintes aspectos (MITCHELL, KRIEGER e BEROVIC, 2006):

- O microrganismo tolera agitação? Baseado nisso, os biorreatores podem ser completamente estáticos, intermitentemente agitados ou continuamente agitados.
- Quão rápido o microrganismo cresce e qual é a sua sensibilidade ao aumento da temperatura? O controle de temperatura em biorreatores industriais para FES é um desafio, especialmente naqueles processos onde o crescimento é acelerado. Os vários tipos de biorreatores diferem na eficiência da remoção do calor metabólico, que é dependente da interação do microrganismo com o tipo do biorreator e a maneira como ele é operado. Estas considerações podem determinar as decisões chaves no processo, como por exemplo a altura máxima do leito.
- Qual o nível de aeração requerido no sistema? A maioria dos processos baseados em FES envolve o crescimento aeróbico dos microrganismos. Essencialmente, existem duas opções de aeração em biorreatores para FES. Uma delas é circular ar em torno do leito, enquanto a outra opção consiste em injetar ar forçado através do leito.
- O grau de assepsia requerido para a operação do biorreator. Muitos processos baseados em FES envolvem o crescimento rápido de microrganismos em substratos com baixo teor de umidade, garantindo uma vantagem competitiva em relação aos microrganismos contaminantes. No entanto, em outros casos o crescimento é lento e a operação do biorreator requer o desenvolvimento de um processo asséptico que previna a contaminação.
- Facilidade de carga/descarga do substrato no biorreator.
- Quantidade de substrato a ser fermentado.

Baseado nos aspectos listados acima, vários tipos de biorreatores estão sendo usados em FES. Considerando os aspectos de construção e operação, estes biorreatores podem ser divididos em quatro grandes grupos (MITCHELL, KRIEGER e BEROVIC, 2006):

- Grupo I: Biorreatores onde o leito permanece estático durante o processo e o ar é circulado em torno do leito. Estes biorreatores são conhecidos como biorreatores de bandejas.
- Grupo II: Biorreatores onde o leito permanece estático durante o processo e ocorre injeção forçada de ar através do leito. Estes biorreatores são conhecidos como de leito fixo.
- Grupo III: Biorreatores onde o leito é continuamente ou intermitentemente agitado durante o processo e o ar é circulado em torno do leito. Estes biorreatores são conhecidos como tambor rotativo, tambor agitado.
- Grupo IV: Biorreatores onde o leito é continuamente ou intermitentemente agitado e ocorre injeção forçada de ar através do leito. Estes biorreatores são conhecidos como leito fluidizado, reator de mistura.

II.3.1 Biorreator Tipo Bandeja

O biorreator tipo bandeja é a configuração mais simples, onde uma fina camada de substrato mais microrganismo são incubados em uma câmara com controle de umidade e temperatura. Esta tecnologia pode ser facilmente escalonada, uma vez que o número de bandejas pode ser aumentado para atingir a capacidade de processamento exigida pelo processo. Embora esta tecnologia venha sendo amplamente usada na indústria, principalmente no Japão para a produção de molho de soja fermentado, a mesma apresenta o inconveniente de requerer uma ampla área dentro da indústria para o desenvolvimento do processo. A Figura II.1 apresenta o diagrama esquemático de um biorreator tipo bandeja, onde as diversas bandejas são arranjadas, uma em cima das outras, de maneira a formar uma pilha. Cada módulo contém canais por onde é circulado ar atmosférico com temperatura e umidade controlada para a remoção do calor metabólico e fornecimento de oxigênio aos microrganismos.

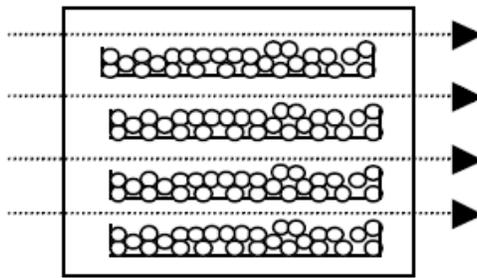


Figura II.1: Diagrama esquemático do biorreator tipo bandeja (Adaptado de MITCHELL, KRIEGER e BEROVIC, 2006).

II.3.2 Biorreator de Leito Fixo

O projeto básico de um biorreator de leito fixo consiste de uma camisa cilíndrica, onde na parte inferior dessa camisa é introduzida uma corrente de ar, a qual percorre todo leito contendo o material sólido. Os biorreatores de leito fixo são muito simples e de fácil utilização, tornando-se bons sistemas para o aumento de escala do processo, pois permitem avaliar os principais efeitos de transferência (massa, calor e oxigênio) e a influência de parâmetros de processo sobre o comportamento dinâmico do sistema (DURAND, 2003). A Figura II.2 apresenta o diagrama esquemático de duas configurações de biorreatores leito fixo, onde os perfis de distribuição de ar dentro do biorreator são no sentido axial e radial para as Figuras a e b, respectivamente.

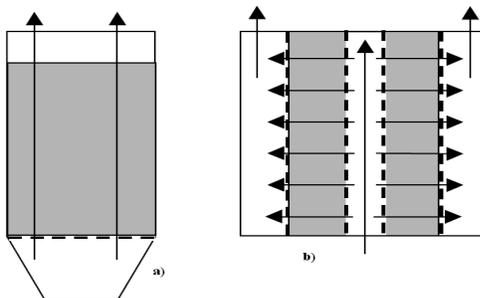


Figura II.2: Diagrama esquemático da configuração padrão de biorreatores leito fixo: a) Distribuição axial de ar dentro do biorreator; b) Distribuição radial de ar dentro do biorreator (DURAND, 2003).

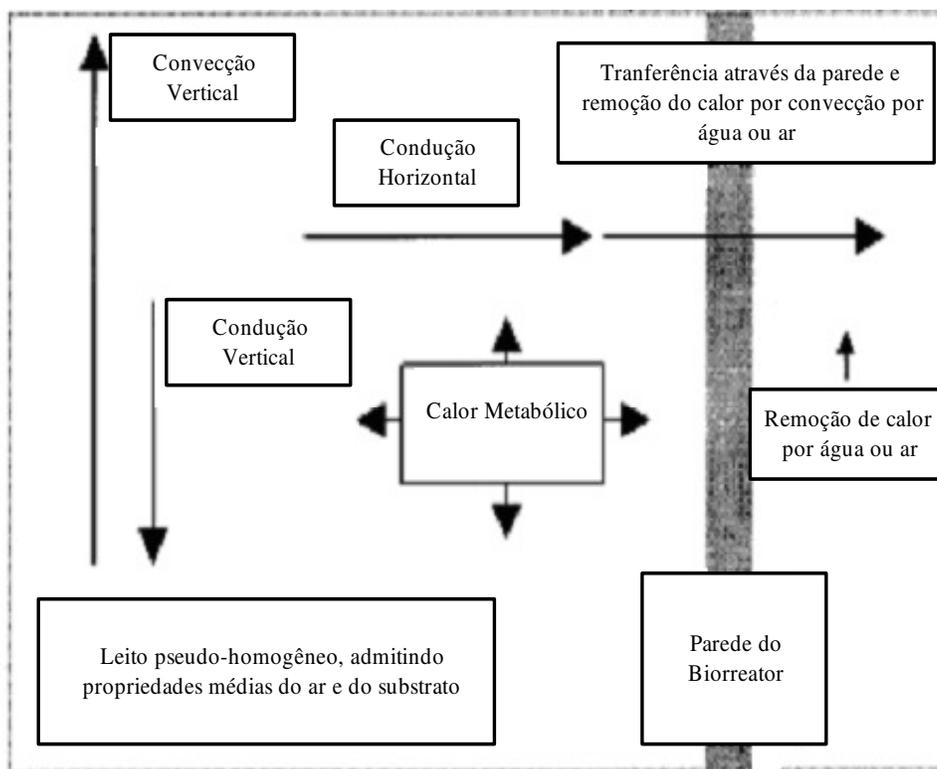


Figura II.3: Diagrama esquemático dos fenômenos de transferência de massa e energia que ocorrem em biorreatores de leito fixo em FES (Adaptado de MITCHELL *et al.*, 2000).

Como o biorreator de leito fixo apresenta baixa eficiência no que diz respeito à remoção de calor metabólico gerado pelo microrganismo, a sua aplicação fica restrita a processos que utilizam poucos quilogramas de substrato. Mitchell *et al.* (2000) apresentaram uma revisão sobre estratégias de projeto, operação e aumento de escala de biorreatores para FES. Com relação aos biorreatores de leito fixo, são apresentados vários trabalhos, os quais usam em média 1,5 a 5 kg de substrato. Roussos *et al.* (1993) apresentaram um projeto de biorreator para operar em escala piloto, com capacidade máxima de 40 kg de substrato. Virtanen *et al.* (2008) usaram um biorreator de leito fixo com capacidade para 40 kg de substrato na produção de biopesticidas. A literatura apresenta inúmeras aplicações de biorreatores de leito fixo para a obtenção de bio-produtos em FES. No entanto, todos os trabalhos foram realizados em escala de laboratório, usando no máximo 40 kg de substrato.

Apesar de todas as dificuldades encontradas no aumento de escala de biorreatores de leito fixo para FES, tem-se um grande interesse no projeto de estratégias mais eficientes, uma vez que esse tipo de biorreator apresenta inúmeras facilidades de projeto e operação. Além disso, o projeto de configurações mais eficientes impulsionaria o emprego de FES em nível industrial, principalmente em processos onde o microrganismo não tolera qualquer tipo de agitação mecânica do meio. No entanto, para que tal objetivo seja atingido, uma série de etapas deve ser cumprida, tais como: elucidação experimental do comportamento metabólico do microrganismo em escala de laboratório, desenvolvimento de modelos matemáticos que sejam representativos dos fenômenos envolvidos em pequena escala, uso desses modelos como uma ferramenta para prever o comportamento em grande escala e, por fim, aplicação do processo em escala industrial.

II.3.3 Biorreator de Tambor Rotativo

Os biorreatores do tipo tambor rotativo apresentam melhores características para prevenir os gradientes de massa e energia através do leito que os biorreatores de leito fixo, enquanto provém agitação mais branda que aqueles dotados com agitadores internos. A ausência de pás agitadoras e a baixa perda de carga ao longo do biorreator fazem com que a operação e construção do mesmo seja simples. A agitação branda associada com o movimento rotacional do tambor contendo o substrato minimiza, os efeitos de rompimento celular devido ao atrito, tornando-se assim a configuração ideal para os processos onde os microrganismos toleram agitação branda.

Em um biorreator de tambor rotativo, a transferência de calor e, portanto, a remoção do calor metabólico, é limitada pela evaporação de água das partículas de substrato e pela perda de calor por convecção através das paredes do biorreator para o ambiente. Quanto maior a escala do processo fermentativo, a remoção de calor por evaporação torna-se mais importante que a perda de calor por convecção (MITCHELL, von MEIEN e KRIEGER, 2003). Uma das maiores vantagens dos biorreatores do tipo tambor rotativo é a possibilidade de adição de água durante a fermentação, por exemplo, pela aspensão de uma

fina camada sobre o substrato durante o movimento de rotação do tambor. Isto implica dizer que a remoção de calor por evaporação pode ser usada como o principal mecanismo de retirada de calor do meio sem limitar o crescimento microbiano devido à diminuição da umidade do meio. Os principais fenômenos de transferência de massa e energia que ocorrem em biorreatores do tipo tambor rotativo em FES foram reportados por Mitchell *et al.* (2000) e estão apresentados na Figura II.4.

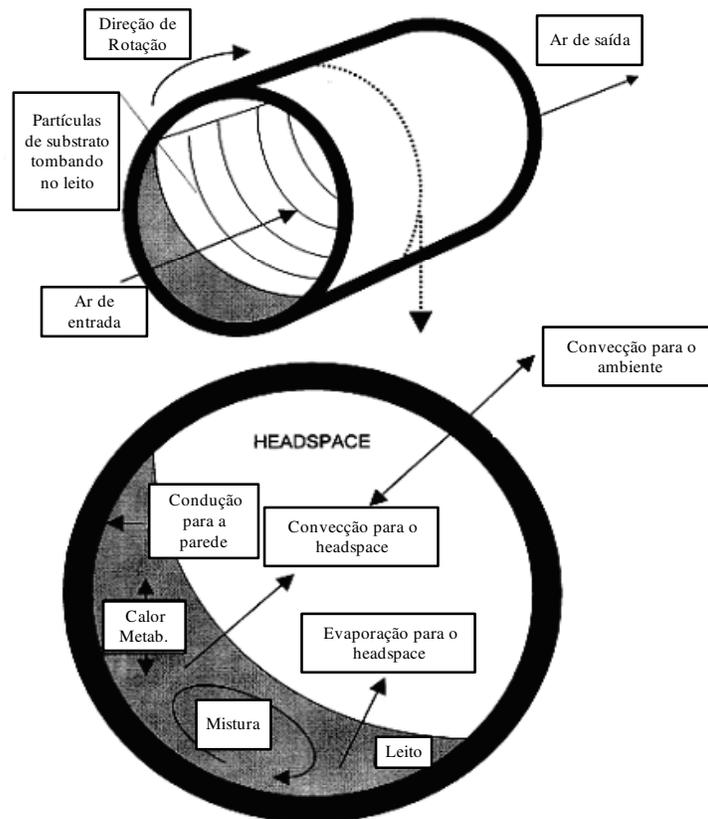


Figura II.4: Diagrama esquemático dos fenômenos de transferência de massa e energia que ocorre nos biorreatores do tipo tambor rotativo em FES (Adaptado de MITCHELL *et al.* 2000).

II.3.4 Biorreator de Leito Fluidizado e de Leito Agitado

A principal diferença entre os biorreatores do tipo tambor rotativo e os biorreatores de leito fluidizado e de leito agitado é a maneira pela qual ocorre o sistema de aeração do leito. Em biorreatores de leito fluidizado e reatores de leito agitado o ar é injetado diretamente no leito contendo o substrato, como ocorre nos biorreatores de leito fixo, melhorando consideravelmente a área de contato entre o gás e as partículas sólidas, enquanto que no biorreator de tambor rotativo o ar é injetado no *headspace* do biorreator. No caso de biorreatores do tipo leito fluidizado, os mesmos não podem ser assumidos perfeitamente agitados, mas a remoção de calor por convecção é efetiva, de maneira que o balanço de energia é desconsiderado na grande maioria das vezes, limitando-se somente ao balanço de massa, especificamente, o balanço para água (MITCHELL, von MEIEN e KRIEGER, 2003). No caso de biorreatores de leito agitado, diversos mecanismos de agitação têm sido empregados como alternativas para obter uma melhor uniformização das propriedades do leito. Mitchell *et al.* (2000) apresenta várias configurações diferentes de biorreatores de leito agitado, onde, na grande maioria dos casos, a agitação é realizada pelo uso de pás dispostas no centro do biorreator. A Figura II.5 apresenta um diagrama esquemático de um biorreator de leito agitado (a) e um biorreator de leito fluidizado (b).

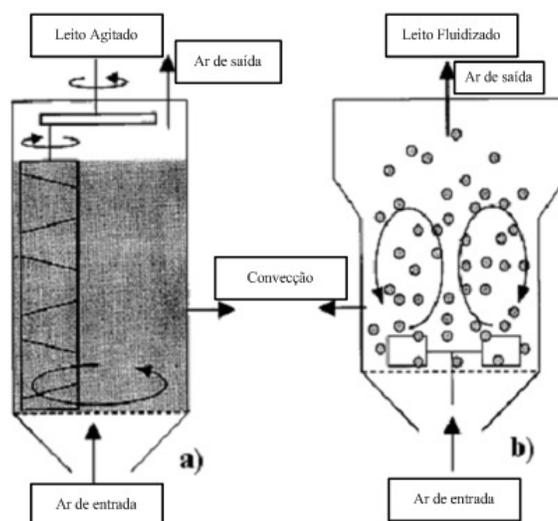


Figura II.5: Diagrama esquemático dos biorreatores tipo leito agitado (a) e leito fluidizado (b) em FES (Adaptado de MITCHELL *et al.*, 2000).

II.4 MODELAGEM MATEMÁTICA DE BIORREATORES DE LEITO FIXO EM FES

O desenvolvimento de modelos matemáticos em bioprocessos é uma das principais ferramentas para o aumento de escala e otimização do processo. Os modelos auxiliam na predição de como as interações entre os vários fenômenos envolvidos durante a fermentação podem contribuir para melhorar o controle global do processo. A aplicação de modelos matemáticos em FES pode ser dividida em dois grandes grupos: modelos macroscópicos e modelos cinéticos e/ou microscópicos (MITCHELL, von MEIEN e KRIEGER, 2003). A Figura II.6 apresenta um diagrama esquemático dos principais fenômenos macroscópicos e microscópicos que ocorrem em FES, incluindo as inter-relações entre os fenômenos relacionados.

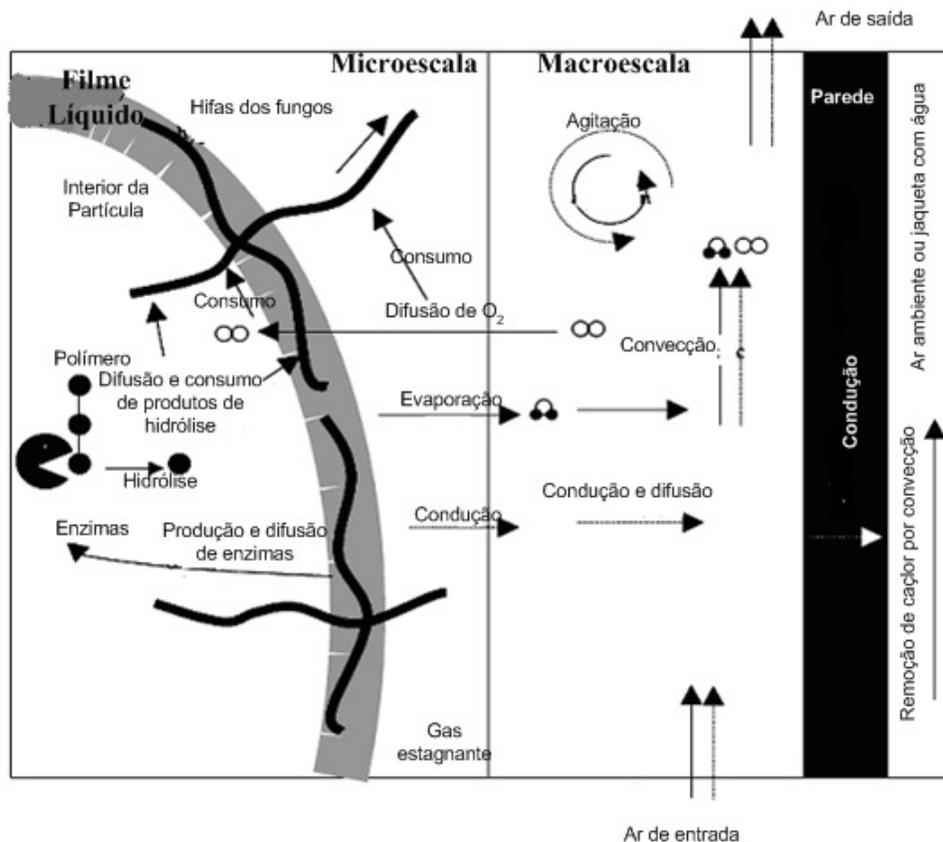


Figura II.6: Diagrama esquemático dos fenômenos macroscópicos e microscópicos que ocorrem em FES (Adaptado de VICCINI *et al.*, 2001)

Os modelos macroscópicos descrevem a transferência de energia e massa entre o leito contendo o substrato com a vizinhança, a qual pode ser entre as fases sólida e gasosa dentro do biorreator ou a partir da parede do biorreator para o ambiente. Os modelos microscópicos, por sua vez, descrevem a cinética de crescimento microbiano em FES e como o crescimento pode ser afetado pelos vários processos que ocorrem simultaneamente ao nível de uma única partícula de substrato, onde cada partícula pode ser considerada como um micro-reator. Claramente, tanto os fenômenos microscópicos quanto os macroscópicos afetam o desempenho do processo, apesar dos diferentes objetivos. A Figura II.7 apresenta um diagrama esquemático da estrutura básica de um modelo matemático para FES, onde é mostrado como as inter-relações entre os fenômenos macroscópicos e os microscópicos afetam o desempenho do processo.

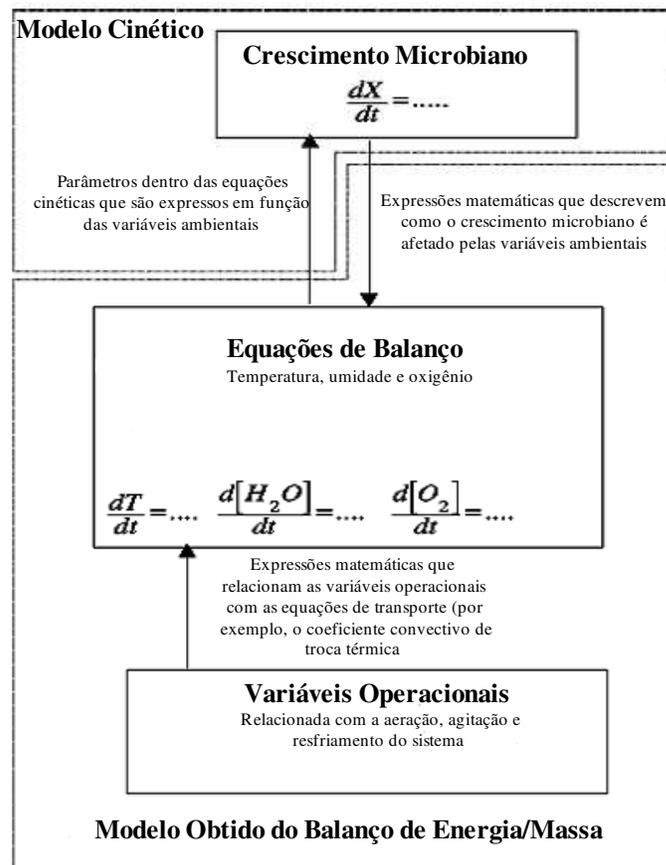


Figura II.7: Diagrama esquemático da estrutura básica de um modelo matemático para FES
(Adaptado de MITCHELL, von MEIEN e KRIEGER, 2003)

II.4.1 Modelos Cinéticos e/ou Microscópicos para FES

Os modelos microscópicos são aqueles que procuram descrever o comportamento cinético do microrganismo e como este depende dos vários processos que ocorrem na superfície ou dentro de uma partícula (MITCHELL *et al.*, 2000). Os fenômenos microscópicos que podem ser potencialmente incluídos no modelo cinético são o efeito das variáveis como temperatura, pH, atividade de água, concentração de oxigênio e nutrientes no crescimento microbiano. Além disso, alguns modelos avaliam o efeito da difusão de enzimas, hidrólise de polímeros pelas enzimas e difusão dos produtos de hidrólise no crescimento microbiano (VICCINI *et al.*, 2001).

O crescimento microbiano pode ser descrito por duas abordagens distintas: equações empíricas simples ou por modelos fenomenológicos que levam em consideração como os fenômenos intraparticulares limitam o crescimento dos microrganismos no meio. Mitchell *et al.* (2004) apresentaram uma revisão dos modelos cinéticos mais empregados em FES, bem como os modelos microscópicos que vêm sendo desenvolvidos. De uma maneira geral, os modelos empíricos predominam em FES, onde a taxa de crescimento é função da temperatura do processo. Os principais modelos empíricos reportados na literatura para descrever a cinética de crescimento microbiano em FES encontram-se apresentados na Tabela II.1.

Tabela II.1. Resumo dos principais modelos empíricos reportados na literatura para descrever o crescimento microbiano em FES (MITCHELL *et al.*, 2004)

| Nome | Equação | Número |
|--------------------|---|--------|
| Linear | $\frac{dX}{dt} = k$ | (II.1) |
| Exponencial | $\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$, $\mu = f(T)$ | (II.2) |
| Logístico | $\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)$, $\mu, X_{\max} = f(T, a_w)$ | (II.3) |

No entanto, existem variações na maneira como são empregados os modelos listados na tabela acima, de maneira a melhorar a capacidade de predição e/ou inferência do modelo matemático. Nos parágrafos seguintes serão apresentados os principais trabalhos que reportam essas aplicações diferenciadas dos modelos matemáticos empíricos para prever o crescimento microbiano em FES. Serão enfocadas a apresentação do modelo e a principal vantagem associada com o seu uso.

Bovill *et al.* (2000) modificaram a equação logística, pela inclusão de um termo que representa o estado fisiológico das células, o qual é dependente das mudanças das condições ambientais, conforme as equações II.4a e II.4b.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \cdot \left(\frac{Q}{1+Q}\right) \quad (\text{II.4a})$$

onde:

$$\frac{dQ}{dt} = f(T, a_w, Q) \quad (\text{II.4b})$$

onde X é a concentração celular, μ é a velocidade específica de crescimento, X_{\max} é a concentração celular máxima obtida na fermentação, T é a temperatura dentro do leito sólido, a_w é a atividade de água do substrato e Q é um parâmetro empírico que representa o estado fisiológico das células. Se as condições ambientais são favoráveis ao crescimento do microrganismo o valor de Q tende a 1. Caso contrário, tem-se valores menores que 1 para Q , implicando numa redução do crescimento microbiano. A abordagem proposta possibilita investigar como as condições ambientais passadas afetam o crescimento microbiano atual, uma vez que essas condições afetam o valor de Q . O crescimento microbiano também depende das condições ambientais atuais, as quais são inclusas no parâmetro μ , o qual é o máximo valor possível dada uma determinada condição ambiental.

Dalsenter *et al.* (2005) propuseram um modelo que postula que o crescimento microbiano é controlado pela concentração de um componente essencial hipotético dentro

das células, denominado componente F. A concentração deste componente é representada em termos adimensionais e varia entre 0-1, onde 1 representa a concentração normal deste componente dentro das células e 0 representa uma célula completamente morta. O crescimento ocorre conforme a seguinte equação:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot F \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \quad (\text{II.5a})$$

onde μ é a velocidade específica de crescimento na temperatura ótima para o microrganismo, X_{\max} é a concentração celular máxima obtida na fermentação. A concentração deste componente é função da temperatura do meio, a qual é descrita pela seguinte equação:

$$\frac{dF}{dt} = k_s \cdot F \cdot (1 - F^n) - k_D \cdot F \quad (\text{II.5b})$$

onde:

$$k_s = A_s \cdot \exp\left(\frac{-E_s}{R \cdot T}\right) \quad (\text{II.5c})$$

$$k_D = A_D \cdot \exp\left(\frac{-E_D}{R \cdot T}\right) \quad (\text{II.5d})$$

onde k_s e k_d são as taxas de síntese e desnaturação do componente F, respectivamente, A_s e A_D são os fatores de frequência para a síntese e desnaturação do componente F, respectivamente, E_s e E_D são a energia de ativação de desnaturação do componente F, respectivamente, T é a temperatura do leite, R é a constante dos gases ideais e n é uma constante ajustável. O modelo proposto considera que a variação de temperatura não afeta a velocidade específica máxima de crescimento, mas afeta a concentração do componente F. Sendo assim, a temperatura de processo tem efeito somente sobre o nível do componente F e este é que regula todo o crescimento microbiano. O modelo apresentou melhores resultados quando comparado com equações empíricas simples.

Ikasari e Mitchell (2000) desenvolveram um modelo empírico de duas fases, o qual consiste de uma fase inicial onde o crescimento é máximo (período compreendido entre o início da fermentação até o final da fase exponencial t_a) e uma fase de desaceleração (período compreendido entre final da fase exponencial t_a e o final da fermentação). A equação correspondente para a fase de aceleração é dada por:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{3}, t < t_a \quad (\text{II.6a})$$

enquanto que a equação para a fase de desaceleração é representada por:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot L \cdot e^{-k(t-t_a)} \cdot X, t \geq t_a \quad (\text{II.6b})$$

onde L é um fator de sobrevivência do microrganismo na mudança entre fases e k é uma constante de desaceleração, os quais podem ser estimados através de regressão não linear de dados experimentais de crescimento microbiano em FES. O modelo sugere que no instante em que inicia a fase de desaceleração há um decréscimo de aproximadamente 80% no número de hifas ativas, seguido por um decréscimo exponencial nesse período.

Hamidi-Esfahani *et al.* (2007) propuseram um modelo de duas fases, o qual aplica os modelos logístico e exponencial para simular o crescimento de um fungo em diferentes temperaturas. O modelo proposto assume que o microrganismo cresce exponencialmente na primeira fase, conforme:

$$\frac{dX_1}{dt} = \mu_1 \cdot X_1 \quad (\text{II.7a})$$

onde:

$$\mu_1 = \left[d_1 (T - T_{\min}) (1 - e^{d_2 (T - T_{\max})}) \right]^2 \quad (\text{II.7b})$$

onde T é a temperatura do leito, T_{\min} e T_{\max} são as temperaturas mínimas e máximas para as quais o crescimento microbiano é possível, respectivamente, d_1 e d_2 são constantes

empíricas ajustáveis. Na segunda fase ocorre uma diminuição na velocidade de crescimento dos microrganismos em FES, decorrentes do aumento da temperatura do meio, sendo descrito pelo modelo logístico, conforme:

$$\frac{dX_2}{dt} = \mu_2 \cdot X_2 \cdot \left(1 - \frac{X_2}{X_{\max}}\right) \quad (\text{II.7c})$$

onde:

$$\mu_1 = a \cdot e^{\left(\frac{-E_a}{R \cdot T}\right)} \quad (\text{II.7d})$$

onde a é o fator de frequência para o crescimento microbiano, E_a é a energia de ativação para o crescimento microbiano, T é a temperatura do leite e R é a constante dos gases ideais. A transição entre as fases ocorre conforme o seguinte critério: se a taxa de crescimento obtido pela Eq. II.7a for maior que o obtido pela Eq. II.7c, o crescimento é descrito pela Eq. II.7a, senão pela Eq. II.4c. Os demais parâmetros do modelo são estimados através de regressão não linear dos dados experimentais, expressos em termos do consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono. O modelo foi apto para descrever toda a curva de crescimento, incluindo a fase lag e a fase de desaceleração do crescimento microbiano.

