



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO NO CULTIVO EM ESTADO
SÓLIDO DE *Drechslera (Helminthosporium) monoceras***

Reinaldo Gaspar Bastos
Autor

Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana
Orientadora

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da
Universidade Estadual de Campinas como requisito final para obtenção do título de
Doutor em Engenharia Química

Campinas, 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

B297t Bastos, Reinaldo Gaspar
Transferência de oxigênio no cultivo em estado
sólido de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* /
Reinaldo Gaspar Bastos.--Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Engenharia bioquímica. 2. Oxigênio -
Transferência. 3. Fungos - Crescimento. I. Santana,
Maria Helena Andrade. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III.
Título.

Titulo em Inglês: Oxygen transfer in solid state cultivation of *Drechslera*
(*Helminthosporium*) *monoceras*

Palavras-chave em Inglês: Solid state cultivation, Oxygen transfer,
Drechslera

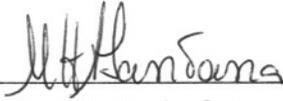
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Leda dos Reis Castilho, Ranulfo Monte Alegre, Silvio
Roberto Andrietta e Salah Din Mahmud Hasan.

Data da defesa: 18/12/2006

Tese de Doutorado defendida por Reinaldo Gaspar Bastos e aprovada em 18 de dezembro de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana (orientadora)



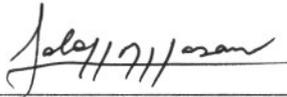
Prof^a Dr^a Leda dos Reis Castilho



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre



Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta



Prof. Dr. Salah Din Mahmud Hasan

TCR/CLM

Este exemplar corresponde a versão final da tese de doutorado em Engenharia Química.

Prof^a Dr^a Maria Helena Andrade Santana

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Maria Helena Andrade Santana pela sua orientação sempre eficiente e pela amizade sincera que cultivamos durante estes anos de convivência harmoniosa.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Processos Biotecnológicos (DPB/FEQ/UNICAMP) Adriano, Aline, Amanda, Ana Paula, André, Beatriz, Christiane, Christine, Classius, Cláudia, Elaine, Fernanda, Fernando, Giuliana, Humberto, Luciana, Lucimara, Pablo, Patrícia, Rafaela, Raquel, Salah, Tatiana e Thaís, pelos momentos que passamos juntos e pelo aprendizado que tive com eles.

Aos amigos do laboratório Amós e Gilson, pela amizade, companheirismo e por todos os momentos de descontração que passamos.

À Kelly, Andréa e Aline do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/UNICAMP) pelas micrografias, pela análise de fisioadsorção e granulometria no Mastersizer S (Malvern).

Ao Laboratório de Interação Molecular e Bioengenharia (LIMBio/FEQ/UNICAMP), em particular ao colega Igor pela sua ajuda no SDS-Page.

Ao Prof. Dr. Walderez Gamabale (ICB/USP), pelo fornecimento da cepa de *D. monoceras*.

Ao Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

Ao pessoal de Guarapuava/PR, em especial ao Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Centro-Oeste (DEALI/UNICENTRO), pelo incentivo à qualificação do seu quadro docente.

A todos que participaram e de alguma forma contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus familiares, pelo incentivo.

À Mariana pelo seu amor, carinho e companheirismo durante todos esses anos, e ao Murilo, por ter surgido na minha vida.

A Aquele, responsável por tudo.

RESUMO

O cultivo em estado sólido tem merecido expressiva atenção nos últimos anos pelas vantagens oferecidas principalmente nos processos que envolvem fungos filamentosos. Entretanto, o interesse pelos fenômenos de transferência de massa e pelo desempenho de biorreatores é objeto de estudos mais recentes, motivado pelo escalonamento dos processos. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo estudar a transferência de oxigênio no processo de produção de proteínas alergênicas obtidas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* por cultivo em estado sólido em colunas de leito fixo com farelo de trigo e espuma de poliuretano. Os resultados indicam que vazões de ar da ordem de 1L/min e 30mm de altura de leito de partículas mantêm a umidade inicial do meio sólido praticamente constante para farelo de trigo. Essas condições asseguram os melhores valores de K_{La} s, além de minimizar a compactação do leito, permitir o crescimento na fase aérea e assegurar a ausência de água livre durante o processo. O cultivo em espuma de poliuretano apresenta produção de proteínas superior aos ensaios com farelo de trigo devido à manutenção das propriedades físicas da matriz sólida inerte. Foram identificadas proteínas na faixa de 15 a 139kDa para ensaios em farelo de trigo e 11 a 244kDa sobre espuma de poliuretano, sendo que as frações indicadas como mais alergênicas 14,4, 36 e 60kDa foram encontradas para os dois tipos de suportes. Estes resultados mostram que condições selecionadas de vazão de ar, altura de leito e suporte sólido preservam a ausência de água livre no cultivo em estado sólido, aumentando a produção das proteínas alergênicas e facilitando o controle do processo.

Palavras-chave: cultivo em estado sólido, transferência de oxigênio, *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*

ABSTRACT

In recent years, a resurgence of interest in solid-state cultivation has been observed due to its numerous advantages, mainly concerning the growth of filamentous fungi. However, studies on the oxygen transfer and performance of bioreactors are still scarce. The main difficulties faced by process scale-up are the control of parameters and limiting oxygen transfer. The aim of this research was to study the oxygen transfer for the production of allergenic proteins from the biomass of *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* cultured on wheat bran and polyurethane foam. Results indicated that flow rates about 1L/min and 30mm of bed height lead to the best values of overall oxygen transfer coefficient (K_La) on wheat bran, showing no substrate bed packing and formation of aerial hyphae, maintaining the characteristics of solid state cultivation. Evaluation of polyurethane foam showed high protein production, without changing the physical properties of support. SDS-Page assays identified proteins from crude extract in an approximate range of 15 to 139kDa and 11 to 244kDa for polyurethane foam and for wheat bran, respectively. The pool of proteins obtained includes the molecular masses, identified in previous works, as the most allergenic fractions (14,4, 36 and 60kDa). These results show that selected conditions of air-flow rate, bed height and solid support preserve the absence of free water in solid state cultivation, increasing the production of allergenic proteins and facilitating the control of the process.

Key-words: solid state cultivation, oxygen transfer, *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	II
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
SUMÁRIO.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XVII
NOMENCLATURA.....	XVIII
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Cultivo em estado sólido	7
3.2 Transferência de massa nos cultivos em estado sólido.....	9
3.3 Transferência de oxigênio	15
3.3.1 Caracterização da transferência de oxigênio	18
3.4 Tipos de biorreatores	21
3.5 Suportes para processos em estado sólido.....	27
3.6 Determinação da concentração celular no cultivo em estado sólido.....	32
3.6 Extratos alergênicos.....	35
3.7 Extratos alergênicos de <i>Drechslera (Helminthosporium) monoceras</i>	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Materiais	37
4.2 Caracterização dos suportes.....	37
4.2.1 Densidade e porosidade dos suportes	37
4.2.2 Área superficial dos suportes	38
4.2.3 Análise granulométrica.....	38
4.3 Preparo do inóculo	39
4.3.1 Manutenção das culturas	39
4.3.2 Pré-cultivo.....	39
4.4 Caracterização dos cultivos em estado sólido em colunas de Raimbault	41

4.5 Cultivos em estado sólido com farelo de trigo	42
4.6 Cultivos sobre suporte inerte.....	44
4.7 Obtenção do extrato fúngico bruto.....	45
4.8 Análises.....	45
4.8.1 Conteúdo de umidade do suporte sólido	45
4.8.2 pH do meio sólido	46
4.8.3 Teor de proteína no extrato bruto fúngico.....	46
4.8.4 Teor de açúcares redutores no extrato bruto fúngico.....	46
4.8.5 Rendimento de glicose em proteínas	47
4.8.6 Caracterização das proteínas por SDS-PAGE	47
4.9 Determinação do coeficiente global de transferência de oxigênio	48
4.10 Estimativas da concentração celular	52
4.10.1 Demanda de oxigênio.....	52
4.10.2 Grau de empacotamento do meio sólido	53
4.10.3 Balanço do grau de redução	53
4.10.4 Balanço do conteúdo de água no meio sólido	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Caracterização dos suportes sólidos e dos seus leitos	57
5.1.1 Densidade aparente e porosidade dos leitos	57
5.1.2 Área superficial, tamanho e volume de poros dos suportes	66
5.1.3 Diâmetro médio do farelo de trigo	67
5.2 Inóculo	70
5.3 Cultivo em estado sólido em colunas de leito fixo	71
5.4 Estabelecimento dos níveis de vazão de ar e altura de leito - Ensaio na ausência de microrganismos.....	76
5.4.1 Cultivo em estado sólido.....	77
5.4.1.1 Influência da altura do leito e vazão de ar.....	77
5.4.1.2 Influência da altura de leito à vazão de ar 1L/min.....	83
5.4.1.3 Influência da vazão de ar para altura de leito 30 mm	86
5.5 Influência da umidade inicial do meio sólido e tamanho de partícula	93
5.6 Avaliação da transferência de oxigênio em coluna de leito fixo com maiores dimensões	106
5.7 Avaliação da transferência de oxigênio em cultivos sobre suporte inerte.....	112

5.8 Caracterização das proteínas produzidas por eletroforese SDS-PAGE	123
5.9 Estimativa da biomassa celular.....	127
6 CONCLUSÕES.....	135
7 SUGESTÕES	137
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
ANEXOS.....	148
ANEXO I – Perfil de concentração de oxigênio no filme líquido	148
ANEXO II – Curvas-padrão e de calibração.....	151
ANEXO III – Correlações	154
ANEXO IV – Isotermas de BET para os suportes inertes.....	156
ANEXO V – Distribuição de tamanho de partículas	159
ANEXO VI – Perfis de umidade do meio sólido, proteína e glicose do extrato fúngico, rendimento de glicose em proteínas e taxa de transferência de oxigênio para diferentes alturas de leito	162

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Fenômenos macroscópicos que ocorrem nos biorreatores durante o crescimento fúngico sobre suportes sólidos.....	10
Figura 3.2 Fenômenos microscópicos que ocorrem nos biorreatores durante o cultivo sobre suportes sólidos.....	11
Figura 3.3 Etapas para a adesão de células aplicadas na fermentação em estado sólido e crescimento de biofilmes	13
Figura 3.4 Modelo de crescimento de fungos filamentosos	14
Figura 3.5 Modelo de reação-difusão.....	15
Figura 3.6 Resistência ao transporte de oxigênio nos cultivos em estado sólido	19
Figura 3.7 Biorreatores de mistura e aeração forçada.....	23
Figura 3.8 Esquema das colunas de leito fixo em escala de laboratório (colunas de raimbault).....	24
Figura 3.9 Esquema de coluna esterilizável para escala de laboratório	24
Figura 3.10 Sistemas em leito fixo e nas condições mínimas de fluidização.....	26
Figura 3.11 Representação da perda de matéria seca.....	34
Figura 4.1 Sistema de colunas de raimbault apresentando doze colunas em banho termostatizado	41
Figura 4.2 Sistema de colunas para avaliação da transferência de oxigênio em diferentes alturas de leito fixo.....	43
Figura 4.3 Unidade experimental para biorreator de coluna (50mm x 320 mm)	43
Figura 4.4 Sistema de coluna com leito de espuma de poliuretano.....	44
Figura 4.5 Representação dos mecanismos de transferência de oxigênio nos cultivos em estado sólido	49
Figura 5.1 Fotografias das partículas de 0,35mm do farelo de trigo.....	62
Figura 5.2 Fotografias das partículas de 0,59mm do farelo de trigo.....	63
Figura 5.3 Fotografias da espuma de poliuretano	64

Figura 5.4 Fotografias dos suportes saturados com água.....	65
Figura 5.6 Fotografia do inóculo de <i>Drechslera</i> produzido em frascos erlenmeyers contendo meio ágar-czapeck.....	70
Figura 5.7 Comportamento da fermentação para a produção de biomassa de <i>D. monoceras</i> conduzida em colunas de Raimbault com farelo de trigo como substrato para 200 mm de altura de leito	72
Figura 5.8 Umidade do meio sólido estimada pelo balanço de massa e pela medida experimental.....	75
Figura 5.9 Perfis axiais de umidade do leito de partículas com vazão de ar de 0,03 e 1 L/min	76
Figura 5.10 Perfis de umidade do meio sólido para diferentes vazões e alturas de leito (farelo de trigo 0,59mm).....	77
Figura 5.11 Perfis de proteína no extrato bruto obtido para diferentes vazões e alturas de leito (farelo de trigo 0,59mm)	78
Figura 5.12 Perfil de glicose no extrato bruto obtido para diferentes vazões e alturas de leito (farelo de trigo 0,59mm)	78
Figura 5.13 Perfis de $Y_{p/s}$ nas diferentes condições de vazão de ar e altura de leito (farelo de trigo 0,59mm).....	80
Figura 5.14 Perfis das taxas de transferência de oxigênio (N) por volume de sólidos no meio em função da vazão e altura do leito (farelo de trigo 0,59mm)	82
Figura 5.15 Perfis das taxas de consumo de oxigênio por volume de biofilme nas em função da vazão e altura do leito (farelo de trigo 0,59mm)).....	82
Figura 5.16 Perfis de umidade em diferentes alturas de leito (vazão de ar 1l/min; farelo de trigo 0,59mm).....	84
Figura 5.17 Perfis de proteína no extrato bruto (vazão de ar 1L/min; farelo de trigo 0,59mm)	84
Figura 5.18 Perfis de glicose no extrato bruto.....	84
Figura 5.19 Perfis do rendimento proteína/glicose	85
Figura 5.20 Perfis da taxa N (vazão de ar 1L/min; farelo de trigo 0,59mm).....	86
Figura 5.21 Perfis radiais da concentração de oxigênio dissolvido no filme líquido (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm)	88

Figura 5.22 Perfis de umidade para diferentes vazões de ar	89
Figura 5.23 Perfis da taxa de transferência de oxigênio obtidos para diferentes vazões de ar	89
Figura 5.24 Perfis da taxa de consumo de oxigênio por volume de biofilme nas diferentes vazões de ar (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm).....	90
figura 5.25 Perfis de umidade do substrato sólido e proteína obtidas a partir do extrato fúngico para cultivos a 0,4 L/min (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm)	91
Figura 5.26 Rendimento de glicose em proteína para cultivos a 0,4 L/min (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm)	92
Figura 5.27 Perfis de umidade do meio sólido com farelo de trigo 0,59mm para diferentes umidades iniciais	93
Figura 5.28 Perfis de proteína no extrato bruto para os cultivos com farelo de trigo 0,59mm a diferentes umidades iniciais	94
Figura 5.29 Perfis radiais de oxigênio dissolvido no biofilme para as diferentes umidades iniciais do meio sólido com farelo de trigo 0,59 mm	95
Figura 5.30 Perfis da taxa de transferência de oxigênio para cultivos sobre farelo de trigo 0,59 mm com diferentes umidades iniciais.....	96
Figura 5.31 Perfil do K_La para leito de farelo de trigo 0,59mm com 25% de umidade inicial	96
Figura 5.32 Perfil do K_La para leito de farelo de trigo 0,59 mm com 35% de umidade inicial	97
Figura 5.33 Perfil do K_La para leito de farelo de trigo 0,59 mm com 45% de umidade inicial	97
Figura 5.34 Fotografias das partículas de farelo de trigo 0,59mm com 11 dias de cultivo a 35% de umidade inicial	98
Figura 5.35 Perfis de umidade do meio sólido com farelo de trigo 0,35mm para diferentes umidades iniciais	98
Figura 5.36 Perfis de proteínas solúveis no extrato bruto para diferentes umidades iniciais em leitos de farelo de trigo 0,35mm	99
Figura 5.38 Perfis da taxa de transferência de oxigênio para cultivos sobre farelo de trigo 0,35 mm com diferentes umidades iniciais.....	102

Figura 5.39 Perfil do K_La ao longo do biofilme com 25% de umidade inicial do meio sólido de farelo de trigo 0,35 mm	104
Figura 5.40 Perfil do K_La com 35% de umidade inicial do meio sólido de farelo de trigo 0,35mm.....	104
Figura 5.41 Perfil do K_La com 45% de umidade inicial do meio sólido de farelo de trigo 0,35 mm.....	105
Figura 5.50 Fotografias da espuma de poliuretano com 11 dias de cultivo a 45% de umidade inicial e 0,4L/min de vazão de ar	112
Figura 5.51 Taxa de transferência de oxigênio ao longo do cultivo em espuma de poliuretano para todas as condições de umidades iniciais com 0,4L/min de vazão de ar.....	113
Figura 5.52 Perfis de K_La no cultivo com espuma de poliuretano com 0,4l/min de vazão de ar em diferentes umidades iniciais.....	114
Figura 5.53 Perfil de umidade do suporte inerte durante o cultivo com 0,4L/min de vazão de ar	115
Figura 5.54 Umidade do meio sólido estimada pelo balanço de massa e pela medida experimental para vazão de ar 0,4L/min	116
Figura 5.55 Perfil de proteínas no extrato bruto durante o cultivo em suporte inerte com 0,4L/min de vazão de ar.....	116
Figura 5.56 Perfil da glicose no extrato bruto durante o cultivo em suporte inerte com 0,4L/min de vazão de ar.....	117
Figura 5.57 Perfil do rendimento no cultivo em suporte inerte com 0,4 L/min de vazão de ar.....	117
Figura 5.58 Perfil de umidade do meio sólido durante o cultivo em espuma de poliuretano com 1L/min de vazão de ar.....	118
Figura 5.59 Umidade do meio sólido estimada pelo balanço de massa e pela medida experimental para vazão de ar 1L/min.....	119

Figura 5.60 Perfil de proteínas no extrato bruto durante o cultivo com espuma de poliuretano a 1L/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial.....	119
Figura 5.61 Perfil da glicose no extrato bruto durante o cultivo em espuma de poliuretano com 1L/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial.....	120
Figura 5.62 Perfil do rendimento do cultivo em espuma de poliuretano com 1l/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial.....	120
Figura 5.63 Taxa de transferência de oxigênio ao longo do cultivo em espuma de poliuretano para 1L/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial.....	121
Figura 5.64 Perfis de K_La no cultivo com espuma de poliuretano com 1L/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial.....	122
Figura 5.67 Perfis de oxigênio dissolvido para as diferentes concentrações de inóculo.	127
Figura 5.68 Relação entre a taxa de consumo de oxigênio e concentração de biomassa	129
Figura 5.70 Curva de crescimento em espuma de poliuretano estimada pela demanda de oxigênio (condições de cultivo: umidade inicial 45%, altura de leito 30mm, vazão de ar 0,4L/min).....	130
Figura 5.71 Perfil de gás carbônico produzido nos cultivos com suporte inerte e natural	131
Figura 5.72 Estimativa da concentração celular para cultivo com suporte inerte e natural através do balanço do grau de redução	132
Fig. 5.73 Matriz de correlações das estimativas de biomassa para farelo de trigo	133
Fig. 5.74 Matriz de correlações das estimativas de biomassa para espuma de poliuretano	134

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1 Densidade aparente e porosidade dos leitos formados por partículas de farelo de trigo e cilindro de espuma de poliuretano de diâmetro 30mm.....	59
Tabela 5.2 Caracterização do farelo de trigo 0,35mm com diferentes umidades e da porosidade do leito de partículas.....	59
Tabela 5.3 Caracterização do farelo de trigo 0,59mm com diferentes umidades e da porosidade do leito de partículas.....	59
Tabela 5.4 Caracterização do filme líquido em espuma de poliuretano com diferentes umidades.....	61
Tabela 5.5 Caracterização dos suportes saturados com água.....	61
Tabela 5.6 Área superficial, tamanho médio e volume de poros para os farelos de trigo e espuma de poliuretano determinados através das isotermas de BET.....	67
Tabela 5.7 Dados dos rendimentos de glicose em células para farelo de trigo 0,59mm para diferentes condições de vazão e altura de leito.....	80
Tabela 5.8 Dados dos rendimentos de glicose em células para farelo de trigo 0,59mm nas diferentes alturas de leito.....	85
Tabela 5.9 Estimativa da produção de água a partir da taxa de produção de gás carbônico.....	132

NOMENCLATURA

a	Área interfacial por volume	m^2/m^3
BSA	Albumina do soro bovino	
$D_{O_2,G}$	Difusividade de oxigênio na fase gasosa	m^2/s
$D_{O_2,L}$	Difusividade de oxigênio na fase líquida	m^2/s
C_G	Concentração de oxigênio na fase gasosa	mol/m^3
C_L	Concentração de oxigênio na fase líquida	mol/m^3
C_L^*	Concentração de oxigênio na saturação	mol/m^3
dp	Diâmetro das partículas	m
E	Taxa de evaporação de água	g/g.h
FEQ	Faculdade de Engenharia Química	
F_W	Quantidade de água adicionada por meio sólido	g/h
k_G	Coeficiente convectivo de transferência de massa	m/s
$K_L a$	Coeficiente global de transferência de oxigênio	s^{-1}
k_w	Fator de conversão de água/CO ₂ produzidos	g/g
LDPB	Laboratório de desenvolvimento de processos biotecnológicos	
LIMBio	Laboratório de Interação Molecular e Bioengenharia	
LRAC	Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração	
M_S	Massa de sólidos	g
m_X	Concentração celular (base seca)	mg/g
N	Taxa de transferência de oxigênio	$mol/m^3.s$
n_p	Número de partículas ou poros	
p	Pressão parcial de oxigênio no gás	atm
Q	Vazão volumétrica de ar	L/min
q_o	Taxa específica de consumo de oxigênio	mg/g.h
r	Dimensão radial	m
R	Constante universal dos gases	atm.L/(gmol.K)
R_1	Raio da partícula sólida	m
R_2	Raio da partícula sólida mais biofilme	m

R_{CO_2}	Taxa de produção de gás carbônico	mol/m ³ .s
Re	Número de Reynolds	
R_{O_2}	Taxa de consumo de oxigênio	mol/m ³ .s
RQ	Quociente respiratório	gCO ₂ /gO ₂
R_w	Taxa de produção de água	g/g.h
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis	
T	temperatura	K
t	tempo	h
UFC	Unidades formadoras de colônias	
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas	
V_{biofilme}	Volume do biofilme	m ³
V_{leito}	Volume do leite	m ³
V_m	Volume de células no leite	m ³
V_s	Volume de meio sólido	m ³
V_x	Volume disponível para o crescimento microbiano	m ³
W_p	Quantidade de água perdida por meio sólido	g/h
X_w	Umidade média do leite	g/g
$Y_{P/S}$	Rendimento de glicose em proteína	mg/mg

LETRAS GREGAS

ϵ	Porosidade do leite	%
δ	Espessura de biofilme	μm
ψ	Grau de empacotamento do leite	
ρ_{ap}	Densidade aparente	g/cm ³
ρ_{real}	Densidade real	g/cm ³
γ_B	Grau de redução da biomassa	
γ_S	Grau de redução do substrato	
Δ	Gradiente	mol/m ³

1 INTRODUÇÃO

O cultivo em estado sólido é caracterizado pelo crescimento de microrganismos na ausência ou próximo da ausência de água livre, sendo que o meio sólido deve apresentar umidade suficiente para manter o metabolismo microbiano (Pandey, 1992; Rahardjo *et al.*, 2006). Estes processos vêm recebendo atenção especial devido às suas vantagens quando comparados aos cultivos submersos. Até os anos 90, as principais vantagens citadas para os processos em estado sólido estavam ligadas à limitação de água no sistema, que conduz à maiores produtividades e obtenção de produtos mais concentrados quando comparadas aos processos de fermentação submersa. A essas vantagens adiciona-se a diversidade de suportes naturais que podem ser usados nos cultivos em estado sólido. Atualmente, dois outros aspectos também têm sido evidenciados tais como a adesão de fungos filamentosos na superfície das matrizes sólidas e a importância do seu crescimento aéreo, ambos ausentes no crescimento submerso. A adesão de células em superfícies sólidas produz diferenças no comportamento fisiológico dos fungos, evidenciadas por mudanças na expressão gênica, secreção de enzimas e morfologia (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003). O crescimento aéreo tem sido citado na literatura de modo qualitativo como um detalhamento das fases do crescimento fúngico (Mitchell, 1991), e poucos trabalhos têm estudado esse aspecto, como reportado por Rahardjo *et al.* (2006) em seu artigo de revisão. Com essas novas abordagens, a análise do comportamento dos cultivos em estado sólido deve contemplar adicionalmente todo um conjunto de conceitos relacionados com a formação de biofilmes, imobilização de células e crescimento microbiano sobre superfícies sólidas.

Os processos em estado sólido possuem um potencial econômico considerável na obtenção de produtos para as indústrias química, alimentícia, farmacêutica e agrícola. Em geral, estes cultivos são atrativos pela sua simplicidade e semelhança com o *habitat* natural de muitos microrganismos.

Diversos suportes naturais e inertes vêm sendo utilizados nestes processos. Os suportes naturais servem como matriz sólida para o crescimento

fúngico, sendo a principal fonte de energia para os microrganismos. O uso de materiais nutricionalmente inertes como suporte em cultivos em estado sólido visa facilitar o projeto do meio nutriente e o monitoramento dos parâmetros de processo (Sabu *et al.*, 2000). Durante o crescimento nos suportes naturais, os microrganismos penetram e ligam-se fortemente às partículas sólidas, as quais vão sendo degradadas, alterando as características físico-químicas do meio (Lareo *et al.*, 2005). Assim, o uso de suportes inertes impregnados com líquido nutriente permite a manutenção da estrutura física da matriz, facilitando o controle dos processos.

Apesar de a tecnologia ser conhecida há vários séculos, somente nas últimas décadas é que tem havido avanços significativos no entendimento dos fenômenos que ocorrem nos cultivos em estado sólido, motivados pela necessidade de escalonamento dos processos. Na literatura isso é evidenciado pela escassez de trabalhos abordando esses aspectos e pela natureza qualitativa dos trabalhos de revisão (Raghavarao *et al.*, 2003).

A principal dificuldade no escalonamento é o controle das variáveis do processo. Para contornar essas dificuldades, novas configurações de biorreatores têm sido usadas tais como tambores rotativos e colunas de leito fixo e fluidizado. Além disso, têm sido utilizados suportes inertes os quais não interagem com a fase biótica do processo, mantendo sua estrutura física praticamente constante.

Do ponto de vista dos fenômenos de transporte, os estudos na última década têm sido mais voltados para a transferência de calor (Mitchell *et al.*, 2000; Durand, 2003; Pandey, 2003; Lekanda & Pérez-Correa, 2004), enquanto que os estudos dos fenômenos de transferência de massa ainda são muito escassos.

As limitações de transferência de oxigênio são inevitáveis nestes processos. A principal resistência ao transporte ocorre no biofilme celular formado na superfície e/ou interior das partículas sólidas, onde ocorre difusão e consumo de oxigênio (Gowthaman *et al.*, 1995). A transferência de oxigênio é o parâmetro mais importante no estudo do escalonamento e controle destes processos uma vez que a produção de calor é proporcional ao consumo de oxigênio. Além disso,

o suprimento do oxigênio para o micélio que cresce na superfície ou no interior das partículas pode ser prejudicado pela difusão ineficiente (Rahardjo *et al.*, 2002).

Outro aspecto importante dos processos em estado sólido é a diversidade de produtos que podem ser obtidos, os quais atualmente compreendem enzimas e proteínas para aplicações médico-farmacêuticas (Hasan *et al.*, 2003). O micélio e os esporos de fungos contêm componentes bioquímicos os quais podem apresentar propriedades alergênicas (Menezes, 1995). Este conhecimento abriu novas perspectivas de produção de antígenos para o tratamento de doenças respiratórias como a rinite alérgica. Reações alérgicas de significativa intensidade foram obtidas com *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* (DHm) e o tratamento com o extrato alergênico obtido da biomassa fúngica apresentou resultados promissores. DHm é encontrado na natureza como parasita de cereais e a sua presença pode ser identificada no solo e no ar. A característica do seu *habitat* natural motivou o estudo do crescimento da sua biomassa em estado sólido e a caracterização do produto obtido foi objeto de pesquisa em trabalhos recentes do nosso grupo. Nesse sentido, Saraiva (2001) estudou a extração das proteínas alergênicas da biomassa de DHm obtida por fermentação em estado sólido. Hasan (2002) avaliou o cultivo deste fungo em estado sólido utilizando um sistema de colunas de leito fixo (colunas de Raimbault) através de uma análise estatística de variáveis. Estudou ainda a produção do extrato alergênico (proteínas semi-purificadas) e caracterização do produto obtido quanto à alergenicidade das proteínas do extrato. Os resultados obtidos através de *dot blotting* e *immunoblotting* foram positivos, indicando que os antígenos fúngicos podem ser produzidos por cultivo em estado sólido. A transferência de oxigênio foi um fator limitante para o crescimento da biomassa fúngica e produção das proteínas alergênicas. Outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa destacaram a perspectiva de utilização desses antígenos no tratamento de rinite alérgica, envolvendo a encapsulação dessas proteínas em lipossomas para aplicação em terapia de alergia por dessensibilização (Cabral *et al.*, 2004).