Apesar da dificuldade em se avaliar os fenômenos de transporte em micro-escala, alguns trabalhos apresentam o desenvolvimento e aplicação de modelos matemáticos mecanísticos para simular alguns fenômenos complexos que ocorrem em FES. Mitchell *et al.* (1991) propuseram um modelo matemático relacionando o crescimento à difusão de enzimas no interior das partículas de substrato e à hidrólise do polissacarídeo, mostrando que a taxa de difusão dos produtos de hidrólise até a superfície pode limitar o crescimento. As partículas de substrato foram consideradas como uma placa plana infinitesimal, onde a difusão da enzima glucoamilase (C_E) para o interior da partícula de substrato pode ser descrita pela seguinte equação:

$$\frac{dC_E}{dt} = D_E \frac{\partial^2 C_E}{\partial z^2} \quad (\text{II.8a})$$

onde D_E é a difusividade efetiva da enzima para o interior da partícula, z é a posição e t é o tempo. Foi assumido que a enzima é liberada pelos microrganismos na superfície do substrato. A hidrólise do amido (C_S) dentro da partícula de substrato segue a cinética de Michaelis-Menten:

$$\frac{dC_S}{dt} = -k_{\text{cat}} \cdot C_E \cdot \left(\frac{C_S}{k_s + C_S} \right) \quad (\text{II.8b})$$

onde k_{cat} e k_s são as constantes catalítica e a de Michaelis-Menten, respectivamente. A liberação de glicose (C_G) pela ação da glucoamilase e a difusão da glicose dentro da partícula de substrato são descritas por:

$$\frac{dC_G}{dt} = D_G \frac{\partial^2 C_G}{\partial z^2} + k_{\text{cat}} \cdot C_E \cdot \left(\frac{C_S}{k_s + C_S} \right) \quad (\text{II.8c})$$

onde D_G é a difusividade efetiva da glicose no interior da partícula. A concentração celular foi tratada matematicamente como sendo uma fina camada em torno das partículas de substrato com densidade constante.

Rajagopalan e Modak (1995) melhoraram o modelo de Mitchell *et al.* (1991), considerando a esfericidade das partículas de substrato, a qual é uma consideração melhor que a de uma placa plana infinita, além de levar em consideração a difusão de oxigênio no interior de um filme líquido ao redor das partículas de substrato, considerando que o crescimento microbiano ocorre na superfície das partículas. A descrição resumida das etapas envolvidas no desenvolvimento do modelo encontra-se na Figura II.8.

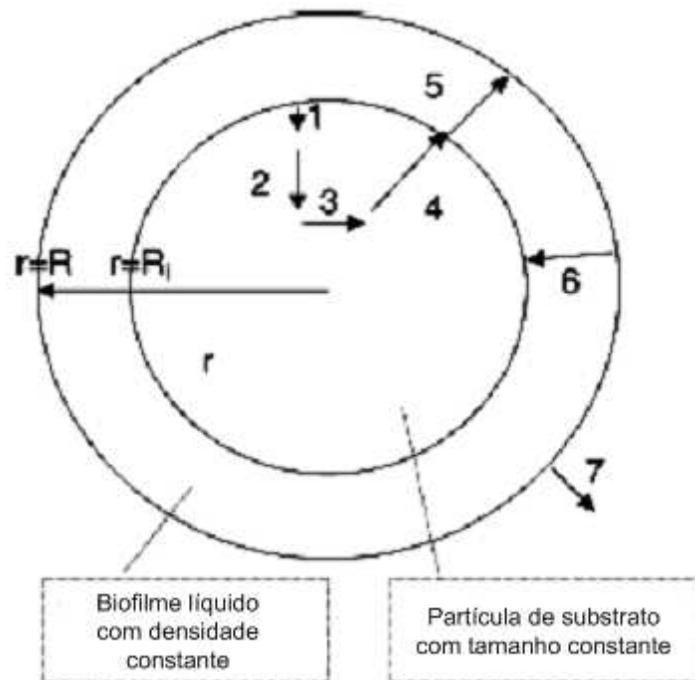


Figura II.8: Diagrama esquemático dos fenômenos considerados no desenvolvimento do modelo de Rajagopalan e Modak (1995). Legenda: 1- liberação da enzima glucoamilase na interface biofilme/substrato; 2 – difusão da enzima para o interior da partícula de substrato; 3 – hidrólise do amido pela enzima; 4 – liberação da glicose e difusão até o biofilme líquido; 5 – difusão da glicose dentro do biofilme líquido e consumo da mesma pelo microrganismo; 6 – Difusão do oxigênio para o interior do biofilme líquido e consumo pelo microrganismo; 7 – expansão do biofilme devido ao crescimento microbiano.

(Adaptado de MITCHELL *et al.* 2004)

De acordo com Rajagopalan e Modak (1995), a difusão da enzima glucoamilase (C_E) para o interior da partícula de substrato pode ser descrita pela seguinte equação:

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{D_E}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_E}{\partial r} \right) \quad (\text{II.9a})$$

onde D_E é a difusividade efetiva da enzima para o interior da partícula com raio r em cada instante de tempo t . Foi assumido que a enzima foi liberada na interface biofilme

líquido/substrato. A hidrólise do amido (C_S) dentro da partícula de substrato foi assumida seguir a cinética de Michaelis-Menten:

$$\frac{dC_S}{dt} = -k_{cat} \cdot C_E \cdot \left(\frac{C_S}{k_s + C_S} \right) \quad (\text{II.9b})$$

onde k_{cat} e k_s são as constantes catalítica e a de Michaelis-Menten, respectivamente. A liberação de glicose (C_G) pela ação da glucoamilase e a difusão da glicose dentro da partícula de substrato foram descritas por:

$$\frac{dC_G}{dt} = \frac{D_G}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_G}{\partial r} \right) + k_{cat} \cdot C_E \cdot \left(\frac{C_S}{k_s + C_S} \right) \quad (\text{II.9c})$$

onde D_G é a difusividade efetiva da glicose no interior da partícula com raio r em cada instante de tempo t . A difusão de oxigênio (C_{O_2}) para o interior da partícula de substrato pode ser descrita pela seguinte equação:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = \frac{D_{O_2}}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_{O_2}}{\partial r} \right) - \mu_{max} \cdot X \cdot Y_{O_2/X} \cdot \left(\frac{C_{O_2}}{k_{O_2} + C_{O_2}} \right) \left(\frac{C_G}{k_G + C_G} \right) \quad (\text{II.9d})$$

onde C_{O_2} e C_G são as concentrações de glicose e oxigênio no biofilme líquido e $Y_{O_2/X}$ é o coeficiente de rendimento de oxigênio em células. A equação que descreve o crescimento microbiano é a seguinte:

$$\frac{dX}{dt} = \int_{R_i}^R \mu_{max} \cdot X \cdot \left(\frac{C_{O_2}}{k_{O_2} + C_{O_2}} \right) \left(\frac{C_G}{k_G + C_G} \right) \cdot 4\pi r^2 \cdot dr \quad (\text{II.9e})$$

onde X é a concentração de biomassa, μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento, C_G é a concentração de glicose no biofilme líquido, R é o raio do biofilme e R_i é o raio da partícula.

Rajagopalan, Rockstraw e Munson-McGee (1997) propuseram um modelo que leva em consideração a alteração do tamanho das partículas ocasionada pelo consumo de

substrato e crescimento microbiano na superfície, o qual não é limitado pela difusão da glicose no biofilme líquido. A seguinte equação foi proposta de maneira a descrever a variação transiente do raio da partícula ($R_i(t)$):

$$R_i(t) = \sqrt[3]{R_{i0}^3 - \frac{3 \left[\int_0^t D_G \left(\frac{\partial C_G}{\partial r} \right) \cdot 4\pi R_{i0}^2 dt \right]}{4\pi\rho_G}} \quad (\text{II.10a})$$

onde D_G , C_G e ρ_G são a difusividade efetiva, concentração e densidade da glicose no interior da partícula de substrato, respectivamente e R_{i0} é o raio inicial da partícula. O volume residual da partícula (V_S) é dado por:

$$V_S = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot (R_{i0}^3 - R_i(t)^3) \cdot \rho_G \quad (\text{II.10b})$$

Nopharatana, Howes e Mitchell (1998) apresentaram um modelo que descreve a variação temporal e espacial do crescimento das hifas dos fungos ao longo das superfícies dos substratos e relacionaram como a difusão de glicose do interior do substrato até a superfície e a difusão de glicose dentro das hifas pode limitar o tamanho e a densidade das mesmas. O modelo proposto considera somente a coordenada vertical, onde os pontos na coordenada horizontal foram assumidos idênticos. Embora o crescimento dos fungos ocorra devido à extensão e ramificações das hifas, o modelo não descreve a extensão e ramificação de hifas individuais. A Figura II.9 apresenta um diagrama esquemático dos fenômenos envolvidos no modelo proposto.

O modelo que descreve a geração e o movimento das hifas é descrita pela Eq. II.11a:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \alpha \left(1 - \frac{B}{B_{\max}} \right) \left(\frac{G}{k + G} \right) + D \left(1 - \frac{B}{B_{\max}} \right) \left(\frac{G}{k + G} \right) \frac{\partial n}{\partial x} \quad (\text{II.11a})$$

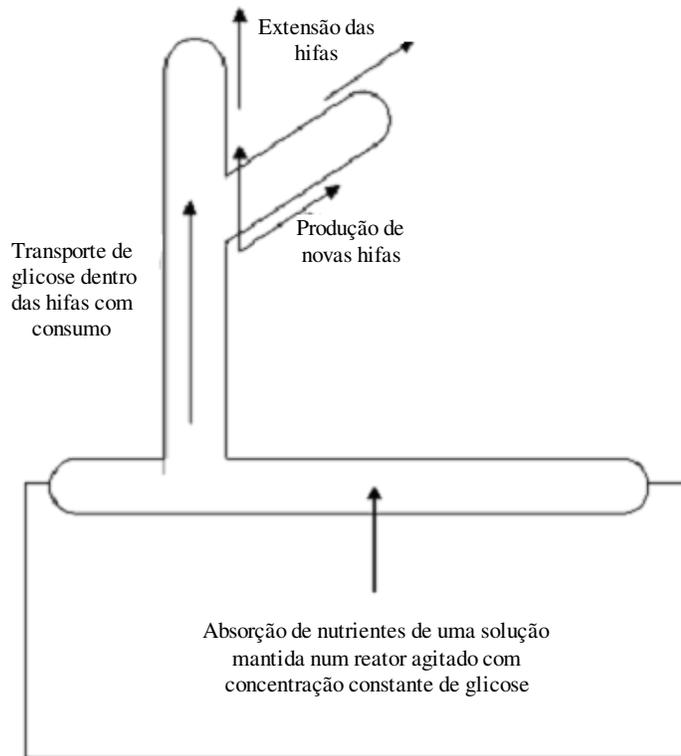


Figura II.9: Diagrama esquemático dos fenômenos considerados no desenvolvimento do modelo de Nopharatana, Howes e Mitchell (1998) (Adaptada de MITCHELL *et al.* 2004)

A equação anterior postula que o número de hifas numa altura específica (x) é resultado de dois processos. O primeiro termo do lado direito da equação diz respeito à produção de novas hifas devido a ramificação, a qual depende da concentração da glicose (G), assumindo cinética de Monod, onde k é a constante de saturação e B a concentração global de biomassa. A taxa específica máxima de produção das hifas é dada por α . O segundo termo do lado direito da equação diz respeito ao movimento das hifas numa altura específica. Este movimento, devido a extensão das hifas, é modelado como sendo um processo resultante da difusão, onde D é a difusividade das pontas das hifas, assumindo que a taxa de extensão das hifas depende da concentração de glicose e da concentração global de biomassa. A produção global de biomassa é dada por:

$$\frac{\partial B}{\partial t} = n \cdot v_{\max} \cdot a \cdot \rho \cdot \left(1 - \frac{B}{B_{\max}}\right) \left(\frac{G}{k + G}\right) \quad (\text{II.11b})$$

onde v_{\max} é a máxima taxa de extensão possível para as hifas, a é a área de seção transversal das hifas e ρ é a massa seca de hifa por tempo. Um balanço de massa também é escrito para a difusão e consumo da glicose dentro das hifas, conforme:

$$\frac{\partial G}{\partial t} = D_{\text{hif}} \frac{\partial}{\partial x} \left(B \frac{\partial (G/B)}{\partial x} \right) - \frac{1}{Y_{X/G}} \frac{\partial B}{\partial t} - m_G B \quad (\text{II.11c})$$

onde D_{hif} é a difusão efetiva da glicose nas hifas, $Y_{X/G}$ é o coeficiente de rendimento de glicose em células e m_G é o coeficiente de manutenção das hifas devido ao consumo de glicose.

Ao contrário de fermentação submersa, onde há muitos estudos de modelos de crescimento microbiano segregados e estruturados, em FES há uma lacuna a ser preenchida. Um modelo de crescimento microbiano representativo do processo é o principal aspecto do projeto de configurações mais eficientes de biorreatores leito fixo para FES. O que se percebe é que para todos os modelos apresentados anteriormente, tem-se apenas uma representação qualitativa ou semiquantitativa dos fenômenos envolvidos, o que justifica o fato que muitas estratégias de projeto serem pouco eficientes.

II.4.2 Modelos Macroscópicos em FES

Os modelos macroscópicos são aqueles que se referem à operação do biorreator. Eles descrevem os fenômenos de transferência de massa e calor no processo e, normalmente, elucidam os fenômenos ao nível de uma única partícula, de uma maneira bem simplificada. Em biorreatores de leito fixo para FES as principais variáveis operacionais manipuladas são a temperatura e a vazão do ar de entrada. O grande desafio é manipular essas variáveis de tal maneira que se tenha um adequado fornecimento de oxigênio, prevenção do superaquecimento do meio e manutenção da atividade de água

próxima da ótima para o microrganismo se desenvolver. Em virtude da complexidade da interação entre os fenômenos, o desenvolvimento de modelos matemáticos macroscópicos, baseados em princípios de transferência de massa e calor, sé uma ótima ferramenta para simular o processo e compreender os aspectos relevantes (MITCHELL *et al.*, 2000). Muitos trabalhos que enfocam a modelagem macroscópica dos fenômenos de transferência de massa e calor em biorreatores do tipo leito fixo são encontrados na literatura, sendo que os mais relevantes serão discutidos a seguir.

Os primeiros modelos matemáticos para biorreatores leito fixo não apresentavam a inclusão da evaporação de água no balanço de energia (SAUCEDO-CASTANEDA *et al.*, 1990; SANGSURASAK e MITCHELL, 1995). Sangsurasak e Mitchell (1998) propuseram um modelo bi-dimensional para a transferência de calor em um biorreator de leito fixo para o crescimento de *A. niger*. O modelo indicou que o processo de evaporação dentro do biorreator foi responsável pela retirada de 78% do calor metabólico. O balanço de energia proposto inclui um termo referente à evaporação e à transferência de calor nas coordenadas radial e axial, conforme a Eq. II.12:

$$\rho_b \cdot C_{pb} \frac{\partial T}{\partial t} + (\rho_a \cdot C_{pa} + \rho_a \cdot f \cdot \lambda) \cdot v_z \frac{\partial T}{\partial z} = \left[\frac{k_b}{r} \frac{\partial T}{\partial r} + k_b \frac{\partial^2 T}{\partial r^2} \right] + k_b \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + R_Q \quad (\text{II.12})$$

onde ρ_a e ρ_b são as densidades do ar úmido e do leito, respectivamente, C_{pa} e C_{pb} são as capacidades caloríficas do ar e do leito, respectivamente, k_b é a condutividade térmica do leito, v_z é a velocidade superficial, λ é a entalpia de vaporização da água, f é a capacidade de evaporação de água do leito pelo ar, r e z são as posições radial e axial dentro do biorreator, T é a temperatura do leito e R_Q é a taxa de geração de calor metabólico.

Ashley, Mitchell e Howes (1999) apresentaram um modelo de transferência de calor axial para o crescimento de *A. niger* em um biorreator de leito fixo como uma ferramenta para selecionar a melhor estratégia de aeração que possibilite diminuir os gradiente de temperatura durante a fermentação. Uma vez que a transferência de calor através das paredes do biorreator foi considerada desprezível, somente a coordenada axial foi

considerada no modelo. A Eq. II.13 apresenta o balanço de energia macroscópico ao longo da coluna, incluindo os termos referentes à convecção, remoção de calor por evaporação, condução na direção axial e o termo referente à geração de calor devido ao crescimento microbiano:

$$\rho_b \cdot C_{pb} \frac{\partial T}{\partial t} + (\rho_a \cdot C_{pa} + \rho_a \cdot f \cdot \lambda) \cdot v_z \frac{\partial T}{\partial z} = k_b \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + \rho_s (1 - \varepsilon) \cdot Y \frac{\partial X}{\partial t} \quad (\text{II.13})$$

onde ρ_a , ρ_b e ρ_s são as densidades do ar úmido, do leito e do substrato, respectivamente, C_{pa} e C_{pb} são as capacidades caloríficas do ar e do leito, respectivamente, k_b é a condutividade térmica do leito, v_z é a velocidade superficial, λ é a entalpia de vaporização da água, f é a capacidade de evaporação de água do leito pelo ar, z é a posição axial dentro do biorreator, T é a temperatura do leito, X é a concentração celular e Y é o coeficiente de geração de calor metabólico. O modelo matemático para o biorreator leito fixo do tipo Zymotis, o qual é um biorreator que apresenta placas internas por onde circula ar ou água para a remoção de calor, pode desconsiderar o termo referente a condução de calor da equação anterior (MITCHELL e von MEIEN, 2000).

Weber *et al.* (2002) investigaram o comportamento do microrganismo frente às mudanças na temperatura do meio e conteúdo de água do substrato através da proposição de um modelo baseado em equações de balanço de massa e energia. O balanço de energia foi aproximado considerando um estado pseudo estacionário, conforme:

$$0 = r_Q + F \frac{d}{dz} [C_{pg} \cdot (T - T_{ref}) + y_{vap} \cdot C_{pvap} \cdot (T - T_{ref}) + \lambda] \quad (\text{II.14a})$$

onde F é a vazão mássica de ar, y_{vap} é a umidade do ar em cada posição dentro do biorreator, C_{pg} e C_{pvap} são as capacidade caloríficas do ar e do vapor d'água, respectivamente, r_Q é a taxa de produção de calor metabólico, T e T_{ref} são a temperatura em cada posição e a temperatura de referência para o cálculo da entalpia, respectivamente e λ é a entalpia de vaporização da água. O balanço para a água extracelular foi descrito conforme a seguinte equação:

$$(1-\varepsilon) \cdot C_s \cdot \frac{dX_{ws}}{dt} = r_{ws} - (1-\varepsilon) \cdot X_{ws} \cdot \frac{dC_s}{dt} - F \cdot \frac{y_{out} - y_{in}}{H} \quad (\text{II.14b})$$

onde C_s é a concentração volumétrica de sólidos totais dentro do biorreator, X_{ws} é a concentração de água, r_{ws} é a taxa de produção de água metabólica pelos microrganismos, H é a altura do biorreator, y_{out} e y_{in} são as umidades do ar de saída e entrada do biorreator, respectivamente e ε é a porosidade do leito.

von Meien e Mitchell (2002) propuseram um modelo de duas fases para a transferência de água e calor num biorreator de leito fixo intermitentemente agitado. O balanço para a água na fase gasosa é dado por:

$$\varepsilon \cdot \rho_g \frac{\partial \varphi_g}{\partial t} + G \frac{\partial \varphi_g}{\partial z} = k_a \cdot (\varphi_s - \varphi_s^*) \quad (\text{II.15a})$$

onde φ_g , φ_s e φ_s^* são o conteúdo de água na fase gasosa, o conteúdo de água na fase sólida e o conteúdo de água da fase sólida que estaria em equilíbrio com a fase gasosa, respectivamente, G é a vazão mássica de ar, k_a é o coeficiente global de transferência de massa entre as fases sólidas e gasosa, ε é a porosidade do leito e ρ_g é a densidade da fase gasosa.

A transferência de massa na fase sólida é afetada pela transferência de massa entre a fase sólida e gasosa, e pela produção de água metabólica durante o crescimento microbiano:

$$\frac{\partial(S \cdot \varphi_s)}{\partial t} = -k_a \cdot (\varphi_s - \varphi_s^*) + Y_{wb} \cdot \left(S \frac{\partial b}{\partial t} + b \frac{\partial S}{\partial t} \right) \quad (\text{II.15b})$$

onde S é a concentração volumétrica de sólidos totais, b é a concentração de biomassa e Y_{wb} é o coeficiente de rendimento de água metabólica devido ao crescimento microbiano.

O balanço de energia para a fase vapor representa o fenômeno de mudança de temperatura ao longo do biorreator, além de representar o fenômeno de transferência de energia por convecção a partir da fase sólida para a fase gasosa, conforme a Eq. II.15c:

$$\varepsilon \cdot \rho_g \cdot (Cp_g + \varphi_g \cdot Cp_v) \frac{\partial T_g}{\partial t} + (Cp_g + \varphi_g \cdot Cp_v) \cdot G \frac{\partial T_g}{\partial z} = -h_a \cdot (T_g - T_s) \quad (\text{II.15c})$$

onde Cp_g e Cp_v são a capacidade calorífica do ar seco e do vapor d'água, respectivamente, T_g e T_s são a temperatura da fase gasosa e sólida, respectivamente e h_a é o coeficiente global de transferência de calor entre as fases gasosa e sólida.

O conteúdo de energia da fase sólida de um determinado ponto dentro do biorreator é afetado pela convecção para a fase gasosa, evaporação da água para a fase gasosa e pela produção de calor metabólico. Estes três fenômenos estão representados na equação II.15d:

$$S \cdot (Cp_s + \varphi_s \cdot Cp_w) \frac{\partial T_s}{\partial t} = h_a \cdot (T_g - T_s) - \lambda \cdot k_a \cdot (\varphi_s - \varphi_s^*) + Y_Q \cdot \left(S \frac{\partial b}{\partial t} + b \frac{\partial S}{\partial t} \right) \quad (\text{II.15d})$$

onde Cp_s , Cp_w são a capacidade calorífica dos sólidos secos e a capacidade calorífica da água, respectivamente, Y_Q é o coeficiente de rendimento de calor metabólico devido ao crescimento microbiano e λ é a entalpia de vaporização da água.

O modelo proposto por von Meien e Mitchell (2002) prevê que próximo à região de entrada do ar no biorreator há diferenças significativas entre a temperatura do ar e do sólido, sendo que no restante do biorreator essas temperaturas encontram-se próximas do equilíbrio, dependendo das condições de operação do biorreator..

Khanahmadi *et al.* (2006) desenvolveram um método para prever a umidade do substrato num biorreator de leito fixo intermitentemente agitado. O método é baseado na medida da temperatura do ar de entrada e saída no biorreator e adota a hipótese de que as correntes de ar estão saturadas com vapor d'água. O modelo, composto pelas equações de balanço de massa e energia, conseguiu prever o conteúdo de água que deve ser adicionado entre os eventos de agitação. A equação de balanço é similar à proposta por Ashley, Mitchell e Howes (1999), porém exclui o termo referente à difusão ao longo do biorreator, conforme a Eq. II.16:

$$\rho_b \cdot C_{pb} \frac{\partial T}{\partial t} + (\rho_a \cdot C_{pa} + \rho_a \cdot f \cdot \lambda) \cdot v_z \frac{\partial T}{\partial z} = \rho_s (1 - \varepsilon) \cdot Y \frac{\partial X}{\partial t} \quad (\text{II.16})$$

Sahir, Kumar e Kumar (2007) desenvolveram um modelo para um biorreator de leito fixo empregando a abordagem de N-tanques em série. A solução do modelo é menos complexa comparada com os métodos convencionais, uma vez que reduz o modelo composto por equações diferenciais parciais para um sistema composto por equações diferenciais ordinárias (EDO's), desde que sejam empregadas as rotinas adequadas para resolver o sistema de EDO's. A partir dos dados obtidos com o modelo foi possível prever com precisão os gradientes axiais de temperatura. A equação resultante para cada tanque é representada pela Eq. II.17.

$$\frac{dT_n}{dt} = \frac{F \cdot C_{p_a} \cdot (T_{n-1} - T_n) + F \cdot \lambda \cdot (h_a |_{T_{n-1}} - h_a |_{T_n}) + F \cdot C_{p_v} \cdot (h_a |_{T_{n-1}} \cdot T_{n-1} - h_a |_{T_n} \cdot T_n)}{(B/N) \cdot (1 + W) \cdot C_{p_s}} + \frac{(B/N) \cdot Y_Q \cdot dX/dt - h \cdot (A/N) \cdot (T_n - T_w)}{(B/N) \cdot (1 + W) \cdot C_{p_s}} \quad (\text{II.17})$$

onde h_a é a umidade do ar, h o coeficiente global de transferência de calor, B é a massa total de sólidos dentro do biorreator, N é o número total de tanques considerados, W é o conteúdo de água no material sólido, X é o conteúdo de biomassa no material sólido, T_w é a temperatura na camisa do biorreator e C_{p_s} é a capacidade calorífica do material sólido. Os demais símbolos foram definidos anteriormente. O diagrama esquemático do modelo proposto é apresentado na Figura seguinte.

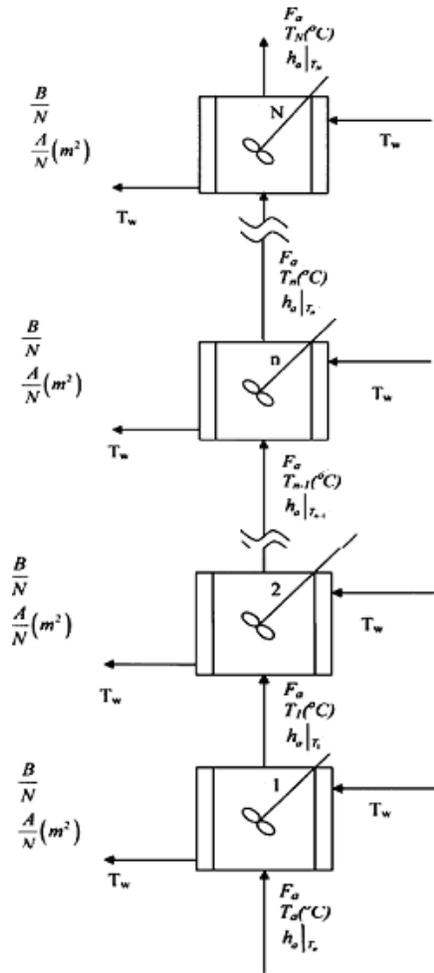


Figura II.10: Diagrama esquemático do modelo proposto por Sahir, Kumar e Kumar (2007)

A partir da revisão bibliográfica apresentada alguns aspectos são evidenciados. A produção de inulinase por FES mostrou ser tecnicamente viável em micro-escala, uma vez que foi possível a obtenção de elevada atividade em um período relativamente curto. No entanto, não há nada referente sobre o comportamento do processo em escala maior, empregando biorreatores. O aumento de escala, por sua vez, requer o desenvolvimento de modelos matemáticos confiáveis que possam ser utilizados como ferramentas de projeto, otimização e controle do processo.

A literatura é vasta e completa no que diz respeito ao desenvolvimento de modelos associados aos fenômenos de transferência de massa e calor dentro de biorreatores. No

entanto, há uma limitação no que diz respeito ao desenvolvimento de modelos matemáticos associados ao crescimento microbiano, principalmente devido à dificuldade de separar as células dos substratos, dificultando a quantificação da concentração celular. Como controle do processo depende do crescimento microbiano, boa parte dos modelos apresenta deficiências durante a predição do comportamento dinâmico do processo, principalmente em escala maior. Esta dificuldade é facilmente visualizada quando se compara o número de processos envolvendo FES que estão operando industrialmente com os que envolvem fermentação submersa, onde há um maior desenvolvimento de modelos e do processo.

Diante deste contexto, todo esforço no sentido de encontrar estratégias para o aumento de escala de processos envolvendo FES é bem vindo, desde que seja realizado dentro do rigor científico requerido para esta situação.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

III.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, o uso de fermentação em estado sólido (FES) tem recebido maior atenção por parte dos pesquisadores, uma vez que estudos referindo-se à produção de enzimas, flavors, corantes e outras substâncias de interesse na indústria de alimentos demonstraram alto potencial de produção através de FES, aumentando o rendimento quando comparado com o mesmo processo conduzido em fermentação submersa (COUTO e SANROMÁN, 2006). No entanto, a maior parte destas aplicações são restritas à produção em escala de bancada, usando poucos gramas de substrato. Por mais promissor que estes processos possam ser, não está claro se eles podem ser efetivamente conduzidos em escala piloto ou industrial (WEBER *et al.*, 2002).

A produção de inulinase por FES tem demonstrado um grande potencial, uma vez que altos rendimentos têm sido alcançados usando resíduos agroindustriais como substratos, o que reduz os custos de produção (BENDER *et al.*, 2006; SELVAKUMAR e PANDEY, 1999; XIONG, JINHUA e DONGSHENG, 2007). Nos últimos três anos, a produção de inulinase por FES foi melhorada significativamente usando bagaço de cana como substrato (MAZUTTI *et al.*, 2006; 2007). Do ponto de vista da aplicação industrial, o principal resultado alcançado foi à redução do tempo de fermentação de 96 h para 24 h, aumentando a produtividade do processo. Além disso, tempos de fermentação menores diminuem o risco de contaminação e o aumento de escala desse processo é facilitado, devido a diminuição dos gradientes de massa e temperatura (MAZUTTI *et al.*, 2007). No entanto, todos os trabalhos reportados na literatura foram conduzidos em pequena escala (BENDER *et al.*, 2008; 2006; MAZUTTI *et al.*, 2006; 2007; SELVAKUMAR e PANDEY, 1999; XIONG, JINHUA e DONGSHENG, 2007; SHENG *et al.*, 2008; AYYACHAMY *et al.*, 2007).

No decorrer do estudo da viabilidade de aumento de escala do processo de produção de inulinase por FES a configuração de biorreator bastante promissora é a de leito fixo, uma vez que este tipo de reator pode ser usado para (i) analisar a evolução global do processo e determinar o efeito que as variáveis manipuladas exercem sobre a temperatura e umidade

do meio e (ii) para estudar os fenômenos de transferência de massa e energia (DURAND, 2003). Além disso, a levedura *Kluyveromyces marxianus* mostrou ser sensível à tensão de cisalhamento ocasionada pela agitação do meio, conforme trabalho publicado por Silva-Santisteban e Maugeri (2005).

Neste contexto, o objetivo central deste capítulo é apresentar resultados referentes à produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo com capacidade operacional de 3 kg (base seca) usando a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Como não existem trabalhos na literatura enfocando a produção de inulinase por FES em biorreatores de leito fixo foi preciso, inicialmente, avaliar o efeito das variáveis operacionais sobre a produção da enzima, através da metodologia de planejamento de experimentos.

III.2 MATERIAL E MÉTODOS

III.2.1 Microrganismo, Pré-inóculo e Substratos

O microrganismo utilizado foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, a qual foi previamente reportada como produtora de inulinase por FES e é pertencente ao grupo GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (MAZUTTI *et al.*, 2007; 2006). O microrganismo foi mantido a 4°C em caldo YM contendo: 3 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g.L⁻¹ de extrato de malte, 5 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de ágar. O meio para o pré-inóculo contém: 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ sacarose, 5 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 1,5 g.L⁻¹ de NH₄Cl, 1,15 g.L⁻¹ de KCl e 0,65 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. Cada tubo de caldo YM foi transferido para um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, o qual foi encubado a 30°C, 150 rpm por 24 horas.

O meio sólido usado como substrato em FES para a produção de inulinase era composto por bagaço de cana suplementado com 15% (p/p) de melação de cana pré-tratado, 30% (p/p) de água de maceração de milho (AMM) e 20% (p/p) de farelo de soja, cuja composição foi definida em trabalhos anteriores, onde o processo foi conduzido em micro-

escala (MAZUTTI *et al.*, 2006; 2007). O bagaço de cana, adquirido numa destilaria artesanal localizada no Município de Marcelino Ramos - RS, foi seco sob temperatura ambiente e triturado mecanicamente, de maneira a uniformizar o tamanho de partículas. A AMM foi adquirida na Corn Products Internacional – Mogi Guaçu (SP); o melaço de cana foi adquirido na Refinaria Éster – Campinas (SP); o farelo de soja foi adquirido na empresa Olfar – Erechim (RS). A umidade inicial dos substratos foi corrigida para 65% conforme determinada em trabalho anterior (MAZUTTI *et al.*, 2006). O melaço de cana foi pré-tratado preparando-se uma solução 200 g.L⁻¹ em ácido sulfúrico pH 5,0. Esta solução permaneceu em repouso por 24 horas. Após esse período, o pH final foi ajustado para 4,0 com ácido sulfúrico. A solução resultante foi centrifugada a 15000 x g por 15 minutos a 4°C (SGUAREZI *et al.*, 2008).

III.2.2 Fermentação em Estado Sólido (FES)

As fermentações foram realizadas num biorreator de leito fixo em escala de laboratório com capacidade útil de 3kg de bagaço de cana seco. A unidade experimental consiste basicamente de um cilindro metálico (34 cm de diâmetro e 50 cm de altura) conectado a uma linha de ar saturado com água. O umidificador de ar, o qual fornece ar com umidade relativa em torno de 95%, consiste de um cilindro de PVC disposto horizontalmente antes da entrada do ar no biorreator. Ar seco, fornecido por um compressor de ar, foi bombeado diretamente dentro do umidificador usando um difusor, onde o ar permanecia em contato com a água por um tempo suficiente para que fosse obtido ar úmido nas condições de processo. O ar próximo da saturação, na temperatura de operação, entra na base do biorreator, percorrendo todo o leito, até sua saída no topo. A Figura III.1 apresenta um diagrama esquemático do biorreator de leito fixo utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

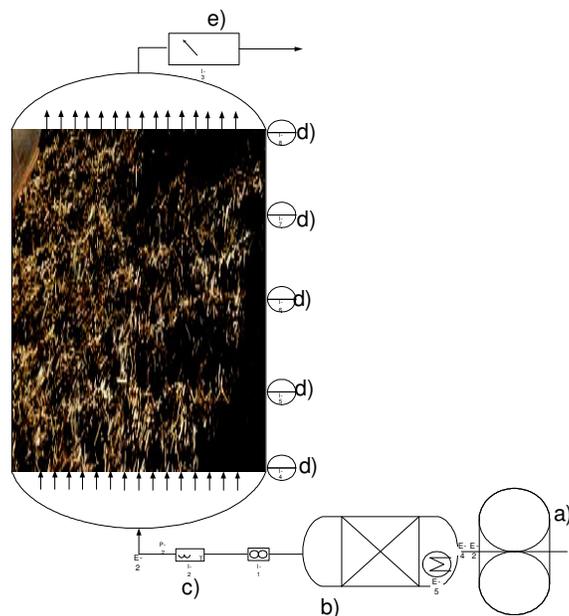


Figura III.1: Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo empregado neste estudo: a- compressor; b- umidificador; c – controle de vazão, temperatura e umidade; d – sensores de temperatura; e – medidor de CO₂, temperatura e umidade.

O biorreator foi carregado com 3 kg (base seca) de bagaço de cana devidamente suplementado. A umidade dos substratos foi corrigida para 65% (Base seca - p/p) e autoclavado a 121°C por 20 minutos. As fermentações iniciaram com um volume de inóculo correspondente à massa de células definidas no planejamento de experimentos. Todos os experimentos foram conduzidos por 24 h. Após a fermentação, o leito foi totalmente homogeneizado e a atividade enzimática obtida foi o valor médio resultante de seis análises. Nesta etapa do trabalho não foram avaliados os efeitos dos gradientes de massa e energia nos perfis de produção de inulinase, uma vez que o objetivo era avaliar a viabilidade técnica da produção de inulinase por FES usando o biorreator leito fixo. As temperaturas de entrada e saída do biorreator, bem como as temperaturas ao longo leito, foram constantemente monitoradas através de um sensor de temperatura PT100 (NOVUS, Brasil), mas os seus valores não são apresentados ao longo deste capítulo.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da temperatura e a vazão volumétrica do ar de entrada, além da massa inicial de células na produção de inulinase por FES no biorreator leito fixo, um delineamento composto central rotacional para três variáveis independentes foi executado, totalizando 17 experimentos. A Tabela III.1 apresenta os níveis investigados no planejamento de experimentos. Os resultados foram analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft Inc.

III.2.3 Atividade Enzimática

Após a fermentação, a inulinase foi extraída do meio através da adição de 100mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8, seguindo com a incubação à 50°C, 150 rpm por 30 minutos (BENDER *et al.*, 2008). A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante, após a filtração dos sólidos, adicionando-se 0,5 mL da solução de extração adequadamente diluída em 4,5 mL de uma solução 2% (p/V) de sacarose em tampão acetato de sódio (0,1 M pH 4,8) à 50°C (MAZUTTI *et al.*, 2006). A liberação de açúcares redutores totais (ART) foi medida pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Para cada amostra, foi realizado um branco para corrigir a liberação de açúcares devido à hidrólise não enzimática. Uma unidade de inulinase corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μmol de ART por minuto nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em termos de unidades de inulinase por grama de sólidos seco (U.gds^{-1}).

III.2.4 Umidade

A umidade foi determinada pelo método da AOAC 934.01, o qual se baseia na secagem em estufa a 105°C até a amostra atingir massa constante.

III.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A simplicidade de construção e operação dos biorreatores leito fixo é contraditória com as dificuldades encontradas no controle e otimização do processo, devido aos gradientes de massa e energia que ocorrem durante a fermentação. O objetivo nesta etapa do trabalho não é estudar os efeitos dos gradientes de massa e energia inerentes a operação dos biorreatores leito fixo, mas investigar a viabilidade de se produzir inulinase neste tipo de biorreator. A performance global de um biorreator de leito fixo pode ser avaliada através da manipulação de poucas variáveis operacionais, tais como: massa inicial de células, temperatura e vazão volumétrica do ar de entrada. Com o objetivo de otimizar estas variáveis, um delineamento composto central rotacional (DCCR) para três variáveis independentes foi executado, totalizando 17 experimentos, cujos resultados expressos em termos da atividade enzimática são apresentados na Tabela III.1.

Como pode ser visto na Tabela III.1, os valores de atividade enzimática obtidos experimentalmente variaram de $76,9 \pm 1,8$ U.gds⁻¹ (exp 1) até $436,7 \pm 36,3$ U.gds⁻¹ (exp 16). Esta variação obtida entre os 17 experimentos é um indicativo que existe um ótimo para o conjunto de variáveis independentes, o qual deve ser encontrado. De acordo com os dados apresentados, as maiores atividades foram obtidas no ponto central do DCCR, cujo resultado é comparável ao obtido por Mazutti *et al.* (2006), os quais obtiveram 345 ± 41 U.gds⁻¹ após 96 h de fermentação usando 5 g de sólidos secos e ao obtido por Xiong, Jinhua e Dongsheng (2007), onde a atividade máxima foi 410 U.gds⁻¹ após 72 h de fermentação usando 100 g de sólidos secos. Mazutti *et al.* (2007) obtiveram uma atividade máxima em torno de 250 U.gds⁻¹ após 24h de fermentação, o que corresponde a uma produtividade de $10,4$ U.gds⁻¹.h⁻¹. Neste trabalho, a produtividade obtida foi de aproximadamente $17,9$ U.gds⁻¹.h⁻¹, cujo valor é 1,7 vezes maior à obtida por Mazutti *et al.* (2007), 5 vezes maior que à obtida por Mazutti *et al.* (2006) e 2 vezes maior que à obtida por Xiong, Jinhua e Dongsheng (2007). Estes resultados mostram a viabilidade de se produzir inulinase por FES em um biorreator de leito fixo com capacidade para 3 kg (base seca).

Tabela III.1. Matriz do DCCR (valores reais e codificados) com a resposta em termos da atividade enzimática após 24h de fermentação.

| Exp | T (°C) | V (m ³ .h ⁻¹) | MC (g) | Y_{EXP} (U.gds ⁻¹) | Y_{CALC} (U.gds ⁻¹) | Erro (%) $ERRO = \left \frac{Y_{EXP} - Y_{CALC}}{Y_{EXP}} \right \cdot 100$ |
|------------|------------------|--|------------------|--|---|---|
| 1 | 27,0 (-1) | 1,1 (-1) | 11,0 (-1) | 77±2 | 94 | 21,5 |
| 2 | 33,0 (+1) | 1,1 (-1) | 11,0 (-1) | 264±32 | 203 | 23,1 |
| 3 | 27,0 (-1) | 3,3 (+1) | 11,0 (-1) | 277±16 | 255 | 8,1 |
| 4 | 33,0 (+1) | 3,3 (+1) | 11,0 (-1) | 331±19 | 364 | 10,1 |
| 5 | 27,0 (-1) | 1,1 (-1) | 33,0 (+1) | 212±38 | 215 | 1,4 |
| 6 | 33,0 (+1) | 1,1 (-1) | 33,0 (+1) | 212±37 | 220 | 3,7 |
| 7 | 27,0 (-1) | 3,3 (+1) | 33,0 (+1) | 191±21 | 238 | 24,3 |
| 8 | 33,0 (+1) | 3,3 (+1) | 33,0 (+1) | 223±12 | 243 | 8,8 |
| 9 | 25,0 (-1,68) | 2,2 (0) | 22,0 (0) | 210±10 | 188 | 10,3 |
| 10 | 35,0 (+1,68) | 2,2 (0) | 22,0 (0) | 281±18 | 285 | 1,6 |
| 11 | 30,0 (0) | 0,4 (-1,68) | 22,0 (0) | 98±3 | 121 | 23,3 |
| 12 | 30,0 (0) | 4,0 (+1,68) | 22,0 (0) | 319±39 | 276 | 13,6 |
| 13 | 30,0 (0) | 2,2 (0) | 3,5 (-1,68) | 267±5 | 287 | 7,7 |
| 14 | 33,0 (0) | 2,2 (0) | 40,5 (+1,68) | 325±24 | 287 | 11,6 |
| 15 | 30,0 (0) | 2,2 (0) | 22,0 (0) | 426±22 | 430 | 0,8 |
| 16 | 30,0 (0) | 2,2 (0) | 22,0 (0) | 437±36 | 430 | 1,6 |
| 17 | 30,0 (0) | 2,2 (0) | 22,0 (0) | 423±15 | 430 | 1,6 |

T – Temperatura do ar de entrada; V – Vazão volumétrica do ar de entrada; MC – Massa inicial de células; Y_{EXP} – Atividade enzimática experimental; Y_{Calc} – Atividade enzimática calculada pela Eq. III.1

Os dados referentes à produção de inulinase apresentados foram analisados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta. A Tabela III.2 apresenta a análise dos efeitos para os termos lineares, quadráticos e de interação das variáveis independentes. Os termos significativos no modelo codificado (Eq. III.1) foram selecionados baseados no valor de p, que serve como uma ferramenta para checar a significância de cada um dos coeficientes. De acordo com Haaland (1989), é mais

coerente aceitar altos valores de p, ditos $p < 0,15$, ao invés de excluir do modelo algum fator importante que poderá vir a comprometer sua capacidade de predição. Considerando que o processo de FES é heterogêneo e apresenta consideráveis gradientes de massa e energia, foram considerados como significativos os termos que apresentaram valores de $p < 0,15$. Como pode ser visto os termos significativos do modelo ($p < 0,15$) foram T, T^2 , V, V^2 , MC^2 , TxMC, e VxMC, respectivamente. Como os termos MC e TxV não foram significativos ($p > 0,15$), eles foram excluídos do modelo final (Eq. III.1) e adicionados à falta de ajuste do modelo.

Tabela III.2: Análise dos efeitos dos termos do modelo sobre a produção de inulinase

| | Efeito | Erro | p |
|--|---------------|-------------|----------|
| | Padrão | | |
| Média | 430,02 | 25,91 | <0,0001 |
| Temperatura Linear (T) | 47,52 | 24,35 | 0,0920 |
| Temperatura Quadrática (T^2) | -125,54 | 26,82 | 0,0023 |
| Vazão Volumétrica Linear (V) | 92,21 | 24,35 | 0,0068 |
| Vazão Volumétrica Quadrática (V^2) | -165,90 | 26,82 | 0,0005 |
| Massa Inicial de Células Linear (MC) | -1,89 | 24,35 | 0,9414 |
| Massa Inicial de Células Quadrática (MC^2) | -104,00 | 26,82 | 0,0061 |
| Temperatura X Vazão Volumétrica (TxV) | -25,40 | 31,80 | 0,4507 |
| Temperatura X Massa Inicial de Células (TxMC) | -52,40 | 31,80 | 0,1447 |
| Vazão Volumétrica X Massa Inicial de Células (VxMC) | -68,95 | 31,80 | 0,0668 |

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela III.3 foi empregada para a validação do modelo matemático codificado usado para a predição da produção de inulinase a partir da massa inicial de células, temperatura e vazão do ar de entrada no biorreator de leito fixo. O valor de F reflete a razão da soma quadrática média devido à regressão pela soma quadrática média devido ao erro e indica a significância de cada fator do modelo. Conforme é apresentado na Tabela III.3 o valor calculado de F foi 15,5, o qual

é aproximadamente 6 vezes maior que o valor tabelado, mostrando que o modelo é estatisticamente significativo. O coeficiente de determinação (R^2) de 0,9233 sugere que o modelo gerado a partir dos dados da Tabela III.1 pode explicar 92,33% da variação total dos resultados. Isto implica em uma representação satisfatória do processo pelo modelo, conforme é ilustrado pela atividade enzimática calculada pela Eq. III.1 (6° coluna) e o erro relativo (7° coluna) da Tabela III.1.

No entanto, outra possibilidade de se avaliar estatisticamente a validade do modelo é calculando o valor de F referente à razão da soma quadrática média devido à falta de ajuste pela soma quadrática média devido ao erro puro. Porém, nesta situação o modelo gerado neste trabalho não é estatisticamente válido, uma vez que o F calculado é aproximadamente 5 vezes maior que o F tabelado. Porém, matematicamente isto sempre vai ocorrer em situações onde o erro puro é muito baixo. Neste trabalho o valor do erro puro representa apenas 0,8% do valor da falta de ajuste ou 2,87% quando se normaliza pelos graus de liberdade. Nestas situações o bom senso deve predominar e recomendar o uso do modelo matemático, mesmo que a segunda análise estatística tenha indicado que o mesmo não é plenamente satisfatório para representar matematicamente o processo de produção de inulinase dentro da faixa avaliada.

Tabela III.3: ANOVA para a atividade enzimática como resposta para o DCCR

| Fonte de Variação | Soma dos Quadrados | Graus de Liberdade | Quadrados Médios | F |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|----------|
| Regressão | 157350,4 | 7 | 22478,6 | 15,5 |
| Resíduo | 13073,2 | 9 | 1452,6 | |
| Falta de Ajuste | 12967,7 | 7 | | |
| Erro Puro | 105,5 | 2 | | |
| Total | 170423,6 | 16 | | |

$$R^2 = 0,9233; F_{0,15;7;9} = 2,09$$

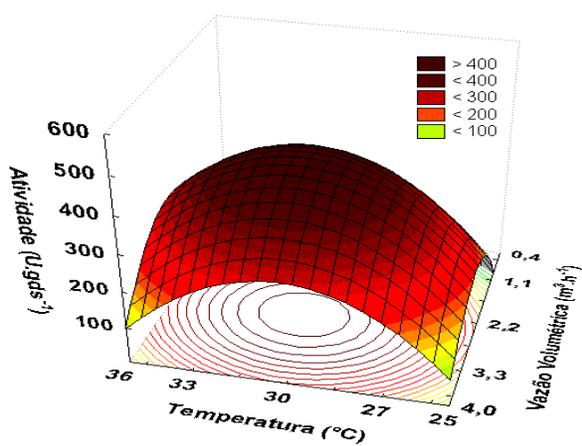
O modelo codificado gerado pela análise de regressão é dado por:

$$Y_{\text{CALC}} = 429,6 + 28,7 \cdot T - 68,3 \cdot T^2 + 46,1 \cdot V - 81,4 \cdot V^2 - 50,4 \cdot MC^2 - 26,1 \cdot T \cdot MC - 34,5 \cdot V \cdot MC \quad (\text{III.1})$$

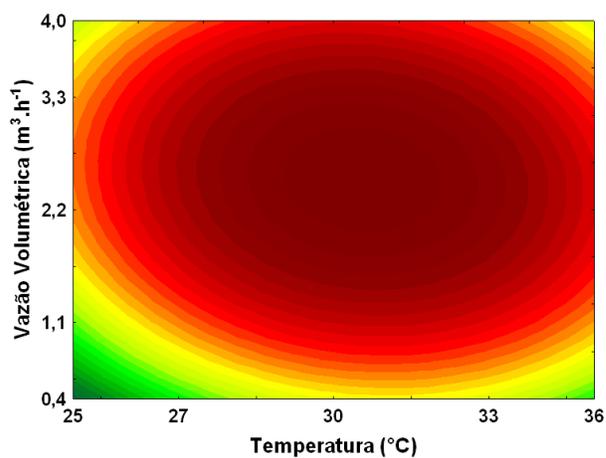
onde Y_{CALC} é atividade enzimática calculada (U.gds^{-1}), T , V e MC são os valores codificados de temperatura, vazão volumétrica de ar e massa de células, respectivamente. O modelo codificado representado pela Eq. III.1 e validado pela análise de variância foi usado para gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno para a produção de inulinase por FES, as quais estão apresentadas na Figura III.2. As Figuras III.2 A e B estão mostrando o efeito de interação da temperatura e a vazão volumétrica de ar na produção de inulinase. A faixa de temperatura e vazão de ar na qual a máxima produção de enzima foi verificada variou entre $28,5\text{-}32,0^\circ\text{C}$ e $1,5\text{-}2,9 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente.

Com relação ao efeito da massa de células e a temperatura na produção de inulinase (Figuras III.2 C e D), verificou-se que a região ótima para estas duas variáveis variou de $29\text{-}32^\circ\text{C}$ e $17\text{-}25 \text{ g}$, respectivamente. Um aspecto interessante verificado nas Figuras III.2C e III.2D é o fato de que quanto maior a massa inicial de células, menor é a temperatura do ar de entrada requerida para que se obtenha a máxima produção de enzima em uma mesma vazão volumétrica do ar de entrada. Isso é verificado devido ao fato de que quanto maior a massa inicial de células maior é a geração de calor metabólico, conseqüentemente, a redução da temperatura do ar de entrada favorece a retirada de calor e a manutenção da temperatura do leito mais próxima da temperatura ótima de crescimento do microrganismo.

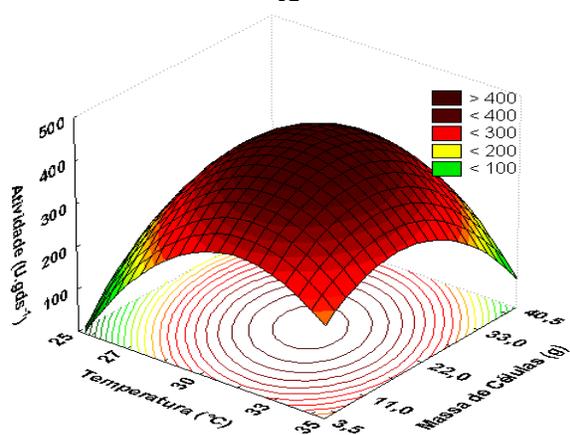
A faixa otimizada para massa de células e vazão volumétrica de ar (Figuras III.2E e III.2F) foi de $13\text{-}25 \text{ g}$ e $2\text{-}3 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. O aumento da vazão volumétrica de ar requer menor massa inicial de células para que se obtenha a máxima produção de inulinase. Possivelmente, tal comportamento se deve a melhor dissipação de calor por convecção, ocorrendo a homogeneização mais efetiva da temperatura do meio. No entanto, em vazões menores a dissipação de calor é mais lenta, o que requer o aumento da massa inicial de células para promover a elevação da temperatura do leito, a qual é dependente do crescimento microbiano.



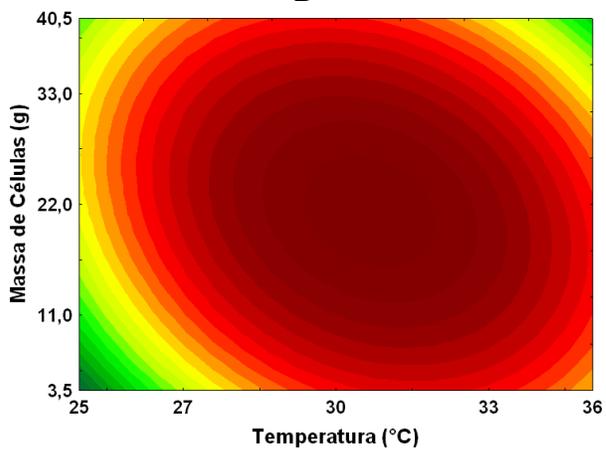
A



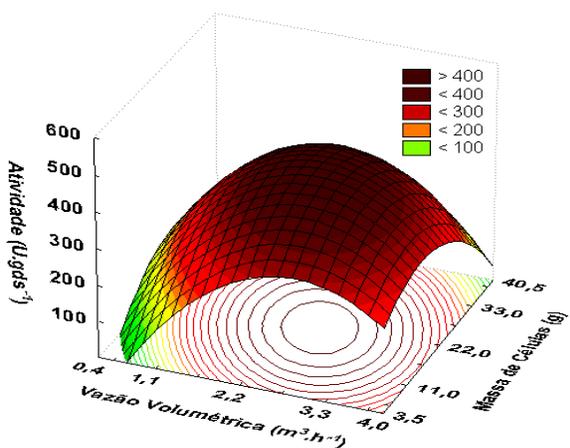
B



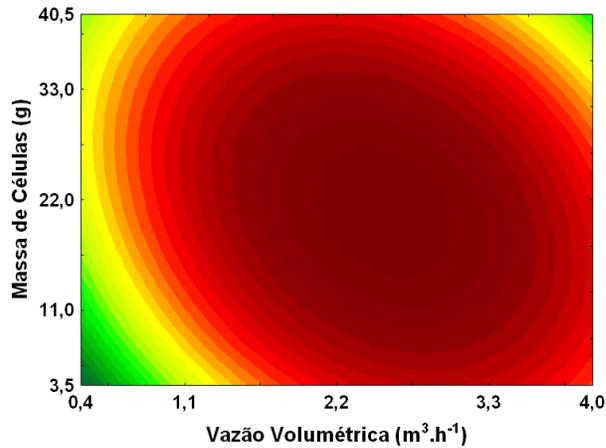
C



D



E



F

Figura III.2: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a produção de inulinase por FES no biorreator leito fixo: Efeito de TxV (A e B); Efeito de TxMC (C e D); Efeito de VxMC (E e F). O valor da terceira variável foi mantido no ponto central.

Em um trabalho prévio, Mazutti *et al.* (2006) encontraram uma temperatura ótima de 36°C para a produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em bequer contendo 5g de substrato, cujo valor é maior que o obtido neste trabalho. Esta discrepância nos valores da temperatura ótima entre as duas configurações de biorreatores é devido à dificuldade de remoção do calor metabólico gerado pelo crescimento microbiano no biorreator de leito fixo. Sendo assim, temperaturas menores do ar de entrada asseguram que o leito permanecerá em torno de 36°C.

Um aspecto muito importante no desenvolvimento de modelos matemáticos é a validação experimental dos mesmos, que deve ser realizada em condições diferentes daquelas empregadas para a estimação de parâmetros, principalmente para modelos empíricos, como é o caso da Eq. III.1. A maioria dos trabalhos apresentados na literatura que apresentam o ajuste de um modelo empírico aos dados experimentais pela metodologia de planejamento de experimentos somente analisa a ANOVA e consideram isso suficiente para validar o modelo. A ANOVA é uma ferramenta muito útil para avaliar a confiabilidade do modelo, mas é de vital importância verificar o poder de predição desse modelo em condições que não foram empregadas no planejamento de experimentos. Este procedimento garante que o modelo gerado é realmente válido dentro da faixa investigada e pode ser usado como uma ferramenta confiável.

A Tabela III.4 apresenta a validação do modelo matemático codificado (Eq. III.1) para o processo de produção de inulinase por fermentação em estado sólido no biorreator de leito fixo. Foram realizados três experimentos adicionais, diferentes daqueles conduzidos no DCCR, próximos da região otimizada, uma vez que essa é a região com maior interesse do ponto de vista de aumento de escala. Como pode ser visto, em todos os casos as predições feitas pelo modelo estão dentro da faixa de variação obtida experimentalmente. Os resultados obtidos na análise de variância (realizada anteriormente) e na etapa de validação permitem concluir que a Eq. III.1 é válida para predizer a produção de inulinase dentro da faixa investigada no DCCR.

Tabela III.4: Validação experimental do modelo codificado apresentado na Eq. III.1

| Exp | T (°C) | V (m ³ .h ⁻¹) | MC (g) | Y_{CALC} (U.gds ⁻¹) | Y_{EXP} (U.gds ⁻¹) | Erro (%) $ERRO = \left \frac{Y_{exp} - Y_{mod\ el}}{Y_{exp}} \right \cdot 100$ |
|------------|------------------|--|------------------|---|--|--|
| 1 | 31,3 (0,44) | 2,7 (0,46) | 22,0 (0) | 428 | 453±42 | 5,6 |
| 2 | 31,3 (0,44) | 2,2 (0) | 17,6 (-0,40) | 421 | 411±21 | 2,4 |
| 3 | 30,0 (0) | 2,8 (0,55) | 18,4 (-0,30) | 432 | 414±22 | 0,2 |

III.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesta primeira etapa do trabalho mostraram que a produção de inulinase usando resíduos agroindustriais no biorreator de leito fixo com capacidade de 3 kg (base seca) é tecnicamente viável. O uso da metodologia de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta é uma ferramenta útil para a otimização das variáveis operacionais. Após a otimização, a produção foi de 429±7 U.gds⁻¹ após 24 h de fermentação, conduzindo a uma produtividade de 18,2 U.gds⁻¹.h⁻¹ nas condições do ponto central do DCCR. Este valor é, em média, 1,7 vez maior que obtido anteriormente usando 5 g de bagaço de cana.