Nesse contexto, o presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento da produção de proteínas alergênicas obtidas da biomassa de DHm, com vistas ao escalonamento do processo, estudando aspectos macroscópicos da

transferência de oxigênio nos cultivos em estado sólido conduzidos em biorreator de leito fixo e analisando os resultados à luz dos novos conceitos microscópicos envolvidos no crescimento de fungos sobre superfícies sólidas. Assim, essa pesquisa foi focada no estudo da influência da altura de leito, vazão de ar e umidade inicial na transferência de oxigênio usando inicialmente o farelo de trigo como suporte natural. Adicionalmente, a transferência de oxigênio também foi estudada em espuma de poliuretano como suporte inerte. Em ambos os casos o desempenho da transferência de oxigênio foi analisada em termos do coeficiente global de transferência de massa gás-líquido (K_La), perfis de proteínas e coeficientes de rendimento proteína/glicose ao longo dos cultivos.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar a transferência de oxigênio no cultivo em estado sólido de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* (DHm) em suportes natural e inerte.

O estudo abordou os seguintes aspectos:

Em suporte natural:

- Influência de diferentes alturas de leito e vazão de ar;
- Influência do nível de umidade do meio sólido sob condições controladas;
- Influência do tamanho de partícula
- Comparação do comportamento dos cultivos conduzidos em biorreator do tipo coluna de maiores dimensões;
- Caracterização da transferência de oxigênio em cultivo de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* em suporte inerte em condições de vazão de ar e umidade previamente selecionadas para o suporte natural.
- Estimativa da biomassa nos cultivos com suporte natural e inerte;
- Identificação das proteínas produzidas nos cultivos sobre os suportes natural e inerte.

Para todos os aspectos foram determinadas a quantidade total de proteínas produzidas, os perfis de umidade do meio sólido, consumos de glicose e oxigênio e determinado o coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido (K_La) durante as fermentações.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultivo em estado sólido

O cultivo em estado sólido tem apresentado grande potencial tecnológico para produção de alimentos, produtos químicos e farmacêuticos (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003; Pandey, 2003). O processo caracteriza-se pelo crescimento de microrganismos sobre uma matriz sólida, ou seja, substrato insolúvel, na ausência ou perto da ausência de água livre (Lonsane *et al.*, 1992; Pandey, 1992; Viccini & Mitchell, 2003). Estes processos, portanto, diferenciam-se dos cultivos submersos e das reações com células imobilizadas pela quantidade de água livre presente (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003). Comparado com as fermentações submersas, o meio sólido apresenta baixa quantidade de água e uma fase gasosa importante entre as partículas (Durand, 2003). Mais recentemente, o cultivo de microrganismos em estado sólido vem sendo também caracterizado e definido como fermentação por biofilme ou por adesão em superfícies, por envolver conceitos comuns a esses processos (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003). A adesão dos fungos filamentosos ocorre devido a uma classe de proteínas de massas molares baixas chamadas hidrofobinas, podendo ser produzidas por ascomicetos, basidiomicetos e zigomicetos (Wessels, 1996; Wösten & De Vocht, 2000; Linder *et al.*, 2005). Estas proteínas estabilizam a adesão das células em suportes naturais e inertes. Entretanto, outras moléculas como glicoproteínas, podem participar do processo de adesão.

A matriz sólida pode ser substrato natural contendo fonte de carbono ou um suporte inerte impregnado de solução nutriente (Ooijkaas *et al.*, 2000a). As matrizes usadas como suportes nos processos em estado sólido podem variar na sua composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água (Durand, 2003).

Recentes estudos têm buscado aplicar esta tecnologia para produção de enzimas, metabólitos e esporos (Hölker *et al.*, 2004). Nesse sentido, resíduos agroindustriais como farelo de trigo e milho servem como fonte de nutrientes e

suporte para estes processos na medida em que possuem características poliméricas e são insolúveis em água. Como suportes inertes usados nestes cultivos podemos citar poliuretano, poliestireno, nylon, alumina, amberlite, dentre outros (Ooijkaas *et al.*, 2000a; Sabu *et al.*, 2001). O preparo e pré-tratamento do substrato sólido consistem em etapas que visam transformar o substrato bruto em uma forma utilizável para fermentação. Estas etapas compreendem a diminuição do tamanho das partículas; hidrólise físico-química ou enzimática dos polímeros para aumentar a disponibilidade do substrato ao microrganismo; suplementação de nutrientes do meio de cultivo; ajuste do pH e umidade; cozimento ou tratamento a vapor para pré-degradação da estrutura macromolecular e eliminação dos contaminantes (Lonsane *et al.*, 1992). Zhao *et al.* (2001), trataram palha de trigo por secagem a 50°C por 4 horas, seguido de tratamento térmico em autoclave a 121°C por 60 min. Hoogschagem *et al.* (2001) avaliaram a influência do tipo de grão de trigo e do pré-tratamento no cultivo de *Aspergillus oryzae*. Foram testados seis tipos de grãos de trigo comerciais e dois tratamentos: grãos encharcados em água destilada a 50°C por 4 horas e a 20°C por 16 horas. De acordo com os autores, a variedade do trigo e o pré-tratamento afetam o desempenho dos cultivos em estado sólido.

O cultivo em estado sólido é considerado o mais antigo processo fermentativo, sendo utilizado pelos egípcios para produção de pão desde 2600 a.C. As aplicações mais recentes consistem no enriquecimento de resíduos agroindustriais, produção de enzimas, ácidos orgânicos e outros metabólitos fúngicos (Ooijkaas *et al.*, 2000a).

Diversos microrganismos podem ser cultivados a partir de substratos sólidos. No entanto, os fungos filamentosos possuem a melhor capacidade de crescer nestas condições devido às suas características fisiológicas e bioquímicas. Sendo assim, dentre as classes mais estudadas podemos citar *Phycomycetes* (*Mucor* e *Rhizopus*), *Ascomycetes* (*Aspergillus* e *Penicillium*) e *Basidiomycetes* (*Polysporus*) (Pandey, 1992) e *Hyphomycetes* (*Drechslera monoceras*) (Menezes *et al.*, 1995; Hasan *et al.*, 2003).

Os sistemas em estado sólido apresentam diversas vantagens sobre os cultivos submersos. Como vantagens biológicas podemos citar a baixa demanda de água, utilização de substratos insolúveis em água e fontes de carbono pouco usuais e a similaridade com o ambiente natural de muitos fungos filamentosos. Podemos citar como vantagens de processo a alta produtividade volumétrica, facilitada recuperação de produtos e reduzidas exigências energéticas. No entanto, estes sistemas podem apresentar alguns problemas como o surgimento de gradientes de temperatura, umidade, oxigênio e nutrientes. Além disso, estes processos apresentam desvantagens tais como a utilização apenas de microrganismos que se desenvolvam em baixos níveis de umidade e atividade de água, dificuldades na medida e controle dos parâmetros, necessidade de elevadas concentrações de inóculo, pré-tratamento do substrato e dificuldades no escalonamento do processo (Ooijkaas *et al.*, 2000b; Hölker *et al.*, 2004). Mais recentemente, estudos do comportamento dos fungos no cultivo em estado sólido mostraram diferenciações marcantes na expressão gênica, fisiologia e morfologia ligadas muito mais ao crescimento adesivo das células do que à limitação de água no meio (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003).

3.2 Transferência de massa nos cultivos em estado sólido

Os cultivos em estado sólido possuem algumas limitações ligadas à heterogeneidade dos sistemas, especialmente quanto ao transporte de massa e calor, o que pode comprometer a produtividade do processo (Gowthaman *et al.*, 1993). As características de transferência de calor e massa dependem da natureza do substrato e do microrganismo, condutividade térmica, difusividade efetiva, porosidade e teor de umidade do substrato sólido.

Os fenômenos que ocorrem nos biorreatores são conceitualmente classificados como fenômenos macro e microscópicos (Raghavarao *et al.*, 2002). A Figura 3.1 ilustra os fenômenos macroscópicos que ocorrem nos biorreatores em estado sólido, sendo que podemos destacar o fluxo de ar no biorreator com conseqüentes mudanças na temperatura e nas concentrações de oxigênio, gás

carbônico e água; convecção, difusão e condução que ocorrem na direção normal ao fluxo de ar durante a aeração forçada; efeitos de cisalhamento devido à mistura, incluindo a manutenção da integridade das partículas sólidas; condução de calor através da parede do biorreator. Esses fenômenos representam contribuições importantes para os balanços de massa e energia, porém não necessariamente possuem a mesma intensidade em todos os tipos de biorreatores (Mitchell *et al.*, 2000).

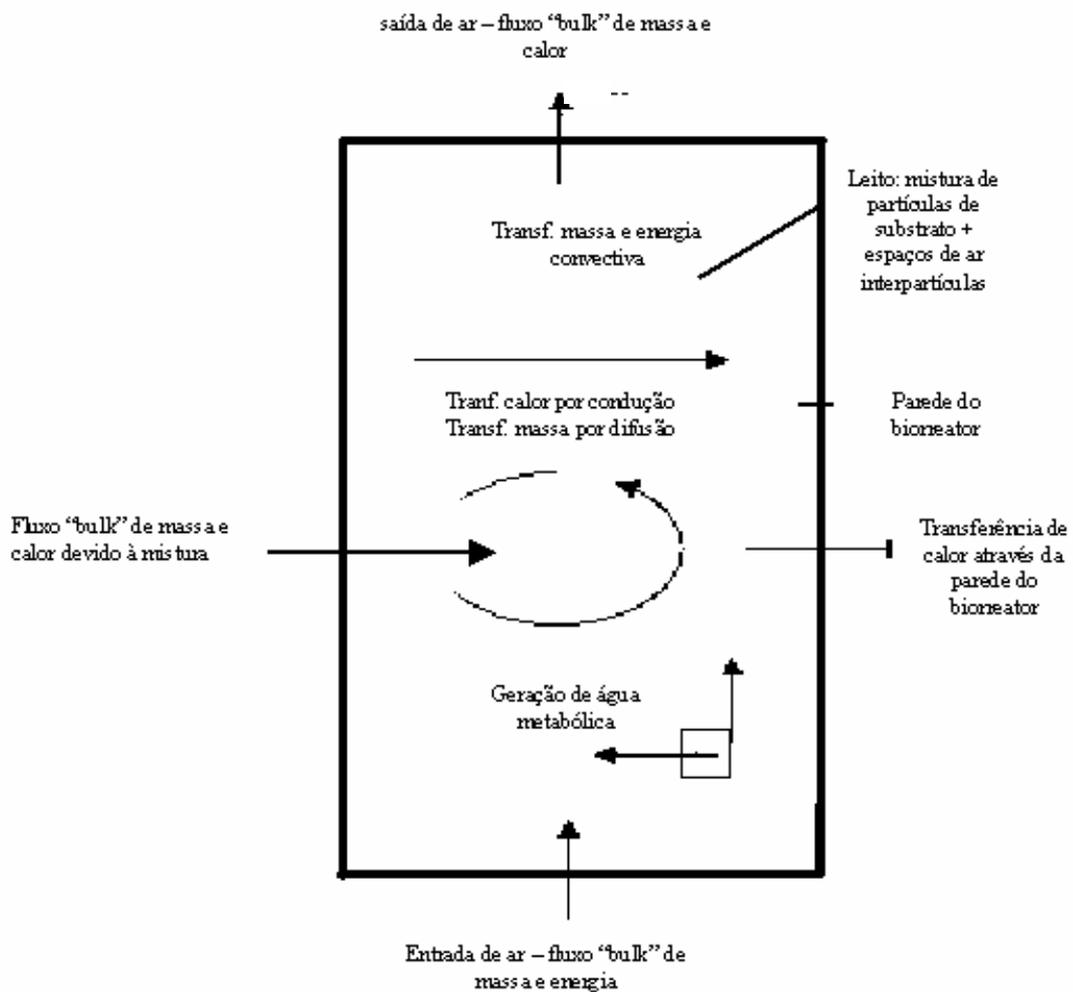


Figura 3.1. Fenômenos macroscópicos que ocorrem nos biorreatores durante o crescimento fúngico sobre suportes sólidos (Adaptado de Mitchell *et al.*, 2000)

Na Figura 3.2, estão esquematizados os fenômenos microscópicos que ocorrem nos biorreatores durante o crescimento fúngico sobre substratos sólidos.

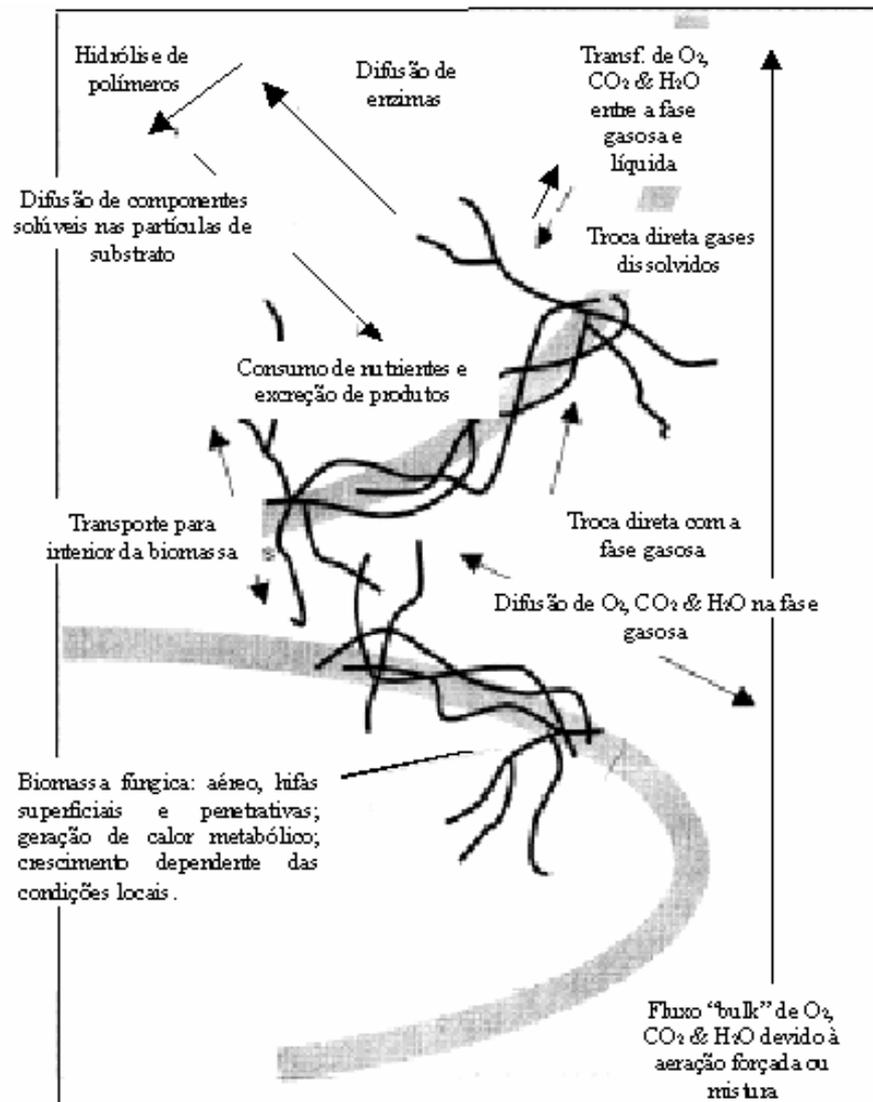


Figura 3.2 Fenômenos microscópicos que ocorrem nos biorreatores durante o cultivo sobre suportes sólidos (Adaptado de Mitchell *et al.*, 2000)

Os microrganismos crescem na região úmida na superfície do substrato formando um biofilme. Durante o crescimento, as hifas penetram na partícula em busca dos nutrientes havendo a difusão de solutos no interior da partícula (Mitchell

et al., 2000). A transferência de massa intrapartícula refere-se ao transporte de nutrientes e enzimas para o interior dos substratos sólidos. Assim, o fator de efetividade é um conceito muito utilizado para caracterizar estes fenômenos, sendo definido como a relação entre a taxa de reação observada pela taxa de reação na ausência de qualquer gradiente de concentração de substratos (Raghavarao *et al.*, 2003). Estes conceitos auxiliam os estudos das limitações difusionais na catálise heterogênea, sendo também aplicados nos processos em estado sólido. Mitchell *et al.* (1991) avaliaram as limitações difusionais da glucoamilase produzida por *Rhizopus oligosporus* por FES, constatando que, devido à difusão, a concentração da enzima tende a ser maior na superfície, resultando em rápido consumo de amido nesta região.

Os estágios da adesão dos fungos na superfície de partículas, característico da fermentação por biofilmes ou fermentação por adesão, estão esquematizados na Fig. 3.3. A formação do biofilme é dividida em três partes: adesão nas partículas; crescimento inicial a partir da geminação de esporos; e fase de maturação com aumento da densidade celular. Os estágios da adesão de fungos incluem a diferenciação na expressão gênica, características nos cultivos em estado sólido ou na fermentação por biofilmes (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003).

A formação e manutenção dos biofilmes são processos dinâmicos que envolvem complexas interações físicas e biológicas. As propriedades físicas do suporte como a hidrofobicidade, carga eletrostática e superfície rugosa devem permitir uma etapa inicial de adesão dos microrganismos. A adesão de fungos filamentosos é mediada principalmente por uma classe de proteínas de massa molar baixa (por volta de 10kDa) chamadas “hidrofobinas” (Gutiérrez & Villena, 2003; Linder *et al.*, 2005). De acordo com Wösten & Vocht (2000), as hidrofobinas são proteínas excretadas por fungos durante o seu desenvolvimento, estando diretamente envolvidas nos diferentes estágios de crescimento fúngico, desde a formação de estruturas aéreas hidrofóbicas como hifas, esporos e corpos de frutificação. Além disso, estas proteínas apresentam diversas funções durante o crescimento fúngico, sendo que a mais importante diz respeito à sua habilidade

em diminuir a tensão superficial, permitindo a adesão das hifas em superfícies orgânicas e inertes (Wessels, 1996; Linder *et al.*, 2005).

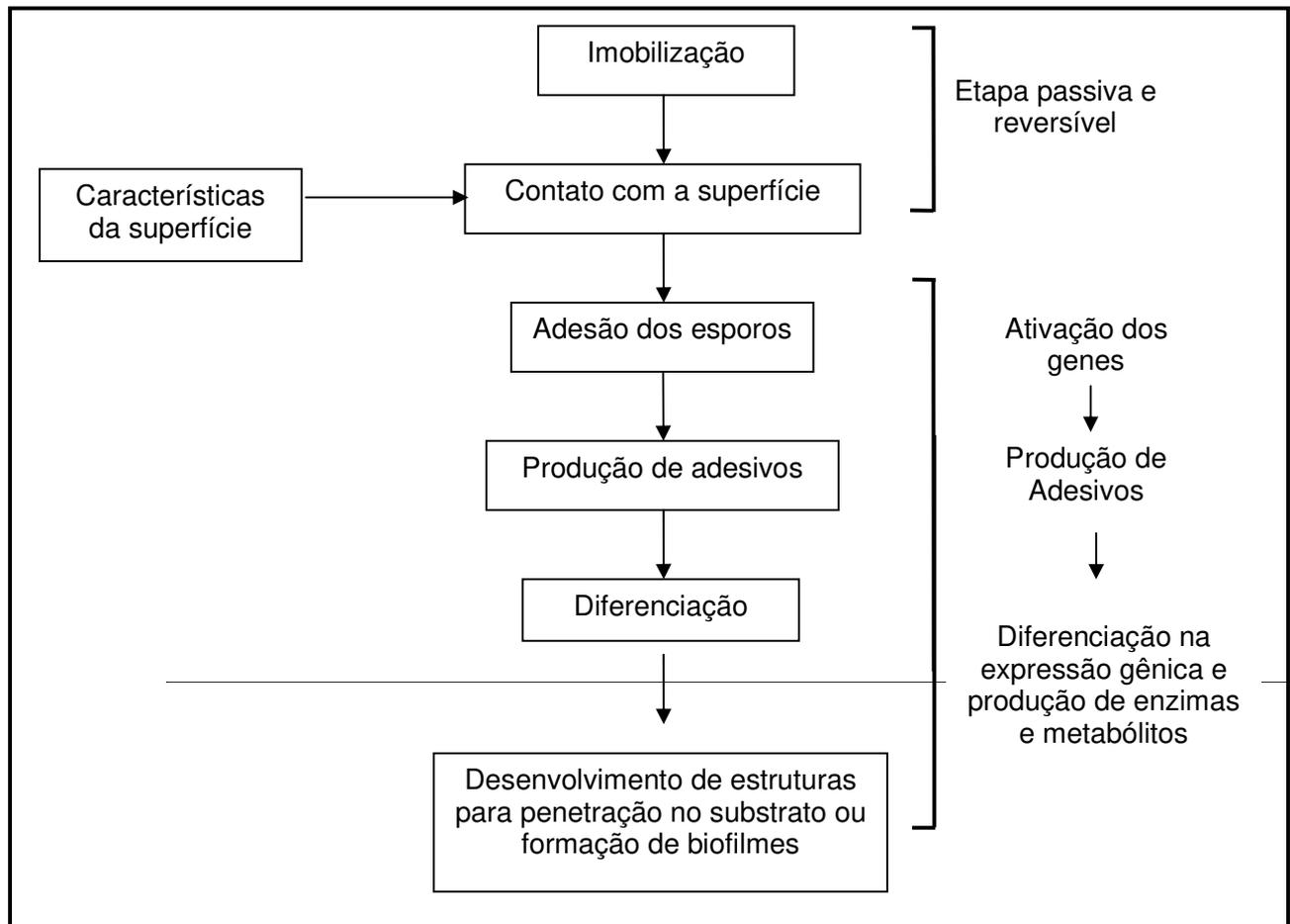


Figura 3.3 Etapas para a adesão de células aplicadas na fermentação em estado sólido e crescimento de biofilmes (Adaptado de Gutiérrez & Villena, 2003)

A Fig. 3.4 apresenta um esquema que ilustra as diferentes camadas fúngicas sobre um substrato sólido. As hifas fúngicas formam uma rede tridimensional porosa conhecida como micélio. Inicialmente, o micélio se desenvolve dentro da matriz sólida, na superfície do substrato e no ar. A penetração dentro do substrato dependerá da disponibilidade de oxigênio para desenvolvimento dos filamentos penetrantes (Rahardjo *et al.*, 2002). Como o micélio continua crescendo, no decorrer do processo a camada aérea pode tornar-

se tão densa que os poros ficam cheios de água, aumentando assim a camada de micélio úmido. Com o aumento da espessura do filme líquido ou da densidade de empacotamento, as regiões mais profundas desta camada tornam-se anaeróbias, retardando o crescimento ou levando ao metabolismo endógeno. Se os poros da fase aérea são preenchidos com ar, há uma rápida difusão de oxigênio, mas um lento transporte dos demais nutrientes, como fonte de carbono, e de enzimas. Por outro lado, se os poros são preenchidos com água, o suprimento dos nutrientes para o biofilme é prejudicado pela difusão lenta.

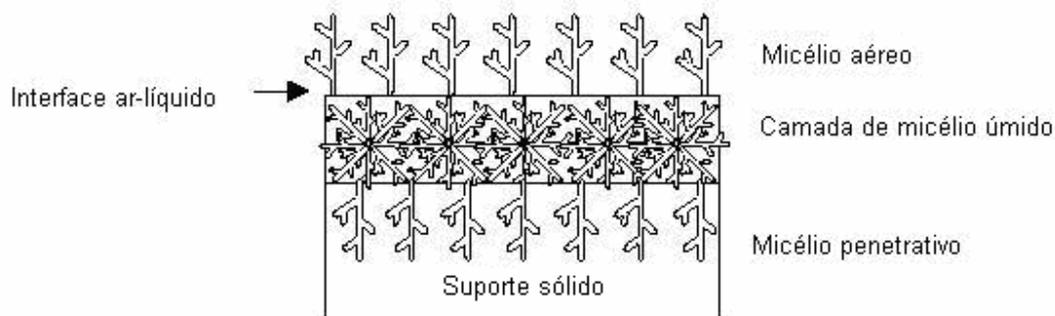


Figura 3.4 Modelo de crescimento de fungos filamentosos (Adaptado de Rahardjo *et al.*, 2006)

Modelos de reação-difusão são utilizados para descrever a transferência de massa em sistemas com biofilmes microbianos, sendo que a difusão do oxigênio é assumida numa única direção (Fig. 3.5). Oostra *et al.* (2001) determinaram os gradientes de concentração de oxigênio no cultivo de *Rhizopus oligosporium* em um meio nutriente definido usando microeletrodos. Estes autores constataram que após 36h não havia disponibilidade de oxigênio em camadas superiores a 100 μ m. Analisando da mesma forma, Rahardjo *et al.* (2002) reportaram observações similares para biofilme de *Aspergillus oryzae*. Neste caso, foi demonstrada a ausência de gradientes de concentração no micélio aéreo. Estes autores verificaram que este fungo forma micélio aéreo abundante, sendo importante no consumo de oxigênio durante o cultivo. A contribuição da fase aérea

chega próximo a 75% da taxa de consumo global de oxigênio. Além disso, não foi verificado um fluxo constante de oxigênio, o qual era atribuído a uma penetração de oxigênio constante na camada úmida de substrato. Sendo assim, as limitações difusionais são menos importantes para fungos que formam hifas aéreas abundantes.

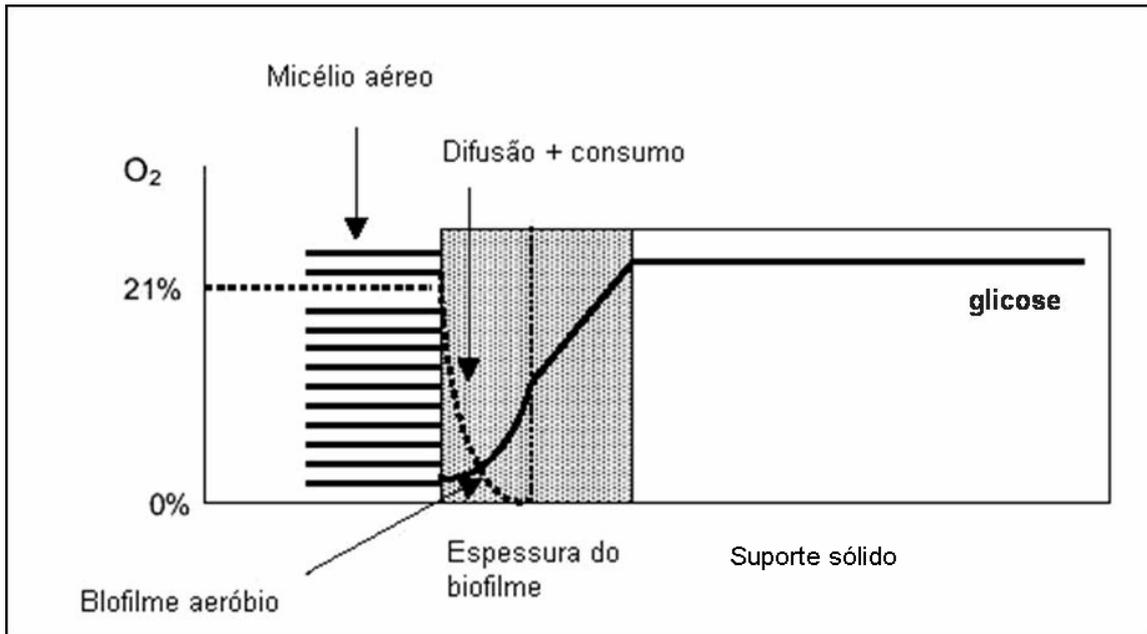


Figura 3.5 Modelo de reação-difusão (Adaptado de Rahardjo *et al.*, 2006)

3.3 Transferência de oxigênio

Nos processos aeróbios, a transferência de oxigênio para os fungos é um dos fenômenos mais importantes e sustenta o crescimento dos microrganismos (Gowthaman *et al.*, 1995). Assim, o coeficiente global de transferência de massa gás-líquido (K_La) é uma variável importante a ser considerada nestes processos (Poughon *et al.*, 2003). Nos cultivos submersos, a transferência de oxigênio depende da forma e tamanho do biorreator e do sistema de agitação e aeração (Durand, 2003). Nestes casos, o K_La tem sido bem definido para avaliar o transporte de massa, sendo usado para expressar a capacidade do equipamento

de transferir oxigênio independente do volume do reator. Nos cultivos em estado sólido são raros os trabalhos que abordam este tema de maneira quantitativa (Gowthaman *et al.*, 1995; Thibault *et al.*, 2000), embora a transferência de oxigênio possa ser um fator limitante em alguns reatores, sendo afetada principalmente pelo controle da temperatura e conteúdo de água do meio sólido. Nestes processos, os microrganismos crescem no interior de uma estrutura porosa ou na superfície de partículas sólidas, as quais são envolvidas por um filme estagnado de líquido (biofilme). O oxigênio é transferido por convecção da fase gasosa para o filme e por difusão molecular através do filme e nos poros do substrato sólido (Thibault *et al.*, 2000). Assim, a maior resistência à transferência de oxigênio nos cultivos em estado sólido ocorre devido à difusão no biofilme.