Os resultados promissores obtidos nesta etapa servem como base para a sequência do trabalho, onde os próximos passos devem contemplar o estudo sistemático do efeito dos gradientes de massa e energia no desempenho do processo.

CAPÍTULO IV

AVALIAÇÃO CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR FES EM BIORREATOR DE LEITO FIXO

IV.1 INTRODUÇÃO

No Capítulo III foi apresentada a avaliação do processo de produção de inulinase por fermentação em estado sólido (FES) em biorreator de leito fixo. As variáveis investigadas através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) foram a massa inicial de células, a vazão e temperatura do ar de entrada no biorreator. Além de comprovar a viabilidade de se produzir inulinase no biorreator de leito fixo e aumentar a produtividade do processo quando comparada com a literatura (MAZUTTI *et al.*, 2006; 2007), aquela etapa é fundamental para o aumento de escala do processo. Obviamente, o trabalho anterior forneceu informações a respeito do desempenho global do processo para aquela configuração de biorreator, além de possibilitar o conhecimento do intervalo onde cada uma das variáveis independentes pode ser manipulada de maneira a maximizar a produção de inulinase, não se preocupando em elucidar ou avaliar qualquer efeito dos fenômenos de transferência de massa e energia dentro do biorreator. As informações extraídas do capítulo anterior servem como ponto de partida para a definição do número de experimentos e das condições experimentais a serem avaliadas durante o estudo cinético do processo.

A avaliação cinética é importante no aumento de escala, pois ela permite visualizar com clareza os fenômenos que ocorrem dentro do biorreator ao longo do tempo, possibilitando a inferência do controlador sobre as variáveis manipuladas com o objetivo de tentar manter o comportamento real do sistema o mais próximo possível do ótimo. As principais variáveis manipuladas num biorreator de leito fixo são a massa inicial de células, a temperatura, a vazão e a umidade do ar de entrada, além da porosidade do leito. A vazão ótima é sempre dependente da dimensão do biorreator, ou seja, quanto maior o biorreator maior será a vazão requerida para fornecer oxigênio aos microrganismos e para a remoção do calor metabólico. A temperatura e umidade, por sua vez, têm influência direta na taxa na qual os microrganismos se desenvolvem, logo afeta a performance do processo. A porosidade e a massa inicial de células são dependentes da quantidade de material sólido

usado na fermentação. Por uma questão de conveniência prática, é melhor fixar estas duas variáveis num determinado valor e avaliar o efeito das demais sobre o comportamento dinâmico do processo.

Como pode ser visto, a manipulação tanto da vazão quanto da temperatura do ar de entrada afeta o crescimento microbiano, o qual precisa ser descrito da melhor maneira possível, pois são os microrganismos os responsáveis pelas transformações químicas e bioquímicas que ocorrem dentro do biorreator. O resultado dessa descrição pode ser usado para a modelagem, otimização, controle e aumento de escala do processo. Porém, a análise cinética do crescimento microbiano em FES é extremamente complicada por duas razões principais. A primeira, é praticamente impossível separar a biomassa do material sólido; segundo, o processo de FES em biorreator de leito fixo caracteriza-se como sendo heterogêneo, dificultando a coleta de amostras representativas (MACHADO *et al.*, 2004; PANDEY, 2003). Mesmo com todas essas dificuldades encontradas na quantificação do crescimento microbiano, métodos indiretos, como, por exemplo, as medidas do consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono, têm surgido como alternativas para quantificar o crescimento microbiano em processos fermentativos aeróbios (TEREBIZNIK e PILOSOV, 1999; BRAND *et al.*, 2001)

Dentro deste contexto, o objetivo deste capítulo é apresentar a avaliação cinética do crescimento microbiano e da produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em biorreator de leito fixo. A partir das informações obtidas na otimização do processo (Cap III), sete novos experimentos foram realizados, sendo monitoradas experimentalmente as produções de CO₂, inulinase e calor metabólico, além do consumo de açúcar redutor total. Para quantificar os compostos resultantes do crescimento microbiano, como, por exemplo, consumo de O₂ e produção de água, foi utilizada uma correlação estequiométrica baseada na produção de CO₂ e consumo de ART.

IV.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para evitar a repetição de informações não serão descritos os tópicos referentes ao cultivo do microorganismo, preparo do pré-inóculo, substratos utilizados e determinação da atividade enzimática, cujas descrições podem ser encontradas na seção “Material e Métodos” no Cap III.

IV.2.1 Fermentação em Estado Sólido (FES)

As fermentações foram realizadas em um biorreator de leito fixo escala de laboratório, conforme descrição prévia no Cap III. Apesar do biorreator apresentar uma capacidade útil para fermentar 3 kg de bagaço de cana seco, nesta etapa do trabalho foram utilizadas apenas 2 kg de bagaço seco, para reduzir a quantidade de material utilizada, uma vez que o mesmo apresenta uma densidade baixa, o que aumenta consideravelmente o seu volume. Baseado na nova massa de inicial de bagaço de cana, o leito contendo o material sólido apresentou 40 cm de altura, sendo que este foi dividido em 4 zonas, as quais apresentam 10 cm de altura cada. Foram monitoradas as temperaturas em cinco pontos dentro do biorreator: a 0 (entrada), 10, 20, 30 e 40 cm (saída do biorreator). Adicionalmente, foram constantemente monitoradas a umidade relativa e a concentração de CO₂ no gás de saída do biorreator. Para a avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo foram realizadas fermentações destrutivas, ou seja, cada intervalo de tempo avaliado corresponde a uma nova fermentação. A Figura IV.1 apresenta um diagrama esquemático do biorreator utilizado nesta etapa, bem como a definição das diferentes zonas e os pontos de medida de temperatura, umidade relativa e CO₂ ao longo do biorreator.

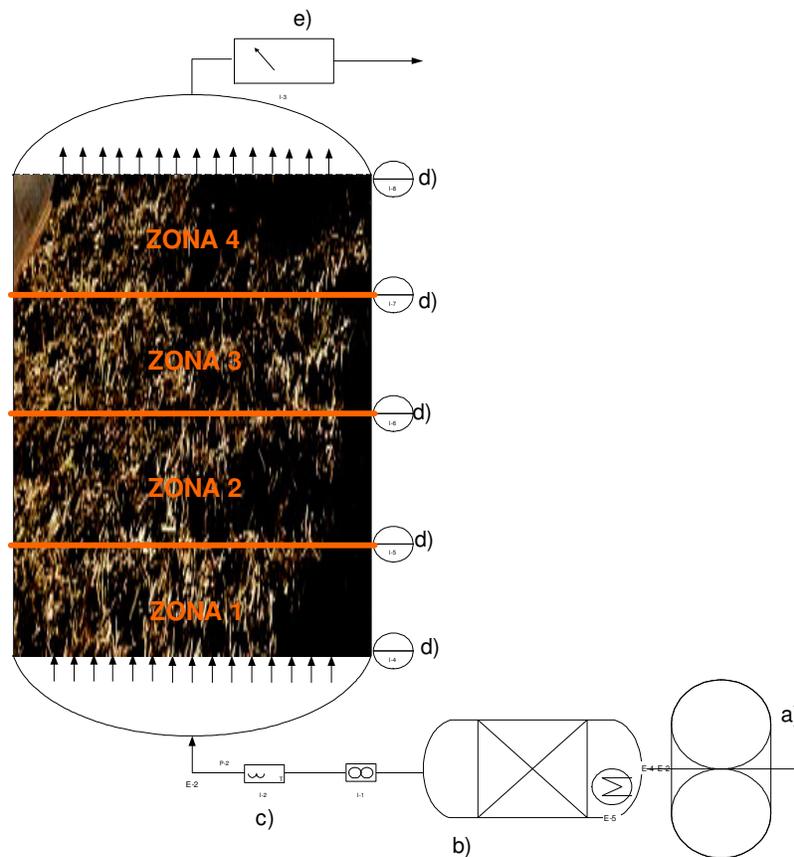


Figura IV.1: Diagrama esquemático do biorreator de leito fixo empregado nesta etapa do trabalho: a- compressor; b- umidificador; c – controle de vazão, temperatura e umidade; d – sensores de temperatura; e – medidor de CO₂, temperatura e umidade.

As variáveis investigadas nesta etapa do trabalho foram a temperatura e vazão do ar de entrada, sendo realizados 7 novos experimentos, os quais estão apresentados na Tabela IV.1. Com relação à vazão volumétrica, as condições de cada experimento foram definidas baseadas nos resultados obtidos em torno do ponto ótimo do DCCR do Cap III, considerando que a alteração da altura do leito apresenta pouca influência na perda de carga. Com relação à temperatura do ar de entrada, foram avaliados três valores: a temperatura ótima (30°C), um valor inferior (27°C) e outro superior à temperatura ótima (33°C). A massa de células foi mantida na condição do ponto central do planejamento de experimentos do Cap III. As fermentações iniciaram com um volume de inóculo

correspondente a 14 g de massa inicial de células, cuja quantidade foi definida considerando a nova carga de substrato.

Tabela IV.1: Variáveis investigadas no estudo cinético do processo de produção de inulinase por FES

| Exp | Vazão volumétrica de ar (m³.h⁻¹) | Temperatura do ar de entrada (°C) |
|------------|---|--|
| 1 | 2,0 | 27,0 |
| 2 | 2,0 | 30,0 |
| 3 | 2,0 | 33,0 |
| 4 | 3,0 | 27,0 |
| 5 | 3,0 | 30,0 |
| 6 | 3,0 | 33,0 |
| 7 | 2,4 | 30,0 |

IV.2.2 Determinação da Concentração de Açúcares Redutores Totais (ART)

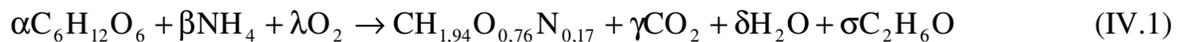
A concentração de açúcares redutores totais (ART) foi monitorada após 0, 2, 4, 8, 12, 18, e 24 horas de fermentação. O açúcar foi extraído do meio pela adição de 100 mL de água bi-destilada, seguindo pela incubação a 40°C, 150 rpm por 60 minutos (BENDER *et al.*, 2008). Na seqüência, 2 mL da solução de extração foram adicionadas a 2 mL de ácido clorídrico 2 M e mantidos sob aquecimento por 5 minutos para hidrolisar a sacarose. Após resfriar a solução por 5 minutos em banho de gelo, foram adicionados 2 mL de NaOH 2 N. A concentração de ART foi medida pelo método 3,5- dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959). A concentração de açúcar foi avaliada individualmente nas quatro zonas dentro do biorreator: 0-10 cm (zona 1), 10-20 cm (zona 2), 20-30 cm (zona 3) e 30-40 cm (zona 4).

IV.2.3 Determinação da temperatura, umidade relativa do ar e calor metabólico

As temperaturas do ar de entrada e saída, além do interior do biorreator (em 10, 20 e 30 cm) foram continuamente monitoradas por meio de sensores PT100 (NOVUS, Brasil). A umidade relativa do ar de entrada e saída do biorreator foi constantemente monitorada por meio de um transmissor de umidade relativa e temperatura (RHT-WM NOVUS, Brasil) com sinal linearmente convertido para 4-20 mA, o qual foi conectado a uma placa de aquisição de dados (FIELDLOGGER NOVUS, Brasil), com intervalo de 30 segundos entre cada aquisição. O calor metabólico gerado pelo crescimento microbiano foi calculado através de um balanço de energia, assumindo que as perdas de calor pelas paredes do biorreator são desprezíveis e que todo o calor produzido pelo microrganismo deixa o biorreator pela corrente de saída.

IV.2.4 Metabolismo microbiano

Considerando que o processo de produção de inulinase por FES em biorreator de leite fixo pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 é essencialmente aeróbio (FONSECA *et al.*, 2007), mas que pode conter zonas de anaerobiose, principalmente no interior do biofilme líquido que recobre as partículas de substrato onde a transferência de O₂ ocorre por difusão (THIBAUT *et al.*, 2000), a Eq. IV.1 é válida para representar a estequiometria do processo:



onde α , β , λ , γ , δ e σ são os coeficientes estequiométricos (C-mol do composto/C-mol biomassa). A composição elementar das células secas (CH_{1,94}O_{0,76}N_{0,17}) foi obtida do trabalho de Silva-Santisteban, Converti e Maugeri (2006). A água de maceração de milho (AMM) usada como fonte de nitrogênio é uma mistura complexa de aminoácidos livres, peptídeos, proteínas, sais inorgânicos, ácidos orgânicos e muitos outros compostos. A estequiometria detalhada para esse processo seria muito complicada, e na prática é mais

conveniente agrupar todos os componentes da AMM num único substrato, como a amônia (NIELSEN e VILLADSEN, 1994).

Os coeficientes estequiométricos da Eq. IV.1 foram calculados a partir da aplicação dos balanços para C, H, O e N. Como pode ser visto, tem-se 4 equações de balanço para o cálculo de 6 coeficientes, o que torna o sistema indeterminado, exigindo a determinação experimental de ao menos duas taxas para possibilitar a solução do sistema. Neste trabalho foram determinadas experimentalmente às taxas do consumo de ART (assumindo ser somente glicose e frutose) e a produção de CO₂.

Para a determinação da concentração de CO₂ a corrente de saída de ar do biorreator foi constantemente analisada através de um sensor de CO₂ gasoso baseado na refração das ondas de infravermelho (CARBOCAP GMT220, VAISALA, Inc., Finlândia) com sinal de saída linearmente convertido para 4-20 mA. O sensor foi conectado à placa de aquisição de dados (FIELDLOGGER NOVUS, Brasil), com um intervalo de 30 s entre cada aquisição.

Conhecendo-se a estequiometria da reação, foram possíveis as determinações do consumo de oxigênio, a produção de água metabólica e etanol no meio, tomando como base a concentração de CO₂. Para que isso, foi preciso considerar que todo CO₂ liberado é devido à respiração microbiana. É importante ressaltar que as concentrações de oxigênio e água metabólica poderiam ser calculadas a partir dos dados de consumo de açúcar, assumindo que ART é basicamente glicose e frutose. Porém, os erros experimentais associados com as medidas de ART são muito maiores ($\pm 10\%$) que às associadas com a determinação de CO₂ (<1%).

O crescimento microbiano foi calculado considerando os resultados de consumo de oxigênio, de acordo com a seguinte equação (BRAND *et al.*, 2001):

$$X_n = \frac{Y_{X/O} \cdot \Delta t \cdot \left[\frac{1}{2} \left(\frac{dO_2}{dt} \Big|_{t=0} + \frac{dO_2}{dt} \Big|_{t=n} \right) + \sum_{i=1}^{i=n-1} \frac{dO_2}{dt} \Big|_{t=i} \right] + \left(1 - \frac{a}{2} \right) \cdot X_0 - a \cdot \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i}{1 + (a/2)} \quad (\text{IV.2a})$$

onde

$$a = m \cdot Y_{X/O} \cdot \Delta t$$

(IV.2b)

O procedimento para estimar a biomassa num determinado tempo ($X_n - g$) requer o conhecimento da massa inicial de células ($X_0 - g$), os valores do coeficiente de rendimento de oxigênio em biomassa ($Y_{X/O} - g/g$) e do coeficiente de manutenção ($m - g/(g.h)$), o qual foi fixado em 0,0031 (BRAND *et al.*, 2001). Os demais termos da equação como Δt é o intervalo de tempo em horas usado para o cálculo da massa de células e o termo $\frac{dO_2}{dt}$ refere-se a variação da massa de oxigênio em relação ao tempo (g/h).

Os principais coeficientes de rendimento globais para o processo são: o rendimento de conversão do substrato (ART) em células ($Y_{X/S}$), o rendimento de conversão do oxigênio em biomassa ($Y_{X/O}$), o rendimento de calor metabólico a partir do crescimento microbiano ($Y_{X/Q}$) e o coeficiente respiratório (QR). Estes coeficientes foram calculados conforme as seguintes equações:

$$Y_{X/S} = \frac{1}{\alpha} \quad (IV.3a)$$

$$Y_{X/O_2} = \frac{1}{\lambda} \quad (IV.3b)$$

$$QR = \frac{\gamma}{\lambda} \quad (IV.3c)$$

$$Y_{Q/X} = \frac{Q}{M_X} \quad (IV.3d)$$

onde Q e M_X são o calor metabólico gerado durante o processo (kJ) e a massa de células no final da fermentação (g).

IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.3.1 Coeficientes de Rendimento

A Tabela IV.2 apresenta os valores dos coeficientes estequiométricos da Eq. IV.1 para os 7 experimentos, os quais foram utilizados no cálculo dos principais coeficientes de rendimento para o processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo.

Tabela IV.2: Coeficientes estequiométricos e de rendimento calculados para o processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo.

| Exp | Coeficientes Estequiométricos (C-mol composto/C-mol biomassa) | | | | | | Coeficientes de Rendimento (g/g ou * kJ/g) | | | |
|-----|--|---------|-----------|----------|----------|----------|---|-----------|------|-------------|
| | α | β | λ | γ | δ | σ | $Y_{X/S}$ | $Y_{X/O}$ | QR | * $Y_{Q/X}$ |
| 1 | 3,59 | 0,17 | 0,43 | 1,103 | 0,74 | 1,48 | 0,27 | 2,06 | 3,53 | 16,65 |
| 2 | 3,59 | 0,17 | 0,70 | 1,284 | 1,00 | 1,30 | 0,26 | 1,27 | 2,52 | 12,49 |
| 3 | 3,24 | 0,17 | 0,77 | 1,214 | 1,07 | 1,03 | 0,29 | 1,16 | 2,17 | 13,36 |
| 4 | 3,29 | 0,17 | 0,58 | 1,105 | 0,82 | 1,19 | 0,29 | 1,54 | 2,62 | 10,49 |
| 5 | 3,93 | 0,17 | 0,82 | 1,481 | 1,13 | 1,45 | 0,24 | 1,08 | 2,48 | 10,41 |
| 6 | 3,11 | 0,17 | 0,70 | 1,124 | 1,00 | 0,99 | 0,31 | 1,27 | 2,21 | 11,95 |
| 7 | 3,63 | 0,17 | 0,61 | 1,240 | 1,24 | 1,39 | 0,26 | 1,45 | 2,80 | 15,23 |

O coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{X/S}$) variou de 0,24 a 0,31 g de células/g ART entre os sete experimentos. O que se pode perceber é a existência da tendência do valor $Y_{X/S}$ aumentar com o aumento da vazão volumétrica de ar, com exceção do experimento 5. Os maiores valores de $Y_{X/S}$ foram obtidos nos experimentos 3 e 6, onde a temperatura do ar de entrada foi 33°C. Os valores obtidos neste trabalho estão de acordo com o que é reportado na literatura para o crescimento das leveduras do gênero *Kluyveromyces* em fermentação submersa. Usando meio sintético, Silva-Santisteban, Converte e Maugeri (2006) reportaram valores de $Y_{X/S}$ variando de 0,16 a 0,32 g/g para a

levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. Fonseca *et al.* (2007) obtiveram valores de 0,51 g/g para fermentação em batelada e valores entre 0,45 a 0,49 g/g em fermentação contínua para a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 com meio a base de glicose. Usando resíduos agroindustriais a base de AMM e melaço, Treichel *et al.* (2008) e Makino *et al.* (2009) obtiveram coeficientes de rendimento de 0,22 e 0,42 g/g para a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, respectivamente.

Os valores obtidos para o coeficiente de rendimento de O₂ em biomassa variaram de 1,08 a 2,06 g células/g O₂. Nos experimentos 1-3 (vazão volumétrica de ar de 2 m³/h) o aumento da temperatura diminuiu os valores de Y_{X/O}, enquanto que nos experimentos 4-6 (vazão volumétrica de ar de 3 m³/h) tal comportamento não foi verificado. Analisando os experimentos 2, 6 e 5 (Temperatura do ar de entrada de 30°C) à vazão volumétrica de 2, 2,4 e 3 m³/h, respectivamente houve um aumento no valor Y_{X/O} quando a vazão volumétrica de ar passou de 2 para 2,4 m³/h, diminuindo consideravelmente quando a vazão volumétrica foi 3 m³/h. Os valores obtidos de Y_{X/O} neste trabalho são maiores ao obtido por Fernández-Fernández e Pérez-Correa (2007) (0,94 g/g) no crescimento de *Gibberella fujikuroi* em FES num biorreator de leito fixo escala piloto com capacidade de 200 kg e menores que o reportado por Brand *et al.* (2001) (3,81 g/g) no cultivo de *Aspergillus niger* por FES num biorreator de leito fixo com capacidade de 40 g.

O quociente respiratório (QR) variou de 3,53 a 2,17 g CO₂/g O₂ entre os sete experimentos. Nos resultados apresentados na Tabela IV.2 há uma tendência de que o aumento da temperatura do ar de entrada diminua o valor de QR, independentemente da vazão volumétrica de ar empregada. Estes resultados indicam que a operação do biorreator com temperaturas do ar de entrada menores o metabolismo oxidativo diminui, conseqüentemente com um menor consumo de oxigênio. Além disso, pode estar ocorrendo à oxidação incompleta de fontes de carbono e energia, resultando em produtos de fermentação, como é o caso do etanol. Supõem-se duas possibilidades para a produção de etanol. Primeiro, pode haver limitação de oxigênio no interior do biofilme líquido que circunda as partículas de substrato, devido ao processo de difusão do oxigênio da fase gasosa até o microrganismo que se encontra na superfície do substrato. Segundo, o

consumo acelerado de ART pode desviar a rota normal da glicólise para a produção de etanol, resultando numa oxidação parcial da fonte de carbono. Nestes casos, a relação entre CO₂ produzido e O₂ consumido é muito maior que no caso da oxidação completa, justificando o fato que os valores de QR obtidos nesse trabalho são muito maiores que o reportado na literatura para o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em fermentação submersa usando somente glicose como fonte de carbono, cujo valor se aproxima de 1,0 mol CO₂/mol O₂ (FONSECA *et al.*, 2007).

O coeficiente de rendimento de calor metabólico a partir do crescimento microbiano ($Y_{Q/X}$) é um dos principais coeficientes que deve ser levado em conta no momento de propor o aumento de escala do processo. Sabe-se que uma das principais dificuldades no aumento de escala de biorreatores para FES é a remoção do calor metabólico do meio, o qual é dependente da taxa de crescimento microbiano e do coeficiente de rendimento de calor metabólico. Sendo assim, quanto menores os valores de $Y_{Q/X}$ maiores são as chances de se obter sucesso no aumento de escala do processo. Os valores de $Y_{Q/X}$ obtidos neste trabalho variaram de 16,65 a 10,41 kJ/ g X. Entre os resultados é verificado que os maiores valores de $Y_{Q/X}$ foram obtidos quando a vazão volumétrica de ar foi de 2 m³/h. Estes valores são maiores do que os normalmente reportados na literatura para o crescimento de fungos em FES, cujo valor para $Y_{Q/X}$ é 8,366 kJ/ g X relacionado ao crescimento de *Aspergillus niger* em farelo de trigo (SAUCEDO-CASTANEDA *et al.*, 1990). É difícil comparar os valores de $Y_{Q/X}$ obtidos neste trabalho com a literatura porque não existem trabalhos focando o metabolismo de leveduras em FES.

IV.3.2 Avaliação cinética do processo

A Figura IV.2 apresenta os perfis de temperatura obtidos durante os experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo. A temperatura aumenta em função da altura do biorreator, conforme o esperado. No intervalo onde o metabolismo dos microrganismos é máximo, foi verificada uma diferença de até 20°C entre o ar na entrada e na saída do biorreator para todos os experimentos. O

valor máximo de temperatura diferiu pouco entre os experimentos. Nos primeiros três experimentos (vazão volumétrica de ar de $2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) a temperatura máxima do ar de saída foi em torno de 50°C , enquanto que nos experimentos 4, 5 e 6 (vazão volumétrica de ar de $3 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), além do experimento 7 (vazão volumétrica de ar de $2,4 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) a temperatura máxima verificada foi em torno de 47°C . O aumento na vazão volumétrica de ar de 2 para $3 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ pouco contribui para a remoção do calor metabólico gerado pelos microrganismos, devido à baixa capacidade calorífica do ar (von MEIEN e MITCHELL, 2002).

A vazão volumétrica de ar e, principalmente, a temperatura do ar de entrada têm influência direta no tempo onde foram verificados os picos de temperatura, tanto dentro do biorreator como na corrente de saída, os quais são resultados diretos do metabolismo da levedura. Nos experimentos 1 a 3 (vazão volumétrica de ar de $2 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) estes tempos são 9,6, 8,3 e 7,8 h, respectivamente, enquanto nos experimentos 4 a 6 (vazão volumétrica de ar de $3 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) os tempos são 9,3, 8,7 e 7,4 h, respectivamente. No experimento 7 (vazão volumétrica de ar de $2,4 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$) o tempo foi de 9,3h. Como pode ser visto, o aumento da temperatura do ar de entrada de 27 para 33°C diminui consideravelmente o tempo onde os perfis de temperatura atingem seus valores máximos, enquanto que o aumento da vazão volumétrica de ar apresenta pouca influência no tempo onde os mesmos foram obtidos, como pode ser visto comparando-se os experimentos 1 e 4, 2 e 5 e 3 e 6.

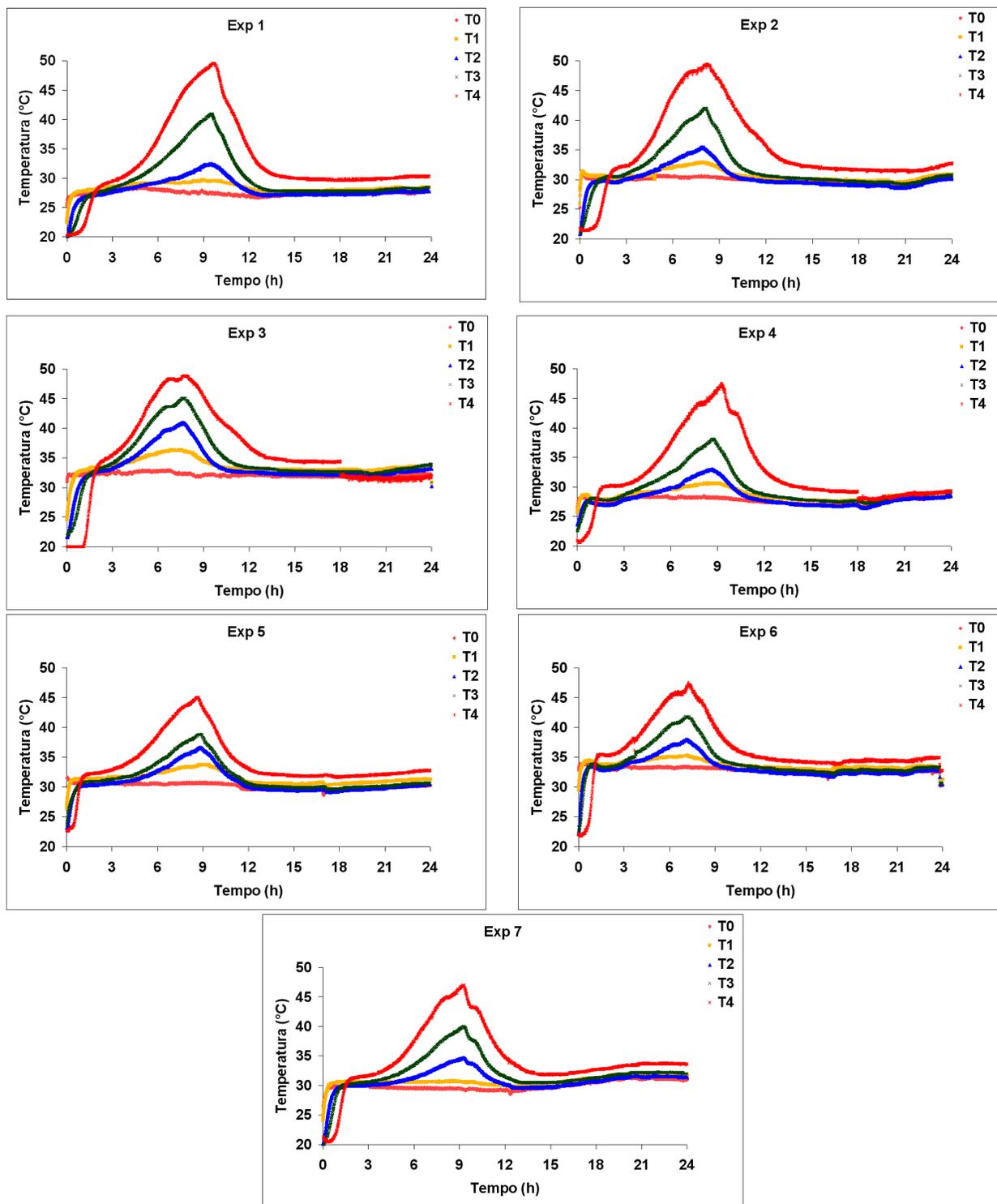


Figura IV.2: Perfis experimentais para temperatura obtidos nos experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES. Temperaturas do ar na entrada (T0), a 10, 20 e 30 cm do leito (T1, T2 e T3, respectivamente) e na saída do biorreator (T4).

Quanto mais alta a temperatura do ar de entrada, mais rápido a temperatura do meio atinge o valor ótimo para o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, cujo valor é 36°C (MAZUTTI *et al.*, 2006; TREICHEL *et al.*, 2008). Analisando os perfis de temperatura dentro do biorreator é possível verificar que acima de 20cm de leito a temperatura do processo atinge valores maiores que 35°C nas primeiras 3,5h de operação.

A Figura IV.3 apresenta os perfis de umidade obtidos durante as fermentações considerando as 4 zonas dentro do biorreator. Em todos os experimentos foi verificado um aumento no valor da umidade final do meio em relação à inicial, obtendo-se um valor médio de 75% após 24 h de fermentação. A partir desse valor médio é possível verificar que, independentemente das condições de temperatura e vazão do ar de entrada no biorreator, ocorreu um aumento de 10% no teor de água dos substratos. Esse aspecto é interessante, uma vez que a faixa ótima de umidade verificada na produção de inulinase por FES varia entre 60-75% para a mesma composição do meio empregada neste trabalho (MAZUTTI *et al.*, 2006).

O aumento na umidade do leito pode estar associado ao fato que o conteúdo de água do substrato pode ser menor que o conteúdo de água do substrato que estaria em equilíbrio com a temperatura da fase gasosa, promovendo um aumento gradual na umidade do substrato. Como a temperatura aumenta ao longo do leito, a força motriz à transferência de massa da fase gasosa para a sólida diminui, uma vez que a que o conteúdo de água de equilíbrio com a temperatura da fase gasosa diminui. Isto pode ser verificado através dos perfis de umidade ao longo do biorreator, os quais diminuem com a altura do mesmo, mas todos com valores maiores que a condição inicial. Além disso, o crescimento microbiano e algumas reações químicas produzem água que, mesmo em pequena quantidade, podem contribuir para o aumento da umidade. No entanto, as hipóteses acima são especulativas, pois não foram realizadas isotermas de sorção e dessorção de água com o meio usado neste trabalho para validar experimentalmente este fenômeno, nem avaliada a liberação de água devido às reações químicas secundárias que ocorrem. Tem-se uma estimativa da produção de água metabólica, conforme discutido na seqüência.

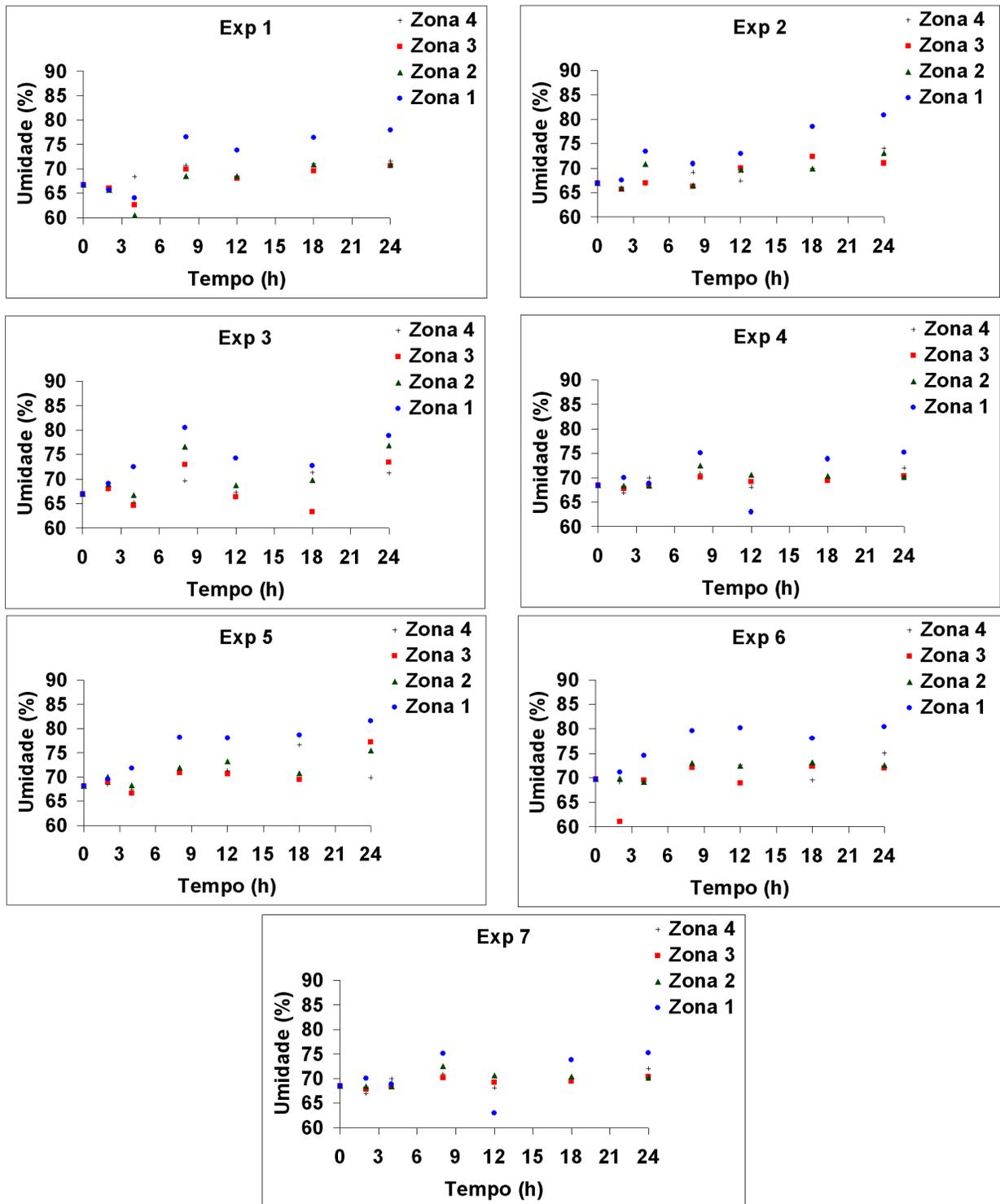


Figura IV.3: Perfis experimentais para umidade obtidos nos experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES para cada uma das quatro zonas dentro do biorreator

As Figuras IV.4, IV.5 e IV.6 apresentam os perfis obtidos durante os experimentos de avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo. A Figura IV.4 refere-se aos perfis de células, ART e calor metabólico; a Figura IV.5 refere-se aos perfis de CO₂, H₂O metabólica, O₂ e etanol; a Figura IV.6 refere-se aos perfis da produção da inulinase obtidos em cada uma das quatro zonas dentro do biorreator. A Tabela IV.3 apresenta a massa total produzida e/ou consumida dos compostos avaliados durante o estudo cinético, bem como a produção de calor metabólico.

Tabela IV.3: Massa total produzida e/ou consumida dos compostos avaliados durante o estudo cinético, bem como a produção de calor metabólico.

| | Células (g) | ART (g) | CO₂ (g) | O₂ (g) | H₂O (g) | Etanol (g) | Q_{ger} (kJ) | Inulinase* (U.gds ⁻¹) |
|----------|-----------------------|-------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------------------|---|
| 1 | 31,2 | 107,3 | 48,5 | 15,2 | 14,6 | 36,6 | 753,2 | 236,2 |
| 2 | 36,4 | 107,6 | 56,5 | 28,7 | 23,1 | 37,6 | 629,7 | 310,4 |
| 3 | 34,4 | 97,2 | 53,4 | 29,7 | 23,4 | 28,0 | 647,1 | 322,2 |
| 4 | 31,3 | 98,7 | 48,6 | 20,4 | 17,5 | 29,5 | 475,5 | 417,7 |
| 5 | 42,0 | 117,8 | 65,2 | 39,0 | 30,1 | 48,2 | 583,2 | 463,3 |
| 6 | 31,9 | 93,3 | 49,5 | 25,0 | 20,2 | 25,0 | 548,7 | 344,4 |
| 7 | 35,2 | 109,2 | 54,5 | 24,2 | 20,4 | 38,8 | 748,4 | 386,8 |

* Produção de inulinase em termos médios, considerando as quatro zonas dentro do biorreator

Com relação aos perfis de produção de calor metabólico (Figura IV.4), dois comportamentos distintos foram identificados entre os 7 experimentos. Nos experimentos 1 a 3 foram verificados os maiores valores de produção de calor (em média 676 kJ – Tabela IV.3), enquanto que nos experimentos 4, 5 e 6 foram verificados valores menores (em média 535 kJ – Tabela IV.3). Uma análise nos dados da Tabela IV.3 permite visualizar uma relação direta do consumo de ART com a produção de calor metabólico. Considerando o erro experimental na determinação de açúcar e na aplicação do balanço de energia, tem-se que quanto maior o consumo de açúcar, maior a produção de calor metabólico.

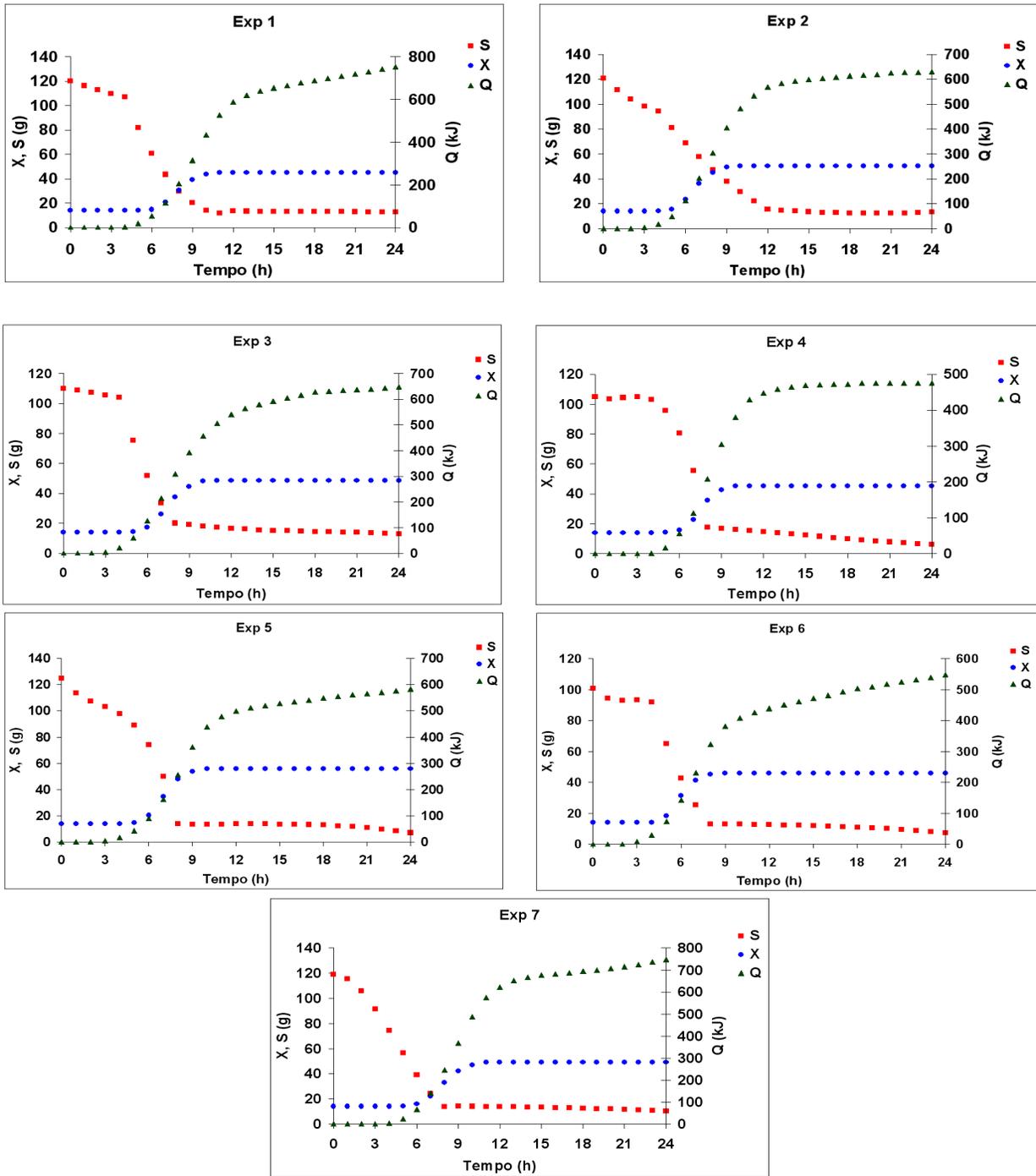


Figura IV.4: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos dos perfis de células, ART e calor metabólico.

Um dos perfis mais importantes a ser discutido diz respeito ao crescimento microbiano (Figura IV.4). A quantificação direta do crescimento microbiano em FES é difícil e, a grande maioria dos estudos apresentados na literatura usa uma abordagem indireta para quantificação do crescimento celular. Em trabalho prévio, Mazutti *et al.* (2006) correlacionou o crescimento microbiano com a concentração de glicosamina. Porém, este método mostrou erros experimentais elevados. Neste capítulo foi adotado o procedimento descrito por Brand *et al.* (2001), onde o crescimento microbiano é calculado baseado nos dados de consumo de oxigênio estimados a partir da Eq. IV.1. A massa inicial de células foi definida de acordo com os resultados obtidos no Cap III, a qual foi mantida constante em 14 g. Após as 24 h de fermentação, a massa final variou de 31,2 g (exp 1) a 42,0 g (exp 5) (Tabela IV.3). As maiores massas finais de células foram 36,4, 42,0 e 35,2 g nos experimentos 2, 5 e 7, respectivamente, onde a temperatura do ar de entrada foi mantida constante em 30°C, variando-se a vazão volumétrica de ar (Tabela IV.3). A partir dos perfis cinéticos é possível visualizar as três fases do crescimento microbiano: fase lag (0-6 h), fase exponencial (6-11 h) e fase estacionária (11-24 h) (Figura IV.4).

Uma análise detalhada do resultado referente ao crescimento microbiano obtido no experimento 5 permite fazer uma correlação com os coeficientes de rendimento da Tabela IV.2. Por exemplo, nesta condição foram obtidos os menores valores de $Y_{X/S}$, $Y_{X/O}$ e $Y_{Q/X}$. Com relação aos coeficientes $Y_{X/S}$ e $Y_{X/O}$ é importante lembrar que o consumo de ART no experimento 5 foi maior e para oxidar essa maior concentração de açúcar é necessário aumentar o consumo de O_2 . Como os dois coeficientes de rendimento são divididos pela massa de ART e O_2 consumidas, respectivamente, são obtidos os menores valores. Entre os experimentos avaliados neste trabalho, o experimento 5 apresentou melhor desempenho no que diz respeito ao aumento de escala do processo, uma vez que permitiu a obtenção da maior massa de células no final da fermentação e, principalmente, a obtenção do menor valor de $Y_{Q/X}$.

Como não existem trabalhos na literatura referentes ao crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES, é difícil a comparação dos resultados obtidos nesse trabalho. Porém, é possível fazer um comparativo com resultados obtidos em

fermentação submersa, levando-se em conta as diferenças nas características de cada processo. Treichel *et al.* (2008) empregaram a mesma levedura em fermentação submersa para a produção de inulinase em meio contendo melaço de cana pré-tratado, AMM e extrato de levedura. Na condição otimizada, a massa inicial de ART e células foram 200 g e 14 g, respectivamente, o que rendeu uma massa final de células de 48 g após 24 h de fermentação. Com a levedura crescendo em FES foi possível obter o dobro de massa final de células do que a reportada em fermentação submersa para a mesma massa inicial de células e ART. Esse maior crescimento em FES se deve ao fato de que a concentração de oxigênio é menos limitante, o que aumentou o rendimento de consumo do açúcar.

Com relação aos perfis de consumo de ART (Figura IV.4) é importante ressaltar que, apesar da composição dos substratos ser fixa, a massa inicial de ART apresentou uma pequena variação nos valores entre os experimentos realizados. Esta variação é devida aos erros experimentais associados com a determinação e, principalmente, devido à grande variabilidade na composição dos substratos, uma vez que diversos resíduos agroindustriais foram usados para compor o meio final. Inicialmente, a cinética de consumo de ART foi monitorada nas 4 zonas dentro do biorreator, mas houve pouca variação nos resultados (menor que o erro experimental). Assim, optou-se por expressar a massa de ART em termos médios sem distinção do local de amostragem. A cinética de consumo de ART obtida em FES é similar à reportada para a mesma levedura em fermentação submersa, onde a massa de açúcar é rapidamente consumida nas primeiras 8 h de fermentação (TREICHEL *et al.*, 2008; MAKINO *et al.*, 2009).

Analisando os perfis do consumo de ART obtidos nos experimentos onde a temperatura do ar de entrada foi 27°C (Exp 1 e 4) e 33°C (Exp 3 e 6), pode-se facilmente visualizar que a taxa inicial de consumo de açúcar é menor que as obtidas nos experimentos 2, 5 e 7, onde a temperatura do ar de entrada foi 30°C. Por exemplo, nos experimentos 2, 5 e 7 as taxas iniciais de consumo de açúcar foram em torno de 6,6 g/h, enquanto que nos demais foram obtidos valores na faixa de 0,4 – 3,3 g/h. Os perfis obtidos para o consumo de ART foram muito similares aos reportados em fermentação submersa, onde ocorre um consumo de 90% da massa de ART nas primeiras 12 h de fermentação (TREICHEL *et al.*,

2008; MAZUTTI *et al.*, 2009; MAKINO *et al.*, 2009). Com relação à massa de ART consumida durante a fermentação tem-se que os maiores consumos (Em ordem decrescente) foram obtidos nos experimentos 5 (117,8 g), 7 (108,8 g), 2 (107,6 g) e 1 (107,4 g) (Tabela IV.3). Para os demais experimentos ocorreu consumo inferior a 100 g de ART. Um aspecto que chama atenção é o alto consumo de ART no experimento 1 não condizer com a produção de células, uma vez que nessa condição foi obtida a menor massa de células. Porém, a explicação para esse fato pode vir da análise dos coeficientes de rendimento (Tabela IV.2). No experimento 1 foram obtidos os maiores valores para $Y_{Q/X}$ e QR. O primeiro indica que o microrganismo aumenta sua capacidade de produção de calor, o que pode ser comprovado nos perfis do calor metabólico (Figura IV.4). O segundo indica que quanto maior seu valor, maior a possibilidade de estar havendo oxidação incompleta de fontes de carbono. A justificativa para a baixa produção de células, comparado com os demais experimentos, é o fato que o microrganismo gasta muita energia para a geração de calor metabólico, diminuindo seu crescimento

Com relação aos perfis de produção de CO₂ (Figura IV.5) tem-se que a massa produzida é diretamente proporcional ao consumo de ART e a massa de células no meio. A produção de CO₂ ocorreu no período compreendido entre 5 e 12 h de fermentação, sendo que as maiores produções foram obtidas nos experimentos 2 (56,5 g), 5 (65,8 g) e 7 (54,5 g) (Tabela IV.3). Os dados obtidos com relação ao consumo de O₂ (Figura IV.5) indicaram que o mesmo não seria limitante no processo, uma vez que o maior consumo foi 39 g no experimento 5 (Tabela IV.3). Considerando que o ar apresenta 21% em mol de O₂, o valor consumido é uma pequena parcela de todo o oxigênio que circula pelo biorreator, devido à alta vazão volumétrica de ar empregada. No entanto, poderá ocorrer a limitação devido ao fenômeno de difusão-reação no interior do biofilme líquido que circunda as partículas de substrato (THIBAULT *et al.*, 2000). A produção de água metabólica (Figura IV.5), a qual é resultado do processo de respiração, variou de 14,6 g (exp 1) a 30,1 g (exp 5) (Tabela IV.3). Estes valores contribuem para o aumento da umidade do leite, conforme discutido anteriormente.

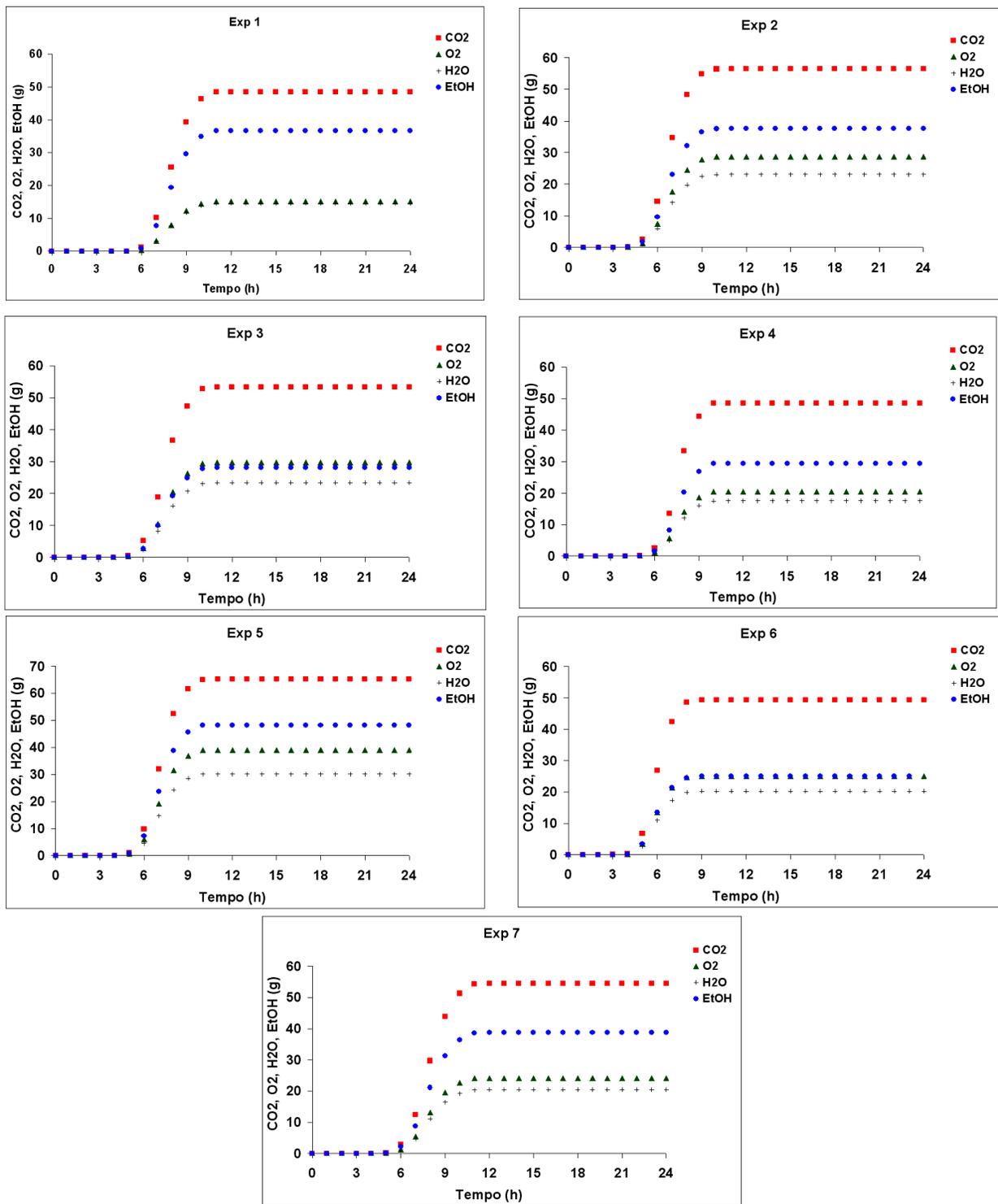


Figura IV.5: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos dos perfis de CO₂, H₂O metabólica, etanol e O₂.

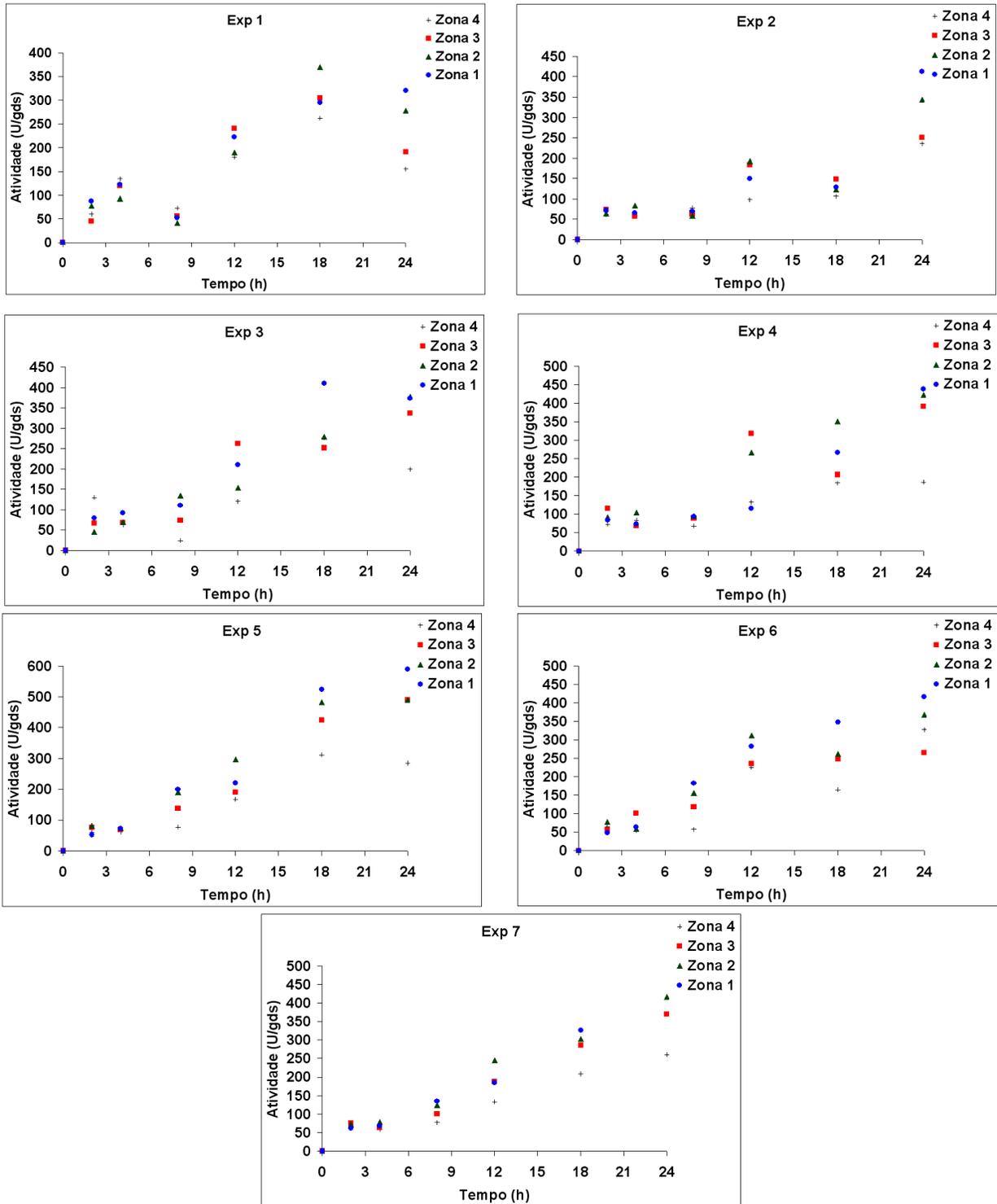


Figura IV.6: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos da atividade enzimática em cada uma das quatro zonas dentro do biorreator.

Com relação à produção de etanol (Figura IV.5), pode-se supor que a sua produção esteja associada a dois fenômenos. O primeiro refere-se à limitação de oxigênio aos microrganismos devido à resistência à transferência de massa no interior do biofilme líquido que recobre as partículas de substrato, onde o processo de transferência ocorre por difusão até a parede celular dos microrganismos que crescem na superfície sólida. O segundo refere-se à produção de etanol pela levedura devido à elevada quantidade inicial de ART no meio, o que pode desviar a rota metabólica normal da glicólise para a produção de etanol. Outros trabalhos reportaram a produção de etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, mesmo em condições aeróbicas de cultivo (SILVA-SANTISTEBAN, CONVERTI e MAUGERI, 2006; FONSECA *et al.*, 2007).

Com relação aos perfis de produção de inulinase, os quais estão apresentados na Figura IV.6, pode ser verificado que a produção de enzima diminui conforme aumenta a altura do biorreator, independente do tempo de fermentação. Esta queda na produção da inulinase pode ser conseqüência da desnaturação causada pelas altas temperaturas, principalmente nas zonas 3 e 4. Além disso, as células microbianas são afetadas pelas temperaturas maiores que 36°C, resultando numa menor taxa de produção da enzima. Para confirmar estas afirmações, na zona 1 e 2, onde a temperatura não excedeu o valor ótimo para o crescimento da levedura, as atividades enzimáticas foram similares e maiores que as obtidas nas zonas 3 e 4. Além disso, pode ocorrer a desnaturação enzimática devido à presença da interface gás-líquido, conforme reportado na literatura para o caso de lipases. Mohanty *et al.* (2001) verificou que ocorre a inativação completa da lipase na presença da interface gás-líquido seguindo uma cinética de primeira ordem. A desnaturação foi devido à alteração na estrutura da proteína, conforme identificado pela análise de fluorescência.