De fato, os resultados de Thibault *et al.* (2000) comprovaram que o coeficiente de transferência de massa convectivo (k_G) não influencia na transferência de oxigênio em cultivos sobre substratos sólidos. No entanto, para fungos que formam hifas aéreas abundantes, a transferência de oxigênio dependerá da composição dos poros da fase aérea preenchidos com água ou ar (Rahardjo *et al.*, 2002; Rahardjo *et al.*, 2006).

De acordo com os resultados obtidos por Oostra *et al.* (2001), a taxa de transferência de oxigênio é limitada devido à resistência ao transporte de oxigênio através do biofilme úmido. O crescimento aeróbio ocorre na fina camada (aproximadamente 60 μm) próxima à interface gás-líquido, enquanto nas regiões mais profundas ocorre crescimento e conversão anaeróbia (Tanaka *et al.*, 1986).

As limitações de oxigênio são inevitáveis e ocorrem em maior proporção na fase aquosa no interior do biofilme, comparada com a transferência através da interface gás-líquido, a qual é a etapa limitante na fermentação submersa. Como resultado, o coeficiente global de transferência de massa gás-líquido (K_La) nos cultivos em estado sólido possui contribuições diferentes em relação à fermentação submersa, e nesse caso torna-se importante a determinação da difusividade do oxigênio dentro da fase aquosa (Mitchell, *et al.*, 2000). Além disso, Thibault *et al.* (2000) apontaram que o K_La nos cultivos em estado sólido é uma

constante física do sistema dependendo apenas da área interfacial de transferência de massa, da difusividade de oxigênio na fase líquida e da espessura do filme, sendo independente da concentração de oxigênio. Assim, se a espessura de biofilme aumentar com o tempo de cultivo, podem ocorrer mudanças na difusividade fazendo com que o valor de K_La varie durante o processo. No entanto, a interpretação do K_La deve ser usada com cuidado uma vez que devido à presença de microrganismos no filme líquido, os perfis da concentração de oxigênio são resultado da difusão e consumo, diferentemente do que ocorre nos cultivos submersos.

Oostra *et al.* (2001) constataram limitações de transferência de oxigênio na fermentação em estado sólido com *Rhizopus oligosporus* em meio de cultivo nutricionalmente definido. Segundo esses autores, a conversão anaeróbia da glicose em etanol por *R. oligosporus* foi indicativo da resistência ao transporte de oxigênio através do biofilme fúngico, alterando o quociente respirométrico. Além disso, outra constatação das condições anaeróbias foi à redução do rendimento em biomassa por glicose consumida ao longo da fermentação. Nesse sentido, segundo Hasan (2002), o perfil do rendimento (Y_{XS}) e concentração de açúcares no final do cultivo de *D. monoceras* em biorreator de leito fixo (colunas de Raimbault) podem ser indicativos da limitação de oxigênio na fermentação em estado sólido. Isto ocorre tanto pela resistência no biofilme quanto pela distribuição de ar ineficiente através do leito de partículas, com a formação de caminhos preferenciais devido ao acúmulo de água proveniente das reações metabólicas. A forma mais prática de aumentar o metabolismo aeróbio é facilitar a transferência de oxigênio da fase gasosa para os microrganismos via aumento da área de interface entre a fase gasosa e o biofilme fúngico. A área interfacial pode ser aumentada através da redução do tamanho das partículas ou pré-tratamento do substrato (Oostra *et al.*, 2001).

3.3.1 Caracterização da transferência de oxigênio

Embora o coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido (K_La) seja um parâmetro muito bem estudado na fermentação submersa, a sua determinação nos cultivos em estado sólido tem sido objeto de estudos mais recentes (Gowthaman *et al.*, 1995 Thibault *et al.*, 2000). O balanço gasoso no biorreator e a variação com o tempo da concentração de oxigênio dissolvida na fase líquida (método dinâmico) são os métodos convencionais de determinação do K_La na fermentação submersa. No entanto, o método dinâmico não pode ser empregado para estimar K_La nos processos em estado sólido uma vez que a concentração de oxigênio na fase líquida não é facilmente determinada por tratar-se de um biofilme estagnado que está em contato direto com a superfície do sólido. Desta forma, estima-se o K_La somente pelo balanço gasoso nos biorreatores (Thibault *et al.*, 2000). O mecanismo de transferência de oxigênio da fase gasosa para os microrganismos é controlado pela resistência no filme líquido estagnado. A taxa global de transferência de oxigênio pode ser expressa matematicamente de acordo com a Eq. 3.1:

$$N = K_L a (C^* - C_L) \quad (\text{Equação 3.1})$$

onde N é a taxa volumétrica de transferência de oxigênio; K_L é o coeficiente de transferência de oxigênio da fase líquida; a é a área interfacial por volume para transferência de oxigênio; C^* é a concentração de oxigênio no gás em equilíbrio com o líquido (concentração de saturação na temperatura e pressão considerada); C_L é a concentração de oxigênio no filme líquido.

A Figura 3.6 apresenta as resistências à transferência de oxigênio em um sistema de fermentação em estado sólido, sendo que a teoria clássica do filme pode ser aplicada. A transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida estática envolve as seguintes etapas: transferência da fase gasosa para a interface gás-líquido e transferência através do filme líquido, tornando-se disponível aos microrganismos. Estes crescem e formam produtos no filme líquido sobre as partículas sólidas de substrato. Desde que o fluxo de ar seja suficiente para permitir turbulência, a resistência do filme gasoso pode ser

desprezada e a resistência no biofilme controla o processo (Gowthaman *et al.*, 1995).

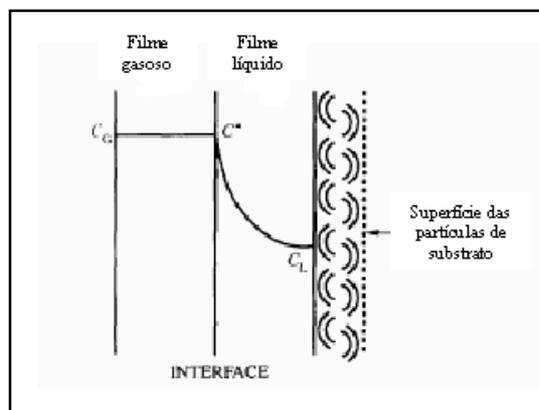


Figura 3.6 Resistência ao transporte de oxigênio nos cultivos em estado sólido
(Adaptado de Gowthaman *et al.*, 1995)

André *et al* (1981) adaptaram o método dinâmico de medida do K_La através da medida contínua de gás carbônico (CO_2) na entrada e saída de um reator de coluna, para aplicação em sistemas gás-líquido-sólido. Este método baseou-se na absorção e dessorção de gás carbônico em um sistema semi-contínuo, com medida da composição do gás na saída com avariação de CO_2 no gás de entrada. De acordo com os autores, a determinação de K_La usando este indicador no gás é viável, uma vez que foram obtidos valores normalmente encontrados na literatura para sistemas envolvendo gás, líquido e sólido.

Gowthaman *et al* (1995) estimaram K_La na fermentação em estado sólido usando biorreator de leito fixo através da medida direta da composição do gás na entrada e saída do reator. Neste trabalho, os autores usaram como hipótese, com base em dados da literatura em que a concentração de oxigênio decresce, devido à resistência difusional, em aproximadamente 10% no filme líquido, ou seja, $\Delta C_L = (C^* - C_L) = 0,9C^*$. Sendo assim, K_La foi calculado pela Equação 3.1. Segundo os autores, esta aproximação para cálculo do coeficiente de transferência de massa pareceu razoável para processos em estado sólido, uma vez que a concentração

de oxigênio no filme líquido (C_L) é de difícil medida experimental, diferente da fermentação submersa onde determina-se a concentração de oxigênio dissolvido diretamente no seio do líquido. No entanto, Thibault *et al.* (2000) indicaram que estas considerações não foram apropriadas para os sistemas em estado sólido. Com base na Equação 1, quando é assumida constante a diferença de concentração de oxigênio em 10% através do filme líquido, isto reflete em uma variação considerável no K_La , conforme demonstrado por Gowthaman *et al.* (1995). K_La é uma constante do sistema, e geralmente assume-se como independente da concentração de oxigênio (Thibault *et al.*, 2000). Segundo estes autores, K_La é proporcional à relação entre a difusividade de oxigênio e a espessura do biofilme. Desta forma, espera-se que o K_La varie ao longo da fermentação na medida que ocorre crescimento da biomassa e pequenas variações da difusividade de oxigênio no filme líquido, mas não da forma apresentada por Gowthaman *et al.* (1995).

Nesse contexto, Thibault *et al.* (2000), reavaliaram a estimativa do K_La proposta por Gowthaman *et al.*, 1995, desenvolvendo um modelo matemático de crescimento uniforme de fungos na superfície de partículas esféricas em leito fixo. Considerando hipótese de estado pseudo-estacionário, ou seja, os perfis de concentração de oxigênio no gás e no líquido são constantes e resultado do consumo de oxigênio, e assumindo espessura de biofilme constante de 25 μ m, os autores encontraram valores de K_La próximos a 0,344s⁻¹ para todas as condições de vazão de ar e em diferentes posições axiais da coluna de leito fixo. Estes resultados indicaram que o gradiente de concentração de oxigênio no filme líquido não é constante ao longo dos cultivos, no entanto o K_La depende apenas da espessura do filme e da difusividade de oxigênio.

Diversos modelos têm sido propostos para explicar como o crescimento fúngico pode ser afetado pela difusão intrapartícula de oxigênio, enzimas, produtos de hidrólise e outros nutrientes e a importância de fenômenos como o encolhimento das partículas e a distribuição espacial da biomassa (Mitchell *et al.*, 2003). Georgiou & Shuler (1986) descreveram o crescimento microbiano na superfície de uma fina camada de substrato contendo glicose. No entanto, a

geometria esférica é considerada uma aproximação de forma de partícula mais conveniente para os cultivos em estado sólido. Rajagopalan & Modak (1995) desenvolveram um modelo matemático para avaliar a difusão de oxigênio em partículas esféricas considerando a formação de um biofilme úmido de densidade constante. O modelo descreve várias etapas, como a liberação da enzima na interface biomassa/substrato; a difusão da enzima na partícula sólida; a hidrólise de polissacarídeos; liberação da glicose e difusão dentro da partícula sólida; difusão da glicose através do biofilme e consumo pela biomassa; difusão do oxigênio através do biofilme e consumo pela biomassa; e expansão do biofilme em virtude do crescimento fúngico. De acordo com estes autores, o crescimento da biomassa (dX/dt) causa uma expansão no biofilme. Considerando que as partículas mantêm a sua estrutura física como se fosse uma matriz inerte, os resultados demonstraram que a limitação de oxigênio é um problema mais sério que a limitação por glicose, podendo haver condições anaeróbias em 70-80% da espessura do biofilme durante o crescimento microbiano exponencial.

3.4 Tipos de biorreatores

Os fatores a serem considerados no projeto de reatores para o cultivo em estado sólido e controle de parâmetros diferem dos cultivos com células em suspensão. A fase gasosa existente entre as partículas do meio sólido é de grande importância uma vez que o ar apresenta uma condutividade térmica bem inferior à da água. Outro ponto importante é a variedade de matrizes usadas nestes cultivos, as quais variam de composição, granulometria, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água.

Os biorreatores geralmente utilizados para os processos em estado sólido são do tipo bandeja, leito fixo, agitados e de leito fluidizado gás-sólido (Durand *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 2000).

Os biorreatores de bandeja caracterizam-se por sua simplicidade, uma vez que o substrato é disposto em bandejas normalmente perfuradas, facilitando a convecção do ar. Neste tipo de biorreator não há aeração forçada nem agitação

mecânica. Desta forma, para evitar o aquecimento metabólico e para manter as condições aeróbias são utilizadas camadas finas de substrato.

Nos biorreatores de leito fixo ocorre a aeração forçada através da camada de substrato. Muitas variações de projeto são possíveis, sendo que para uso em laboratórios esses reatores são tipicamente colunas cilíndricas de vidro ou plástico. O controle da temperatura é feito através de imersão em banho térmico termostaticado ou através do uso de colunas encamisadas. A própria aeração permite o controle da temperatura ao forçar a evaporação da água presente no substrato (Durand *et al.*, 1997).

Os biorreatores agitados compreendem tambores rotativos e os estáticos, onde outros sistemas de agitação tais como agitadores mecânicos promovem a mistura do meio sólido (Figura 3.7), sendo classificados como de mistura e aeração forçada (Michell *et al.*, 2000). Nesses casos, quando a mistura é contínua, assume-se mistura perfeita dentro do biorreator, e as contribuições mais importantes para o balanço de energia dentro do leito de substrato são a geração de calor; a remoção de calor por convecção; e a evaporação da água na corrente de ar do sistema. No caso de mistura intermitente o comportamento de leito empacotado deve ser considerado no período estático.

Nos reatores de leito fluidizado gás-sólido, o gás é soprado ascendentemente através da base perfurada a uma velocidade suficiente para fluidizar as partículas do substrato, podendo ser utilizados dispositivos que quebrem possíveis aglomerados. A coluna é alta o bastante para promover a expansão do leito e a velocidade do fluxo de ar deve permitir uma eficiente transferência de calor e massa através das partículas de substrato e a fase gasosa (Mitchell, *et al.*, 2000). Para contornar as limitações de transferência de massa devido à presença de aglomerados, Tanaka *et al.*, 1986, avaliaram o cultivo de leveduras em fermentador de leito fluidizado gás-sólido com agitadores. Segundo estes autores, o leito fluidizado permite a manutenção das características ótimas de crescimento dos microrganismos, melhor suprimento de água e nutrientes e remoção do calor metabólico e gás carbônico produzidos.

A Figura 3.8 apresenta o esquema típico de colunas de leito fixo (colunas de Raimbault). Este sistema possibilita a aeração das culturas e análise da respiração microbiana (Durand, 2003). Além disso, a pequena quantidade de meio sólido e a geometria das colunas permitem a manutenção da temperatura dos reatores. Nesse sentido, a Figura 3.9 apresenta esquema de coluna de leito fixo com volume de aproximadamente 1L, onde a temperatura e a quantidade de água do meio podem ser monitoradas, havendo controle da umidade relativa e vazão de ar de alimentação.

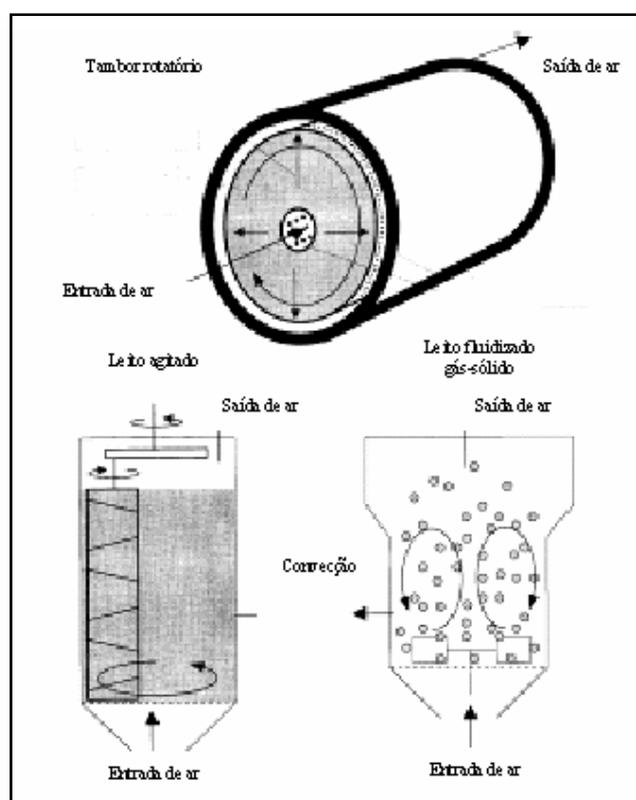


Figura 3.7 Biorreatores de mistura e aeração forçada (Adaptado de Mitchell, *et al.*, 2000)

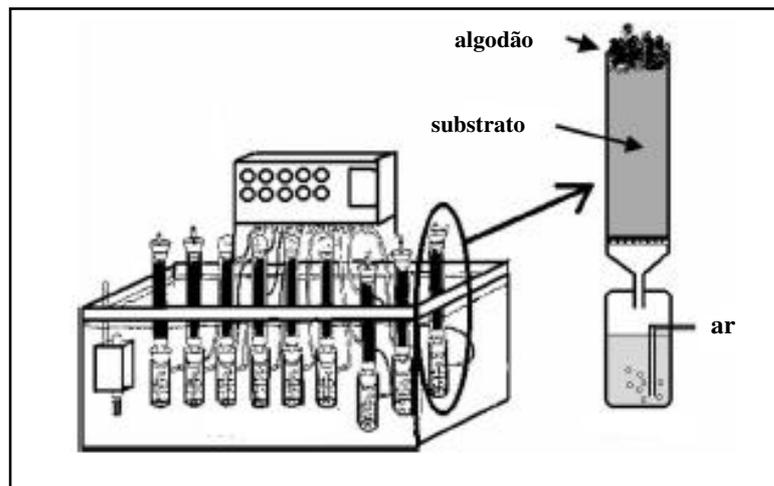


Figura 3.8 Esquema das colunas de leito fixo em escala de laboratório (Colunas de Raimbault) (Adaptado de Durand, 2003)

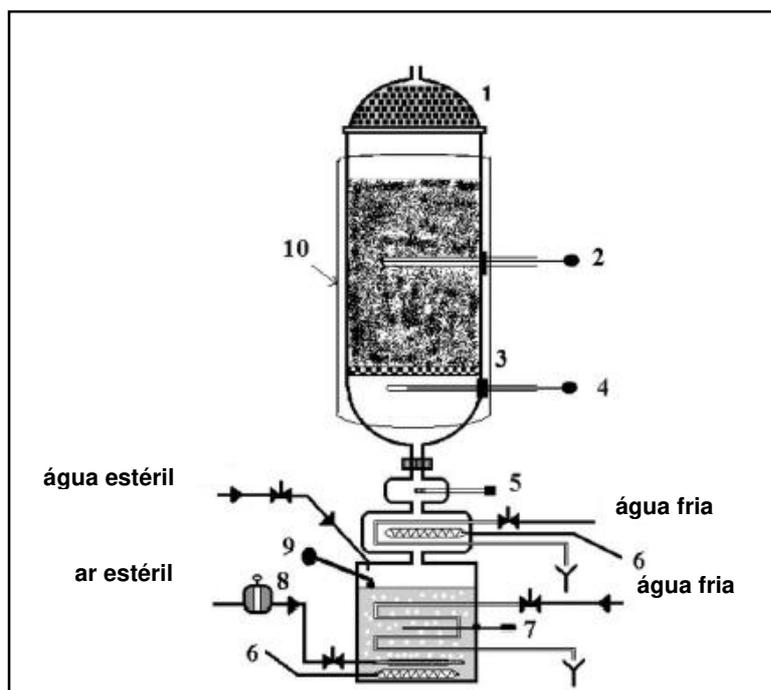


Figura 3.9 Esquema de coluna esterilizável para escala de laboratório (1) colunas (2) termopar; (3) coluna de vidro; (4) termopar para ar de entrada da coluna, (5) termohigrômetro, (6) aquecedor, (7) termopar para temperatura da água, (8) rotâmetro (9) medidor de nível (10) jaqueta térmica (Adaptado de Durand, 2003)

Modelos de desempenho dos reatores de leito fluidizado têm desconsiderado o balanço de energia devido à eficiência da transferência de calor interpartículas. No entanto, muita atenção vem sendo dada aos processos de difusão intrapartícula. O volume de ar ocupado dentro do substrato compreende a fração de vazios na partícula e depende da porosidade e umidade do substrato. Teores de umidade elevados fazem com que a fração de vazios do leito de sólidos seja ocupada pela água, limitando a transferência de oxigênio e criando condições anaeróbias. Por outro lado, teores de umidade baixos limitam a formação de biofilme, inibindo o crescimento dos microrganismos (Ramana Murthy *et al.*, 1993).

A transferência de massa intrapartícula refere-se também ao transporte de nutrientes e enzimas no interior do substrato sólido. Assim, devem ser considerados aspectos como a degradação do substrato sólido pelas enzimas secretadas no meio de fermentação. A relação entre o crescimento fúngico e os fenômenos de transferência de massa é bastante complexa e os modelos matemáticos auxiliam a descrição desse comportamento e o entendimento dos processos.

A Figura 3.10 apresenta de uma maneira geral um sistema de leito fixo e nas condições mínimas de fluidização. Os sólidos serão suspensos quando a queda de pressão exceder a sua massa, quando a velocidade do gás atinge a velocidade mínima de fluidização (Kunii & Levenspiel, 1997). De acordo com a classificação de sólidos proposta por Geldart, materiais agrícolas tais como farelo de trigo, milho ou soja são partículas coesivas, de difícil fluidização devido a formação de aglomerados e caminhos preferenciais no leito.

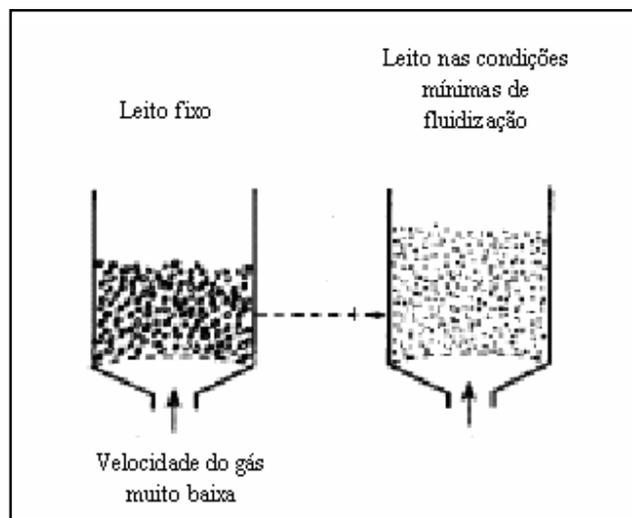


Figura 3.10 Sistemas em leito fixo e nas condições mínimas de fluidização
(Adaptado de Kunii & Levenspiel, 1997)

Estes biorreatores de leito fluidizado ou seus variantes têm sido utilizados para produção de biomassa e enzimas fúngicas por leveduras. Nesse sentido, Tanaka *et al.* (1986), utilizaram um reator de leito fluidizado com agitadores para produção de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* e enzimas por *Eupenicillium javanicum*. Estes autores constataram que as células de leveduras tiveram uma taxa de consumo de oxigênio alta e um consumo de glicose baixo, indicando aerobiose, resultado do excessivo suprimento de oxigênio com elevada vazão de ar durante a fluidização do leito. A produtividade de enzimas por leito fluidizado foi duas vezes superior aos cultivos em leito fixo, considerando massa seca das células e atividade enzimática.

3.5 Suportes para processos em estado sólido

O uso de materiais nutricionalmente inertes como suporte para processos em estado sólido visa facilitar o projeto do meio nutriente, o monitoramento dos parâmetros de processo e o estudo das estratégias de escalonamento e aspectos de engenharia difíceis de serem avaliados quando são utilizados substratos sólidos orgânicos (Nagendra & Chandrasekaran, 1997; Sabu *et al.*, 2001). Os materiais inertes, quando impregnados com solução nutriente adequada, promovem condição de aerobiose homogênea nos reatores e minimizam as impurezas no produto de interesse. Nos cultivos que utilizam substratos naturais, a matriz sólida serve tanto como suporte para crescimento microbiano como fonte de carbono. Estes materiais são tipicamente polissacarídeos de origem agrícola, de fontes tais como cereais, mandioca, batata, feijão e bagaço de cana. Já os suportes inertes podem ser naturais ou sintéticos, no entanto servem apenas como matriz para o crescimento do microrganismo. Espuma de poliuretano, poliestireno, nylon, vermiculite, alumina e amberlite têm sido utilizados como suportes inertes nos cultivos em estado sólido (Rodríguez *et al.*, 1997; Ooijkaas *et al.*, 2000a; Sabu *et al.*, 2001; Lareo *et al.*, 2005).

Os substratos naturais apresentam como desvantagem o fato de que são degradados ao longo dos cultivos, resultando em alterações nas suas características físicas e na sua geometria. Conseqüentemente, os mecanismos de transporte de calor e massa podem ser afetados. Este problema é contornado utilizando suportes inertes que não interagem com a fase biótica do processo (microrganismos), mantendo sua estrutura física praticamente constante. São citadas ainda como vantagens do uso de suportes inertes a facilitada recuperação e purificação de produtos e uma adequada avaliação dos balanços de massa, uma vez que tratar-se de meios de cultura definidos.

Espumas de polipropileno foram selecionadas como suportes inertes por apresentarem considerável área para adesão das células, difusão eficiente de nutrientes e oxigênio, por não serem degradadas durante os cultivos e por serem disponíveis e de baixo custo (Rodríguez Couto *et al.*, 2001).

Weber *et al.* (1999) propôs a escolha de suportes para coluna de leito fixo baseando-se em dados da literatura e em balanços de massa e energia. Nesse sentido, avaliaram linho, bagaço de cana-de-açúcar e perlite como suporte para produção de esporos de *C. minutans*. Os ensaios utilizando linho apresentaram um maior rendimento, uma vez que este suporte mostrou-se mais eficiente no controle da atividade de água devido à melhor absorção de água, não havendo encolhimento ao longo do cultivo.

Lareo *et al.* (2005) estudaram o efeito da umidade na produção de gás carbônico por *Mucor bacilliformis* cultivado sobre espuma de poliuretano impregnada de solução de nutrientes concentrados. A produção de gás carbônico e a biomassa foram máximas em 96 horas de cultivo, com 90% de umidade do meio sólido.

Poliestireno comercial pode ser usado como suporte sólido inerte para produção de L-glutaminase por *Beauveria sp.* (Sabu *et al.* 2001). Estes autores citaram que o poliestireno é comercializado na forma de esferas expandidas (diâmetro 4 – 5 mm), sendo que devem ser inicialmente submetidas a um pré-tratamento em autoclave a 121°C por 15 min, quando entram em colapso, atingindo um terço do tamanho original. Após, o material deve ser repetidamente lavado com água destilada e seco por algumas horas a 110°C. Assim, as esferas de poliestireno ficam preparadas para serem utilizadas como suportes inertes na produção de enzimas extracelulares por *Beauveria sp.*

A produção de manganês-peroxidase e lignina-peroxidase foi estudada em biorreator preenchido com cubos de nylon contendo *Phanerochaete chrysosporium* imobilizado (Rivela *et al.*, 2000). Os cubos de 5 mm de nylon fibroso, foram pré-tratados em água fervente por 10 min, seguido de lavagem com água destilada, secagem à temperatura ambiente e esterilização a 121°C por 20 min. Este sistema mostrou-se adequado para produção das enzimas lignolíticas por cultivo em estado sólido, sendo conduzido continuamente por até 20 dias sem problemas operacionais.