Outro aspecto que influencia a produção de enzima está associado com a produção de calor metabólico pelo microrganismo. Por exemplo, nos experimentos 4 a 6, onde a produção de calor foi menor comparada com os experimentos 1 a 3, a produção de inulinase média foi maior que aquelas obtidas nos primeiros três experimentos, corroborando com a afirmação anterior de que a menor produção de calor pelo microrganismo pode deslocar parte da energia para a realização de outras atividades

metabólicas. Para finalizar, a maior produção da inulinase ocorreu no experimento 5, com uma atividade média (entre as 4 zonas) de 463 U.gds^{-1} (Tabela IV.3), cujo valor foi similar ao obtido na condição otimizada do Cap III (exp 7).

IV.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste capítulo foi avaliar a cinética de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo. Foram realizados sete experimentos para avaliar o efeito da temperatura e a vazão volumétrica do ar de entrada na performance do processo. Os resultados apresentados aqui podem ser usados no aumento de escala e otimização do biorreator de leito fixo por duas razões. Primeiro, a vazão volumétrica de ar apresenta pouca influência no comportamento dinâmico do processo, dentro da faixa investigada nesta etapa. Isto é particularmente interessante porque em escalas maiores a vazão volumétrica de ar deve aumentar consideravelmente para satisfazer a nova configuração de biorreator sem alterar as características do processo. Segundo, a temperatura do ar de entrada pode ser otimizada para melhorar a performance global do processo. Por exemplo, o domínio de tempo pode ser dividido em N sub-intervalos e, para cada um desses intervalos, pode-se otimizar a temperatura do ar de entrada através da técnica de otimização dinâmica.

Os resultados obtidos neste capítulo servirão como base para a formulação de um modelo matemático baseado em redes neurais para prever as principais taxas associadas com o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES, o qual será apresentado no próximo capítulo.

CAPÍTULO V

MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Kluyveromyces marxianus* EM FES

V.1 INTRODUÇÃO

O crescimento microbiano pode ser simulado por equações empíricas simples ou por modelos fenomenológicos que descrevem os processos difusivos relacionados ao crescimento. Na prática, a maioria dos modelos fenomenológicos que têm sido propostos limita-se a descrever como o crescimento microbiano pode ser limitado por eventos que ocorrem dentro do biorreator. Entre os modelos empíricos empregados para simular o crescimento microbiano tem-se: modelos lineares, logísticos, exponenciais ou de duas fases (VICCINI *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2004). A desvantagem desses modelos empíricos para predição do crescimento microbiano em FES é que eles descrevem apenas uma quantidade restrita de informações a respeito do processo, limitando a representação do crescimento em torno do acúmulo de massa celular.

Uma estratégia mais robusta e confiável para investigar o crescimento microbiano em FES é o estudo das rotas metabólicas e a regulação do metabolismo. A modelagem metabólica simula as interações que ocorrem dentro das células (fluxo intracelular de carbono e energia) em razão dos fenômenos extracelulares que estão ocorrendo dentro do biorreator (SAINZ *et al.*, 2003). Modelos metabólicos têm sido usados em estudos fisiológicos da levedura *Kluyveromyces marxianus* em fermentação submersa (SILVA-SANTISTEBAN, CONVERTI e MAUGERI, 2006; FONSECA *et al.*, 2007). No entanto, não há relatos do estudo em FES, pois é difícil determinar experimentalmente todos os componentes associados ao metabolismo microbiano. Por isso, o custo-benefício do desenvolvimento de um modelo metabólico em FES é baixo, devido ao trabalho necessário para a obtenção de um modelo com poder preditivo confiável.

Uma alternativa intermediária às duas reportadas acima seria o emprego de redes neurais artificiais (RNA's) para simular as principais taxas associadas ao crescimento microbiano. Embora as RNA's também sejam modelos empíricos, elas podem apresentar melhor desempenho para simular processos complexos (como é o caso do crescimento microbiano em FES) que os modelos empíricos simples, desde que sejam usados os

procedimentos corretos para treinamento e validação da rede. A desvantagem das RNA's é o grande número de pontos experimentais necessários para o seu treinamento, que inviabiliza o seu uso em algumas situações práticas. No entanto, este trabalho se caracteriza por apresentar um grande número de dados experimentais ou calculados através da estequiometria (Eq. IV.1) que podem ser usados para o treinamento e validação.

Tendo em vista o que foi exposto acima, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um modelo matemático para descrever as principais taxas associadas com o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES. O modelo é baseado no emprego de redes neurais artificiais (RNA) para simular as principais taxas (em termos mássicos) envolvidas durante o cultivo do microrganismo no biorreator de leito fixo. A abordagem usa como entradas para a rede as temperaturas do ar de entrada e saída do biorreator, a concentração inicial de ART e o tempo de fermentação obtidos nos experimentos realizados no Capítulo IV. As respostas, ou saídas da rede, são as taxas de produção de CO₂, etanol, biomassa, inulinase, água e calor metabólico, além do consumo de ART e oxigênio.

V.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados experimentais utilizados neste capítulo foram obtidos no Capítulo IV, bem como o detalhamento do procedimento experimental. Porém, os dados apresentados anteriormente foram expressos em termos do acúmulo de massa ao longo do tempo e, para o desenvolvimento do modelo matemático, é necessário converter para a variação nas taxas metabólicas ao longo do tempo, conforme a seguinte equação:

$$v_i = \frac{\Delta m_i}{\Delta t} \quad (\text{V.1a})$$

$$v_Q = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \quad (\text{V.1b})$$

onde v_i e Δm_i são as taxas de reação (g/h,) e a variação da massa (g) dos i compostos do metabolismo (ART, biomassa, etanol, água, CO₂, O₂) para o intervalo de tempo, $\Delta t = 30$ s, respectivamente. A taxa de geração de calor metabólico, v_Q , e a variação de calor metabólico, ΔQ , foram expressas em kJ/h e kJ, respectivamente. Com relação à produção de inulinase, foram usados os dados acumulativos médios ao longo do tempo (média obtida entre as 4 zonas dentro do biorreator). Como os dados de consumo de ART e produção de inulinase foram obtidos em intervalos de tempo maiores que 30 s, foi empregado um polinômio para interpolar os dados experimentais. O critério usado para a escolha do polinômio foi a representação correta da tendência experimental.

V.3 FORMULAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO

Neste trabalho foi empregada uma rede neural do tipo *feedforward* implementada em linguagem FORTRAN 90, usando como função de transferência a tangente hiperbólica. As entradas para a RNA foram a concentração inicial de ART, as temperaturas de entrada e saída do ar no biorreator, além do tempo de fermentação. As saídas ou respostas da RNA foram as taxas microbianas para CO₂, etanol, biomassa O₂, ART, calor e água metabólica, e a produção de inulinase. Foi utilizada uma única camada intermediária, onde o número de neurônios foi definido através da avaliação do valor final da Função Objetivo (Eq. V.2). A escolha da melhor topologia da rede foi baseada no menor valor da Função objetivo.

As entradas da rede foram combinadas de maneira a minimizar a função objetivo (F) definida de acordo com a seguinte equação:

$$F = \sum_{i=1}^{NPE} \sum_{j=1}^{NR} \left(v_{i,j}^{exp} - v_{i,j}^{calc} \right)^2 \quad (V.2)$$

onde NR é o número de taxas metabólicas experimentais, NPE é o número de pontos onde a função objetivo F é calculada, $v_{i,j}^{exp}$ e $v_{i,j}^{calc}$ são as taxas metabólicas experimentais e calculadas, respectivamente.

Durante o processo de treinamento, os pesos e *bias* foram otimizados usando dois algoritmos heurísticos: o *Simulated Annealing* (SA) combinado com Nelder e Mead (PRESS *et al.*, 1992) e o *Particle Swarm Optimization* (PSO) (SCHWAAB *et al.*, 2008). No algoritmo do SA a temperatura artificial e a taxa de resfriamento foram 10,0 e 0,98, respectivamente. Estes valores foram definidos de acordo com experiência prévia no emprego deste algoritmo de otimização (MAZUTTI *et al.*, 2009). Para o PSO o intervalo de busca para os pesos e *bias* foi de -5,0 a 5,0. Além disso, foram usadas 40 partículas e os parâmetros de cognição e social, além do peso inercial foram 1,0, 1,0 e 0,7, respectivamente (SCHWAAB *et al.*, 2008).

Para o treinamento da RNA foram usados seis experimentos (Experimentos 1-6 da Tabela IV.1) e para a validação foi empregado um experimento (Experimento 7 da Tabela IV.1). O número de pontos usados para o treinamento e validação foram 68.992 e 11.524, respectivamente. A função objetivo (Eq. V.2) foi avaliada em 137.984 pontos.

V.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.4.1 Taxas Experimentais

As Figuras V.1 e V.2 apresentam as taxas e a simulação dos resultados através do modelo proposto obtidas durante o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES, enquanto que a Figura V.3 apresenta os perfis de produção de inulinase em cada uma das quatro zonas dentro do biorreator, bem como o resultado do ajuste pelo modelo proposto. A Figura V.1 apresenta as taxas de produção de CO₂, água metabólica, etanol e o consumo de ART; a Figura V.2 apresenta as taxas de produção de biomassa, calor metabólico e consumo de O₂.

Conforme pode ser visualizado nas Figuras V.1 e V.2, o metabolismo da levedura é lento nas primeiras 3-4 h de fermentação. Provavelmente, o tempo da fase lag de crescimento é influenciado pelas baixas temperaturas do substrato verificados nesse

intervalo (Figura IV.1) e a adaptação ao novo ambiente. A temperatura ótima de crescimento verificada para esta cepa é 36°C, conforme reportado na literatura (MAZUTTI *et al.*, 2006; SGUAREZI *et al.*, 2008; TREICHEL *et al.*, 2008; MAZUTTI *et al.*, 2009). No intervalo compreendido entre 7 e 9 h foram verificados os maiores valores das taxas metabólicas, sendo que estes diminuíram progressivamente após esse período.

A temperatura do ar de entrada apresentou pouca influência nos valores máximos das taxas metabólicas. O que muda de uma condição experimental para outra é o tempo onde ocorrem as taxas máximas. Em outras palavras, muda o intervalo de tempo em que o metabolismo do microrganismo encontra-se na fase exponencial de crescimento. Quanto maior a temperatura do ar de entrada, menor o tempo onde foram verificadas as taxas máximas. Por exemplo, as taxas máximas no experimento 1 ocorreram em torno de 10 h, enquanto que no experimento 2 e 3 estas taxas foram verificadas em 9 e 8 h, respectivamente. A vazão volumétrica de ar pouco influenciou nas respostas obtidas. Há duas razões para o decréscimo nas taxas metabólicas a partir de 9-10 horas de fermentação. Primeiro, a massa de ART no bagaço de cana é consumida rapidamente (Figuras IV.4 e Tabela IV.3), o que pode limitar o crescimento. Quando a massa de ART atinge valores críticos no meio, o metabolismo microbiano fica restrito ao de manutenção, como pode ser visto pelos baixos valores das taxas de consumo de ART e produção de calor metabólico. Segundo, as altas temperaturas obtidas durante a fermentação (em torno de 50°C) alteram completamente o metabolismo das células e, em muitas situações, podem comprometer a viabilidade celular. O aumento da temperatura no meio é o maior desafio na operação de biorreatores leito fixo em FES para a obtenção de bioprodutos (FANAEI e VAZIRI, 2008).

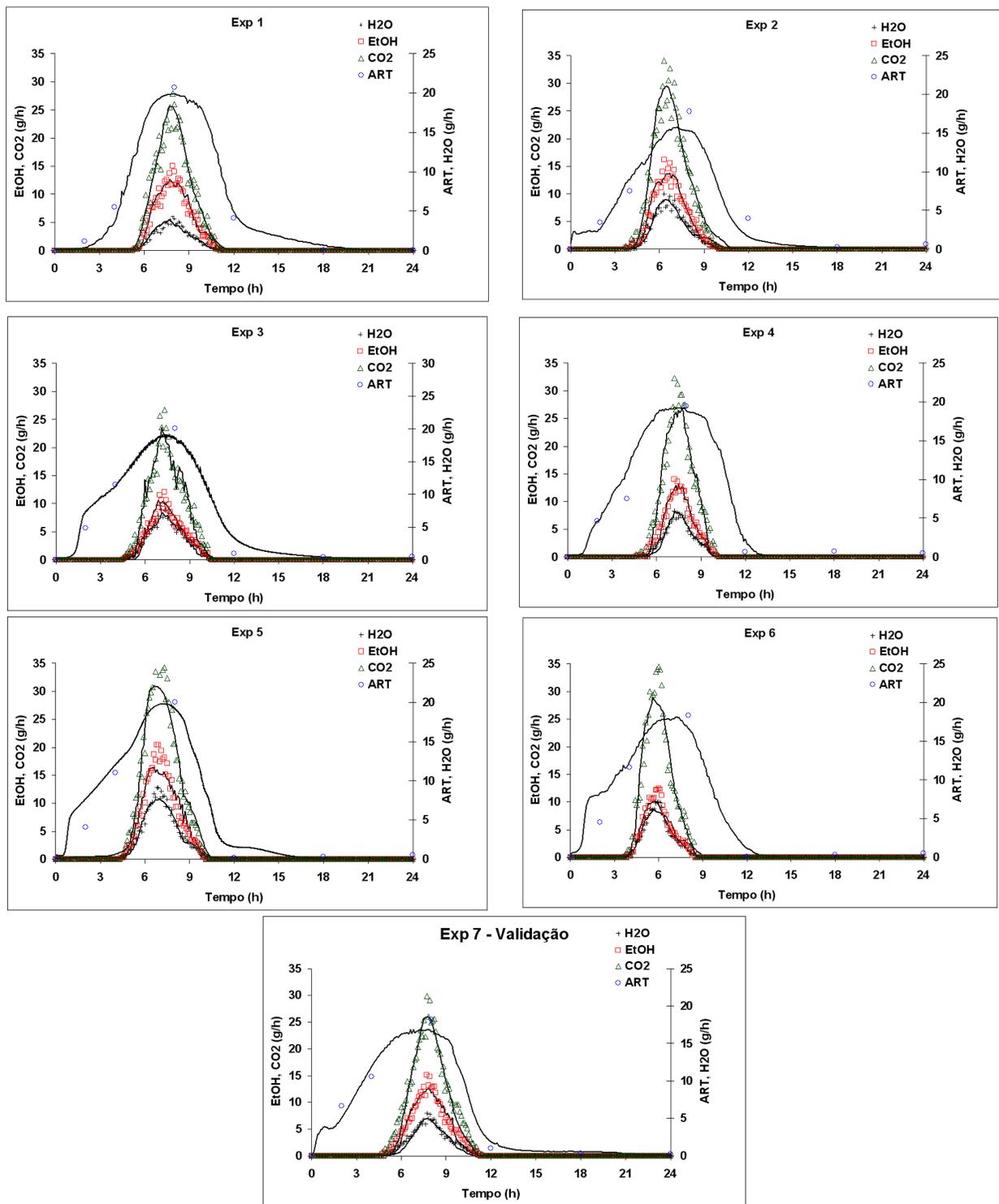


Figura V.1: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos das taxas experimentais (e/ou calculadas – Pontos discretos) e simuladas (linhas contínuas) para CO₂, H₂O metabólica, ART e etanol.

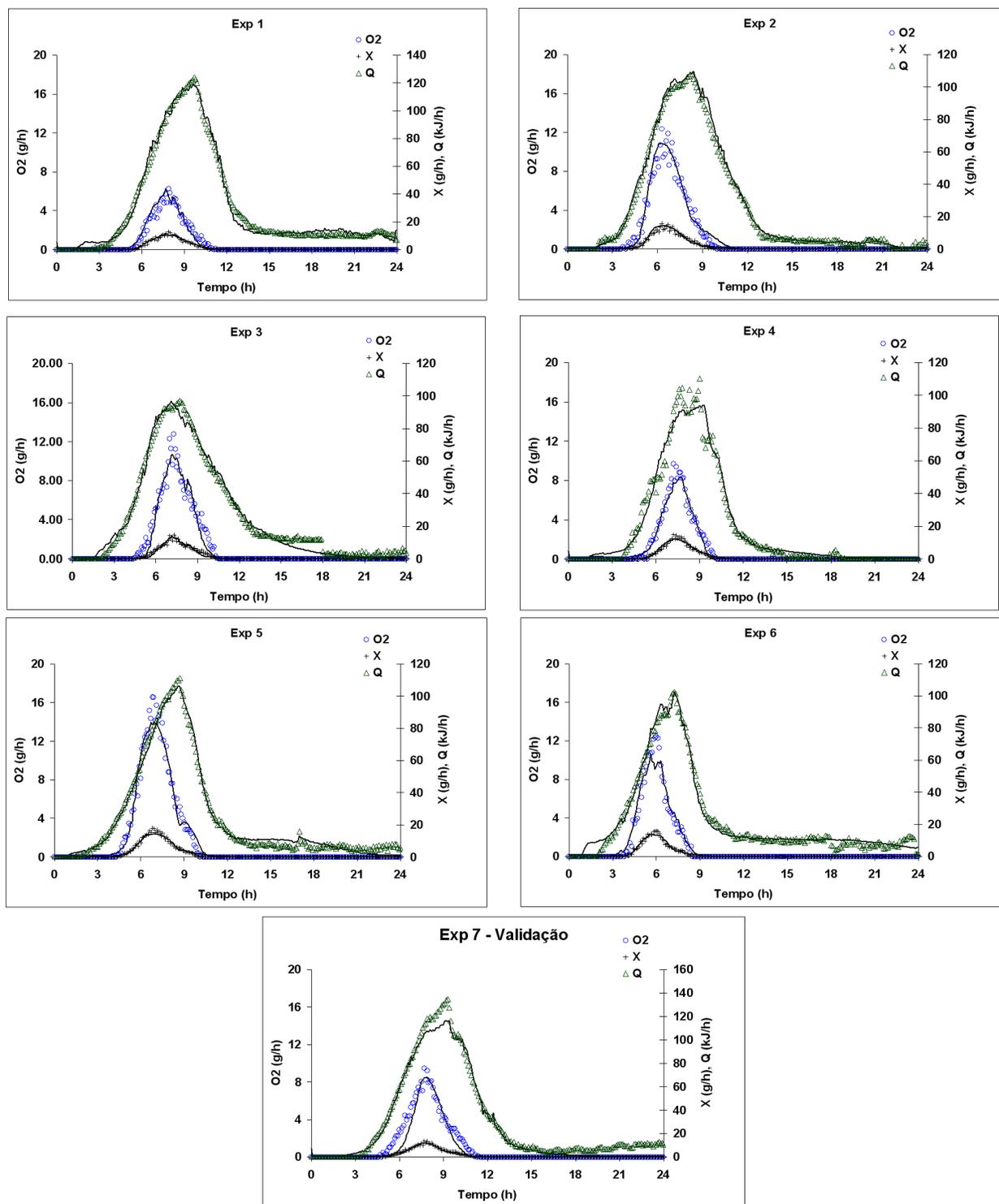


Figura V.2: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo em termos das taxas experimentais (e/ou calculadas – Pontos discretos) e simuladas (linhas contínuas) para células, O_2 e calor metabólico.

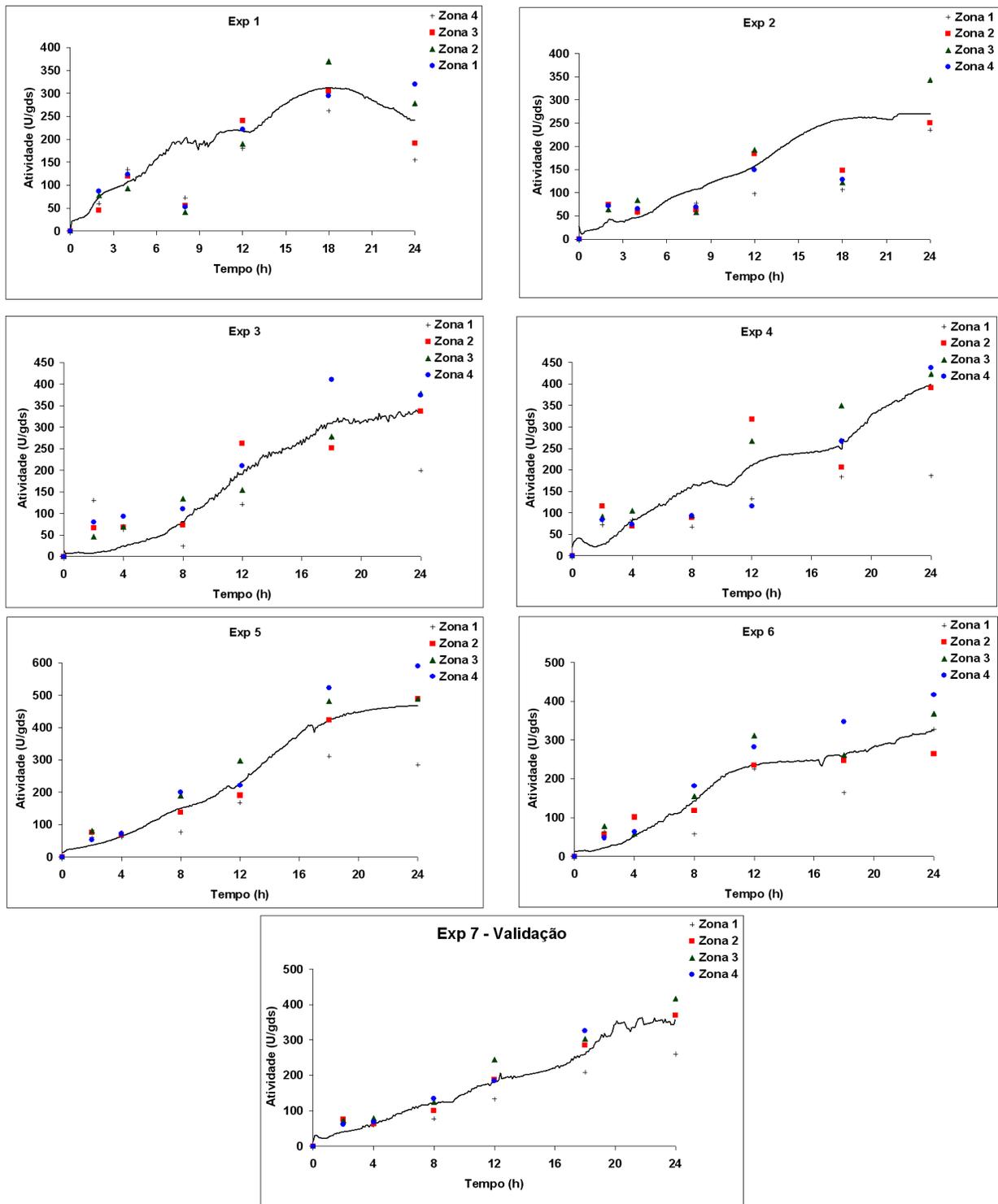


Figura V.3: Comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo nas 4 zonas (pontos discretos) e os valores simulados (linhas contínuas) correspondendo ao valor médio entre as 4 zonas.

V.4.2 Modelagem Matemática

A RNA é aceita e conhecida no meio científico e industrial, como técnica de modelagem pela sua grande habilidade para representar sistemas com dinâmica altamente não-linear (como é o caso de FES) e sem muitas informações a respeito do processo considerado. Porém, esta ferramenta pode levar a conflitos com restrições representadas pelos princípios da conservação, principalmente fora da região de treinamento. Além disso, para a obtenção de uma boa performance no emprego de RNA para a modelagem de processos é necessária uma quantidade significativa de dados experimentais com qualidade, o que normalmente é difícil de se obter. A aplicação de RNA para modelagem de processos requer o cumprimento de algumas etapas, tais como: escolha da topologia de rede, função de transferência, treinamento e validação (LINKO, ZHU e LINKO, 1999). As escolhas feitas em cada uma dessas etapas são baseadas na experiência prévia e na aplicação (MAZUTTI *et al.*, 2009).

Neste trabalho, foram usados como entrada para a RNA a concentração inicial de ART, as temperaturas de entrada e saída de ar do biorreator e o tempo de fermentação. Apesar da composição do meio (em termos percentuais mássicos da concentração de melão, AMM e farelo de soja) ser constante entre os experimentos, foram verificadas variações na massa inicial de ART no meio. A análise dos resultados cinéticos apresentados no capítulo IV mostrou que a massa inicial de açúcar influenciou o perfil dos compostos metabólicos investigados, justificando a sua escolha como entrada para a RNA. Porém, para aumentar a aplicabilidade do modelo metabólico, os dados de massa inicial de ART foram expressos em massa inicial de ART por kg de bagaço. Esse procedimento foi adotado, pois com o aumento de escala do processo a massa inicial de ART será muito maior que a utilizada na avaliação cinética, extrapolando a faixa na qual a rede foi treinada. O tempo de fermentação é sempre uma variável importante para ser usada como entrada para a RNA, uma vez que ele caracteriza o perfil cinético das taxas.

Com relação às temperaturas de entrada e saída de ar do biorreator, sabe-se da importância e da influência das mesmas sobre o metabolismo microbiano e, neste trabalho,

foi explorada uma das principais vantagens do emprego de RNA na modelagem de processos: sua capacidade de interpolação de dados. Por exemplo, a temperatura do ar de saída do biorreator variou entre 20-50°C entre os experimentos realizados. Do ponto de vista prático, esta faixa de temperatura não deverá ser extrapolada por duas razões. Primeiro, a temperatura ótima de crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 é 36°C e temperaturas acima desse valor são altamente prejudiciais ao metabolismo e estrutura das células. Segundo, temperaturas abaixo de 20°C o metabolismo da levedura é muito lento, inviabilizando qualquer tentativa de operação abaixo dessa faixa. Ou seja, o processo de produção de inulinase por FES em biorreator de leito fixo terá de ser realizado numa faixa de temperatura acima de 20°C e inferior a 50°C. Além disso, a temperatura do ar de saída é sempre o maior valor, o que sinaliza que a escolha por essa variável como entrada para a RNA é uma boa alternativa, uma vez que a temperatura em qualquer ponto dentro do biorreator será menor que a verificada na saída. Uma das principais desvantagens do emprego de rede neurais é a grande quantidade de dados experimentais necessárias para o seu treinamento. Neste trabalho, esta desvantagem foi minimizada, uma vez que os dados usados no treinamento e validação foram obtidos da aquisição *on line* de temperatura em função do tempo (a concentração inicial de ART foi mantida constante para cada experimento), que permitiu a obtenção de um grande número de pontos experimentais.

As saídas da RNA, ou as respostas, foram as taxas metabólicas de produção de CO₂, etanol, biomassa, água e calor metabólico, as taxas de consumo de O₂ e ART, além da produção de inulinase. As respostas obtidas com a rede neural podem ser acopladas às equações de balanço de massa e energia de biorreatores leito fixo. Sendo assim, é possível avaliar o desempenho global do processo sobre o comportamento microbiano em FES, desde que sejam respeitados os intervalos para os quais a rede é válida

Um aspecto importante na aplicação de RNA para a modelagem de processos é a escolha da função de transferência das respostas entre as camadas da rede. Neste trabalho foi usada a função tangente hiperbólica, a qual foi selecionada a partir de um trabalho prévio (MAZUTTI *et al.*, 2009), onde o uso dessa função possibilitou a obtenção do melhor

deempenho durante o treinamento. O número de unidades, ou neurônios, da camada intermediária será discutido com mais detalhes na próxima seção.

V.4.2.1 Topologia e avaliação da performance de treinamento da RNA

O método mais empregado para o treinamento de RNA é o algoritmo *backpropagation*. No entanto, foram testados dois algoritmos heurísticos, os quais têm a característica de busca global, para a estimação dos pesos e *bias* da RNA. As performances desses algoritmos durante o treinamento foram comparadas entre as várias topologias de rede testadas. No primeiro caso, foi usado o *Simulated Annealing* (SA) combinado com o algoritmo *Simplex* de Nelder e Mead (PRESS *et al.*, 1991). O papel do SA na estrutura de otimização é corrigir movimentos que possam conduzir à otimização dos parâmetros para uma região distante daquela onde se encontra o ótimo global, enquanto que o papel do algoritmo *Simplex* é a geração dos novos parâmetros dentro do caminho determinado pelo SA. No segundo caso, o algoritmo de otimização foi o *Particle Swarm Optimization* (PSO). O algoritmo PSO apresenta características interessantes ao longo do processo iterativo. Nas iterações iniciais, a característica aleatória de busca faz com que as partículas encontrem rapidamente as possíveis regiões de ótimo global dentro do intervalo de busca. Conforme o processo iterativo evolui, as partículas vão se concentrando em torno dessas regiões encontradas e selecionadas, iniciando um estágio de exploração do ótimo local dentro de cada região. A partir da exploração é possível definir o ótimo global para o processo. Outras vantagens do emprego do PSO no treinamento de RNA é o fato de que o algoritmo é pouco sensível aos valores iniciais dos parâmetros, tornando-o atrativo quando se tem um elevado número de parâmetros, como é o caso de RNA (SCHWAAB *et al.*, 2008).

Neste trabalho foi investigada a influência de 5-20 unidades intermediárias no valor da função objetivo (F) para os dois algoritmos de otimização. A Figura V.4 apresenta a redução no valor de F ao longo do processo iterativo. A melhor topologia foi 4-15-8 (4 entradas, 15 unidades intermediárias e 8 saídas), a qual apresentou os menores valores de F

durante o treinamento independente do algoritmo de otimização empregado. Além disso, a escolha da topologia foi baseada na qualidade do ajuste dos dados de treinamento da rede.