Rodríguez Couto *et al.* (2001) estudaram a produção de enzimas lignolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* em coluna de leito fixo e biorreator de imersão, operando com esponjas de polipropileno como suporte. O biorreator de imersão utilizado foi preenchido por polipropileno e apresentava um sistema pneumático, o qual realizava a imersão do suporte sólida numa solução de nutrientes a uma frequência de $0,5s^{-1}$. Os resultados indicaram que este sistema mostrou-se adequado para a produção de enzimas lignolíticas e que os microrganismos mantiveram-se aderidos a superfície do polipropileno, uma vez que o meio líquido manteve a coloração original. Os autores concluíram que a escolha do reator adequado e a seleção do suporte apropriado definem a eficiência de produção de enzimas lignolíticas por cultivos em estado sólido.

Culturas de *Phanerochaete chrysosporium* em suportes inertes (esponja de nylon) e não inertes (palha de cevada) foram empregadas para a produção da enzima lacase por cultivo em estado sólido (Cabaleiro *et al.*, 2002). Foram utilizadas palhas de cevada de aproximadamente 3 mm e cubos de nylon fibroso de 5 mm. O nylon foi tratado em água fervente por 10 min, seguido de lavagem com água destilada. Posteriormente, os cubos foram secos a $60^{\circ}C$. Tanto nylon como palha de cevada foram esterilizados antes dos cultivos. Os autores verificaram que a produção da lacase foi superior nos cultivos em palha de cevada, provavelmente devido à adição de lignina no suporte que serviu de ativador e estabilizou a atividade enzimática. No entanto, trabalhos anteriores mencionavam que fungos crescem de maneira satisfatória em esponjas de nylon motivado pela alta porosidade e rigidez. Nesse sentido, a produção de enzimas por fungos depende da natureza química do suporte, além das suas características físicas.

Amberlite foi utilizado como suporte para cultivo em estado sólido de *Giberella fujikuroi* (Gelmi *et al.*, 2000). Segundo estes autores, o uso de amberlite facilita a avaliação da cinética de consumo de nutrientes e não influencia na medida dos componentes do meio. O preparo do suporte consistiu na secagem a $50^{\circ}C$ até 10% de umidade, sendo então misturado com nutriente e solução contendo micélio. As velocidades específicas de crescimento elevadas e as

concentrações celulares máximas obtidas sugerem o uso de amberlite como suporte inerte nos cultivos de *G. fujikuroi*.

Gelmi *et al.* (2002) desenvolveram um modelo matemático para cultivo em estado sólido de *Giberella fujikuroi* em colunas, representando as variações da concentração de biomassa ativa e produção de metabólitos secundários em diferentes condições de temperatura e atividade de água. Os autores utilizaram amberlite com o objetivo de simplificar a modelagem, uma vez que a degradação do suporte sólido foi desconsiderada e os efeitos da transferência de massa minimizados. Este modelo reproduziu satisfatoriamente as medidas de biomassa, uréia, oxigênio, gás carbônico e ácido gibelêrico. Além disso, o modelo sugere que *Giberella fujikuroi* não assimila diretamente uréia, sendo necessária a quantificação em laboratório para identificar os compostos nitrogenados intermediários.

A produção de enzimas lignolíticas sobre cubos de esponja fibrosa de nylon em biorreator de tambor rotatório por *Phanerochaete chrysosporium* (Domínguez *et al.*, 2001). Este sistema permitiu a produção contínua de lignina peroxidase por até 18 dias, sem a ocorrência de problemas operacionais.

O cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* e *Phlebia radiata* foi conduzido sobre suporte inerte (esponja de nylon) e natural (cubos de sabugo de milho). De acordo com Cabaleiro *et al.* (2002), o meio de cultivo adequado foi escolhido através da produção de enzimas lignolíticas. Os resultados não indicaram influência significativa do tipo de suporte na produção de enzimas.

Zhao *et al.* (2001) compararam palha de trigo e carvão vegetal como suportes inertes para o cultivo de *Rhizobium leguminosarum* em coluna de 18 cm de altura por 12 cm de diâmetro. Os autores não detectaram diferenças significativas nas células viáveis em 24, 48 e 72 horas entre os dois modelos de suporte.

Esferas de poliestireno foram utilizadas como suporte inerte para produção de L-glutaminase em estado sólido por *Vibrio costicola* (Nagendra & Chandrasekaran, 1997). As esferas com 2-3 mm de diâmetro foram autoclavadas

a 121°C por 15 minutos, o que causou um colapso na estrutura e reduziu o tamanho das partículas para 1-1,5mm. De acordo com os resultados, os autores sugerem o uso de suportes sólidos nutricionalmente inertes nestes cultivos visando contornar os problemas operacionais na obtenção de bioprodutos úteis tais como enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos.

Rinzema *et al.* (1997) utilizaram esferas de ágar com ácido oléico e glicose como meio de cultura definido para cultivo de *Rhizopus oligosporium*. Os autores verificaram que nas colunas de leito fixo o meio de cultura contendo glicose apresentou períodos de metabolismo anaeróbio. No entanto, a utilização de esferas de ágar com ácido oléico em colunas rotatórias mostrou ser uma perspectiva interessante para estes processos, uma vez que nesta situação não houve conversão anaeróbia.

A produção de enzimas ligninolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* foi estudada em biorreator de tambor rotatório (Dominguez *et al.*, 2001). Os fungos foram cultivados sobre cubos de esponja de nylon. O nylon foi preferido como suporte devido principalmente à sua natureza inerte, o que permite avaliar a eficiência do biorreator sem as interações de uma série de variáveis com um suporte não inerte. Além disso, a alta aspereza, natureza hidrofóbica e alta porosidade permitem a aderência do fungo ao suporte e uma difusão de nutrientes e oxigênio eficiente no leito do reator. O suporte foi preparado por aquecimento e lavagem com água destilada, secagem à temperatura ambiente e foi autoclavado a 121°C por 20 minutos. Os resultados obtidos foram satisfatórios para produção de enzimas lignolíticas para esta configuração de biorreator.

Mariano *et al.* (1995) desenvolveram um modelo matemático para o crescimento de fungos filamentosos em leito fixo usando amberlite como suporte inerte. Este sistema é composto de poros heterogêneos de um material biologicamente inativo impregnado de meio de cultura definido e inóculo. O modelo matemático mostrou-se eficiente na estimativa de parâmetros biológicos de difícil medida experimental.

Demirci & Pometto (1995) conduziram fermentação láctica por *Lactobacillus casei* em suportes inertes plásticos. Os suportes foram obtidos a partir da mistura de polipropileno, casca de grãos, albumina bovina e extrato de leveduras. Ho *et al.* (1997) avaliaram os efeitos de diferentes componentes agrícolas nas propriedades de suportes plásticos usados na produção de ácido láctico por cultivo em biofilmes. Foram usados 50% de componentes de origem agrícola e 50% de polipropileno. Segundo esses autores, os resultados indicaram que a formulação usando 35% de cascas, 5% de farinha de soja, 5% de extrato de leveduras e 5% de albumina bovina apresentou grande potencial para ser utilizado como meio nutricional e suporte para desenvolvimento do biofilme e produção de ácido láctico.

Segundo Ooijkaas *et al.* (2000a), os suportes inertes com meios de cultura definidos devem continuar sendo avaliados uma vez que permitem reprodutibilidade dos experimentos e estudos de cinética em cultivos em estado sólido.

3.6 Determinação da concentração celular no cultivo em estado sólido

A determinação da biomassa constitui um parâmetro fundamental na caracterização do cultivo microbiano. Nos processos em estado sólido é geralmente impossível obter medidas diretas da biomassa já que, como os microrganismos crescem aderidos à superfície e estão intimamente ligados à matriz sólida, a biomassa não pode ser separada quantitativamente (Durand *et al.*, 1997; Viccini & Mitchell, 2003). Desta forma, estes estudos baseiam-se em métodos indiretos de estimativa de biomassa, tais como medidas de componentes celulares, taxas de consumo de oxigênio ou produção de gás carbônico.

Nos processos em estado sólido existem três fases, ou seja, uma matriz sólida (orgânica, mineral ou sintética), uma fase líquida que circunda a matriz e a fase gasosa. Como os microrganismos podem estar presentes nas três fases, é difícil a determinação direta da biomassa. Na fermentação submersa os microrganismos são facilmente separados do meio de cultivo, uma vez que

envolve formas esporuladas ou unicelulares. No entanto, quando os fungos crescem em estado sólido na forma de micélio, as hifas penetram na matriz sólida, tornando impossível a separação da biomassa (Durand *et al*, 1997).

Em geral, os métodos de análise de constituintes celulares baseiam-se na medida de glucosamina, ergosterol, quitina, ácidos nucleicos, açúcares totais e proteína (Sharma *et al.*, 1977; Desgranges *et al.*, 1991; Scotti *et al*, 2001).

De acordo com Durand *et al.* (1997) alguns metabólitos estão associados ao crescimento e podem ser usados como indicadores da biomassa, tais como enzimas extracelulares, ATP e consumo de substrato. Por exemplo, a atividade de α -amilase é diretamente proporcional à massa de micélio de *Aspergillus oryzae*. O teor de ATP pode ser usado como indicador de biomassa, embora não seja preciso na fase de crescimento estacionário. Além disso, o consumo de substratos pelo microrganismo nos cultivos em estado sólido resulta em uma seqüência metabólica complexa série de passos. (Viccini & Mitchell, 2003). Se a fonte de carbono é um polímero, incluirá a liberação de enzimas hidrolíticas e sua difusão dentro das partículas do substrato, a reação com o polímero para liberar compostos solúveis, a difusão destes compostos dentro da matriz sólida e o consumo pela biomassa (Mitchell *et al*, 1991).

Zhao *et al.* (2001) trabalhando com *Rhizobium leguminosarum*, estimaram a biomassa pelo número de células viáveis. Aproximadamente 1g da massa fermentada foi misturada com 10mL de água destilada estéril e agitado vigorosamente por 10min. O extrato foi então diluído e plaqueado. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC).

Os métodos de estimativa de biomassa em linha compreendem a medida de evolução de gás carbônico ou consumo de oxigênio (Durand *et al*, 1997).

Pouca atenção tem sido dada aos sistemas de medida utilizados nos cultivos em estado sólido. Viccini & Mitchell (2003) desenvolveram um modelo matemático para converter os dados obtidos em termos de concentração absoluta (massa de biomassa seca por massa de substrato seco inicial) e concentração relativa (massa de biomassa seca por massa de matéria seca na amostra no

momento da amostragem). Devido ao fato da maioria dos biorreatores apresentarem gradientes em macroescala, cujos efeitos são descritos por equações diferenciais parciais, os pesquisadores costumam usar equações empíricas para descrever a cinética de crescimento. No entanto, nos ajustes com equações empíricas simples, existe uma complicação pelo fato da matéria seca do leito do substrato diminuir durante a fermentação, devido à liberação de gás carbônico (Figura 3.11).

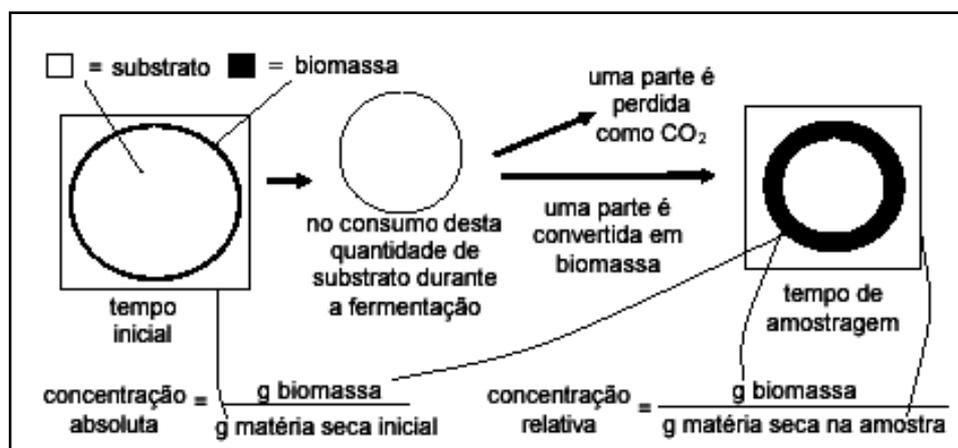


Figura 3.11 Representação da perda de matéria seca (Adaptado de Viccini & Mitchell, 2003)

Desgranges *et al.* (1991) avaliaram a variação de glucosamina, ergosterol e açúcares totais durante o cultivo de *Beauveria bassiana* em estado sólido, sendo que glucosamina foi considerada como melhor indicador da biomassa.

Auria *et al.* (1993) propuseram a medida da queda de pressão do leito de fermentação para quantificar as mudanças macroscópicas nos processos em estado sólido. Segundo esses autores, um aumento na queda de pressão está correlacionado com as diferentes fases de crescimento fúngico. Durante o processo de esporulação, ocorre rápido crescimento dos fungos, o que reduz os espaços interpartículas, causando um aumento na queda de pressão.

3.6 Extratos alergênicos

Os extratos brutos contém substâncias extraídas da biomassa fúngica mediante processos simples em que se empregam líquidos extratores como água ou soluções de Tris-HCl, Evans, Coca, Frugoni e soluções bicarbonatadas. São compostos de proteínas, carboidratos e outros componentes em menor concentração. As proteínas são os principais compostos alergênicos, sendo que para sua utilização em diagnóstico e terapia de alergia torna-se imprescindível o fracionamento e padronização destes extratos (Basomba, 1982; Menezes *et al.*, 1995). A maioria das pesquisas realizadas com alergia em fungos apontam a atividade alergênica de proteínas de massas moleculares entre 10 e 150 kDa.

Os extratos alergênicos utilizados para fins diagnósticos e de terapia são preparados a partir de esporos e do micélio vegetativo de fungos (Yunginger, 1988), sendo que os mais importantes já estudados referem-se aos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. Yunginger (1980) isolaram um alérgeno de *Alternaria alternata*, denominado-o de Alt-1, a partir de fermentação submersa a 25°C em meio Czapeck suplementado com maltose, dextrose e tripticase. *Aspergillus sp.* é um importante fungo anemófilo, detectado em praticamente todos os países. Extratos fúngicos deste gênero têm sido estudados principalmente no que diz respeito à produção de reagentes para diagnóstico da aspergilose broncopulmonar, para controle de produção de toxinas (Hoffman, 1984). Espécies de *Penicillium sp.* foram isoladas dos mais variados ambientes, sendo que a maior fonte de alérgenos foi considerada no interior de residências. Fungos do gênero *Cladosporium sp.* são anemófilos mais freqüentes em regiões com clima temperado (Bush, 1993).

De acordo com Marques (1997), para cada fungo, a quantidade e a qualidade das frações alergênicas estão associadas com os substratos, condições de cultivo e líquido extrator. O estabelecimento criterioso destes parâmetros de processo representa uma condição básica para a padronização dos extratos alergênicos de fungos.

3.7 Extratos alergênicos de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*

A literatura apresenta poucos estudos sobre os extratos alergênicos de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. Praticamente os trabalhos são de Menezes *et al.* (1995) os quais realizaram um extenso estudo sobre a alergenicidade do extrato obtido da sua biomassa cultivada em fermentação submersa. As frações protéicas mais alergênicas foram identificadas como as de massas moleculares 60, 36 e 14,4 kDa, designadas por Dre 1, 2 e 3, respectivamente. Em trabalhos do nosso grupo, Saraiva (2001) estudou o processo de extração, por meio de diferentes líquidos, de componentes da biomassa de *Drechslera monoceras* produzido por fermentação em estado sólido usando farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar. Obteve melhores resultados de extração de proteínas usando água como líquido extrator (relação 1:15 sólido-solvente), pH entre 8,3 e 9, a temperatura de 30°C. Hasan (2002) estudou a produção de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo, do tipo colunas de Raimbault. Nesse trabalho, foram otimizadas as condições operacionais através de planejamento e análise estatística de experimentos. Para o farelo de trigo, substrato que apresentou maior produtividade comparado ao bagaço de cana e farelo de milho, as condições otimizadas partindo-se de 0,4 mg/mL de inóculo, temperatura 25°C e vazão de ar 2 L/h foram pH 9,5 e 45,8% de umidade. Na faixa de variáveis estudadas, os efeitos da vazão de ar não foram significativos ao nível de 90%, porém a evolução dos perfis de biomassa e glicose ao longo dos cultivos indicou possíveis limitações de transferência de oxigênio no sistema. Ainda nesse trabalho foi estudada a obtenção do extrato alergênico a partir da semi-purificação do extrato bruto com a precipitação das proteínas e remoção de polifenóis. Como os resultados de Hasan (2002) sugeriram limitações de transferência de oxigênio e apontam para a necessidade de um estudo particular a respeito desde aspecto específico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Nos ensaios foram utilizados como suportes naturais farelo de trigo com granulometria 0,35 e 0,59mm, classificados num conjunto de peneiras Tyler. O farelo foi obtido no Moinho Paulista, S.A. e mantido no laboratório com aproximadamente 12% de umidade (base úmida) a temperatura ambiente. A espuma de poliuretano foi obtida no comércio local na forma de cubos, sendo confeccionados cilindros 30mm de diâmetro por 30mm de altura para adaptação nas colunas. Estes foram mantidos secos no laboratório a temperatura ambiente em dessecador. Os reagentes utilizados nas análises e na composição dos meios de cultura foram de qualidade p.a.

4.2 Caracterização dos suportes

4.2.1 Densidade e porosidade dos suportes

A densidade real e aparente dos leitos formados por farelo de trigo foram determinadas por picnometria, por meio da medição indireta da massa e do volume do sólido em picnômetro, utilizando água. Pesou-se o picnômetro vazio e após, com água. Através da massa, obteve-se o volume de água usando a densidade na temperatura considerada (densidade da água Mili-Q a 23°C 0,998 g/cm³). O picnômetro foi então preenchido com os sólidos e pesado, calculando-se a densidade aparente que é a razão entre a massa de sólidos e o volume do picnômetro, ou seja, o volume aparente que corresponde aos sólidos e a fração de vazios. O volume real de sólidos foi calculado após determinação da fração de vazios, a qual é obtida por preenchimento do picnômetro que contém os sólidos com água Mili-Q a 23°C, seguido de pesagem. Pela densidade da água, calcula-se o volume de vazios e o volume real de sólidos. A metodologia desconsidera a quantidade de água que penetra nos poros do sólido. A porosidade (ϵ) do leito de partículas foi calculada a partir da densidade real (ρ_{real}) e densidade aparente (ρ_{ap}) através da equação 4.1 (Henderson & Perry, 1976).

$$\varepsilon = \left(1 - \frac{\rho_{\text{ap}}}{\rho_{\text{real}}} \right) \quad (\text{Eq. 4.1})$$

A espuma de poliuretano foi caracterizada pela sua capacidade máxima de absorção de água conforme proposto Lareo *et al.* (2005). Após a secagem a 105°C por 24h, as amostras foram acondicionadas em dessecador, sendo pesadas e posteriormente imersas em água a temperatura ambiente (23°C) em um frasco posicionado no prato de uma balança analítica. A seguir, após a estabilidade da medida da massa do conjunto, a amostra foi retirada, sendo o excesso de água escorrido naturalmente e pesado separadamente. A capacidade máxima de absorção de água foi estimada pelo peso da amostra seca (A) e peso da amostra úmida (B), de acordo com a Eq. 4.2. Assim, sabendo-se a quantidade de água absorvida no suporte inerte tem-se o volume dos poros, permitindo a estimativa do volume real de sólido descontando o volume de água absorvida do volume aparente. Desta forma, pela caracterização da absorção de água é possível estimar a densidade real e aparente e calcular a porosidade do suporte.

$$\text{Absorção(\%)} = \left(\frac{B - A}{A} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 4.2})$$

4.2.2 Área superficial dos suportes

As amostras foram previamente secas em estufa a 105°C por 24 horas e pesadas em balança analítica. Em seguida, a área superficial dos suportes foi determinada por fisioadsorção com nitrogênio no equipamento “BET Surface Area ASAP 2010”, no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC /FEQ/UNICAMP)

4.2.3 Análise granulométrica

O tamanho das partículas de farelo de trigo ao longo dos cultivos foi estimada por análise granulométrica em um conjunto de peneiras Tyler intercaladas de MESH 12, 20, 28, 48 e 100. O diâmetro médio das partículas (d_p)

foi calculado conforme Eq. 4.3 (Henderson & Perry, 1976), sendo que o índice da equação corresponde a uma relação entre fração em massa retida e a quantidade de peneiras utilizadas.

$$dp = 0,1041(2)^{\text{índice}} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

O diâmetro médio de partículas de farelo de trigo fermentadas foi determinado por espalhamento de luz com laser de alta potência no Mastersizer S (Malvern), tendo como dispersante água destilada, no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC /FEQ/UNICAMP).

As amostras de farelo de trigo e espuma de poliuretano foram visualizadas em microscópio ótico LEICA DML com aumento de dez vezes no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC/FEQ/UNICAMP), utilizando software LEICA Quips e LEICA QFAB para realizar medidas de espessura de filme líquido nas fotografias.

4.3 Preparo do inóculo

4.3.1 Manutenção das culturas

A cepa do fungo *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* (ICB USP K-1-16 e CBS 154.26) foi cedida pelo Prof. Dr. Walderez Gambale do Departamento de Microbiologia (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo), sendo mantida em tubo inclinado com ágar-batata e óleo mineral, a temperatura ambiente (Hasan, 2002).

4.3.2 Pré-cultivo

A cultura foi propagada em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 600 mL de meio inclinado de ágar-Czapeck. Após um período de 14 dias, o micélio e esporos foram suspensos em 200 mL água destilada estéril. Com a presença em muito maior proporção do micélio vegetativo em relação aos esporos, conforme observado no trabalho de Hasan (2002), a inoculação foi feita principalmente com

micélio, sendo a sua concentração determinada através de curva-padrão de massa celular seca (em anexo), com leituras de absorbâncias das diluições a 550 nm (Menezes *et al.*, 1995).

O meio de cultura ágar-Czapeck modificado por Yunginger *et al.* (1980) foi composto por: NaNO₃ (2g), K₂HPO₄ (1g), MgSO₄ (0,5g), KCl (0,5g), FeSO₄ (0,01g), maltose (15g), dextrose (15g), peptona bacteriológica (10g), ágar-ágar (15g) e água destilada (1000mL). Neste meio de cultivo foram adicionados 40gL⁻¹ de substrato sólido para adaptação prévia do microrganismo ao meio final de fermentação. O meio de cultura foi autoclavado a 121°C por 20 minutos.

4.4 Caracterização dos cultivos em estado sólido em colunas de Raimbault

Inicialmente foram realizados ensaios em colunas de Raimbault nas condições otimizadas por Hasan (2002), consideradas como ponto de partida para os próximos experimentos (Fig. 4.1). Foi utilizado como substrato o farelo de trigo, sendo autoclavado conforme descrito no item 4.2.2 e classificado por meio de peneiramento nos diferentes níveis de umidade.

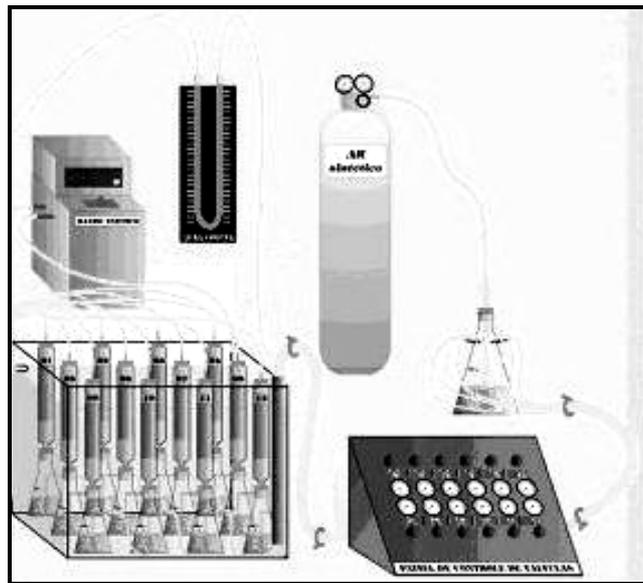


Figura 4.1 Sistema de colunas de Raimbault apresentando doze colunas em banho termostático

A inoculação das culturas de *Dechslera (Helminthosporium) monoceras* foi realizada em câmara de fluxo laminar com bico de Bunsen. O substrato sólido foi inoculado e homogeneizado em sacos de polipropileno e autoclavado conforme descrito no item 4.2.2. O pH inicial do meio foi ajustado utilizando solução KOH 1N. A umidade inicial do meio sólido foi corrigida em 45% pela solução contendo o inóculo, com posterior adição de água Mili-Q esterilizada. Os ensaios foram conduzidos por sete dias nas seguintes condições previamente otimizadas: farelo de trigo com 0,59 mm de tamanho de partícula, 25°C, pH 9,5, 0,4 mg.mL⁻¹ de inóculo com 14 dias, umidade inicial de 45% (conteúdo em base úmida) e vazão

de ar de 2 L/h. Os perfis de umidade do substrato sólido, pH, teor de açúcares e proteína no extrato bruto foram determinados ao longo dos cultivos.

4.5 Cultivos em estado sólido com farelo de trigo

Para os cultivos em estado sólido nas diferentes condições de altura de leito fixo, vazão de ar, diâmetro das partículas de farelo de trigo e umidades iniciais do meio sólido foi considerado um sistema de biorreatores de coluna com monitoramento da vazão de ar, umidade relativa, temperatura e oxigênio, conforme Figura 4.2. A unidade experimental incluiu três sistemas básicos: monitoramento de gases na entrada e saída do biorreator, umidificação do ar e reação. O sistema de alimentação de ar consiste num compressor de ar odontológico. O ar foi primeiramente distribuído para as colunas, sendo após umidificado em frascos erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de água destilada previamente esterilizada. A vazão de ar na entrada e saída das colunas foi monitorada durante os cultivos, sendo que a baixa vazão (2L/h) foi medida em manômetro tipo “U” inclinado e as altas vazões de ar (0,2 a 1L/min) por rotâmetros OMEL[®]. A umidade relativa do ar da entrada das colunas foi monitorada por Termohigrômetro Digi-Sense[®]. Inicialmente foram realizados ensaios com meio sólido nas diferentes alturas de meio para assegurar a ausência de gradientes de temperatura ao longo da coluna. Assim, a temperatura do meio sólido durante os cultivos foi monitorada por termopares IOPE SP-G 22C8. As colunas de vidro com dimensões 20 cm de altura por 3 cm de diâmetro foram preenchidas com o meio sólido até completar as diferentes alturas de leito. O preparo do meio sólido ocorreu conforme item 4.3, considerando as diferentes condições de diâmetro das partículas e umidades iniciais do meio sólido. Assim, a umidade foi ajustada com a solução de inóculo e água Mili-Q esterilizada quando necessário. As amostras de meio sólido foram retiradas durante os cultivos do topo do leito de partículas, caracterizando desta forma um perfil axial. Foram realizados ensaios preliminares utilizando termopares para verificar a ausência de gradientes de temperatura ao longo da coluna nas diferentes alturas de leito.

Os ensaios em coluna encamisada de dimensões maiores (50mm de diâmetro x 320mm de altura) foram conduzidos de acordo com o mesmo procedimento apresentado anteriormente, conforme Fig. 4.3.

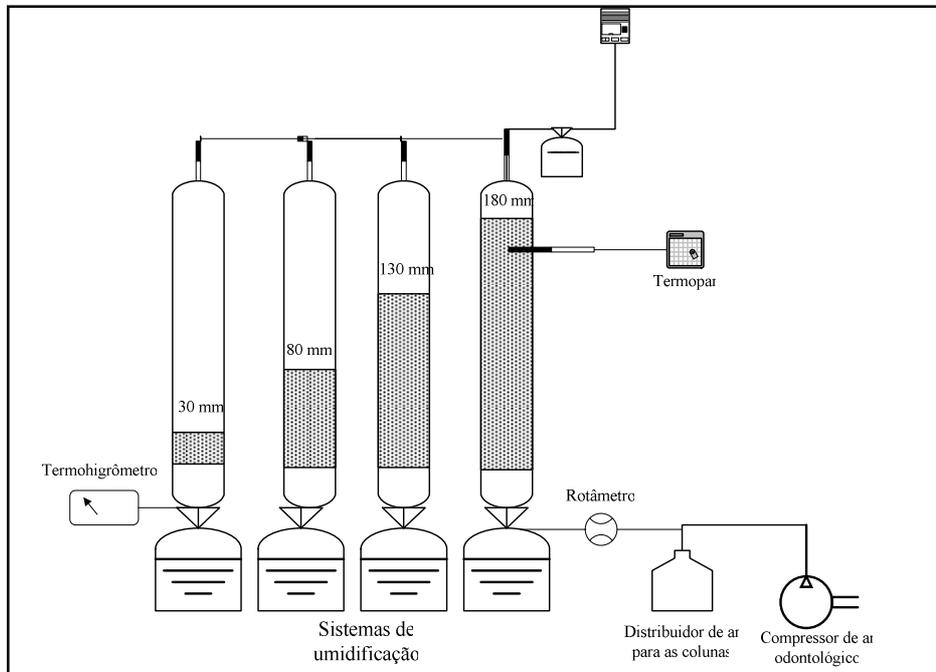


Figura 4.2 Sistema de colunas para avaliação da transferência de oxigênio em diferentes alturas de leito fixo

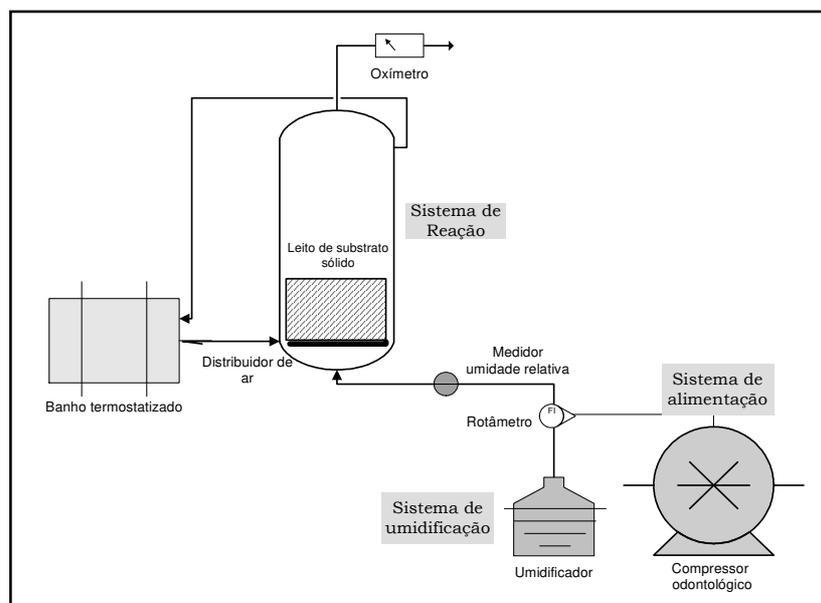


Figura 4.3 Unidade experimental para biorreator de coluna (50mm x 320 mm)

4.6 Cultivos sobre suporte inerte

Os ensaios utilizando espuma de poliuretano foram conduzidos nas condições de vazão de ar e altura de leito selecionados nos experimentos anteriores com suporte natural de farelo de trigo, em colunas de diâmetro 30mm e altura 200mm, de acordo com a Fig. 4.4.

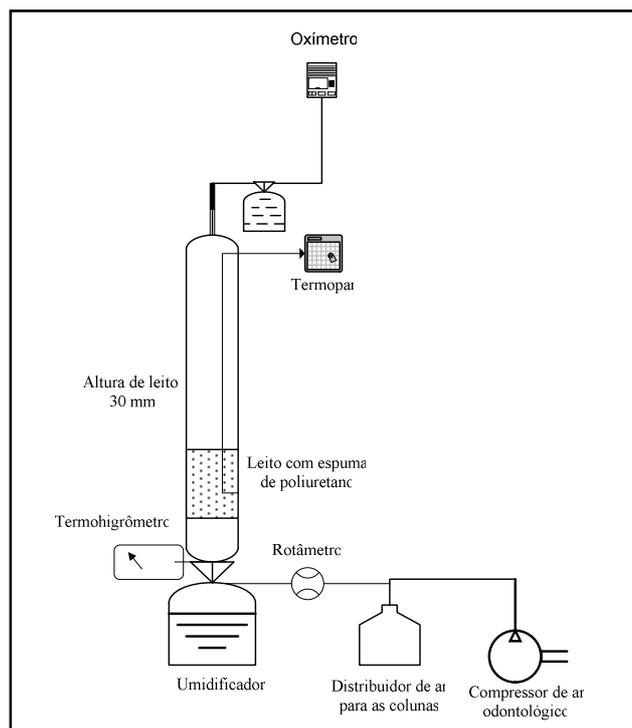


Figura 4.4 Sistema de coluna com leito de espuma de poliuretano

Um cilindro de espuma de poliuretano com diâmetro igual ao diâmetro interno das colunas (30mm) foi impregnado com solução nutriente para obtenção da seguinte composição em base seca: NaNO_3 (8,87mg/g), K_2HPO_4 (4,44mg/g), MgSO_4 (2,22mg/g), KCl (2,22mg/g), FeSO_4 (0,205mg/g), ZnSO_4 (0,205mg/g) e CuSO_4 (0,205mg/g). Estes nutrientes apresentaram a composição do meio Czapeck, mantendo a mesma relação nutriente/meio sólido utilizada nos ensaios com farelo de trigo. O pH inicial da solução nutriente foi ajustado com solução KOH 1N. Em seguida, os cilindros já contendo os nutrientes foram esterilizados em sacos de polipropileno a 121°C por 20 minutos em autoclave, resfriados a

temperatura ambiente, sendo adicionado posteriormente glicose (66,58mg/g), maltose (66,58mg/g), peptona (49,32mg/g) e CaCO_3 (24,66mg/g). Após, a umidade inicial foi ajustada, considerando a massa seca da espuma, com solução contendo inóculo e água Mili-Q esterilizada, quando necessário.

4.7 Obtenção do extrato fúngico bruto

O extrato fúngico bruto de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* foi obtido conforme metodologia proposta por Menezes *et al.* (1995), adaptada para fermentação em estado sólido por Saraiva (2001). O meio sólido obtido nos diferentes tempos de cultivo foi seco a 37°C por 48 horas. O extrato foi então obtido por trituração do farelo de trigo fermentado seco com água Mili-Q (proporção 1:15) em almofariz, sendo após transferido para frascos Erlenmeyer e incubado por 16 horas a 30°C com agitação constante em incubadora tipo shaker orbital (G24 Environmental Incubator Shaker). No caso dos ensaios com espuma de poliuretano, o suporte sólido contendo os microrganismos aderidos foi tratado com água Mili-Q, obtendo-se uma suspensão fúngica.

Para ambos suportes o pH da extração foi ajustado em 9 por adição de NaOH 1N. O extrato foi filtrado, centrifugado a 10.000xg durante 15 minutos, sendo que o sobrenadante obtido foi conservado a 4°C para posterior análise.

4.8 Análises

4.8.1 Conteúdo de umidade do suporte sólido

A umidade do meio sólido (base úmida) foi determinado por gravimetria, em estufa a 105°C até peso constante, utilizando dessecador e balança analítica (Shojaosadati & Babaeipour, 2002).

4.8.2 pH do meio sólido

O pH foi medido com pHmetro nos ensaios preliminares com farelo de trigo a partir de suspensão de 2g meio sólido fermentado em 50 mL de água deionizada.

4.8.3 Teor de proteína no extrato bruto fúngico

O teor de proteínas obtido no extrato bruto foi quantificado através do ensaio colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo 0,1g de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50mL de etanol 95%, com agitação, seguido de adição de 100mL de ácido fosfórico 85%. Esta solução foi agitada por 2 horas, sendo completado o volume para 1L com água mili-Q. Após 6 horas de agitação em shaker, o material foi filtrado, sempre protegido com papel alumínio, e mantido em refrigeração por 24 horas antes de ser utilizado. Assim, para medida da absorbância, 1,5mL do reagente de Bradford pronto foi misturado com 30 μ L de amostra e agitado em tubos de ensaio. Após 10 minutos, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 595nm. Foi preparada uma curva de calibração (em anexo) com BSA (albumina do soro bovino) como proteína padrão.

4.8.4 Teor de açúcares redutores no extrato bruto fúngico

O teor de glicose do extrato fúngico foi determinado pelo método enzimático utilizando o Kit Glicose Oxidase da LABORLAB[®]. Inicialmente foi preparada uma curva padrão utilizando diferentes concentrações de glicose. Foi utilizado 20 μ L de amostra para cada 2mL do reativo de trabalho contendo glicose oxidase, sendo incubado a 37°C por 10 minutos, seguido de leituras em espectrofotômetro a 505 nm.

4.8.5 Rendimento de glicose em proteínas

O rendimento de glicose em proteínas $Y_{P/S}$ foi calculado pela relação das taxas de produção de proteína e consumo de glicose em cada tempo considerado, conforme Eq. 4.4:

$$Y_{P/S} = - \frac{\left(\frac{d_{\text{proteína}}}{dt} \right)}{\left(\frac{d_{\text{glicose}}}{dt} \right)} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

4.8.6 Caracterização das proteínas por SDS-PAGE

A identificação das proteínas nos extratos brutos obtidos foi feita pela determinação das massas molares por eletroforese SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis), sendo utilizados géis de 7,5 e 12,5% de poliacrilamida, no Laboratório de Interação Molecular e Bioengenharia (LIMBio/FEQ/UNICAMP). Para o gel de 12,5% foi utilizado marcador de baixa massa molar da GE Healthcare[®], o qual contém as seguintes proteínas e enzimas padrão: fosforilase b (97kDa), albumina (66kDa), ovalbumina (45kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (20,1kDa) e α -lactalbumina (14,4kDa). Para o gel de 7,5% foi usado marcador de alta massa molar da GE Healthcare[®] contendo as seguintes proteínas padrão: miosina (212kDa), α 2-macroglobulina (170kDa), β -galactosidase (116kDa), transferrina (76kDa) e desidrogenase glutâmica (53kDa).

As proteínas da amostra foram desnaturadas por aquecimento a 100°C na presença de SDS e reduzidas na presença de β -mercaptoetanol. As eletroforeses foram realizadas no sistema Mini-protean II da Biorad (1988), com fonte de 190V por 45min. A revelação das proteínas no gel foi feita com nitrato de prata (Morrissey, 1981). A primeira raia de cada gel foi reservada para o marcador de massa molar, sendo as demais para as amostras de extrato. Em cada raia foi

aplicado 10 μ L de amostra previamente diluída, de modo a ter-se uma concentração de aproximadamente 0,2mg/mL.

A identificação das massas molares das proteínas foi realizada a partir de curva de calibração, sendo graficados os logaritmos decimais das massas moleculares das proteínas do marcador com os valores da relação entre a distância percorrida pela proteína após o término da corrida eletroforética e a distância total no gel, R_f , apresentadas nas Figuras 7 e 8 dos Anexos.

4.9 Determinação do coeficiente global de transferência de oxigênio

A taxa global de transferência de oxigênio (N) e o coeficiente global de transferência de oxigênio gás-líquido (K_La) foram determinados através do balanço de oxigênio nas colunas e pela estimativa do perfil radial de oxigênio dissolvido no biofilme, respectivamente (Gowthaman *et al.*, 1995). O perfil da concentração de oxigênio no biofilme líquido formado na superfície dos suportes sólidos foi calculado de acordo com Thibault *et al.* (2000), conforme Eq. 4.5, assumindo que:

(a) O consumo de oxigênio é igual à demanda de oxigênio na fase gasosa em cada seção do leito fixo de partículas, ou seja, regime permanente;

(b) Os fungos são incapazes de penetrarem na matriz sólida, crescendo apenas na superfície das partículas sólidas, ou seja, no filme líquido que envolve os suportes (Figura 4.5);

(c) A espessura do biofilme é constante durante o cultivo, no entanto, há possibilidade de considerar a transferência de oxigênio a diferentes espessuras;

(d) A densidade do biofilme é constante e a taxa de consumo de oxigênio é uniforme para espessura de biofilme considerada, sendo que há um perfil de oxigênio dissolvido ao longo do filme;

(e) A difusividade de oxigênio na fase líquida é constante, considerada igual à difusividade em água a 25°C;

(f) A concentração de oxigênio no gás está em equilíbrio com o líquido na interface, podendo ser calculada pela Lei de Henry;

(g) Os suportes são homogêneos; no caso de farelo de trigo, todas as partículas são esféricas e apresentam o mesmo tamanho; no caso de espuma de poliuretano, o suporte apresenta-se como cilindro contendo poros com volumes iguais;

(h) A vazão volumétrica de ar é constante ao longo do biorreator.

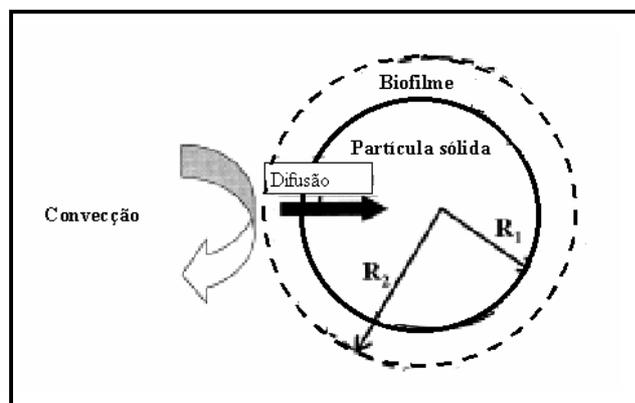


Figura 4.5 Representação dos mecanismos de transferência de oxigênio nos cultivos em estado sólido (Adaptado de Gowthaman et al., 1995)

A concentração de oxigênio foi medida na entrada e saída dos biorreatores por oxímetro YSI®5301B. A espessura do biofilme foi considerada constante de acordo com trabalhos anteriores (Thibault *et al.*, 2000) e medida por microscopia para diferentes condições de umidade do meio sólido. A difusividade de oxigênio na fase líquida foi considerada para água a 25°C ($2,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$). Sendo assim, fazendo o balanço de oxigênio no filme líquido (resolução em anexo) tem-se que:

$$D_{O_2,L} \left(\frac{d^2 C_L}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_L}{dr} \right) = R_{O_2} \quad (\text{Eq. 4.5})$$

onde r é a posição radial (m); $D_{O_2,L}$ é a difusividade de oxigênio na fase líquida (m^2/s); C_L é a concentração de oxigênio no líquido (mol/m^3); R_{O_2} é a taxa de consumo de oxigênio no biofilme. As condições de contorno foram:

$$r = 0; \quad \frac{dC_L}{dr} = 0 \quad (\text{Eq. 4.6})$$

$$r = R_1; \quad D_{O_2,L}^F \frac{dC_L^F}{dr} = D_{O_2,L}^S \frac{dC_L^S}{dr} \quad (\text{Eq. 4.7})$$

$$r = R_2; \quad D_{O_2,L}^F \frac{dC_L^F}{dr} = k_G (C_G - C_G^i) \quad (\text{Eq. 4.8})$$

onde R_1 é o raio da partícula sólida (m); R_2 é o raio da partícula sólida mais biofilme (m); $D_{O_2,L}^F$ é a difusividade de oxigênio do filme na fase líquida (m^2/s); $D_{O_2,L}^S$ é a difusividade de oxigênio do fase líquida na partícula (m^2/s); C_L é a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida (mol/m^3); C_G é a concentração de oxigênio na fase gás; C_G^i é a concentração de oxigênio na interface ou a concentração de saturação (mol/m^3); k_G é o coeficiente de transferência de oxigênio da fase gasosa. O coeficiente de transferência de massa convectivo pode ser estimado por várias correlações na literatura. De acordo com a Eq. 4.9 (Brodkey & Hershey, 1988), k_G pode ser obtido para a faixa de vazão de ar utilizados, considerando o Número de Reynolds (Re), diâmetro médio das partículas (d_p) porosidade do leito de partículas (ϵ) e difusividade de oxigênio no gás ($D_{O_2,G}$):

$$\frac{k_G d_p}{D_{O_2,G}} = \frac{0,1}{(1 - \epsilon)^{1,4}} Re^{1,4} \quad (\text{Eq. 4.9})$$

O coeficiente de transferência de oxigênio gás-líquido ($K_L a$) foi determinado nas condições experimentais através do balanço de oxigênio nos biorreatores, considerando sempre o maior gradiente da concentração de oxigênio dissolvido verificado ao longo do biofilme formado ao redor das partículas sólidas. Primeiramente, a taxa global de transferência de oxigênio (M) foi calculada de acordo com a Eq. 4.10, onde V_s é o volume de meio sólido; Q é a vazão

volumétrica do ar; T é a temperatura na entrada e saída das colunas; R é a constante dos gases e p é a pressão parcial de oxigênio no gás de entrada e saída das colunas:

$$N = \frac{1}{RV_S} \left[\left(\frac{Qp}{T} \right)_{\text{entrada}} - \left(\frac{Qp}{T} \right)_{\text{saída}} \right] \quad (\text{Eq. 4.10})$$

$$N = K_L a (C^* - C_L) \quad (\text{Eq. 4.11})$$

Assim, $K_L a$ foi calculado através da Eq. 4.11, assumindo C^* como a solubilidade de oxigênio na fase líquida na temperatura e pressão consideradas. A concentração de oxigênio no filme líquido formado na superfície da matriz sólida (C_L) foi estimada através do perfil radial de oxigênio no biofilme formado em torno das partículas (Equação 4.5). A taxa média de consumo de oxigênio (R_{O_2}) em termos de volume de biofilme foi calculada de acordo com a Eq. 4.12, considerando a diferença de concentração de oxigênio na fase gasosa (C_G) na entrada e saída das colunas. Como o denominador da Eq. 4.12 é o volume de biofilme, utilizou-se volume total de filme líquido formado ao redor das partículas de farelo de trigo e nos poros da espuma de poliuretano. Assim, R_1 é a distância do centro da partícula até a superfície do suporte (raio das partículas esféricas); R_2 é a distância do centro das partículas até a superfície do biofilme; n_p é o número de partículas no leito ou o número de poros da espuma de poliuretano, calculado para o volume de meio sólido considerado.

$$R_{O_2} = \frac{((QC_G)_{\text{entrada}} - (QC_G)_{\text{saída}})}{n_p (4/3) \pi (R_2^3 - R_1^3)} \quad (\text{Eq. 4.12})$$

A espessura do biofilme foi assumida como sendo constante e igual a 25 μ m para os ensaios iniciais (Thibault *et al.*, 2000) e determinada por microscopia em diferentes condições de umidade para farelo de trigo e espuma de poliuretano. A densidade do biofilme foi assumida como constante e igual a da água (Mitchell *et al.*, 2003).

Assim, para cálculo do $K_L a$ foi necessário a estimativa de C_L . Partindo das condições de contorno apresentadas e conforme resolução em anexo, temos o perfil radial de oxigênio no biofilme considerando consumo de oxigênio segundo reação de ordem zero (Eq. 4.13):

$$\frac{C_L(r)}{C^*} = 1 + \frac{1}{6} \left(\frac{R_{O_2} R_2}{D_{O_2, L} C^*} \right) \left[\left(\left(\frac{r}{R_2} \right)^2 - 1 \right) + 2 \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^3 \left(\frac{R_2}{r} - 1 \right) \right] \quad (\text{Eq. 4.13})$$

4.10 Estimativas da concentração celular

4.10.1 Demanda de oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio (R_{O_2}) por *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* em meio líquido Czapeck foi determinada pela equação 4.14, sendo obtidas as curvas de concentração oxigênio dissolvido (C_{O_2}) versus tempo. Os ensaios foram realizados em cubetas com banho agitado e termostatizado (YSI[®] 5301B Standard Bath), sendo utilizado 10 mL de caldo Czapeck. A concentração de oxigênio dissolvido foi medida por oxímetro YSI[®] Model 5300 e a taxa específica de consumo de oxigênio (q_o) foi calculada conforme a Eq. 4.15 para cada concentração celular (X). Partindo-se de uma solução concentrada de inoculo (0,186mg/mL) foram realizadas cinco diluições para avaliação do consumo de oxigênio. Assim, foi estabelecida uma correlação entre a quantidade de biomassa e a taxa de consumo de oxigênio para avaliação do perfil da concentração celular ao longo dos cultivos em meio sólido.

$$R_{O_2} = \frac{dC_L}{dt} \quad (\text{Eq. 4.14})$$

$$q_o = \frac{R_{O_2}}{X} \quad (\text{Eq. 4.15})$$

4.10.2 Grau de empacotamento do meio sólido

A concentração celular (X) pode ser relacionada também com fator ou grau de empacotamento do meio sólido (ψ), o qual é definido pela relação entre o volume de células no leito de partículas (V_m) e o volume disponível para o crescimento microbiano (V_X). O fator de compactação tem valor unitário quando as células ocupam todo o espaço disponível para crescimento no leito, ou seja, a fase líquida mais a fase gasosa quando for o caso de fungos com micélio aéreo (Laukevics *et al.*, 1985). Assim, a concentração celular é proporcional ao fator de compactação conforme a Eq. 4.16, sendo que m_X é a concentração de biomassa por massa de meio sólido e ρ_{ap} é a densidade aparente do meio sólido.

$$X = m_X \rho_{ap} \psi \quad (\text{Eq. 4.16})$$

Da Eq. 4.16, a concentração de biomassa (m_X) pode ser calculada de acordo com a taxa específica de consumo de oxigênio, considerando a taxa de consumo por biofilme (R) e a relação entre volume de biofilme e volume de leito (Eq. 4.17).

$$m_X = \frac{R \left(\frac{V_{\text{biofilme}}}{V_{\text{leito}}} \right)}{q_0 \rho_{ap}} \quad (\text{Eq. 4.17})$$

4.10.3 Balanço do grau de redução

A concentração celular (X) e o quociente respiratório (RQ) foram estimados pela estequiometria da biorreação, considerando o grau de redução do substrato e da biomassa. A equação geral para crescimento microbiano aeróbio sem formação de produtos pode ser escrita como:



Esta equação pode ser reescrita tendo glicose como fonte de carbono e nitrato como fonte de nitrogênio:



onde $(CH_\alpha O_\beta N_\delta)$ representa a composição da biomassa e “a”, “b”, “c”, “d” e “e” são os coeficientes estequiométricos para oxigênio, nitrato, biomassa, gás carbônico e água, respectivamente. De acordo com Lareo *et al.* (2005), a composição elementar para fungos filamentosos seria 40,11% de C, 7,37% de N, 7,13% de H e 40,39% de O, assumindo conteúdo de cinzas de aproximadamente 5% (Oijkaas *et al.*, 2000). Assim, teríamos $CH_{2,13}O_{0,76}N_{0,16}$ e considerando grau de redução de glicose (γ_s) igual a 4, pode-se calcular os coeficientes a e c da equação pelo grau de redução da biomassa (γ_B):

$$\gamma_s - 4a = c\gamma_B \quad (\text{Eq. 4.19})$$

Partindo dos coeficientes da Eq. 4.18 para oxigênio e gás carbônico obtidos pelo grau de redução, temos que o quociente respiratório (RQ) pode ser calculado pela Eq. 4.20:

$$RQ = \frac{d}{a} \quad (\text{Eq. 4.20})$$

4.10.4 Balanço do conteúdo de água no meio sólido

De acordo com proposto por Lekanda & Pérez-Correa (2004), assumindo que o conteúdo de água no leito é homogêneo, havendo uma umidade média no leito (X_w), o acúmulo de água (dX_w/dt) pode ser escrito como:

$$\frac{dX_w}{dt} = R_w - E + \frac{F_w - W_p}{M_s} - \frac{X_w}{M_s} \frac{dM_s}{dt} \quad (\text{Eq. 4.21})$$

Na equação, R_W é taxa de produção de água [$\text{g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{meio sólido}}\cdot\text{h}$]; E representa a perda de água por evaporação [$\text{g}_{\text{água}}/\text{g}_{\text{meio sólido}}\cdot\text{h}$]; F_W é a quantidade adicionada por meio sólido; W_P é a quantidade de água perdida no fundo da coluna; M_S é a massa de meio sólido. Considerando que o substrato sólido é farelo de trigo, não havendo quantidade de água adicionada ou perdida além da evaporação, temos:

$$\frac{dX_W}{dt} = R_W - E - \frac{X_W}{M_S} \frac{dM_S}{dt} \quad (\text{Eq. 4.22})$$

No caso de suportes inertes como espuma de poliuretano onde não há degradação do meio sólido, o balanço da quantidade de água torna-se:

$$\frac{dX_W}{dt} = R_W - E \quad (\text{Eq. 4.23})$$

De acordo com a Eq. 4.23, não há acúmulo de água no meio sólido e a umidade é mantida constante quando a taxa de produção de água pelas reações metabólicas for equivalente à taxa de evaporação da água. A produção de água pode ser estimada pelo consumo de glicose de acordo com a reação estequiométrica (Eq. 4.18), ou então pela Eq. 4.24, considerando a produção de CO_2 . R_{CO_2} é a taxa de produção de CO_2 e k_W é o fator de conversão entre a quantidade de água e CO_2 produzidos, sendo que o valor típico fica em torno de $1,15 \text{ kg}_{\text{água}}/\text{kg } \text{CO}_2$ (Lekanda & Pérez-Correa, 2004).

$$R_W = \frac{k_W R_{\text{CO}_2}}{M_S} \quad (\text{Eq. 4.24})$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos suportes sólidos e dos seus leitos

Os farelos de trigo com 12% de umidade original foram esterilizados, umidificados aos níveis de 25, 35 e 45% e caracterizados pelo diâmetro médio e distribuição de tamanhos e densidade aparente do leito formado pelas partículas (ρ_{ap}). Os sólidos secos foram ainda caracterizados ainda pela sua área superficial, tamanho e volume de poros. A espessura inicial do filme líquido ao redor das partículas foi determinada para os diferentes níveis de umidade inicial e para as partículas saturadas com água. O diâmetro médio das partículas úmidas foi determinado no início e ao longo dos ensaios, sendo apresentada a distribuição de tamanhos em anexo.

Os leitos formados pelas partículas secas e úmidas foram caracterizados pela porosidade, determinada indiretamente a partir das densidades real e aparente das partículas.

A espuma de poliuretano foi caracterizada pela sua capacidade máxima de absorção de água, densidade aparente e porosidade do leito formado por um cilindro de diâmetro aproximadamente igual ao diâmetro interno da coluna (30mm).

5.1.1 Densidade aparente e porosidade dos leitos

As Tabelas 5.1 a 5.3 apresentam os resultados de densidade aparente do farelo de trigo original (12% de umidade) e nos níveis 25, 35 e 45%, assim como da porosidade dos leitos formados pelas partículas úmidas. Para a espuma de poliuretano a densidade aparente e porosidade do leito foram determinados sem umidificação adicional.

A espuma de poliuretano utilizada apresentou capacidade de absorção de água máxima de 17,53mL/g. Esse resultado foi similar ao obtido por Lareo *et al.* (2005), trabalhando com cultivo de *Mucor bacilliformis* em espuma de poliuretano.

Tabela 5.1 Densidade aparente e porosidade dos leitos formados por partículas de farelo de trigo e cilindro de espuma de poliuretano de diâmetro 30mm

Suportes	ρ_{aparente} (g/cm ³)	Porosidade (%)
*Farelo de trigo 0,35mm	0,292	30,5
*Farelo de trigo 0,59mm	0,168	57,14
Espuma de poliuretano	0,0275	66,93

* Farelo com 12% de umidade (base úmida)

Observa-se que os valores de densidade aparente obtidos (Tabela 5.1) foram similares aos encontrados na literatura para diversos tipos de farelos, estando por volta de 0,2g/cm³ (Henderson & Perry, 1976).

Nas Tabelas 5.2 e 5.3 observa-se que a umidificação adicional do farelo de trigo conduz ao aumento do diâmetro e densidade aparente das partículas e, em consequência disso, ocorre redução na porosidade dos leitos de 25,5 a 11,4% quando a umidade inicial variou de 25 a 45%, para partículas de diâmetro original 0,35mm.