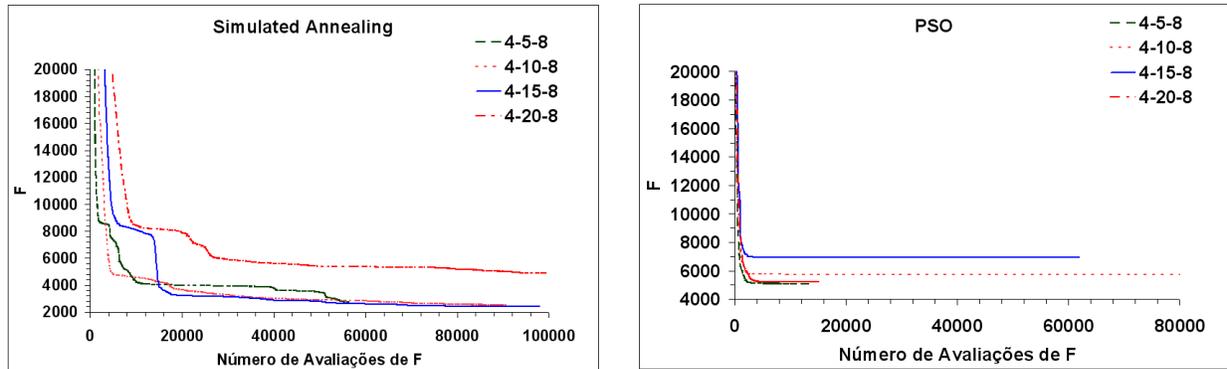


Figura V.4: Análise comparativa da performance de treinamento da RNA entre as diversas topologias de rede testadas, considerando os dois algoritmos de otimização.

O SA apresentou melhores resultados que o PSO em termos da minimização do valor da função objetivo, enquanto que o PSO apresentou maior eficiência computacional, uma vez que o número de avaliações de F foi menor em todas as situações. O melhor desempenho obtido pelo SA durante o treinamento pode ser atribuída ao fato de que o intervalo de busca dos parâmetros é maior comparado ao usado no PSO. Porém, se a região de busca para o PSO é estendida, aumenta a chance de algumas partículas se concentrarem em torno de falsas regiões de ótimo global, resultando numa redução na qualidade e precisão dos parâmetros estimados. Neste trabalho, a região de busca usada no PSO foi a mesma para todos os parâmetros. O mais conveniente seria definir um intervalo diferente para cada parâmetro, mas isto seria inviável, devido ao grande número de pesos e *bias* da RNA.

O número de avaliações da função objetivo é dependente da seleção dos parâmetros de cada algoritmo e, principalmente, do número de pesos e *bias* da RNA. Para o SA, a temperatura artificial e a taxa de resfriamento influenciam o número de avaliações. Quanto maior a temperatura e mais próximo de 1 for a taxa de resfriamento, maior o número de avaliações necessárias para a minimização de F e, principalmente, mais confiáveis são os

parâmetros estimados. Mazutti *et al.* (2009) empregaram o SA para estimar os pesos e *bias* de uma RNA usada para a predição do comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por fermentação submersa em biorreator batelada. Os autores definiram a temperatura artificial e a taxa de resfriamento em 1,0 e 0,90, respectivamente, e o número de avaliações de F para uma topologia de rede 5-10-3 foi consideravelmente menor que o obtido nesse trabalho. Levando-se em conta o objetivo desse trabalho é o desenvolvimento de um modelo que represente o melhor possível o as principais taxas associadas com o metabolismo da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 crescendo em FES, é preferível aumentar o tempo computacional durante o treinamento e obter um modelo confiável do processo. Baseado nos resultados do treinamento, a melhor topologia de rede para esse trabalho é 4-15-8.

V.4.2.2 Simulação do Processo

A aplicabilidade da RNA 4-15-8 para simulação das taxas metabólicas e produção de inulinase média pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 crescendo em FES está apresentada nas Figuras V.1 e V.2, usando os dados do treinamento e do estágio de validação da rede. Como pode ser visto, a RNA mostrou uma boa performance na predição dos perfis das taxas metabólicas investigadas, além da predição da produção de inulinase. Uma análise detalhada dos resultados da simulação metabólica indica a presença de ruídos na resposta da rede para CO₂, ART, calor metabólico e produção média de enzima. O surgimento de ruídos nas respostas da rede é resultado do alto número de pontos experimentais usados no treinamento, os quais foram usados diretamente sem o emprego de qualquer filtro para eliminar pontos oscilatórios. No entanto, o surgimento desses ruídos não compromete a robustez do modelo metabólico, uma vez que os mesmos apresentam oscilação menor que a obtida experimentalmente para cada variável.

O sucesso na aplicação de RNA para prever as principais taxas metabólicas da levedura *K. marxianus* crescendo em FES é resultado da grande quantidade de dados experimentais usada para o treinamento da rede, a qual foi muito superior ao recomendado,

que é ao menos 4 vezes maior que o número de parâmetros. A rede, com topologia 4-15-8, tem 136 parâmetros e foram empregados 68.992 pontos experimentais no treinamento da mesma. Na prática, o desenvolvimento de um modelo fenomenológico do metabolismo da levedura crescendo em FES é praticamente impossível. O uso de RNA possibilitou a obtenção de um modelo capaz de representar de maneira satisfatória os fenômenos complexos que envolvem o crescimento de microrganismos em FES e mostrou ser uma ferramenta útil na predição das taxas metabólicas. O próximo passo é a implementação de um modelo macroscópico integrado ao modelo metabólico gerado nesta etapa.

V.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho avaliou os efeitos da temperatura e vazão volumétrica de ar de entrada no biorreator sobre as principais taxas associadas com o crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES. Algumas diferenças foram verificadas nos perfis das taxas entre as condições experimentais investigadas. O aumento da temperatura do ar de entrada mostrou ter uma influência no tempo onde as taxas máximas foram verificadas, sendo que quanto mais alta a temperatura menor foi o tempo. As maiores taxas ocorreram no período compreendido entre 4-9h.

O modelo desenvolvido para prever as principais taxas associadas ao crescimento e a produção de inulinase da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES mostrou uma boa performance em ambas as etapas de treinamento e validação. A abordagem proposta neste trabalho mostrou-se apta para modelar o crescimento microbiano em FES e pode substituir as equações cinéticas, acoplando-a às equações de balanço de massa e energia e usar como uma ferramenta robusta e confiável para a simulação dinâmica de processos envolvendo FES.

CAPÍTULO VI

MODELAGEM MATEMÁTICA DOS PERFIS DE TEMPERATURA E BIOMASSA NO INTERIOR DO BIORREATOR DE LEITO FIXO

VI.1 INTRODUÇÃO

Na revisão bibliográfica apresentada no Cap II, foi reportada uma série de vantagens do emprego de FES para a obtenção de produtos de interesse. No entanto, sabe-se que o maior desafio em FES é a remoção do calor metabólico, o qual é dependente do crescimento microbiano no meio sólido. Na grande maioria dos casos, ocorre o aumento da temperatura do meio devido à baixa condutividade térmica dos substratos e do ar usado para a aeração do sistema, o que provoca uma redução considerável na atividade microbiana e, em casos extremos, a morte dos microrganismos (FANAIEI e VAZIRI, 2008). O acúmulo de energia no meio condiciona ao processo de FES em biorreatores de leito fixo a existência inevitável dos gradientes espaciais de temperatura, aumentando a complexidade do processo. Embora a agitação possa melhorar significativamente a remoção de calor do meio, este procedimento não é usado em biorreatores leito fixo, uma vez que alguns microrganismos não toleram a alta tensão de cisalhamento e a colisão das partículas sólidas envolvidas na agitação do leito, que rompem as células (HAMIDI-ESFAHANI *et al.*, 2007). Infelizmente, comparado com fermentação submersa, tem-se menor conhecimento sobre a operação e o aumento de escala de biorreatores em FES, o que limita a aplicação industrial e comercial de processos envolvendo FES (von MEIEN *et al.*, 2004).

No Cap IV foram apresentados os dados experimentais referentes ao comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo. Entre os resultados obtidos, tem-se que a temperatura atingiu valores até 15°C acima da temperatura ótima do crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, que é 36°C. Além disso, a umidade do substrato apresentou pouca alteração ao longo da fermentação e, em todas as situações apresentadas, ocorreu um incremento de aproximadamente 5-10% no seu valor, mostrando que a umidade não é o fator limitante na produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo. Tendo em vista os resultados obtidos, os quais mostraram a viabilidade técnica de se produzir inulinase por FES, é de fundamental importância o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevam de

maneira eficiente o comportamento dinâmico do processo, de maneira que estes possam ser utilizados como ferramenta de otimização, controle e aumento de escala.

No Cap V foi apresentada a primeira etapa do desenvolvimento de um modelo matemático do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo, o qual refere-se ao emprego de redes neurais para simular as principais taxas associadas ao crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES. Conforme resultados apresentados anteriormente, o modelo proposto apresentou um bom desempenho em ambas as etapas de treinamento e validação da rede neural, provando ser uma ferramenta útil para modelar o crescimento microbiano em FES. O modelo de crescimento microbiano proposto anteriormente foge ao que normalmente é apresentado na literatura para descrever a atividade biológica em FES, conforme modelos apresentados na revisão bibliográfica (Cap II).

Neste capítulo será proposto um modelo matemático apto a descrever os gradientes de temperatura e biomassa envolvidos durante a operação do biorreator de leito fixo para a produção de inulinase por FES, onde as taxas referentes ao crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 serão substituídas pelo modelo proposto no Cap V, o qual é baseado no emprego de redes neurais artificiais. Sendo assim, o modelo final do processo de produção de inulinase será um modelo híbrido, composto pelas equações de balanço de massa e energia ao longo do biorreator e pela rede neural validada no capítulo V.

VI.2 MATERIAIS E MÉTODOS

VI.2.1 Caracterização física dos substratos

A distribuição do tamanho das partículas de substrato seco foi determinada com o auxílio de uma série de peneiras do tipo Tyler da marca Granutest e um agitador mecânico

da marca Produ-test. O diâmetro médio de Sauter foi empregado para calcular o diâmetro médio das partículas, conforme (PERRY, GREEN e MALONEY, 1984):

$$d_p = \frac{1}{\sum_{i=1}^{np} x_i / d_{p_i}} \quad (\text{VI.1a})$$

onde np é o número de peneiras usadas, d_{p_i} é o diâmetro da peneira i e:

$$x_i = \frac{M_i}{M} \quad (\text{VI.1b})$$

onde M_i é a massa de sólidos retida na peneira i e M é a massa total de sólidos

A densidade aparente (ρ_s) foi determinada através do método gravimétrico, onde 100 g de bagaço de cana seco (M_s) foram adicionados num balão volumétrico de 500 mL (V_b), sendo determinado o volume de água necessário para completar o volume do balão (V_w). A densidade do bagaço foi determinada conforme a seguinte equação:

$$\rho_s = \frac{M_s}{V_b - V_w} \quad (\text{VI.2})$$

A porosidade do leito (ε) foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\varepsilon = 1 - \frac{V_s}{V_L} \quad (\text{VI.3})$$

onde V_s é o volume de sólidos carregado no biorreator ($V_s = M_s / \rho_s$) e V_L é o volume do leito. Neste trabalho $V_L = 0,036 \text{ m}^3$.

VI.3 MODELAGEM MATEMÁTICA

O desenvolvimento do modelo matemático para descrever os perfis de temperatura ao longo do biorreator de leito fixo empregado para a produção de inulinase por FES é baseado nas seguintes hipóteses:

- O biorreator é isolado do ambiente de maneira que a transferência de calor através das paredes do mesmo pode ser considerada desprezível;
- Os resultados obtidos no Cap IV mostraram que a umidade do leito não limita o crescimento, o modelo proposto considera equilíbrio térmico entre o leito e a fase gasosa no interior do biorreator, desprezando os balanços de massa para a fase sólida e vapor.
- O fluxo mássico de ar ao longo do biorreator foi considerado constante;
- As propriedades do ar e do substrato foram consideradas constantes ao longo do processo;

Conforme as hipóteses mencionadas acima, o modelo proposto para a transferência de calor no interior do biorreator de leito fixo é baseado na seguinte equação (FANAEI e VAZIRI, 2008):

$$\rho_b \cdot C_{p_b} \frac{\partial T}{\partial t} = \rho_s \cdot (1 - \varepsilon) \cdot Y_Q \frac{\partial X_c}{\partial t} - \rho_a \cdot C_{p_a} \cdot v_z \frac{\partial T}{\partial z} - \rho_a \cdot f \cdot \lambda \cdot v_z \frac{\partial T}{\partial z} + k_b \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \quad (\text{VI.4})$$

onde C_{p_b} e C_{p_a} são a capacidade calorífica do leito e do ar úmido, respectivamente, ρ_b , ρ_s e ρ_a são as densidades do leito, do substrato e do ar, respectivamente, f é a capacidade de evaporação de água no meio, λ é a entalpia de vaporização da água, T é a temperatura do meio, z é a altura do biorreator, v_z é a velocidade superficial de ar úmido que entra no biorreator, X_c é a concentração de biomassa, Y_Q é o coeficiente de rendimento de calor metabólico a partir do crescimento, ε é a porosidade do leito e k_b é a condutividade térmica do leito. O termo do lado esquerdo da equação representa o acúmulo de energia ao longo do tempo em cada posição dentro do biorreator; o primeiro termo do lado direito representa a

produção de calor devido ao crescimento microbiano; o segundo termo do lado direito representa o transporte de energia por convecção; o terceiro termo do lado direito representa a mudança na energia ocasionada pela evaporação da água; e o quarto termo do lado direito representa a condução de energia. Todos os termos da equação acima são expressos por $J.h^{-1}.m^{-3}$.

O primeiro termo do lado direito da equação VI.4 pode ser rearranjado, conforme:

$$\rho_s \cdot (1 - \varepsilon) \cdot Y_Q \frac{\partial X_c}{\partial t} = \frac{R_Q}{V_L} \quad (VI.5a)$$

onde X_c é a concentração de biomassa (g células/ g sólidos), R_Q é a taxa de geração de calor metabólico ($kJ.h^{-1}$) advinda da rede neural validada no Cap V e pode ser expresso conforme:

$$R_Q = RNA(T_{in}, T(t, z), ART_0, Tempo) \quad (VI.5b)$$

onde T_{in} e $T(t, z)$ são as temperaturas do ar de entrada e a temperatura do ar em cada posição dentro do biorreator calculadas pela VI.6, respectivamente e ART_0 é a concentração inicial de ART. Dessa maneira, a equação do balanço de energia é representada conforme:

$$\rho_b \cdot Cp_b \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{R_Q}{V_L} - \rho_a \cdot Cp_a \cdot v_z \frac{\partial T}{\partial z} - \rho_a \cdot f \cdot \lambda \cdot v_z \frac{\partial T}{\partial z} + k_b \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \quad (VI.6)$$

onde:

$$\rho_b = \varepsilon \cdot \rho_a + (1 - \varepsilon) \cdot \rho_s \quad (VI.7a)$$

$$k_b = \varepsilon \cdot k_a + (1 - \varepsilon) \cdot k_s \quad (VI.7b)$$

$$Cp_b = \frac{\varepsilon \cdot \rho_a \cdot (Cp_a + f \cdot \lambda) + (1 - \varepsilon) \cdot \rho_s \cdot Cp_s}{\rho_b} \quad (VI.7c)$$

onde k_a e k_s são a condutividade térmica do ar e do substrato, respectivamente.

As condições iniciais e de contorno são dadas conforme:

$$t = 0 \rightarrow T = T_{in} \quad (VI.8a)$$

$$z = 0 \rightarrow T = T_{in} \quad (VI.8b)$$

$$z = H \rightarrow \frac{\partial T}{\partial z} = 0 \quad (VI.8c)$$

onde H é a altura do leito.

Adicionalmente, a massa de células pode ser calculada em qualquer ponto dentro do biorreator conforme:

$$\frac{\partial X_m}{\partial t} = R_b \quad (VI.9a)$$

onde X_m é a massa de células (g) e R_b é a taxa de geração de biomassa (g células/h) advinda da rede neural validada no Cap V e pode ser expresso conforme:

$$R_b = \text{RNA}(T_{in}, T(t, z), \text{ART}_0, \text{Tempo}) \quad (VI.9b)$$

A condição inicial para a Eq. VI.9a é a seguinte:

$$t = 0 \rightarrow X = X_0 = 14 \text{ g} \quad (VI.9c)$$

Os valores dos parâmetros empregados nas equações acima são apresentados na Tabela VI.1.

Tabela VI.1: Valores dos parâmetros usados na simulação dos gradientes de temperatura no biorreator de leito fixo através da equação de transferência de calor

| Símbolo | Descrição | Valores | Unidades | Referência |
|------------|------------------------------------|---------|---|------------------------|
| C_{p_a} | Capacidade calorífica do ar | 1180 | $J.kg^{-1}.^{\circ}C^{-1}$ | Himmelblau (1982) |
| C_{p_s} | Capacidade calorífica do substrato | 2500 | $J.kg^{-1}.^{\circ}C^{-1}$ | Laurentino (2007) |
| f | Capacidade de evaporação de água | 0,00246 | $kg_{\text{água}}.kg_{\text{ar}}^{-1}.^{\circ}C^{-1}$ | Fanaei e Vaziri (2008) |
| λ | Entalpia de vaporização da água | 2414,3 | $kJ.kg^{-1}$ | Himmelblau (1982) |
| H | Altura do leito | 40 | cm | Este trabalho |
| ϵ | Porosidade do leito | 0,85 | - | Este Trabalho |
| k_a | Condutividade térmica do ar | 74,16 | $J.h^{-1}.m^{-1}.^{\circ}C^{-1}$ | Fanaei e Vaziri (2008) |
| k_b | Condutividade térmica do substrato | 720 | $J.h^{-1}.m^{-1}.^{\circ}C^{-1}$ | Laurentino (2007) |
| ρ_a | Densidade do ar úmido | 1,14 | $kg.m^{-3}$ | Himmelblau (1982) |
| ρ_s | Densidade do substrato | 660 | $kg.m^{-3}$ | Este Trabalho |

Para resolver numericamente a equação VI.3 as derivadas parciais referentes à posição dentro do biorreator foram aproximadas pelo método das diferenças finitas usando tamanho de passo constante ao longo do biorreator. Através da aproximação por diferenças centrais, a Eq. VI.3 resultou em um sistema de equações diferenciais ordinárias (EDOs), onde uma equação foi obtida para cada ponto discreto dentro do biorreator. O sistema de EDOs foi resolvido numericamente através do emprego do pacote LIMEX (DEUFLHARD, HAIRER, ZUGCK, 1987), cujo método utiliza tamanho de passo variável ao longo do processo iterativo, sendo aconselhado para a resolução de sistemas rígidos, onde uma

pequena variação no intervalo de integração resulta numa variação grande no valor da derivada.

A Figura VI.1 apresenta o diagrama esquemático da estrutura do modelo híbrido proposto neste trabalho. Como pode ser visto, a rede neural artificial (RNA) é alimentada constantemente pelo tempo de fermentação, concentração inicial de ART, a temperatura do ar de entrada no biorreator e a temperatura calculada pela Eq. VI.6 em cada instante de tempo numa dada posição dentro do biorreator. Apesar da rede proposta apresentar 8 saídas, foram usadas somente duas, as quais correspondem as taxas de produção de calor metabólico e taxa de geração de biomassa. Estas duas taxas são acopladas com as equações de balanço para temperatura e biomassa ao longo do biorreator.

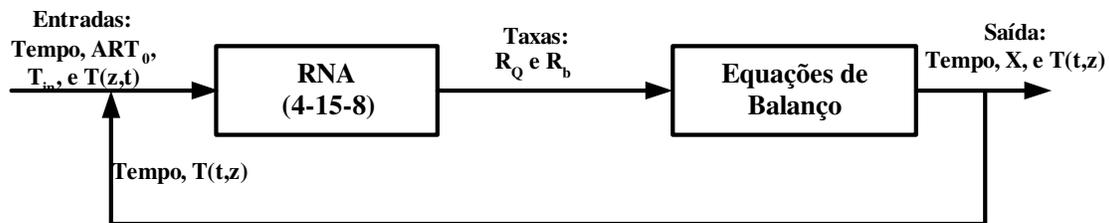


Figura VI.1: Diagrama esquemático da estrutura do modelo híbrido proposto neste trabalho

VI.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.4.1 Caracterização do leito sólido

Os valores dos parâmetros usados na simulação dinâmica dos perfis de temperatura ao longo do biorreator de leito fixo foram apresentados na Tabela VI.1, dos quais os únicos parâmetros determinados experimentalmente neste trabalho foram a porosidade e a densidade aparente do leito, cujo procedimento experimental foi detalhado anteriormente. Os demais parâmetros foram obtidos a partir de artigos da literatura que abordam a modelagem matemática de processos envolvendo FES. A Figura VI.2 apresenta a distribuição granulométrica das partículas do leito. Como pode ser visto a partir da Figura

VI.2 os maiores percentuais de partículas retidas foram verificados nas peneiras com diâmetro da abertura compreendido entre 1,98-0,5 mm, permanecendo retido aproximadamente 90% das partículas. O diâmetro médio de partícula, calculado pela equação VI.1 foi de 0,688 mm.

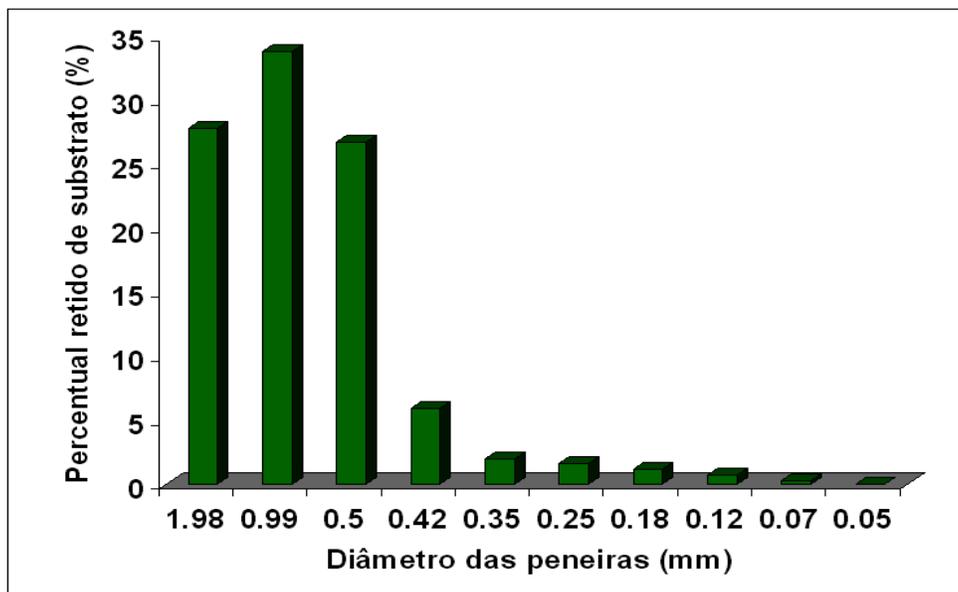


Figura VI.2: Distribuição granulométrica das partículas do leito

A densidade aparente do leito foi determinada experimentalmente e corresponde a 660 kg.m^{-3} . Como é conhecido o volume do biorreator, a massa total de substrato adicionada e a densidade aparente do leito foi possível a determinação da porosidade do leito, cujo valor encontrado foi de 0,85, mantendo a umidade dos substratos em 65%. Este valor é similar ao reportado por Laurentino (2007) para o bagaço de cana.

VI.4.2 Modelagem matemática dos perfis de temperatura ao longo do biorreator

A maior limitação encontrada na simulação dos perfis de temperatura em biorreatores de leito fixo de processos envolvendo FES é o desenvolvimento de um modelo

matemático que descreva de maneira eficiente e fiel os fenômenos associados ao crescimento microbiano. Muitos modelos referentes ao balanço macroscópico de energia apresentados na literatura não confrontam os resultados preditos de temperatura ao longo do biorreator com os valores reais obtidos durante a operação do processo, o que impede de se fazer uma avaliação rigorosa da qualidade do modelo proposto. Este é o caso dos artigos clássicos de modelagem de processos envolvendo FES, como por exemplo, os trabalhos reportados por von Meien e Mitchell (2002), von Meien *et al.* (2004), Hamidi-Esfahani *et al.* (2007), entre outros trabalhos. No entanto, existem alguns trabalhos interessantes na literatura, onde os modelos propostos conseguem descrever de maneira satisfatória os perfis de temperatura ao longo do biorreator, como é o caso dos trabalhos de Fanaei e Vaziri (2008), Lekanda e Perez-Correa (2004), Fernandez-Fernandez e Perez-Correa (2007), entre outros.

O grande objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo matemático capaz de prever os principais fenômenos associados com o crescimento microbiano, principalmente a produção de calor metabólico. Conforme os resultados apresentados no Cap V, tal objetivo foi alcançado, uma vez que o emprego das redes neurais permitiu uma boa aproximação do crescimento microbiano. No entanto, o modelo desenvolvido anteriormente somente apresenta vantagens se acoplado aos balanços macroscópicos de massa e energia, de maneira a se obter um modelo híbrido capaz de prever o comportamento dinâmico do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo.

Isto foi alcançado neste último capítulo, onde o termo responsável pela geração de calor devido ao metabolismo da levedura *K. marxianus* no balanço macroscópico de energia foi obtido a partir do emprego da rede neural validada anteriormente, o que caracteriza o uso de um modelo híbrido para simular os perfis de temperatura ao longo do biorreator de leito fixo. Os resultados da simulação dinâmica do processo são apresentados na Figura VI.3, onde pode ser visto que o modelo híbrido proposto descreveu de maneira satisfatória os perfis de temperatura ao longo do biorreator. De uma maneira geral, o modelo apresentou desvios baixos em relação aos valores experimentais de temperatura

para todos os experimentos, validando o modelo proposto para essa configuração de biorreator.

No entanto, se faz necessário o esclarecimento de um aspecto com relação ao modelo híbrido proposto para o correto entendimento dos resultados obtidos. A rede neural foi treinada e validada usando os valores da temperatura na saída do biorreator (além da concentração inicial de ART, temperatura de entrada no biorreator e o tempo de fermentação), o que sugere que as taxas calculadas referem-se aos valores médios dentro do biorreator. A estrutura híbrida calcula as taxas a partir dos valores de temperatura calculados no interior do biorreator. Logo, essas taxas referem-se aos valores médios obtidos abaixo da altura de leito onde foi calculada a temperatura. Por exemplo, admitindo que a temperatura foi calculada à 10 cm de altura no interior do biorreator, tem-se que a taxa de geração de calor metabólico fornecido pela rede neural se refere ao valor médio obtido na altura de leito compreendido entre 0-10 cm. Assim, as taxas calculadas pela rede neural não se referem aos valores locais, mas aos valores médios no intervalo de 10 cm abaixo do ponto onde foi calculada a temperatura do leito.

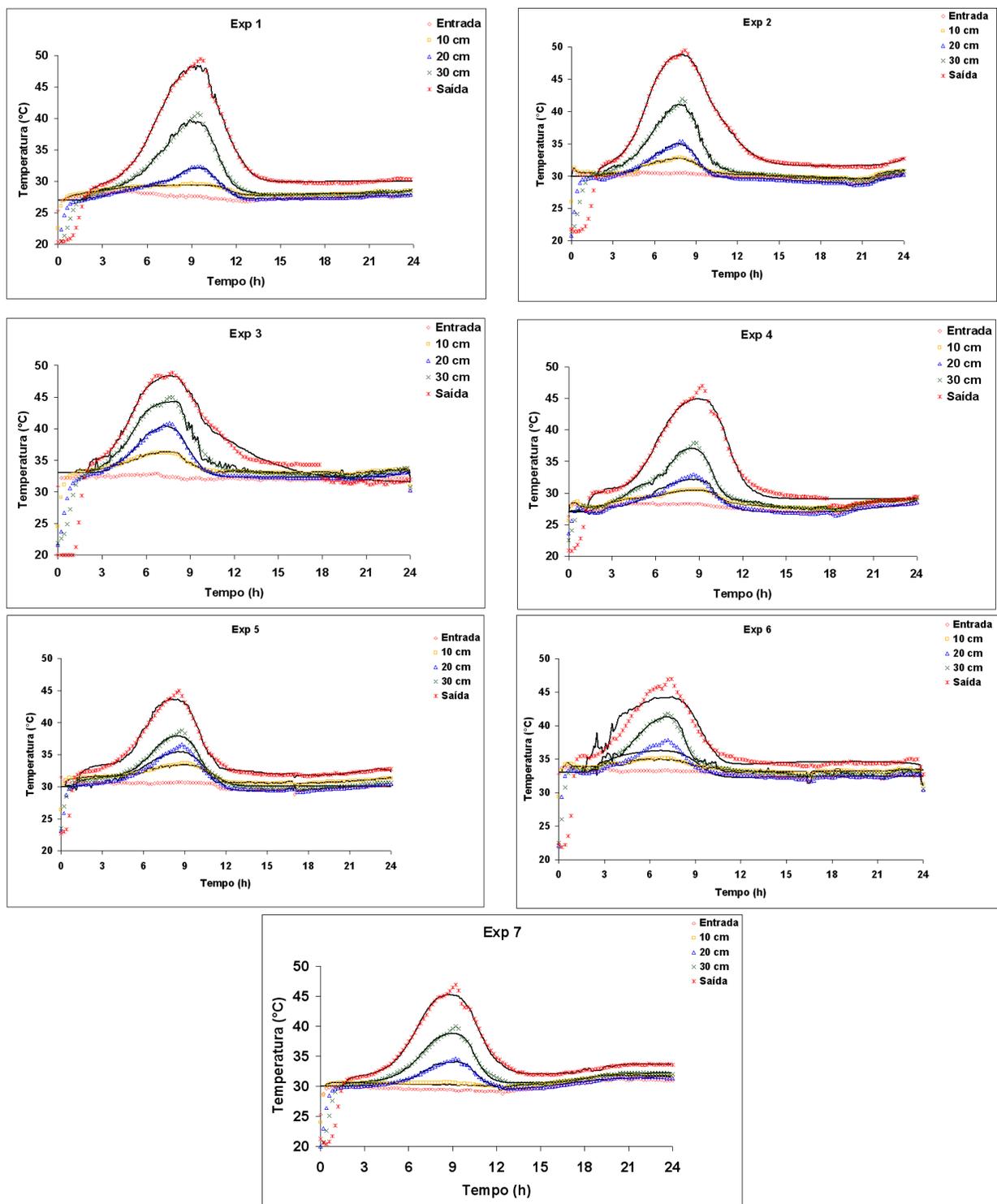


Figura VI.3: Perfis experimentais (Pontos Discretos) e simulados (Linhas contínuas) para temperatura obtidos na avaliação cinética do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo.