A espessura do filme líquido formado na superfície variou com a umidade das partículas, sofrendo pequeno aumento (5,28 a 5,46 μ m) quando a umidade do meio passou de 25 para 35%, porém atingiu 8,83 μ m para 45% de umidade.

Farelo de trigo com diâmetro original 0,59mm, (Tabela 5.3) apresentou menores densidades aparentes (0,17 a 0,20 g/cm³) com a variação do nível de umidade de 25 a 45%. Nessas condições, a porosidade do leito variou de 54,1 para 46,8% e a espessura do filme líquido na superfície das partículas foi de 8,74 a 10,55 μ m.

Tabela 5.2 Caracterização do farelo de trigo 0,35mm com diferentes umidades e da porosidade do leito de partículas

Umidade (g/100g)	Diâmetro médio (mm)	ρ_{ap} (g/cm ³)	Porosidade (%)	Espessura média do filme líquido (μm)*	Desvio padrão (μm)
25	0,9	0,27	25,5	5,28	0,62
35	1,55	0,29	18,6	5,46	0,59
45	1,75	0,28	11,4	8,83	1,41

* resultados obtidos pela média de no mínimo 20 medidas

Tabela 5.3 Caracterização do farelo de trigo 0,59mm com diferentes umidades e da porosidade do leito de partículas

Umidade (g/100g)	Diâmetro médio (mm)	ρ_{ap} (g/cm ³)	Porosidade (%)	Espessura média do filme líquido (μm)*	Desvio padrão (μm)
25	1,5	0,17	54,1	8,74	1,74
35	1,9	0,18	50,9	8,92	1,57
45	2,2	0,20	46,8	10,55	1,54

* resultados obtidos pela média de no mínimo 20 medidas

Os valores de espessura de filme líquido determinados para ambos tamanhos de partículas foram inferiores aos reportados em trabalhos anteriores sobre fermentação em estado sólido, em geral em torno de 25 μm , variando até 100 μm (Tanaka *et al.*, 1986; Rajapolan & Modak, 1995; Thibault *et al.*, 2000; Rahardjo *et al.*, 2002). No entanto, em muitos casos os autores basearam-se em espessuras de biofilmes de microrganismos depositados em filtros biológicos ou acumulados em outras superfícies, nas quais os níveis de umidades eram bem

superiores, havendo inclusive a presença de água livre. Oostra *et al.* (2001) encontraram por simulação matemática valores semelhantes aos filmes líquidos obtidos neste trabalho, que correspondiam a espessura máxima do biofilme formado na superfície de gel de ágar para que não ocorresse anaerobiose.

A Tab. 5.4 apresenta as espessuras de filme líquido determinadas por microscopia ótica para suporte espuma de poliuretano com diferentes umidades. Pode-se constatar que o aumento de 25 para 35% de umidade eleva consideravelmente a espessura do filme líquido formado na superfície e nos poros da espuma. No entanto, a espessura se mantém praticamente constante de 35 para 45% de umidade. A espessura de filme líquido máxima foi obtida na saturação do suporte (24,1 μ m), conforme verificado na Tab. 5.5. Neste caso, com 94% de umidade, ou seja, no máximo de água absorvida pela espuma sem a presença de água livre, a espessura de biofilme obtida foi similar aos valores sugeridos pela literatura para cultivos em estado sólido (Thibault *et al.*, 2000). Entretanto, para farelo de trigo foram obtidas espessuras bem inferiores ao relatado na literatura, sendo aproximadamente 12 μ m para os dois tamanhos de partículas. Estes resultados sugerem que o diâmetro do farelo de trigo apresenta pouca influência no filme líquido formado ao redor das partículas e, conseqüentemente, na resistência à transferência de oxigênio. Além disso, pode-se verificar que a capacidade máxima de absorção de água, por volta de 80% de umidade, sugere que em muitos trabalhos na literatura há presença de água livre no meio sólido, descaracterizando a fermentação em estado sólido, promovendo um regime intermediário entre o crescimento em biofilme e submerso, tornando crítica a transferência de massa.

Tabela 5.4 Caracterização do filme líquido em espuma de poliuretano com diferentes umidades

Umidade (g/100g)	Espessura média do filme líquido (μm)*	Desvio padrão (μm)
25	14,45	2,65
35	17,85	2,60
45	18,04	2,95

* resultados obtidos pela média de no mínimo 20 medidas

Tabela 5.5 Caracterização dos suportes saturados com água

Suportes	Absorção de água máxima (%)	Espessura média do filme líquido (μm)*	Desvio padrão (μm)
Farelo de trigo 0,35mm	81,74	11,45	2,00
Farelo de trigo 0,59mm	84,31	12,05	2,06
Espuma de poliuretano	94,02	24,10	2,98

* resultados obtidos pela média de no mínimo 20 medidas

Os dados apresentados nas Tab. 5.2 a 5.5 foram obtidos a partir das fotografias ilustradas nas Fig. 5.1 a 5.4, onde pode-se visualizar os suportes com diferentes umidades e saturados com água: partículas de farelo de trigo 0,35mm, partículas de farelo de trigo 0,59mm e espuma de poliuretano. Esses resultados são importantes para o entendimento dos mecanismos de transferência de oxigênio nos cultivos em estado sólido, uma vez que em geral os trabalhos da literatura não relatam as propriedades físico-químicas dos suportes sólidos usados nem a espessura dos filmes líquidos formados nas suas superfícies.

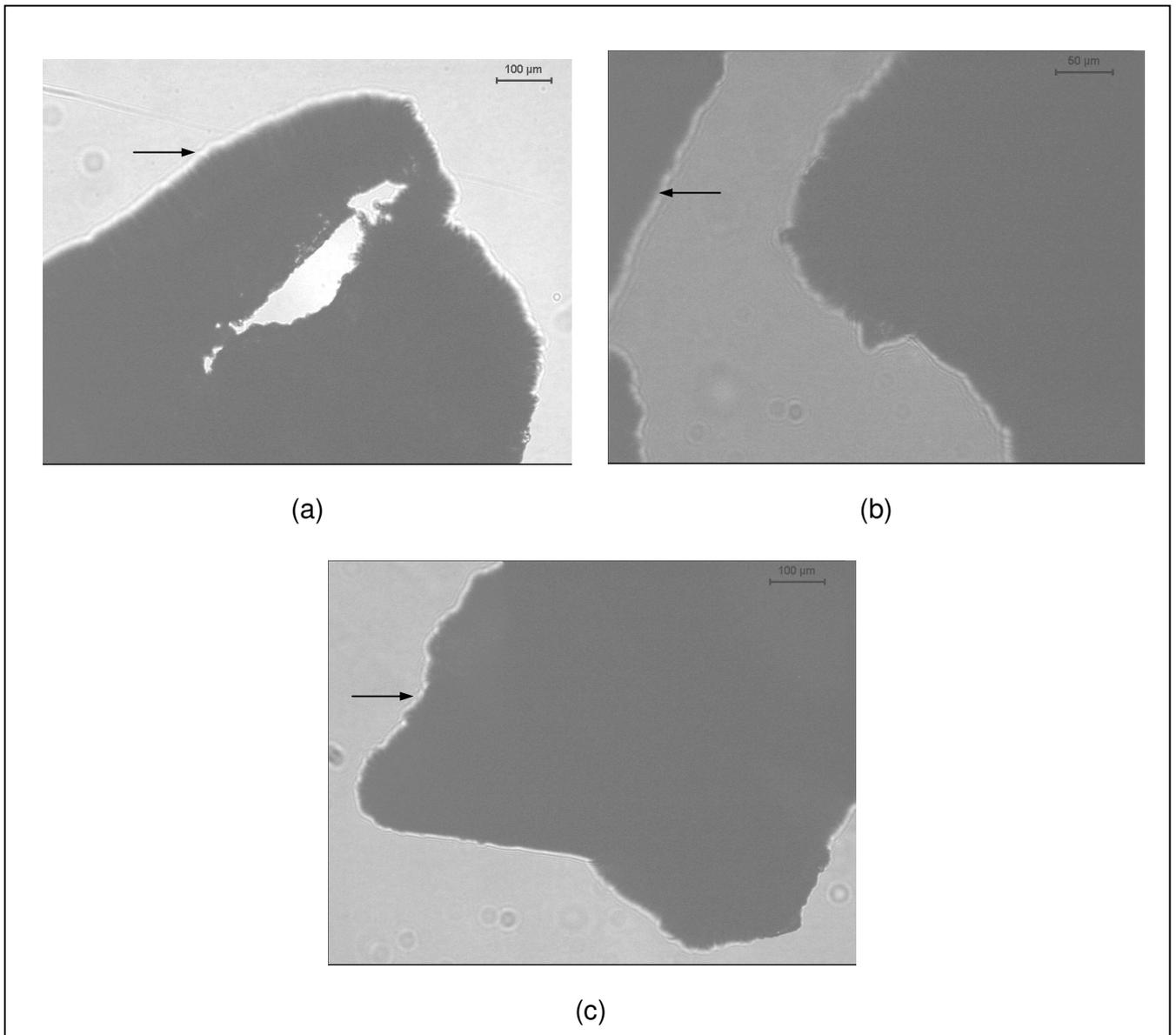


Figura 5.1 Fotografias das partículas de 0,35mm do farelo de trigo: (a) 25%, (b) 35 %, (c) 45% de umidade (as setas indicam o filme líquido formado na superfície do suporte sólido)

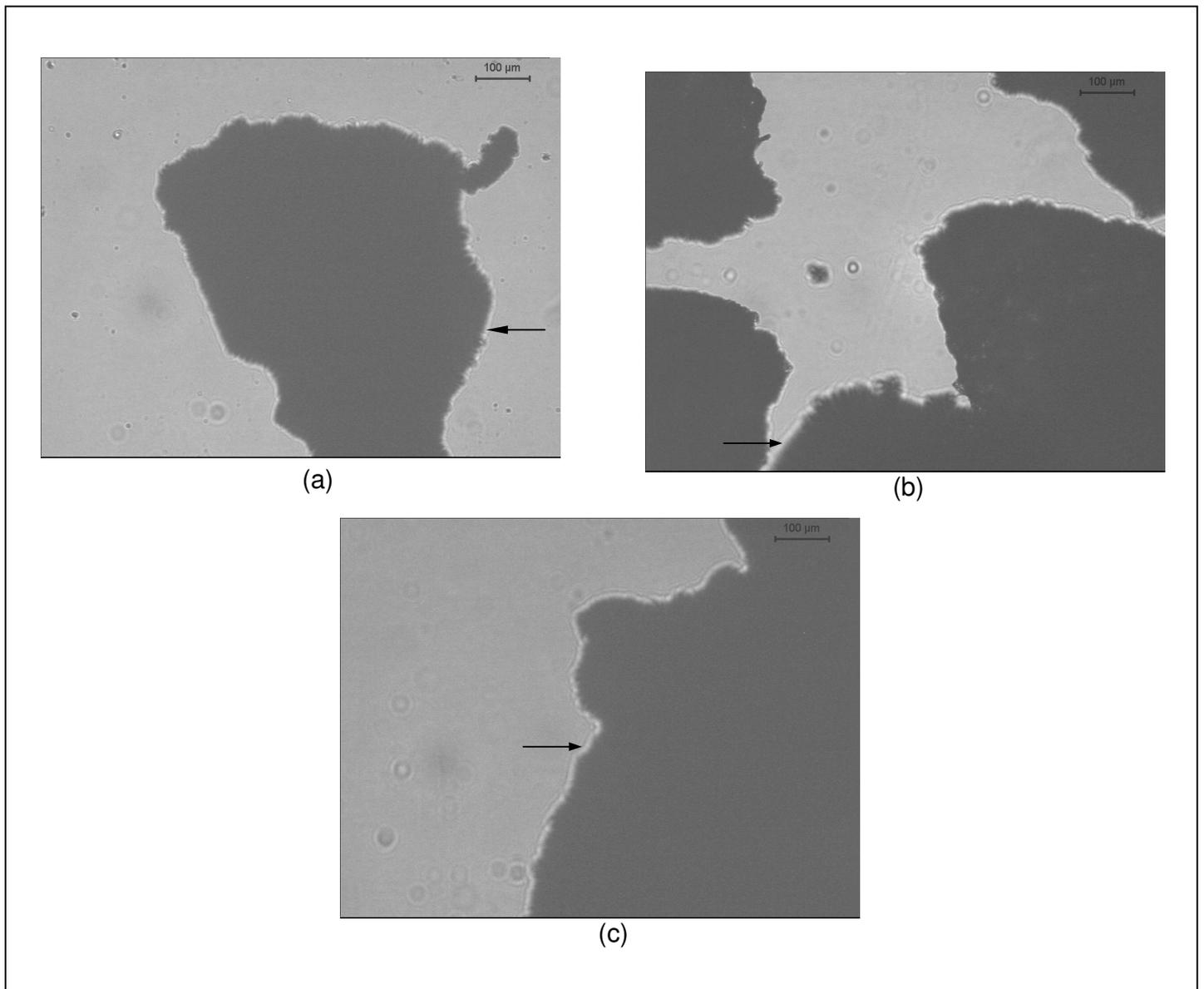


Figura 5.2 Fotografias das partículas de 0,59mm do farelo de trigo : (a) 25%, (b) 35 %, (c) 45% de umidade (as setas indicam o filme líquido formado na superfície do suporte sólido)

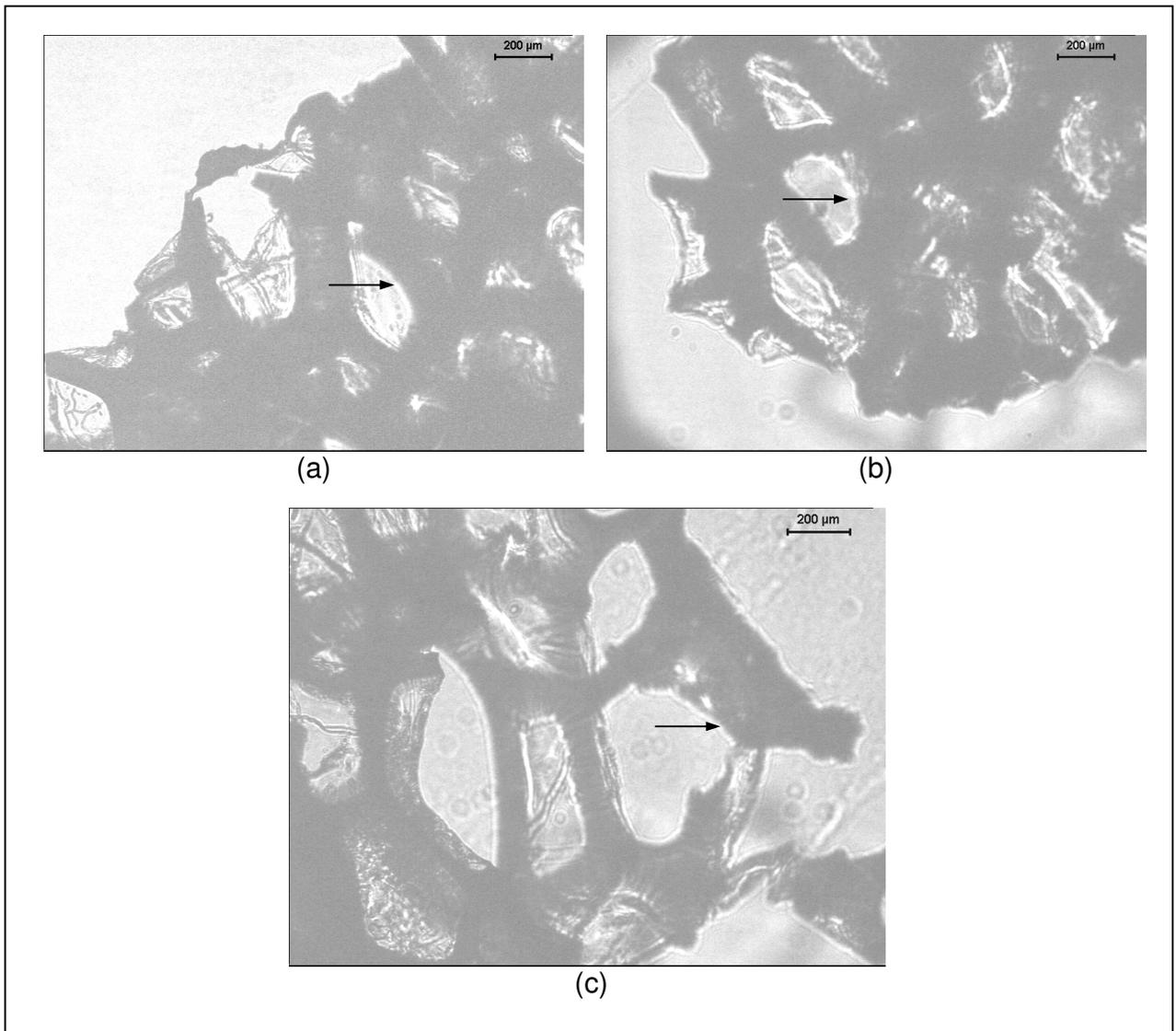


Figura 5.3 Fotografias da espuma de poliuretano : (a) 25%, (b) 35 %, (c) 45% de umidade (as setas indicam o filme líquido formado na superfície do suporte sólido)

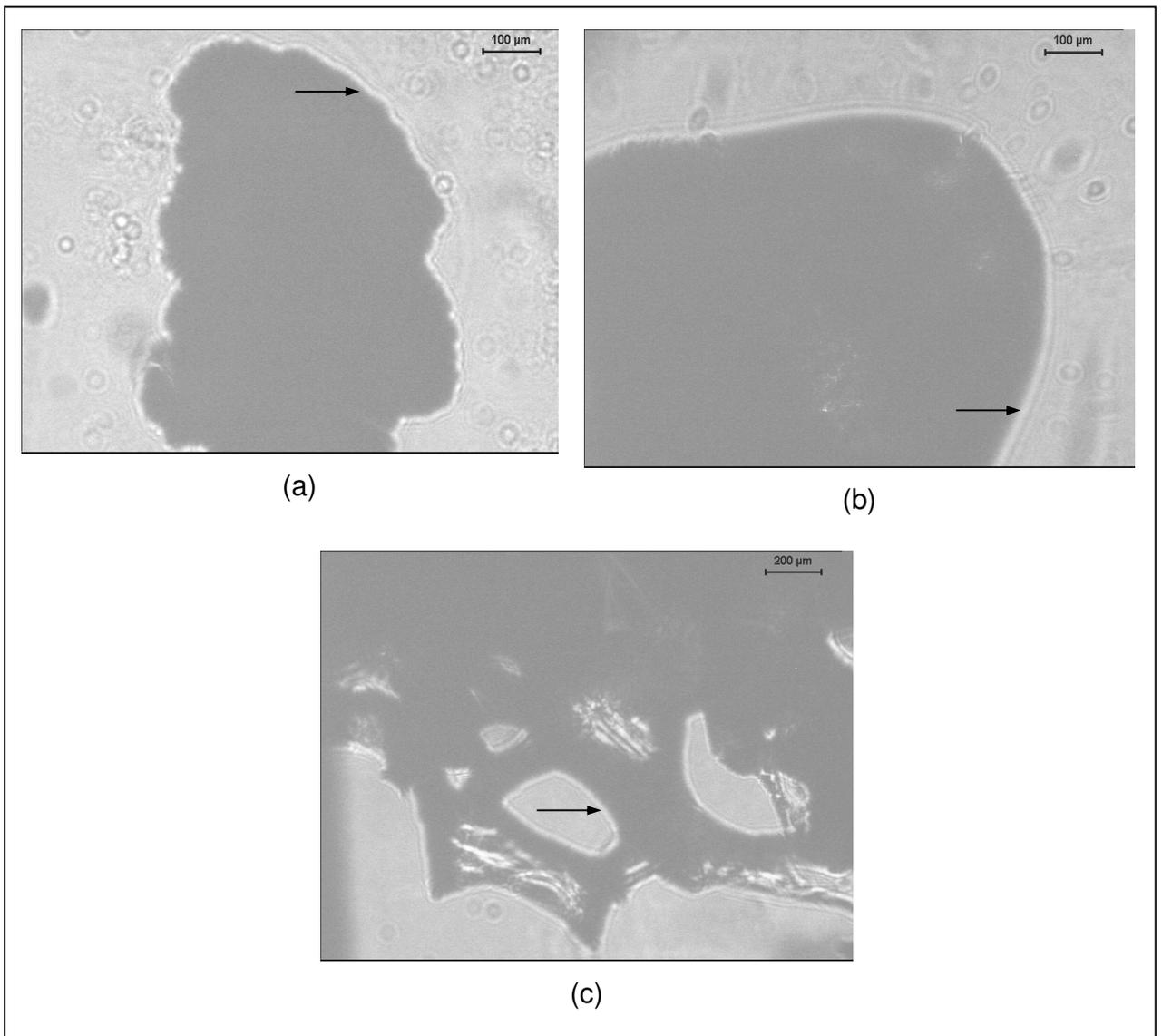


Figura 5.4 Fotografias dos suportes saturados com água: (a) farelo de trigo 0,35mm, (b) farelo de trigo 0,59mm, (c) espuma de poliuretano (as setas indicam o filme líquido formado na superfície do suporte sólido)

5.1.2 Área superficial, tamanho e volume de poros dos suportes

Os resultados de área superficial, tamanho e volume de poros dos suportes sólidos são apresentados na Tabela 5.6. Pode-se verificar que a espuma de poliuretano apresentou maior tamanho médio de poros e área superficial, o que permite uma melhor distribuição dos nutrientes, do oxigênio gasoso e formação de biofilmes na superfície e no interior da matriz sólida. Os dados de tamanho e volume de poros obtidos para os farelos de trigo sugerem que o crescimento fúngico ocorre preferencialmente na superfície das partículas e no espaço aéreo interpartícula, conforme reportado por Rahardjo *et al.*, 2002. O oxigênio consumido seria o correspondente à adsorção nas hifas aéreas, sem as limitações difusionais, e no filme líquido formado ao redor das partículas, onde a difusão seria limitante. Além disso, pelos valores de volume de poros pode-se considerar que toda a água adicionada fica na forma de um filme líquido na superfície da matriz sólida. Assim, as partículas de farelo de trigo comportam-se praticamente como sólidos não porosos. Desta forma, a determinação de densidade real e aparente realizada no item 5.1.1 pode ser feita com água, de acordo com a metodologia indicada no item 4.1.1, uma vez que a quantidade de água absorvida pelos poros é desprezível.

Para espuma de poliuretano verifica-se área superficial e volume de poro cem vezes maior que para farelo de trigo 0,35mm. Desta forma, conforme pode-se visualizar na Fig. 5.3, há formação de filme líquido na superfície e nos poros da espuma. Devido à maior área para formação de biofilme, estes resultados sugerem um maior crescimento fúngico sobre este suporte, uma melhor distribuição de oxigênio devido à maior porosidade do leito (Tab. 5.1) e formação de filmes líquidos mais espessos (Tab. 5.4).

Tabela 5.6 Área superficial, tamanho médio e volume de poros para os farelos de trigo e espuma de poliuretano determinados através das isotermas de BET

Suportes	Área superficial (m ² /g)	Volume de poro (cm ³ /g)	Tamanho médio de poro (Å)
Farelo de trigo 0,35mm	0,3560	0,000872	97,9849
Farelo de trigo 0,59mm	0,2817	0,000378	53,6621
Espuma de poliuretano	3,4932	0,07006	106,7792

5.1.3 Diâmetro médio do farelo de trigo

As partículas de farelo de trigo antes da umidificação com a solução nutriente e solução do inóculo apresentavam umidade em torno de 12%. Foram utilizadas amostras de farelo de trigo com 0,59 mm, como usado por Hasan, 2002, e adicionalmente o tamanho de 0,35mm, visando melhorar a transferência de oxigênio (Oostra *et al.*, 2001). A Figura 5.5 apresenta a variação do tamanho das partículas de farelo de trigo ao longo dos cultivos analisadas por granulometria em peneiras. Verifica-se a redução no seu tamanho conforme sugerido por Mitchell *et al.*, 2003. As matrizes sólidas sofrem degradação durante a fermentação, tendo a sua estrutura física alterada. Com a umidificação passando dos 12% para 25, 35 ou 45%, houve aumento no tamanho médio das partículas para todos os casos, em consequência do seu intumescimento. Assim, para as partículas de 0,59mm no início dos cultivos o diâmetro médio foi de 2,2, 1,9 e 1,5mm para 45, 35 e 25% de umidade, respectivamente. Para partículas de farelo com 0,35mm o tamanho foi 1,75, 1,45 e 0,9mm para 45, 35 e 25% de umidade, respectivamente. Para farelo de trigo com 0,35mm após 11 dias de cultivo, o diâmetro médio determinado por espalhamento dinâmico de luz (Mastersizer S Malvern) foi de 0,51159mm (90% das partículas apresenta tamanho abaixo de 0,74667mm), com área

superficial de $0,1417\text{m}^2/\text{g}$ para partículas com densidade real (ρ_{real}) igual a $0,42\text{g}/\text{cm}^3$ (Figura 12 – Anexo V).

Verifica-se que para todos os casos foram obtidos diâmetros maiores de partícula para umidades de 45%, sendo que houve diminuição do tamanho ao longo dos cultivos em todos os casos, exceto para farelo 0,35mm com 25% de umidade inicial. A queda no tamanho de partícula foi observada nos primeiros cinco dias de cultivo, mantendo-se praticamente constante após este período. Isto pode ser explicado uma vez que muitos substratos são degradados durante a fermentação, alterando sua estrutura física e causando efeitos importantes nas propriedades do leito de partículas, quando utiliza-se suportes naturais (Mitchell *et al.*, 2003). Por isso, Viccini & Mitchell (2003) propuseram que a concentração de biomassa no processo em estado sólido devesse ser expressa como concentração relativa, considerando a massa de matéria seca no momento da amostragem, uma vez que a massa seca do leito de substrato diminui durante a fermentação devido à liberação de gás carbônico. Segundo esses autores, há uma taxa de mudança global na matéria seca total que é dada pela soma das taxas de variação na biomassa e no substrato. Esta variação na matéria seca pode causar a diminuição das partículas ao longo dos cultivos. Terebiznik & Pilosof (1999) estudaram a perda de matéria seca no cultivo de *Aspergillus oryzae* sobre farelo de trigo. De acordo com estes autores, 40% em massa da matéria seca inicial é perdida até a fase estacionária de crescimento fúngico. Esta perda foi altamente correlacionada com o crescimento microbiano, apesar de continuar ocorrendo mesmo após a fase estacionária. Assim, a menor diminuição das partículas de farelo de trigo 0,35mm e 25% de umidade inicial poderia sugerir um menor crescimento fúngico nesta condição. As maiores diminuições nos diâmetros das partículas ocorreram para farelo 0,59mm com 35 e 45% de umidade. Apesar destas constatações, não existem estudos na literatura mais específicos relacionando a perda de matéria seca, atividade biológica e variação no tamanho das partículas, de modo a se poder analisar melhor esses resultados.

Nandakumar *et al.* (1996), verificaram a redução de 30 - 60% no tamanho das partículas de farelo de trigo durante o cultivo de *B. coagulans*. Partículas de

600-850 μm foram degradadas em 12 horas e as partículas maiores (1200-2057 μm) em 36 horas. De acordo com os autores, as partículas menores contêm mais amido e apresentam uma fração maior de hemicelulose e celulose. Assim, devido à preferência dos microrganismos pelo consumo de carboidratos, houve uma maior redução nas partículas menores no tempo de fermentação considerado. Esse fato explicaria a maior redução de tamanho para as partículas de 0,35mm com 35% de umidade ao longo do cultivo, sugerindo maior crescimento microbiano nesta condição. Do ponto de vista da engenharia de processos, a redução e mudança na estrutura dos suportes naturais é um problema nos cultivos em estado sólido. Assim, a utilização de suportes inertes que mantivessem sua estrutura física ao longo da fermentação seria importante no estudo dos fenômenos de transferência de calor e massa destes processos (Gutiérrez-Correa & Villena, 2003).

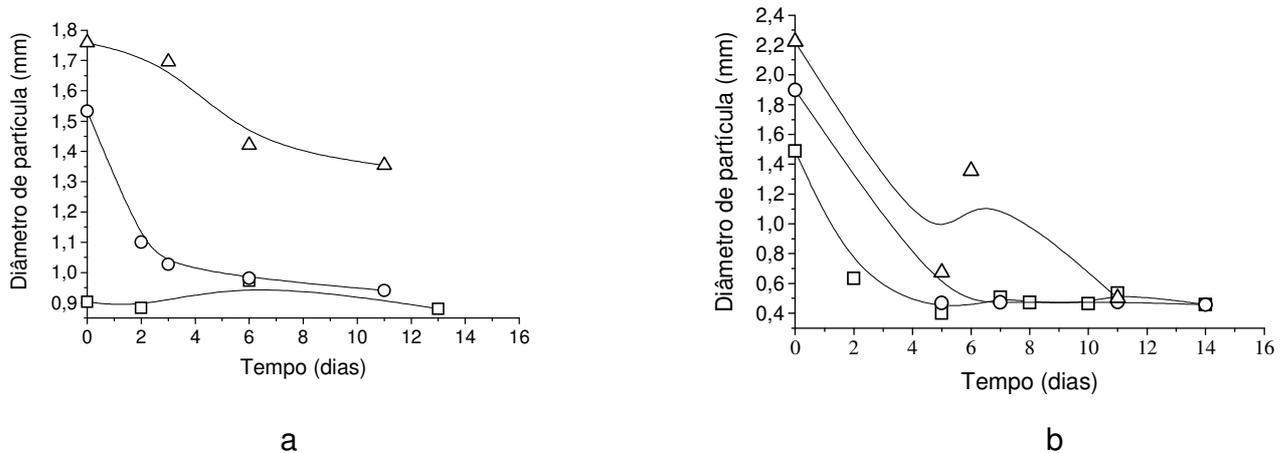


Figura 5.5 Perfis de redução do diâmetro das partículas durante as fermentações em farelo de trigo 0,35 mm (a) e 0,59 mm (b) com vazão de ar 0,4 L/min (Umidade inicial: () 25%, (o) 35%, (Δ) 45%)

5.2 Inóculo

A cepa do fungo *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* (ICB USP K-1-16 e CBS 154.26) foi mantida em ágar-batata com óleo mineral em estufa a 25°C, conforme trabalhos de Menezes *et al*, 1995, e Hasan, 2002. Pode-se verificar na Figura 5.6 que a cultura foi propagada em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 600 mL de meio inclinado de ágar-Czapeck. Tal como observado por Hasan (2002), nas condições de cultivo o inóculo apresenta-se praticamente na forma de micélio.



Figura 5.6 Fotografia do inóculo de *Drechslera* produzido em frascos Erlenmeyers contendo meio ágar-Czapeck

Após um período de 14 dias, o micélio foi suspenso em água destilada estéril e a sua concentração foi determinada através de curva-padrão de massa celular seca, com leituras de absorbâncias das diluições a 550 nm (Hasan, 2002), conforme a Figura 3 do Anexo.

5.3 Cultivo em estado sólido em colunas de leito fixo

Na Figura 5.7 (a - c) são apresentados os resultados obtidos para os ensaios preliminares conduzidos em colunas de Raimbault para a produção de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera monoceras*, visando verificar a viabilidade do inóculo, reproduzir os resultados e os aspectos limitantes do cultivo de *Drechslera* discutidos por Hasan (2002). As condições operacionais foram aquelas otimizadas estatisticamente: substrato farelo de trigo com 0,59 mm de tamanho de partícula, 25°C, pH 9,5, 0,4 mg/mL de inóculo com 14 dias, umidade de 45%, vazão de ar de 0,03 L/min e colunas totalmente preenchidas com partículas (altura de leito de aproximadamente 200mm).

Os resultados foram semelhantes aos obtidos por Hasan (2002), demonstrando não só a reprodutibilidade do processo de produção de proteínas alergênicas, mas também a preservação da viabilidade do microrganismo estocado e os problemas resultantes do acúmulo de água e limitações difusionais do oxigênio.

Na Figura 5.7a observa-se pouca variação do pH do meio sólido nas 168 horas de experimento. O perfil de umidade do meio sólido mostra um aumento de aproximadamente 45% para 54% no tempo total de fermentação, devido ao metabolismo respiratório de *Drechslera monoceras*, que resulta na formação de água decorrente da oxidação do substrato. De acordo com Nakamundar *et al.* (1998), a produção de água metabólica pode levar à redução da porosidade de até 10% em decorrência do intumescimento das partículas e aumento de umidade do leito de farelo de trigo. Devido à vazão de ar baixa (0,03L/min), o acúmulo de água metabólica no leito levou ao aparecimento de água livre, maior resistência à passagem de ar através do leito pela sua compactação, favorecendo a formação de caminhos preferenciais adjacentes à parede da coluna principalmente após 120 horas de fermentação. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.3 verifica-se que há um aumento considerável na espessura do filme líquido quando a umidade fica em torno de 45%. Sendo assim, a produção de água metabólica leva à formação de um filme líquido mais espesso na superfície do substrato,

prejudicando a dissolução do oxigênio. Essas condições descaracterizam a fermentação em meio sólido, e quando o cultivo encontra-se plenamente desenvolvido o que se observa com a compactação do leito e aparecimento de água livre é um regime intermediário entre a fermentação sólida e submersa.

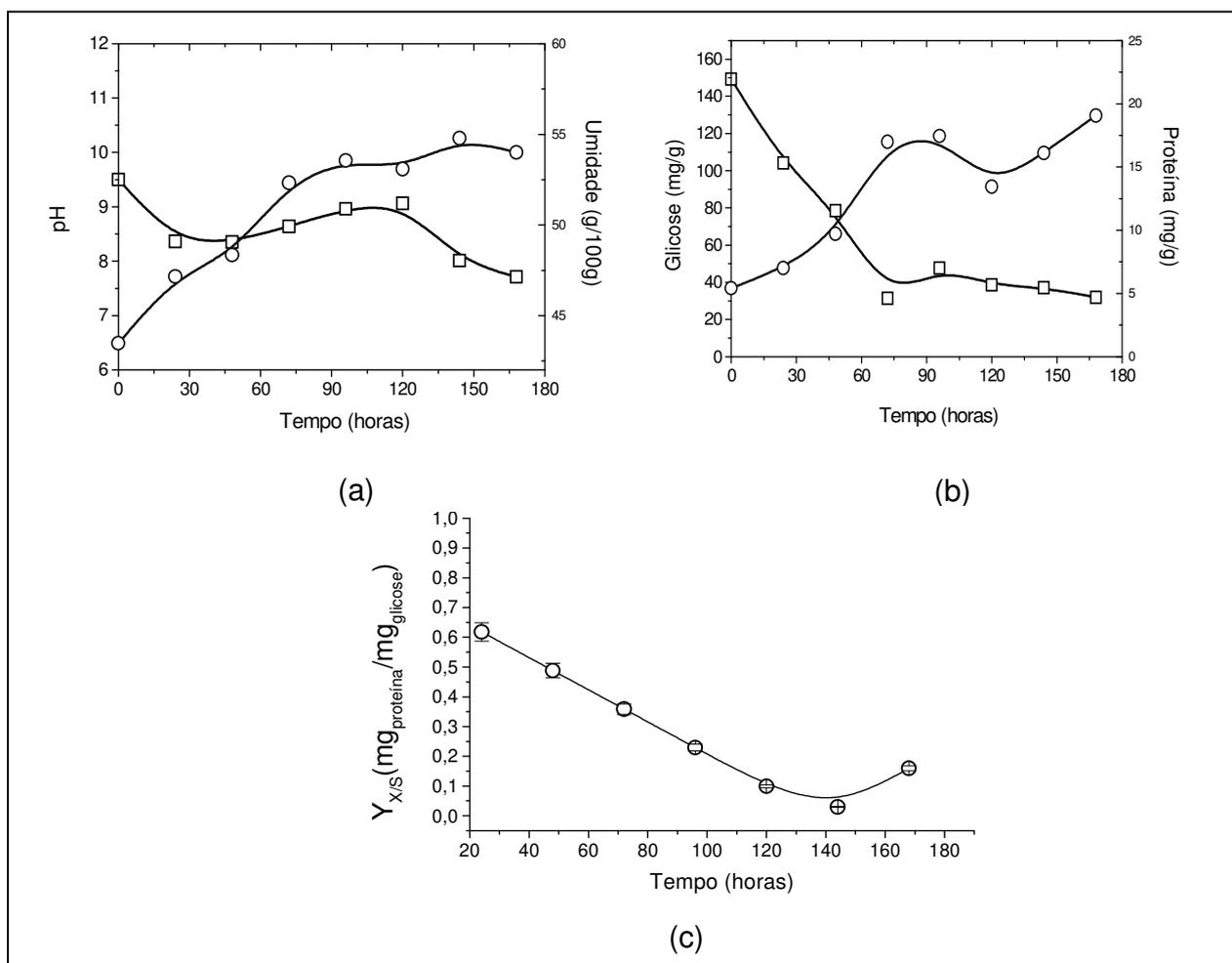


Figura 5.7 Comportamento da fermentação para a produção de biomassa de *D. monoceras* conduzida em colunas de Raimbault com farelo de trigo como substrato para 200 mm de altura de leito: (a) evolução do pH (□) e umidade (○) do meio sólido (b) perfil de açúcares redutores totais (□) e proteínas solúveis (○) no extrato bruto; (c) perfil do rendimento de glicose em proteínas

De acordo com Mitchell *et al.*, 2003, colunas com leito fixo podem apresentar gradientes de temperatura, umidade e concentração de oxigênio gasoso. Assim, estes cultivos que utilizam colunas de Raimbault totalmente preenchidas com substrato natural, estão sujeitos à formação de regiões com baixo teor de oxigênio, desenvolvendo condições de anaerobiose que limitam o crescimento fúngico. Esses aspectos foram relatados por Oostra *et al.* (2001) através da produção de etanol por *Rhizopus oligosporus* em zonas anaeróbias formadas no leito e observados por Hasan (2002).

Os efeitos das limitações de oxigênio refletem-se nos perfis de proteínas (biomassa produzida), açúcares redutores e no rendimento de glicose em proteínas ($Y_{P/S}$), apresentados na Figura 5.7b e c. Esses resultados são indicativos das limitações progressivas da transferência de oxigênio no meio, com aparecimento de condições de anaerobiose após as 72 horas de fermentação.

O perfil de açúcares redutores no extrato bruto obtido a partir do meio sólido fermentado apresentou queda brusca na concentração nas primeiras 72 horas, sendo que após este período a concentração mantém-se praticamente constante até o final das 168 horas de experimento, com um percentual de cerca de 40 mg/g de açúcar residual não consumido.

O perfil de proteínas mostra clara evolução até aproximadamente 72 horas de fermentação, com oscilações no tempo restante, indicando a aproximação de um patamar em torno de um valor máximo de aproximadamente 19 mg/g.

O coeficiente de rendimento $Y_{P/S}$ (Figura 5.7c) sofre uma queda progressiva no decorrer do processo, atingindo após 120 horas um rendimento entre 0,1 e 0,2 mg_{proteína}/mg_{glicose}. Nesse comportamento devem-se levar em conta as oscilações no valor da concentração de proteínas após 72 horas de fermentação. Com essas considerações, o rendimento assumiria um valor aproximadamente constante após as 72 horas de cultivo, tendo em vista que após esse tempo verifica-se uma concentração de açúcares residual aproximadamente constante no meio.

,Por outro lado, Gowthaman *et al.*, 1995, trabalhando com *Aspergillus niger* em leito fixo de farelo de trigo constataram que em altas vazões de ar (25L/min) houve queda na umidade do meio sólido. Hamidi-Esfahani *et al.* (2004) também verificaram que a aeração forçada intensa pode resultar na diminuição do conteúdo de umidade do leito de partículas e queda na produção de biomassa.

Esses resultados demonstram a necessidade de se operar os biorreatores de leito fixo em condições que preservem as características da fermentação em estado sólido, o teor de umidade durante o cultivo e a oxigenação do meio.

A Figura 5.8 apresenta a variação da umidade medida experimentalmente no meio sólido durante a fermentação e os valores estimados pelo balanço de massa considerando que o consumo de uma molécula de glicose leva à formação de seis moléculas de água. Os valores estimados e experimentais apresentaram uma correlação de 0,97 (conforme Fig. 4 dos Anexos). Assim, podemos observar que a quantidade de água produzida é devida fundamentalmente às reações metabólicas no período de cultivo considerado. De acordo com os resultados obtidos utilizando a Eq. 4.22, houve alta taxa de produção de água quando comparada com a taxa de evaporação. Além disso, o efeito da perda de matéria seca não influenciou consideravelmente o conteúdo de água no meio sólido. Desta forma, para que o acúmulo de umidade no meio seja minimizado a produção de água pelo metabolismo microbiano deve ser compatível com as perdas por evaporação, isto é, com a retirada de água do meio sólido. A evaporação da água pode ser afetada por alguns parâmetros como a umidade relativa do ar em torno do substrato sólido, a temperatura do meio, a vazão de ar e as forças intermoleculares dentro do sólido (Lekanda & Pérez-Correa, 2004). Neste caso, como a umidade relativa e a temperatura do sistema foram mantidas praticamente constantes, a vazão de ar e as forças intermoleculares foram os parâmetros que influenciaram a taxa de evaporação. Assim, a evaporação eficiente que permita um equilíbrio do conteúdo de umidade do leito pode ser obtida utilizando altas vazões de ar e diferentes características de compactação do meio sólido.

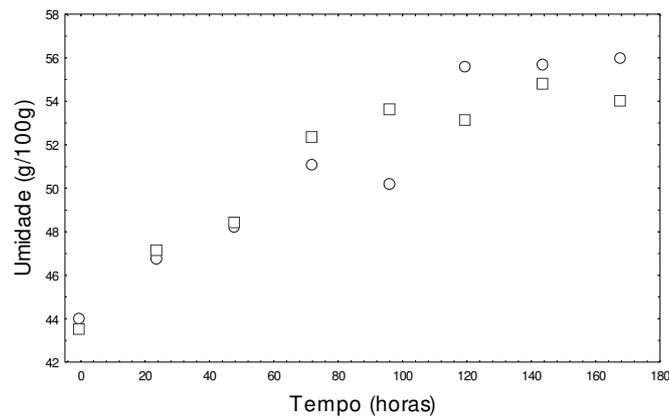


Figura 5.8 Umidade do meio sólido estimada pelo balanço de massa e pela medida experimental: dados estimados (o) e experimentais ()

De acordo com Hasan (2002), as principais variáveis que influenciaram a produção de proteínas alergênicas de *Drechslera monoceras* conduzida em colunas de Raimbault com farelo de trigo como substrato foram o pH e umidade inicial do substrato. Portanto, para o estudo da transferência de oxigênio do presente trabalho, adotou-se o pH 9,5, otimizado por Hasan (2002), e a transferência de oxigênio foi estudada em função da umidade inicial do substrato a qual procurou-se manter aproximadamente constante ao longo da fermentação.

5.4 Estabelecimento dos níveis de vazão de ar e altura de leito - Ensaio na ausência de microrganismos

Os níveis de vazão de ar e altura de leito foram estabelecidos de modo a garantir a manutenção da umidade inicial do meio. A Figura 5.9 apresenta os perfis axiais de umidade do leito de farelo de trigo nos ensaios sem microrganismos, nas vazões de ar de alimentação de 0,03 L/min (2 L/h), nível ótimo obtido estatisticamente por Hasan (2002) e 1 L/min.

Pode-se verificar que o conteúdo de umidade do meio sólido manteve-se praticamente constante para as duas vazões, nas diferentes alturas de leito. Desta forma, mesmo utilizando vazões de ar de alimentação da ordem de (1L/min), constatou-se que o sistema de umidificação foi eficiente, promovendo entrada de ar com 100% de umidade relativa, monitorado pelo termohigrômetro. Isto impede a secagem do farelo de trigo, mantendo a umidade do substrato sólido aproximadamente constante ao longo do tempo.

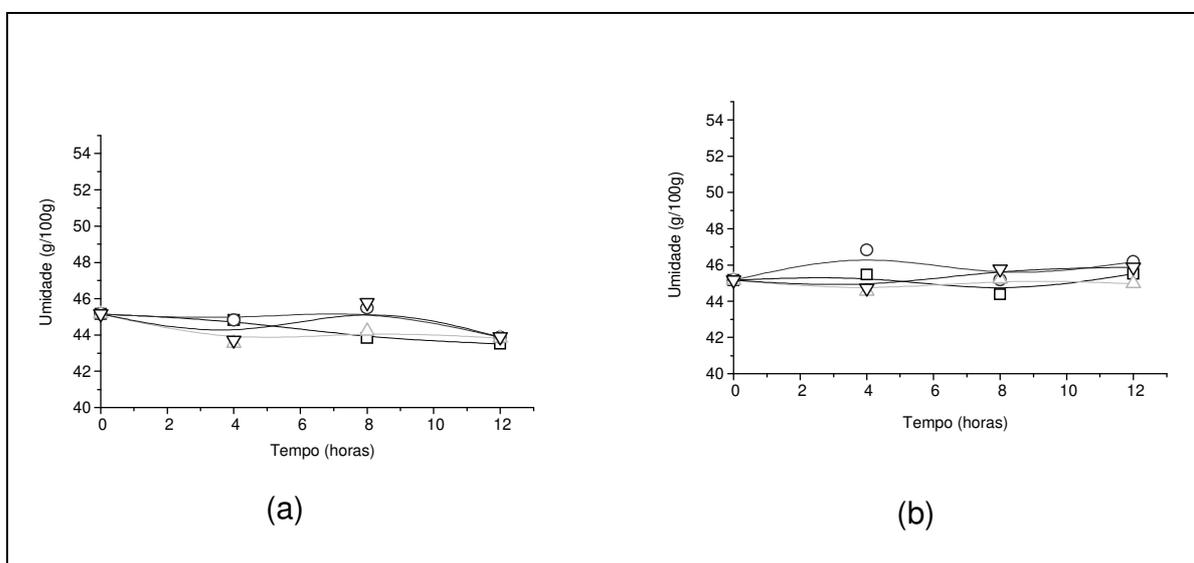


Figura 5.9 Perfis axiais de umidade do leito de partículas com vazão de ar de 0,03 (a) e 1 L/min (b). Alturas de leito: 30mm (); 80mm (o); 130mm (Δ); 180mm (▽).

5.4.1 Cultivo em estado sólido

5.4.1.1 Influência da altura do leito e vazão de ar

A Figura 5.10 apresenta os perfis de umidade do meio sólido com alturas de leito de 30 e 130 mm, para as vazões de ar de 0,03 e 1L/min. Verifica-se um aumento da umidade durante o período experimental, em virtude da produção de água metabólica devido ao crescimento fúngico. Esse aumento foi mais acentuado para a maior altura de leito (130mm), independente da vazão de ar. Para a menor altura de leito (30mm), a vazão de ar 1L/min produziu apenas 5% de aumento da umidade, enquanto para 0,03 L/min, foi observado após 96h, acúmulo de água para o leito de altura 130mm.

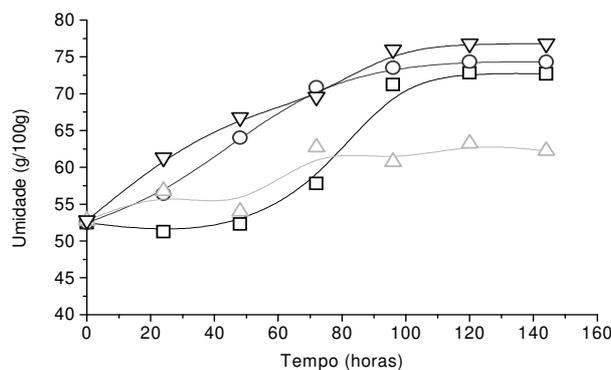


Figura 5.10 Perfis de umidade do meio sólido para diferentes vazões e alturas de leito (farelo de trigo 0,59mm): 30mm - 0,03L/min (□); 130mm - 0,03L/min (○); 30mm - 1l/min (△); 130mm – 1l/min (▽)

A produção de proteína e consumo de glicose foram dependentes somente da vazão de ar para ambas as alturas de leito. Para a menor vazão, menos proteína foi produzida com máximo em 48 horas (Figura 5.11). O consumo de glicose foi maior (aproximadamente 80% da glicose inicial) e mais rápido (72h) (Figura 5.12). Para a vazão de 1L/min, a produção máxima de proteína (16mg/g) foi atingida em 96 horas, com consumo de apenas 40% da glicose inicial a 30mm de altura de leito e 60% de consumo para 130mm.

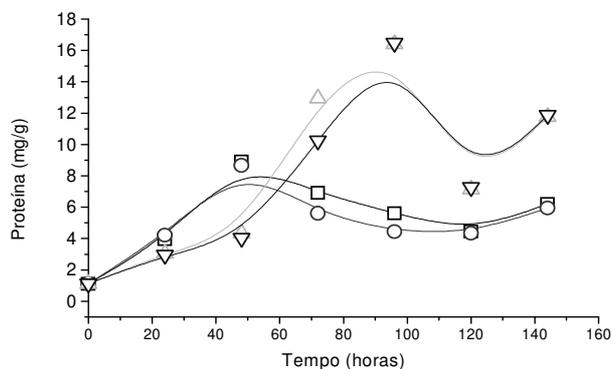


Figura 5.11 Perfis de proteína no extrato bruto obtido para diferentes vazões e alturas de leito (farelo de trigo 0,59mm): 30mm-0,03L/min (□); 130mm-0,03L/min (○); 30mm-1L/min (Δ); 130mm-1L/min (▽)

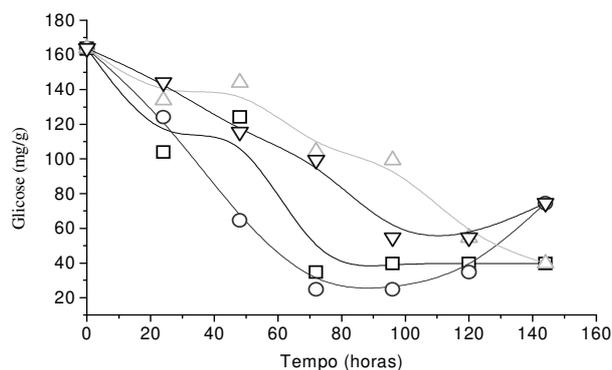


Figura 5.12 Perfil de glicose no extrato bruto obtido para diferentes vazões e alturas de leito (farelo de trigo 0,59mm): 30mm-0,03L/min (□); 130mm-0,03L/min (○); 30mm-1L/min (Δ); 130mm-1L/min (▽)

Observando a evolução dos rendimentos em proteína apresentados na Figura 5.13, verifica-se que estes foram praticamente constantes ao longo da fermentação quando utilizou-se vazão de ar 1L/min, embora para 130mm de altura de leito o seu valor seja de apenas 0,03 mg/mg comparado com 0,06 mg/mg

obtido à 30mm. Nas condições de maior altura de leito, onde há maior acúmulo de água no biofilme reduzindo o espaço aéreo, o rendimento em biomassa é menor, situação de 1L/min e 130 mm de leito. Para a vazão de 0,03 L/min os rendimentos decresceram com o tempo, sendo também menores a 130 mm, quando observou-se maior acúmulo de água no meio. Esses resultados sugerem a importância do balanço entre o crescimento aéreo do microrganismo e confinado no biofilme.

Há um melhor entendimento dos resultados quando se analisa os rendimentos ao invés dos perfis de proteínas, glicose e umidade. As variações no rendimento apresentadas em todos os casos estão dentro do admitido para sistemas biológicos, ao nível de significância de 5%. A Tab. 5.7 apresenta os valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação percentual, calculado pela relação entre a média e desvio padrão, dos rendimentos nas diferentes condições de altura de leito e vazão de ar. Pode-se verificar rendimentos praticamente constantes para 30mm de altura de leito, independente da vazão de ar. No entanto, os dados apresentaram alta variação para a menor vazão de ar, independente da altura de leito. Os dados indicam que a vazão de ar discrimina de maneira melhor o rendimento, de maneira que as menores variações correspondem a limitações menos expressivas quando se utiliza mais alta vazão de ar.

Portanto, esses resultados mostram que a produção de proteínas, associada ao crescimento da biomassa é favorecida pela menor altura de leito (30mm) e mais alta vazão de ar (1L/min), conforme esperado. Ressalta-se aqui que em geral as fermentações convencionais em meio sólido reportadas na literatura são conduzidas com vazões da ordem de 10^{-2} L/min (Alvaraz-Sandoval *et al.*, 1997; Favela Torres *et al.*, 1997; Pandey *et al.*, 2001; Soccol & Vandenberg, 2003).

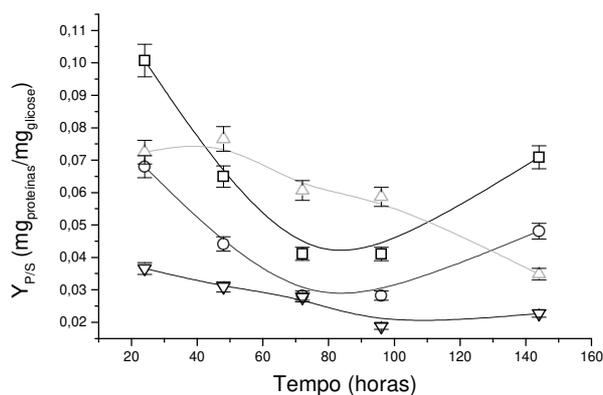


Figura 5.13 Perfis de $Y_{P/S}$ nas diferentes condições de vazão de ar e altura de leito (farelo de trigo 0,59mm): 30mm-0,03L/min (□); 130mm-0,03L/min (○); 30mm-1L/min (△); 130mm-1L/min (▽)

Tabela 5.7 Dados dos rendimentos de glicose em proteínas para farelo de trigo 0,59mm para diferentes condições de vazão e altura de leito

Condição de vazão de ar e altura de leito	Rendimento médio (mg/mg)	Desvio padrão (mg/mg)	Coefficiente de variação (%)
30mm e 0,03L/min	0,062	0,0282	45,46
130mm e 0,03 L/min	0,042	0,0188	44,57
30mm e 1L/min	0,062	0,0163	26,86
130mm e 1 L/min	0,027	0,0070	25,52

Os comportamentos relativos à transferência de oxigênio nos cultivos são apresentados através dos seus parâmetros nas Figuras 5.14 e 5.15. A Fig. 5.14 apresenta a variação da taxa de transferência de oxigênio (N) determinada por unidade de volume de sólidos no meio. Observa-se que houve diferenciação de N somente para a condição de 30mm de leito e 1L/h de vazão de ar. Em todas as outras condições os valores de N foram muito baixos e praticamente constantes ao longo da fermentação. Esses resultados explicam o maior rendimento em proteínas (biomassa) em relação à glicose apresentado na Figura 5.13.

Considerando os dois tipos de crescimento fúngico, a maior taxa de transferência de oxigênio nessas condições deve-se ao favorecimento do crescimento aéreo em consequência do menor acúmulo de água no leite. Para a condição de 30mm de leite e 1L/min, observa-se que o valor de N , inicialmente alto, decresce em 48 horas, voltando a crescer até o final da fermentação. Sabendo-se que nesse tempo não houve variação significativa no tamanho médio das partículas, conforme Figura 5.5, a variação de N deve-se ao efeito conjunto da transferência e demanda de oxigênio. Como houve variação de apenas 10% na umidade, pode-se considerar que a espessura do filme líquido durante a fermentação aumentou aproximadamente na mesma proporção, não alterando significativamente a resistência à transferência de oxigênio no biofilme. Portanto, a variação de N deve-se principalmente à demanda de oxigênio por parte dos microrganismos. Em 48h, com a menor demanda de oxigênio (início da fase logarítmica conforme Figura 5.11), a vazão de ar elevada produziu saturação do filme líquido, baixando N , e elevando-o em seguida com a fase logarítmica em evolução.

Comportamento semelhante ao de N pode ser observado quando a taxa de consumo de oxigênio foi expressa através do parâmetro R , calculado em relação ao volume do biofilme. Na Figura 5.15, os valores de R foram calculados para a espessura do filme máxima (25 μ m), considerada constante ao longo da fermentação. Nessas condições, o coeficiente de transferência oxigênio (K_La), calculado a partir do perfil de concentração de oxigênio dissolvido no biofilme líquido considerando o maior gradiente, foi similar para todas as condições, ficando em torno de 3,98s⁻¹ para leite com 30mm e 4,015s⁻¹ para leite com 130mm. Esse resultado, obtido a partir dos parâmetros N e R , é coerente, já que o K_La depende somente das condições físicas do meio, e o valor de R foi calculado à espessura constante de biofilme.