VI.4.3 Modelagem matemática dos perfis de biomassa ao longo do biorreator

Tendo em vista que a temperatura ao longo do biorreator é uma das entradas para a rede neural se faz necessário que o modelo seja apto a predizer de forma eficiente seus valores ao longo do processo. Como os resultados obtidos na simulação dos perfis de temperatura ao longo do biorreator foram satisfatórios, pode-se usar o modelo para avaliar outros aspectos relacionados ao comportamento dinâmico do processo. Um aspecto interessante de se avaliar é o crescimento microbiano no interior do biorreator, uma vez que esse crescimento foi quantificado anteriormente em termos globais, usando a equação estequiométrica. O modelo poderá fornecer informações de como as variáveis operacionais influenciam o crescimento microbiano nas diferentes alturas de leito ao longo do biorreator.

A Figura VI.4 apresenta o comportamento dinâmico do crescimento microbiano em diferentes posições do leito no interior do biorreator de leito fixo obtido através da simulação numérica, empregando o modelo híbrido. Adicionalmente, foi apresentado perfil médio calculado para o processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo usando a equação estequiométrica. Conforme foi discutido anteriormente, os valores de massa de células apresentados nos gráficos referem-se aos valores médios abaixo do ponto onde foi calculada a temperatura.

Conforme esperado, quanto maior a altura do leito, maior o valor de massa de células para o processo. O aumento da massa de células com a altura do biorreator é devido ao maior volume ocupado pelo leito, fazendo com que a massa acumulada seja maior. A eficácia e a confiabilidade do modelo híbrido podem ser avaliadas comparando-se os valores relacionados à massa de células calculadas na altura de 40 cm, uma vez que neste ponto tem-se o valor médio da massa de células calculado pela equação estequiométrica proposta no Cap IV, o qual se refere à média no interior do biorreator.

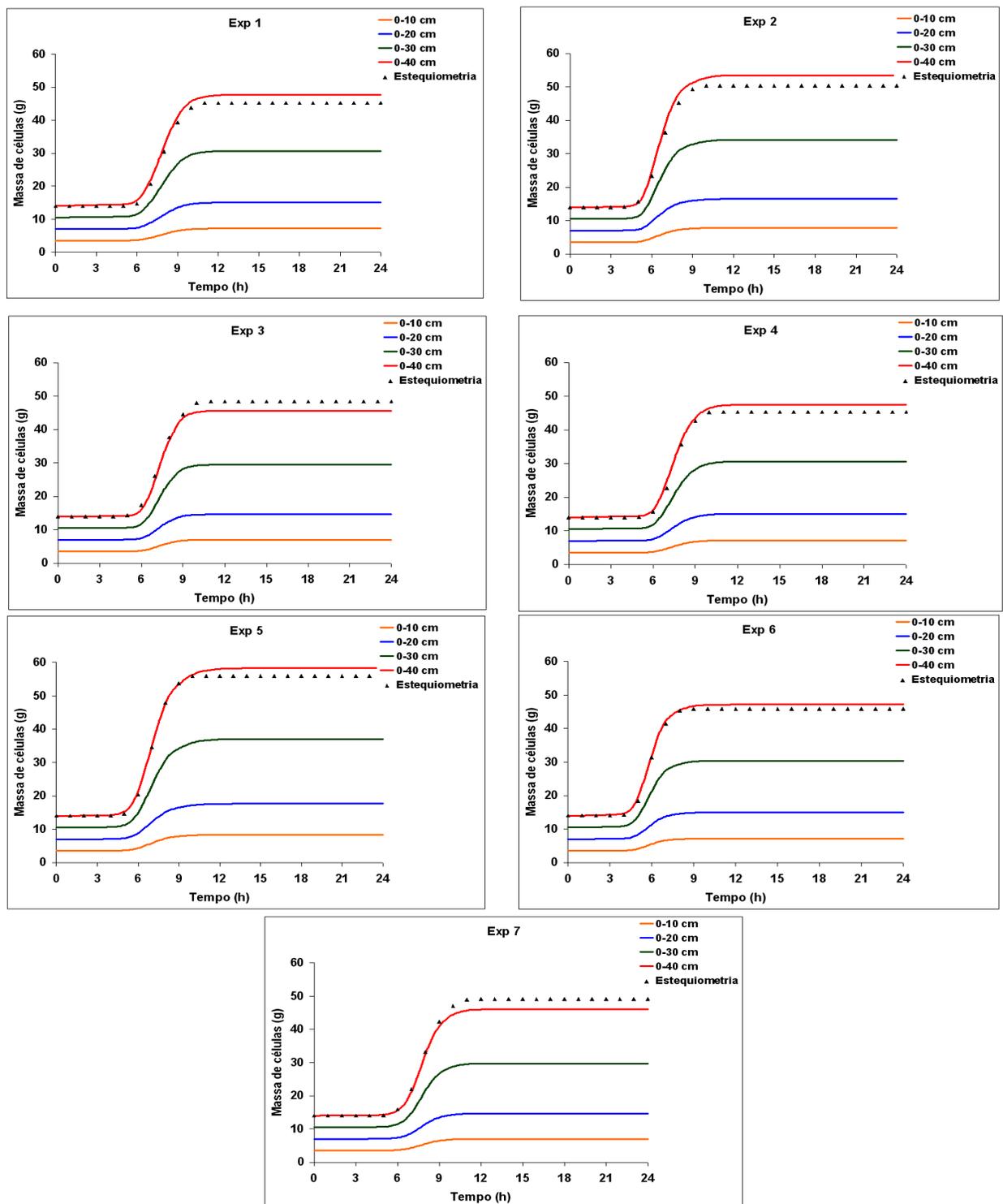


Figura VI.4: Comportamento dinâmico do crescimento microbiano em diferentes posições do leito no interior do biorreator de leito fixo obtido através da simulação numérica (Linhas contínuas) e através da equação estequiométrica (Pontos discretos).

Como pode ser visto, o modelo híbrido apresentou resultados satisfatórios com relação à simulação da massa de células obtida no interior do biorreator ao longo do tempo para todos os experimentos, inclusive o de validação (experimento 7). Os desvios obtidos foram baixos e estão relacionados com a predição da temperatura ao longo do biorreator, uma vez que o modelo híbrido apresentou desvios em relação aos valores experimentais. No entanto, estes desvios não comprometem a confiabilidade do modelo, o qual pode ser usado para fornecer informações mais precisas com relação ao crescimento microbiano no interior do biorreator.

A Figura VI.5 apresenta uma análise detalhada do crescimento microbiano nas diferentes zonas dentro do biorreator. Conforme detalhamento anterior, o biorreator foi dividido em 4 zonas com alturas de leito iguais. O crescimento microbiano foi avaliado considerando cada uma dessas zonas como sendo um micro-reator com condições pseudo-homogêneas. A massa inicial de células em cada uma das 4 zonas foi igual a 3,5 g, o que corresponde a massa inicial total dividida pelo número de zonas, devido à uniformidade da distribuição microbiano dentro do leito de fermentação.

O melhor desempenho com relação ao crescimento microbiano foi obtido nas zonas 3 e 4, as quais correspondem às alturas de 20-30 cm e 30-40 cm, respectivamente, enquanto que as zonas 1 e 2 (0-10 cm e 10-20 cm, respectivamente) apresentaram baixo crescimento. Os resultados obtidos na simulação são interessantes e, principalmente, coerentes, pois durante a operação do biorreator leito fixo a temperatura inicial do ar de entrada foi sempre inferior à ótima para o crescimento da levedura *K. marxianus*, que é 36°C. Conforme indicado na Figura VI.3, a temperatura nas zonas 1 e 2 não atingiram 36°C ao longo do processo, com conseqüente redução no crescimento microbiano. Por outro lado, as zonas 3 e 4 permaneceram períodos maiores nessa temperatura, o que pode ter favorecido o crescimento da levedura. Comparando o crescimento microbiano nas zonas 1 e 2 para os experimentos 1 e 3 (conduzidos nas temperaturas de 27 e 30°C, respectivamente) é possível verificar um melhor desempenho no experimento 3. Os resultados obtidos são possíveis de ocorrer na prática, uma vez que a umidade do leito sempre permaneceu dentro dos limites considerados ótimos para o crescimento da levedura em FES.

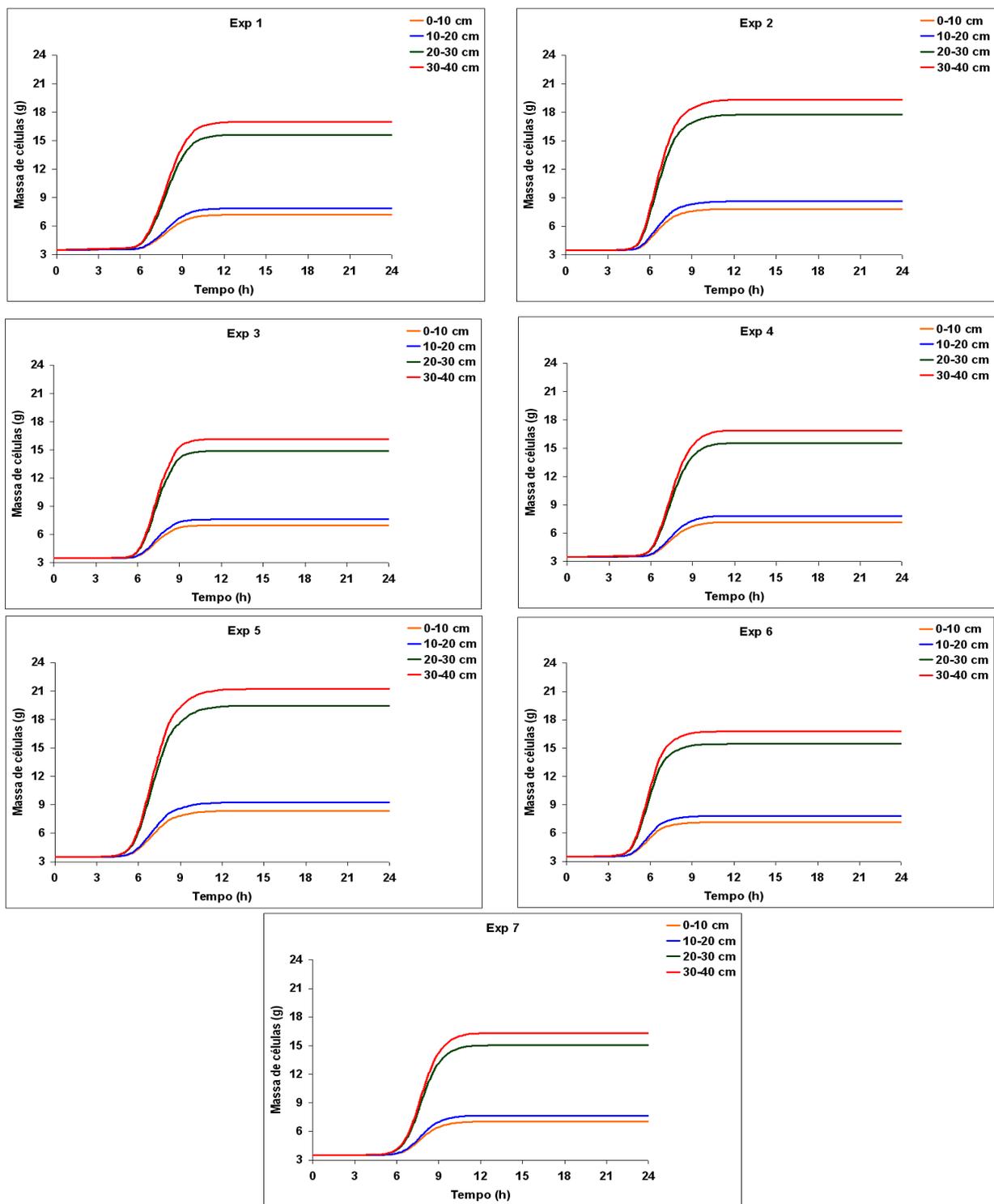


Figura VI.5 Comportamento dinâmico do crescimento microbiano em cada uma das quatro zonas dentro do biorreator de leito fixo obtido através da simulação numérica.

A partir dos resultados obtidos, surge a primeira questão: se o crescimento microbiano é favorecido nas zonas 3 e 4, por que a produção da enzima não acompanha o crescimento microbiano conforme verificado na Figura IV.6? A explicação para esse comportamento se deve ao fato de que a temperatura do processo atinge valores que podem acelerar o processo de desnaturação térmica. Mazutti *et al.* (2007) avaliou a termoestabilidade do extrato aquoso de inulinase obtida por FES numa faixa de temperatura compreendida entre 50 e 65°C. A desnaturação devido à temperatura ocorreu em toda a faixa, inclusive quando a enzima foi mantida à 50°C.

VI.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi tomado o devido cuidado para que todas as medidas experimentais pudessem ser aproveitadas no desenvolvimento do modelo matemático, principalmente na etapa de treinamento e validação da rede neural. Esse cuidado inicial resultou em um modelo capaz de descrever de maneira eficiente o processo de produção de inulinase por FES no biorreator leito fixo usado neste trabalho. O modelo híbrido proposto para a predição dos perfis de temperatura ao longo do biorreator mostrou ser uma ferramenta confiável na simulação dinâmica de biorreatores de leito fixo usados em FES, uma vez que foi verificada uma boa concordância entre os valores de temperatura obtidos experimentalmente e os valores calculados pelo modelo.

Com relação ao crescimento microbiano ao longo do processo, o modelo proposto mostrou boa correlação com os valores calculados através da estequiometria. Além disso, as simulações numéricas do processo indicaram que a levedura apresenta melhor desempenho nas zonas 3 e 4, devido à temperatura do leito ser próxima à ótima para o crescimento do microrganismo. Nesse sentido, estratégias de operação de biorreatores de leito fixo podem ser propostas visando aumentar o crescimento nas zonas 1 e 2, apesar de que isso levará ao aumento na temperatura do leito nestes pontos.

A principal vantagem do modelo proposto neste trabalho em relação aos reportados na literatura diz respeito ao fato de aproximar os fenômenos complexos associados ao crescimento microbiano através de uma rede neural. As redes neurais, quando bem treinadas e validadas, tornam-se ferramentas úteis em modelagem de processos.

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES

VII.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE INULINASE POR FES

A metodologia de planejamento de experimentos e análise de superfície de resposta foi utilizada para a otimização da massa inicial de células, temperatura e vazão volumétrica do ar de entrada no biorreator de leito fixo para a produção de inulinase por FES usando a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. A máxima produção de inulinase obtida após 24 h de fermentação foi 437 ± 36 U.gds⁻¹, cuja atividade corresponde a uma produtividade de $18,2$ U.gds⁻¹.h⁻¹. As condições ótimas de operação com relação a massa inicial de células, temperatura e vazão volumétrica do ar de entrada foram 22 g, 30°C e $2,4$ m³.h⁻¹, respectivamente. A alta produtividade obtida neste trabalho demonstrou a viabilidade técnica da produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo com capacidade para 3 kg (base seca).

VII.2 AVALIAÇÃO CINÉTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE INULINASE POR FES

Neste trabalho foi avaliado o perfil cinético dos principais compostos associados com o metabolismo da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, através da realização de 7 experimentos a diferentes temperaturas e vazões volumétricas do ar de entrada no biorreator, mantendo fixa a massa inicial de células em 14 g. Com relação aos coeficientes de rendimento, o valor de $Y_{X/S}$ foi mais elevado na temperatura de 33°C, independente da vazão volumétrica de ar. A vazão volumétrica apresentou influência nos valores do coeficiente de rendimento de calor metabólico $Y_{Q/X}$, os quais foram consideravelmente menores nos experimentos à vazão de 3 m³.h⁻¹, comparando com os obtidos à vazão de 2 e $2,4$ m³.h⁻¹. Os maiores valores de $Y_{Q/X}$, $Y_{X/O}$ e QR foram verificados no experimento 1, cuja temperatura do ar de entrada foi 27°C e vazão volumétrica de ar de 2 e $2,4$ m³.h⁻¹.

Com relação aos perfis cinéticos, verificou-se que as maiores produções (em termos mássicos) de etanol, CO₂, biomassa, inulinase, água metabólica e consumo de O₂ e ART

ocorreram nos experimentos 2, 5 e 7, onde os experimentos foram conduzidos na temperatura do ar de entrada de 30°C e diferentes vazões volumétricas de ar. A maior produção de calor metabólico ocorreu no experimento, conduzido à 30°C e 2 m³.h⁻¹. A massa final de células foi diretamente proporcional à massa de ART consumida (com exceção do experimento 1), sendo que os maiores valores foram obtidos nos experimentos 2, 5 e 7. No experimento 1 o consumo de ART foi similar aos obtidos nos experimentos 2 e 7, porém a produção de células foi a menor entre todos os experimentos realizados.

VII.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *K. marxianus* EM FES

Neste trabalho foi desenvolvido e validado o modelo matemático baseado em RNA, para simular as principais taxas associadas ao crescimento e a produção de inulinase da levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em FES. Os resultados mostraram que o modelo proposto foi apto a prever de forma eficiente e confiável os perfis das taxas de etanol, CO₂, O₂, biomassa, ART, água e calor metabólico, além da produção de inulinase, tanto na etapa de treinamento da RNA, quanto na etapa de validação. O modelo proposto pode ser incorporado efetivamente nas equações de balanço de massa e energia para simular o comportamento dinâmico de biorreatores de leito fixo para FES, podendo-se obter informações confiáveis a respeito do crescimento microbiano no processo, mesmo com todas as dificuldades encontradas na extração e separação das células e produtos metabólicos do meio fermentado.

VII.4 MODELAGEM MATEMÁTICA DOS PERFIS DE TEMPERATURA E BIOMASSA NO INTERIOR DO BIORREATOR DE LEITO FIXO

O modelo híbrido proposto neste trabalho para a predição dos perfis de temperatura ao longo do biorreator mostrou ser uma ferramenta confiável na simulação dinâmica do biorreatores leito fixo usados em FES, uma vez que foi verificada uma boa concordância

entre os valores de temperatura obtidos experimentalmente e os valores calculados pelo modelo. Sendo assim, o mesmo pode ser usado como uma boa ferramenta para a otimização, controle e aumento de escala do processo de produção de inulinase por FES no biorreator de leito fixo. Com relação ao crescimento microbiano ao longo do processo, o modelo proposto mostrou boa correlação com os valores calculados através da estequiometria. Além disso, as simulações numéricas do processo indicaram que a levedura apresenta melhor desempenho nas zonas 3 e 4, devido à temperatura do leito ser próxima à ótima para o crescimento do microrganismo.

CAPÍTULO VIII

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa surgiram algumas sugestões importantes para serem avaliadas futuramente. Entre elas tem-se:

- Avaliar a produção de inulinase por FES usando biorreatores do tipo tambor rotativo, uma vez que a agitação do leito poderia prevenir os gradientes acentuados de temperatura no leito, melhorando a performance do processo.
- Os resultados apresentados no Cap IV com relação à estimativa da produção de etanol a partir da equação estequiométrica proposta foram interessantes do ponto de vista industrial, onde foi verificado um alto rendimento, comparável ao processo de produção por fermentação submersa. Estes resultados preliminares sugerem a investigação experimental para confirmar os valores obtidos, uma vez que o processo de separação do etanol do substrato sólido é muito mais fácil que a separação do caldo líquido fermentado.
- Os resultados referentes ao perfil de umidade ao longo do biorreator mostraram que a umidade do leito não é limitante no processo, onde ocorre um aumento de cerca de 10% na umidade do substrato. Este aspecto é interessante, uma vez que a remoção de calor metabólico através da evaporação pode ser estudada, através do emprego de ar seco para realizar a aeração do sistema ao invés de ar saturado com água.
- Uso do modelo híbrido para avaliar o processo de produção de inulinase em escala maior e validar experimentalmente as previsões feitas pelo modelo.

CAPÍTULO IX

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17th ed. Gaithersburg, 2000.

ASHLEY, V. M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T., Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 141-150, 1999.

AYYACHAMY, M.; KHELAWAN, K.; PILLAY, D.; PERMAUL, K.; SINGH, S., Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 439-444, 2007.

BENDER, J. P.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., Inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 using solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 951-958, 2006.

BENDER, J. P.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H., Extraction of inulinase obtained by solid state fermentation of sugarcane bagasse by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 149, n. 3, p., 195-203, 2008.

BOVILL, R.; BEW, J.; COOK, N.; D'AGOSTINO, M.; WILKINSON, N.; BARANYI, J., Predictions of growth for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* during fluctuating temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 59, p. 157-165, 2000.

BRAND, D.; PANDEY, A.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; ROUSSOS, S.; BRAND, I.; SOCCOL, C. R., Packed-bed column fermenter and kinetic modeling for upgrading the nutritional quality of coffee husk in solid-state fermentation. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 1065-1070, 2001.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A., Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2006.

DALSENTER, F. D. H.; VICCINI, G.; BARGA, M. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N., A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 801-807, 2005.

DEUFLHARD, E., HAIRER, E., ZUGCK, J. One step and extrapolation methods for differential-algebraic systems. **Numerical Mathematics**, v. 51, p. 501-516, 1987.

DURAND, A., Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 113-125, 2003.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C., Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 7, p. 596-601, 2001.

FANAEI, M. A.; VAZIRI, B. M., Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, DOI: 10.1016/j.cep.2008.06.001, 2008.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; PÉREZ-CORREA, J. R., Realistic model of a solid substrate fermentation packed-bed pilot bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, p., 224-234, 2007.

FONSECA, G. G.; GOMBERT, A.K.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C., Physiology of the yeast *Kluyveromyces marxianus* during batch and chemostat cultures with glucose as the sole carbon source. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 422-435, 2007.

GUO, N.; GONG, F.; CHI, Z.; SHENG, J.; LI, J., Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 499-507, 2009.

HAALAND, P. D., **Experimental design in biotechnology**, Marcel Dekker, INC, New York, 1989.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; HEJAZI, P.; SHOJAOSADATI, S. A.; HOOGSCHAGEN, M.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; RINZEMA, A., A two-phase kinetic model for fungal growth in solid-state cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 36, p. 100-107, 2007.

HIMMELBLAU, D. M., **Basic principles and calculations in chemical engineering**, 5^o ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1982.

IKASARI, L.; MITCHELL, D. A.; STUART, D. M.; Response of *Rhizopus oligosporus* to temporal temperature profiles in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, p. 722-728, 1999.

IKASARI, L.; MITCHELL, D. A., Two-phase model of the kinetics of growth of *Rhizopus oligosporus* in membrane culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n^o 6, p. 619-627, 2000.

KHANAHMADI, M.; ROOSTAAZAD, R.; MICHELL, D. A.; MIRANZADEH, M.; BOZORGMERHI, R.; SAFEKORDI, A., Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 5654-5663, 2006.

LAURENTINO, C. L., **Transferência de calor em leitos fixos com aplicação em reatores de fermentação em estado sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto, 2007.

LEKANDA, J. S.; PÉREZ-CORREA, J. R., Energy and water balances using kinetic modeling in a pilot-scale SSF bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1793-1802, 2004.

LINKO, S.; ZHU, Y. H.; LINKO, P., Applying neural networks as software sensors for enzyme engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 155-162, 1999.

MACHADO, C. M. M.; OISHI, B. O.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R., Kinetics of *Gibberella fujikuroi* growth and gibberellic acid production by solid-state fermentation in a packed-bed column bioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1449-1453, 2004.

MAKINO, Y.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., Inulinase bio-production using agroindustrial residues: screening of microorganisms and process parameters optimization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology, In press*, 2009.

MAZUTTI, M. A.; BENDER, J. P.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M., Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 56-59, 2006.

MAZUTTI, M. A.; CENI, G.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, p. 297-304, 2007.

MAZUTTI, M. A.; CORAZZA, M. L.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; CORAZZA, F.; TREICHEL, H., Inulinase production in a batch bioreactor using agroindustrial residues as the substrate: experimental data and modeling. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 85-95, 2009.

von MEIEN, O. F.; MITCHEL, D. A., A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n° 4, p. 416-428, 2002.

von MEIEN, O. F.; LUZ, L. F. L.; MITCHELL, D. A.; PÉREZ-CORREA, J. R.; AGOSIN, E.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; ARCAS, J. A., Control strategies for intermittently mixed, forcefully aerated solid-state fermentation bioreactors based on the analysis of a distributed parameter model. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 4493-4504, 2004..

MILER, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

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

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

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

MITCHELL, D. A.; von MEIEN, O. F.; KRIEGER, N.; DALSENTER, F. D., A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, p. 15-26, 2004.

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

MOHANTY, M.; GHADGE, R. S.; PATIL, N. S.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; DESHPANDE, A. V., Deactivation of lipase at gas-liquid interface in stirred reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 56, p. 3401-3408, 2001.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J., **Bioreaction Engineering Principles**. Plenum Press, New York, 1994.

NOPHARATANA, M.; HOWES, T.; MITCHELL, D. A., Modeling fungal growth on surfaces. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p. 313-318, 1998.

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

PERRY, R. H.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O., **Perry's chemical engineer's handbook**. 6^o Ed., McGraw-Hill, New York, 1984.

PIRT, S. J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences**, v. 163, p. 224-231, 1965.

PRESS, W.H.; TEUKOLSKY, S. A.; VETTERLING, W. T.; FLANNERY, B. P., **Numerical Recipes in FORTRAN** (2nd ed., pp.704-705). USA:Cambridge University Press, 1992.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G., Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127-135, 2003.

RAJAGOPALAN, S.; MODACK, J. M., Evaluation of relative growth limitation due the depletion of glucose and oxygen during fungal growth on a spherical solid particle. **Chemical Engineering Science**, v. 50, p. 803-811, 1995.

RAJAGOPALAN, S.; ROCKSTRAW, D. A.; MUNSON-McGEE, S. H., Modeling substrate particle degradation by *Bacillus coagulans* biofilm. **Bioresource Technology**, v. 61, p. 175-183, 1997.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F., **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Casa do Pão, Campinas – SP, Brasil, 2005.

ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; PREBOIS, J. P.; LONSANE, B. K., Zymotis, a large scale solid state fermenter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, p. 37-52, 1993.

SAHIR, A. H.; KUMAR, S.; KUMAR, S., Modelling of a packed bed solid-state fermentation bioreactor using N-tanks in series approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 20-28, 2007.

SAINZ, J.; PIZARRO, F.; PÉREZ-CORREA, J. R.; AGOSIN, E. Modeling of yeast metabolism process dynamics in batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n° 7, p. 818-828.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A., Incorporation of death kinetics into a 2-D dynamic heat transfer model for solid-state fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 64, p. 253-260, 1998.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D. A., Validation of a model describing 2-dimensional heat transfer during solid-state in packed-bed bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, p. 739-749, 1998.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G., Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.

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

SCHWAAB, M.; BISCAIA, E. C.; MONTEIRO, J. L.; PINTO, J. C., Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 1542-1552, 2008.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A., Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 851-858, 1999.

SGUAREZI, C.; LONGO, C.; CENI, G.; BONI, G.; SILVA, M. F.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; TREICHEL, H., Inulinase production by agroindustrial residues: acid pretreatment of substrates and optimization of production. **Food Bioprocess and Technology**, v.2, p. 409-414, 2009.

SHENG, J; CHI, Z.; YAN, K.; WANG, X.; GONG, F.; Li, J., Use of response surface methodology for optimizing process parameters for high inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a in solid-state fermentation and hydrolysis of inulin. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 333-339, 2009.

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; MAUGERI, F., Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 717-724, 2005.

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; CONVERTI, A.; MAUGERI, F., Intrinsic activity of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 and carbon and nitrogen balances. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p.479-483, 2006.

TEREBIZNIK, M. R.; PILOSOFF, A. M.R., Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 215-219, 1999.

TREICHEL, H; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., Technical viability of the integrated production of inulinase using pré-treated agroindustrial residues. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, DOI: 10.1007/s00449-008-0262-0, 2008.

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

VIRTATEN, V.; NYSSOLA, A.; LEISOLA, M.; SEISKARI, P., An aseptically operatable static solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, *In press*, 2008.

WEBER, F. J.; OOSTRA, J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A., Validation of a model for process development and scale-up of packed-bed solid-state bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n° 4, p. 381-393, 2002.

XIONG, C.; JINHUA, W.; DONGSHENG, L. Optimization of solid-state medium for the production by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 179-184, 2007.