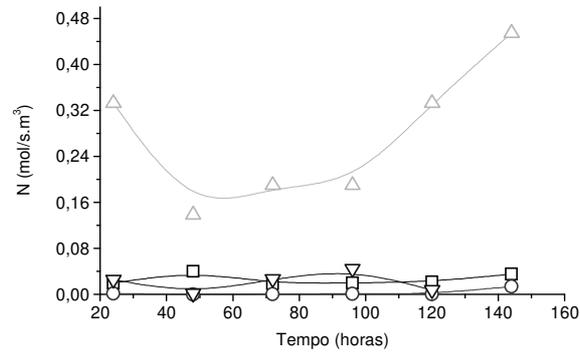


Figura 5.14 Perfis das taxas de transferência de oxigênio (N) por volume de sólidos no meio em função da vazão e altura do leito (farelo de trigo 0,59mm): 30mm-0,03L/min (o); 130mm-0,03L/min (□); 30mm-1L/min (Δ); 130mm-1L/min (▽)

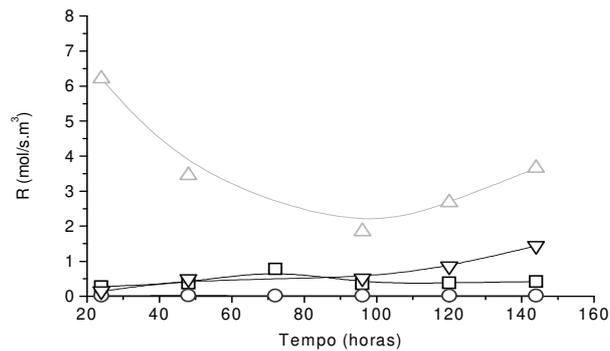


Figura 5.15 Perfis das taxas de consumo de oxigênio por volume de biofilme nas em função da vazão e altura do leito (farelo de trigo 0,59mm): 30mm-0,03L/min (o); 130mm-0,03L/min (□); 30mm-1L/min (Δ); 130mm-1L/min (▽)

Os valores obtidos para o K_La foram semelhantes aos encontrados por Gowthaman *et al.*, 1995 ($2,4s^{-1}$ em 15 horas), constatando que a fermentação em estado sólido caracteriza-se por apresentar valores de K_La bem superiores aos valores típicos dos cultivos submersos. Segundo estes autores, com as altas vazões de ar utilizadas, ocorre um aumento na turbulência do sistema o que tende a reduzir a espessura do biofilme formado nos macro e micro-poros da matriz sólida. Desta forma, com a redução da espessura do filme líquido, diminui a resistência à transferência de massa, refletindo-se em altos valores de K_La . Além disso, neste trabalho o K_La aumentou durante o período experimental, atingido os valores máximos e diminuindo com a demanda de oxigênio. No entanto, Thibault *et al.* (2000) discordaram destes autores, constatando que a variação do K_La apresentada no trabalho de Gowthaman *et al.* (1995) deve-se à consideração que o gradiente de concentração de oxigênio no biofilme é constante igual a 10%, o que implica em valores de R também constantes. Como os valores de N e R obtidos neste trabalho variaram significativamente com o tempo, conseqüentemente não se obtém um gradiente de concentração constante ao longo da fermentação. Os parâmetros N e R são função da transferência física de oxigênio, determinada pelo K_La e pela demanda biológica por parte dos microrganismo no biofilme.

5.4.1.2 Influência da altura de leito à vazão de ar 1L/min

Na vazão de ar onde foram obtidos os melhores resultados do item anterior, foram conduzidos experimentos em quatro diferentes alturas de leito. Conforme podemos verificar na Fig. 5.16, o leito a 30 mm de altura apresentou o menor aumento no conteúdo de umidade do substrato. Para as outras três alturas pode-se considerar que o aumento de umidade foi semelhante. A produção de proteínas, consumo de glicose e rendimento não apresentam uma tendência definida de variação com a altura, para os leitos de 80, 130 e 180mm. Destaca-se em todos os casos a superioridade do leito de 30 mm em relação aos referidos parâmetros (Fig. 5.17 a 5.19), o que pode ser ainda enfatizada a partir dos rendimentos médios apresentados na Tab. 5.8.

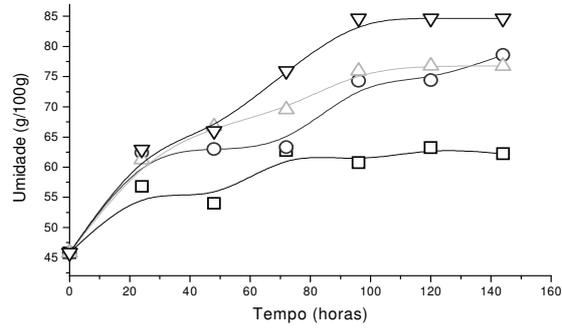


Figura 5.16 Perfis de umidade em diferentes alturas de leito (vazão de ar 1L/min; farelo de trigo 0,59mm): 30mm (□); 80mm (○); 130mm (△); 180mm (▽)

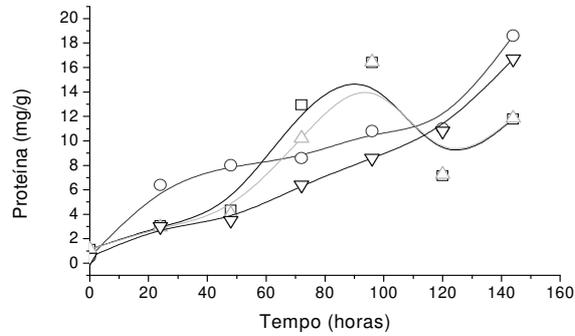


Figura 5.17 Perfis de proteína no extrato bruto (vazão de ar 1L/min; farelo de trigo 0,59mm): 30mm (□); 80mm (○); 130mm (△); 180mm (▽)

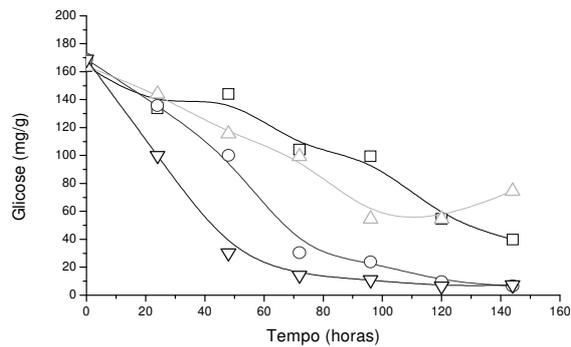


Figura 5.18 Perfis de glicose no extrato bruto (vazão de ar 1L/min; farelo de trigo 0,59mm): 30mm (□); 80mm (○); 130mm (△); 180mm (▽)

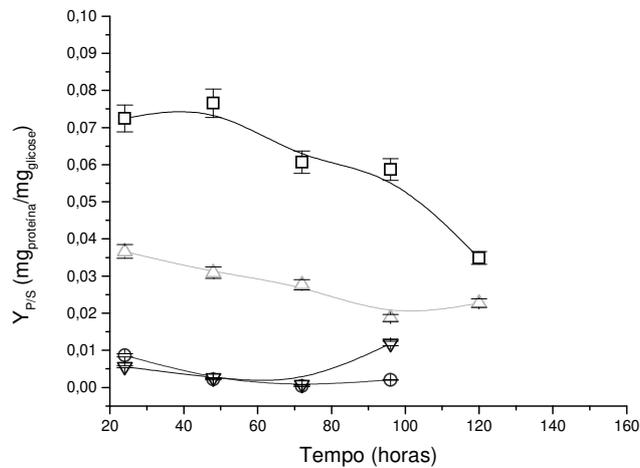


Figura 5.19 Perfis do rendimento proteína/glicose (vazão de ar 1L/min; farelo de trigo 0,59mm): 30mm (□); 80mm (o); 130mm (Δ); 180mm (∇)

Tabela 5.8 Dados dos rendimentos de glicose em proteínas para farelo de trigo 0,59mm nas diferentes alturas de leito

Condições de altura de leito	Rendimento médio (mg/mg)	Desvio padrão (mg/mg)	Coefficiente de variação (%)
30mm	0,061	0,0163	26,87
80mm	0,0043	0,00378	88,56
130mm	0,027	0,00698	25,52
180mm	0,0066	0,00474	71,43

Do mesmo modo, os perfis de N apresentam comportamento semelhantes para as alturas de leito 80, 130 e 180mm, diferenciando-se somente para 30mm (Fig. 5.20). Portanto, para maior transferência de oxigênio e conseqüentemente produção de proteínas, a altura de leito deve situar-se em torno de 30mm. A mesma discussão é válida para o $K_L a$ calculado ao longo das fermentações.

As figuras do Anexo VI apresentam os perfis de umidade do meio sólido, proteína e glicose do extrato fúngico, rendimento de glicose em proteínas e taxa de transferência de oxigênio que resumem os resultados das ensaios conduzidos em diferentes alturas de leito.

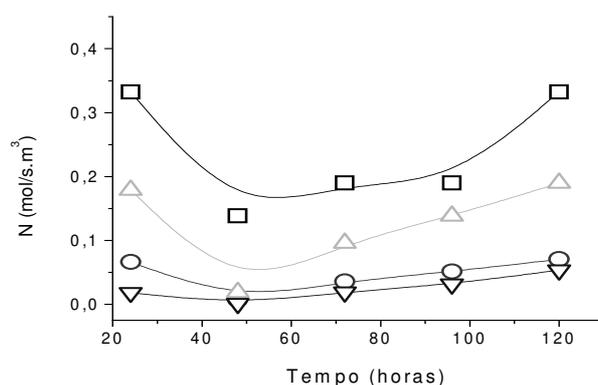


Figura 5.20 Perfis da taxa N (vazão de ar 1L/min; farelo de trigo 0,59mm): 30mm (□); 80mm (○); 130mm (△); 180mm (▽)

5.4.1.3 Influência da vazão de ar para altura de leito 30 mm

A Fig. 5.21 apresenta os perfis radiais de oxigênio dissolvido no biofilme calculados a diferentes velocidades superficiais de ar. Para estes resultados, foi considerada a máxima resistência à transferência de oxigênio, com a espessura do biofilme sendo 25 μ m, conforme proposto por Thibault *et al.* (2000).

Considerando o perfil radial de oxigênio (Eq. 4.13) e calculando a concentração de oxigênio na interface biofilme líquido-partícula sólida de substrato, ou seja, em 25 μ m, onde há o maior gradiente de concentração, verifica-se que o $K_L a$ é aproximadamente 3,9 s⁻¹ em todos os tempos e condições de vazão. $K_L a$ depende apenas das propriedades do sistema em transferir oxigênio da fase gasosa para o biofilme, não sendo influenciado pela vazão de ar na faixa de valores testados. Assim, conforme verificamos na Fig. 5.21, a concentração de oxigênio não varia significativamente após 15 μ m aproximadamente. No entanto,

de acordo com a Tab. 5.3, a espessura do filme líquido é aproximadamente 10 μ m. Desta forma, obtivemos valores de K_La praticamente constantes durante os cultivos, mas distintos para as diferentes vazões ar: $3,75 \pm 0,61s^{-1}$ (0,2L/min), $4,23 \pm 0,62s^{-1}$ (0,4L/min), $3,0 \pm 0,87s^{-1}$ (0,6L/min), $3,5 \pm 1,59s^{-1}$ (0,8L/min) e $3,33 \pm 1,36s^{-1}$ (1Lmin). Embora os valores estejam na mesma ordem de grandeza, estas pequenas variações com a vazão podem ser atribuídas à variação de umidade do meio, conforme os perfis apresentados na Fig.5.22, refletindo-se em variações na espessura do biofilme.

Pela análise das Fig. 5.23 e 5.24 verifica-se que, exceto para 0,2 L/min onde a demanda de oxigênio foi baixa, as taxas de transferência e consumo de oxigênio N e R foram semelhantes para todas as outras vazões de ar. As diferenças nos perfis de umidade observados na Figura 5.22 refletiram-se no cálculo desses parâmetros, produzindo pequena superioridade dessas taxas para a vazão 0,4 L/min. Comportamento semelhante foi observado por Gowthaman *et al.* (1995), que elegeu a velocidade superficial equivalente a vazão de 0,4 L/min como valor ótimo para a vazão de ar em cultivo de *Aspergillus niger* sobre farelo de trigo. Segundo estes autores, o aumento da vazão de ar aumenta a turbulência, reduzindo a espessura do biofilme.

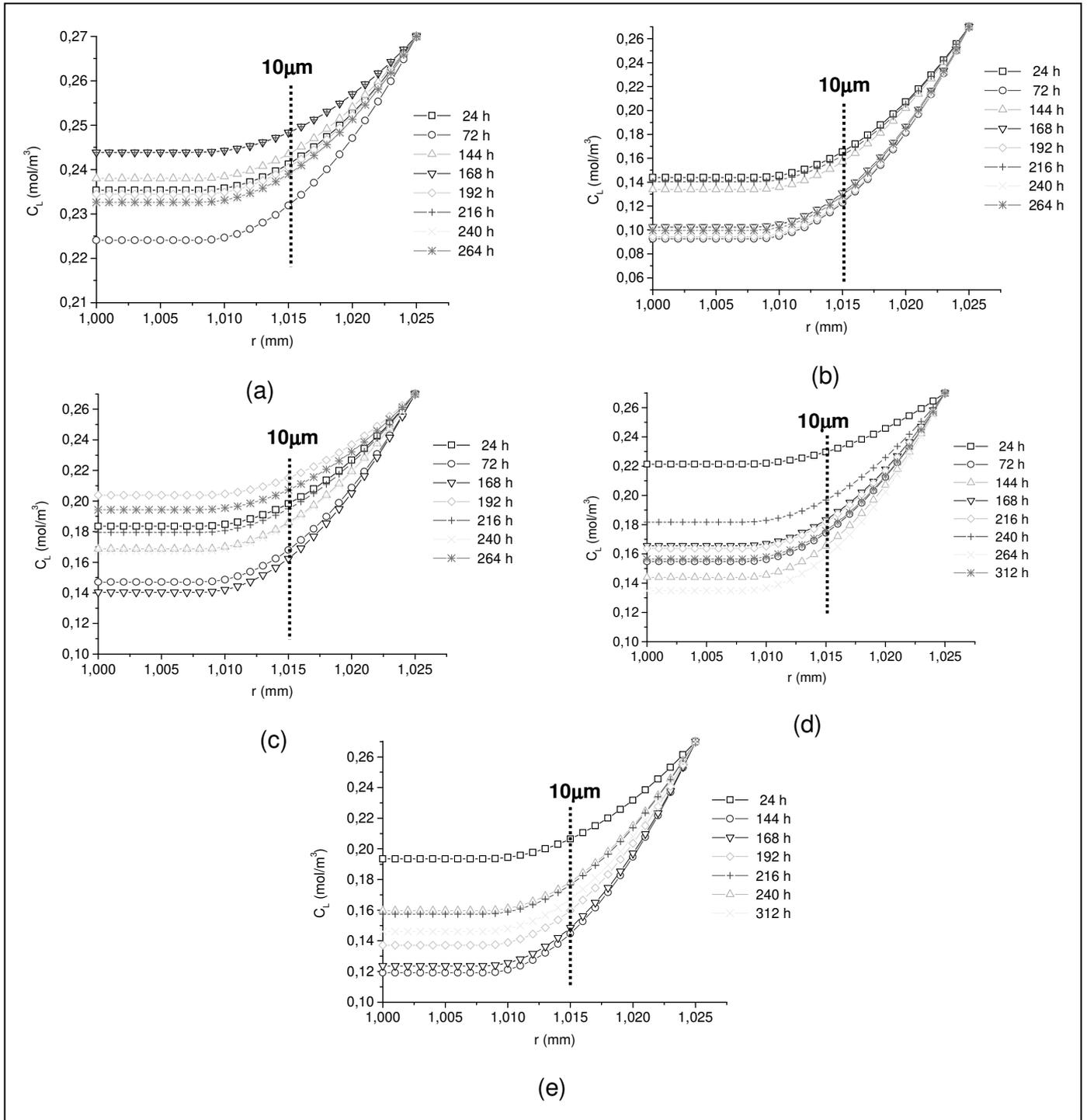


Figura 5.21 Perfis radiais da concentração de oxigênio dissolvido no filme líquido (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm) (a) $Q = 0,2$ L/min; (b) $Q = 0,4$ L/min; (c) $Q = 0,6$ L/min; (d) $Q = 0,8$ L/min; (e) $Q = 1$ L/min

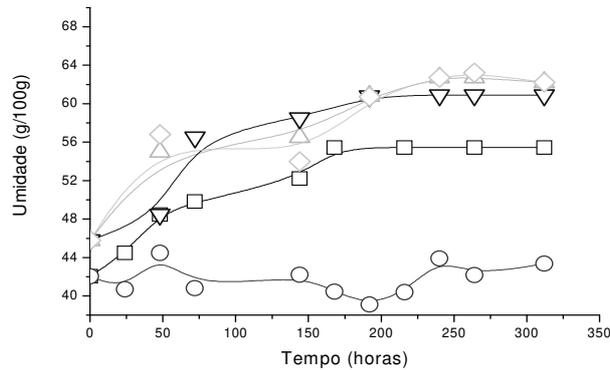


Figura 5.22 Perfis de umidade para diferentes vazões de ar (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm): 0,2L/min (); 0,4L/min (o); 0,6L/min (Δ); 0,8L/min (∇); 1L/min (\diamond)

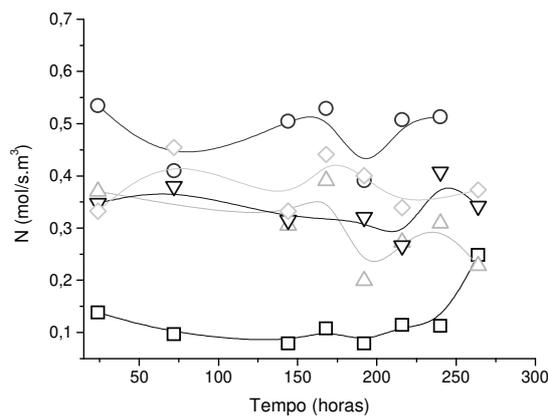


Figura 5.23 Perfis da taxa de transferência de oxigênio obtidos para diferentes vazões de ar (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm): 0,2L/min (); 0,4L/min (o); 0,6L/min (Δ); 0,8L/min (∇); 1L/min (\diamond)

De acordo com esses resultados, considerando as taxas de consumo e transferência e o K_La , embora não haja diferenças expressivas na faixa de vazões entre 0,4 e 1L/min, a vazão de 0,4 L/min apresenta-se como a melhor condição de ar para o cultivo em estado sólido de *Drechslera* em farelo de trigo 0,59mm.

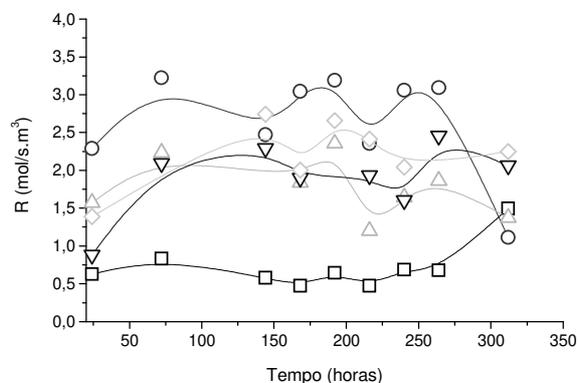


Figura 5.24 Perfis da taxa de consumo de oxigênio por volume de biofilme nas diferentes vazões de ar (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm): 0,2L/min (□); 0,4L/min (○); 0,6L/min (△); 0,8L/min (▽); 1L/min (◇)

A Figura 5.25 apresenta os perfis de umidade e proteína ao longo do cultivo a 0,4L/min. Verifica-se aumento gradativo no teor de proteínas no extrato bruto sugerindo crescimento microbiano homogêneo nas 312 horas de fermentação com ausência das fases de adaptação e estacionária. Isto ocorre quando não há limitação por nutrientes, inclusive oxigênio, no período amostrado. Além disso, a umidade do meio sólido permaneceu praticamente constante, o que indica que, apesar do metabolismo microbiano acentuado gerar quantidades de água metabólica, a altura de leito de 30mm e o sistema de umidificação mantêm a umidade do meio praticamente constante. Desta forma, conforme o referido na Eq. 4.22, a taxa de produção de água pelos microrganismos foi semelhante à taxa de evaporação da água, facilitada pelas condições de altura de leito (quantidade de meio sólido) e alta vazão de ar.

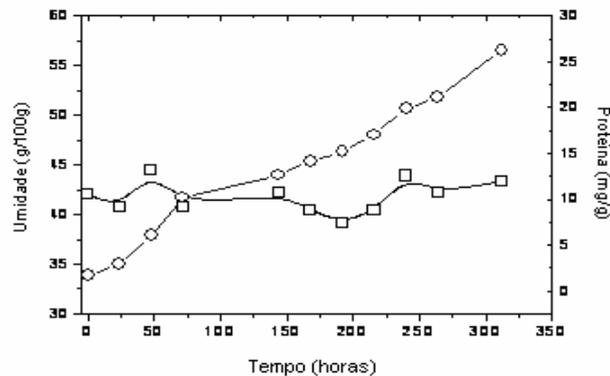


Figura 5.25 Perfis de umidade do substrato sólido e proteína obtidas a partir do extrato fúngico para cultivos a 0,4 L/min (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm): Umidade do meio sólido (□) Proteína no extrato fúngico (○)

Hasan *et al.* (2003), trabalhando com *Drechslera* sobre farelo de trigo em colunas de Raimbault, verificaram que na condição ótima determinada por um planejamento estatístico foram obtidos máximos de 12mg/g de proteína em 150h de fermentação. Estes autores constataram que durante os experimentos ocorria encolhimento do leito de partículas e umedecimento do meio sólido, o que afetaria o rendimento do processo. Quando neste trabalho utilizou-se 30mm de altura de leito e 0,4L/min de vazão de ar, foram obtidos 26 mg/g de proteína em 312 horas, valor superior aos obtidos por Hasan *et al.*, 2003. Isto deve-se possivelmente à eficiente transferência de oxigênio obtida nas condições investigadas no presente trabalho. Assim, o aumento de escala deste processo deverá priorizar um aumento na quantidade de reatores em coluna com altura de leito reduzida.

A Fig. 5.26 apresenta o perfil do rendimento em proteínas com relação à glicose. O rendimento em relação à glicose é praticamente constante após 140h, em torno de um valor médio de 0,07mg/mg. Este valor é superior aos valores apresentados nas Tab. 5.6 e 5.7, indicando que há uma altura de leito e vazão de ar que otimiza o rendimento devido à manutenção das características do leito. De acordo com Oostra *et al.* (2001) a obtenção de rendimentos praticamente constantes sugere que não há limitação de oxigênio durante o cultivo. Estes

autores constataram limitações de oxigênio pela redução no $Y_{X/S}$ de glicose, havendo conversão anaeróbia com formação de etanol. Desta forma, o rendimento de glicose é um parâmetro indicado para avaliar limitações destes processos devido à correlação existente entre a transferência de oxigênio e o consumo de glicose.

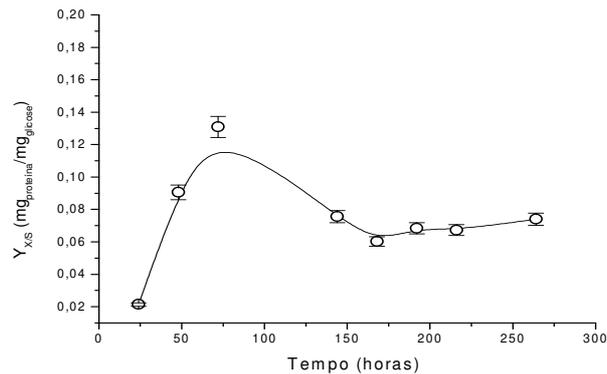


Figura 5.26 Rendimento de glicose em proteína para cultivos a 0,4 L/min (altura de leito 30mm; farelo de trigo 0,59mm)

5.5 Influência da umidade inicial do meio sólido e tamanho de partícula

A Fig. 5.27 apresenta os perfis de umidade do meio sólido durante a fermentação, para partículas de farelo de trigo com diâmetro médio 0,59mm em leito de 30 mm com 0,4 L/min de vazão de ar. Verifica-se que para todas as umidades iniciais testadas não houve variação considerável no conteúdo de água do meio, em consequência das condições de altura de leito e vazão de ar anteriormente selecionados.

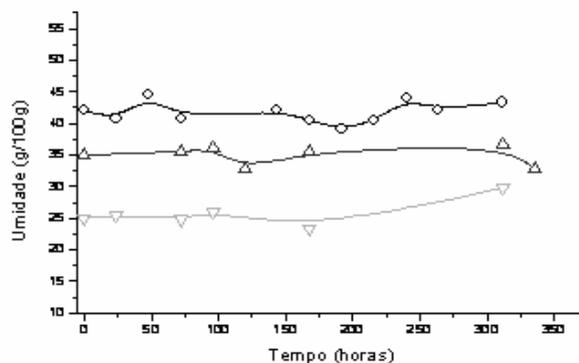


Figura 5.27 Perfis de umidade do meio sólido com farelo de trigo 0,59mm para diferentes umidades iniciais: 25% (∇), 35% (\triangle) e 45% (\circ)

A Figura 5.28 apresenta a produção de proteínas no extrato bruto fúngico obtido para cultivos com diferentes umidades iniciais. Pode-se constatar que a maior produção de proteínas ocorreu a 45% de umidade inicial. Estes resultados indicam que há um teor de umidade ótimo para o crescimento de *Drechslera* por volta de 45%. Para umidades inferiores, há limitação na disponibilidade de nutrientes, principalmente os açúcares, devido à menor atividade de água do sistema. Além disso, considerando o empacotamento do meio, nota-se que a densidade aparente do leito de partículas de farelo de trigo 0,59mm (Tab. 5.3) é maior a 45% de umidade ($0,2 \text{ g/cm}^3$). Assim, de acordo com Laukevics *et al.*, 1985, como mantêm-se praticamente a mesma porosidade e características de

compactação do meio, a concentração celular atingida é proporcional à densidade aparente (Eq. 4.16).

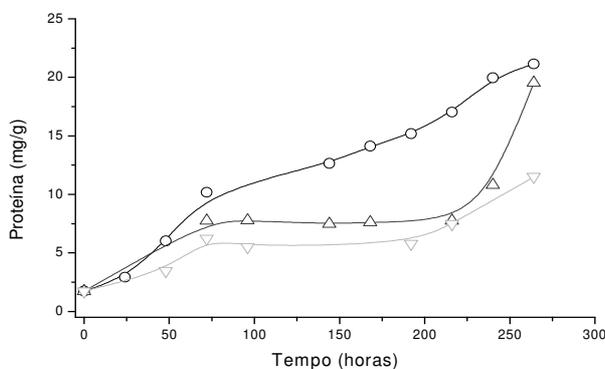


Figura 5.28 Perfis de proteína no extrato bruto para os cultivos com farelo de trigo 0,59mm a diferentes umidades iniciais: 25% (▽), 35% (△) e 45% (○)

A Figura 5.29 apresenta os perfis da concentração de oxigênio dissolvido calculados ao longo do biofilme, considerando espessuras de 5 a 45 μ m. Pode-se constatar que para 45% de umidade inicial, com exceção de 312 horas, os gradientes de concentração de oxigênio são semelhantes, indicando consumo homogêneo de oxigênio ao longo do biofilme durante os cultivos. O oxigênio foi totalmente consumido no biofilme quando a sua espessura foi 45 μ m, e para espessura em torno de 10 μ m a variação da concentração de oxigênio no biofilme esteve em torno de 20%, demonstrando que não há limitação de oxigênio. Para as demais umidades, as variações situaram-se em torno de 10% ao longo de toda a fermentação para todas as espessuras de biofilme. Os máximos de gradientes ocorreram em 120 horas (25% de umidade), 144 horas (35% de umidade). Assim, estes resultados estão em concordância com os perfis de proteína (Fig. 5.28), sugerindo um crescimento microbiano melhor a 45 e 35% de umidade.

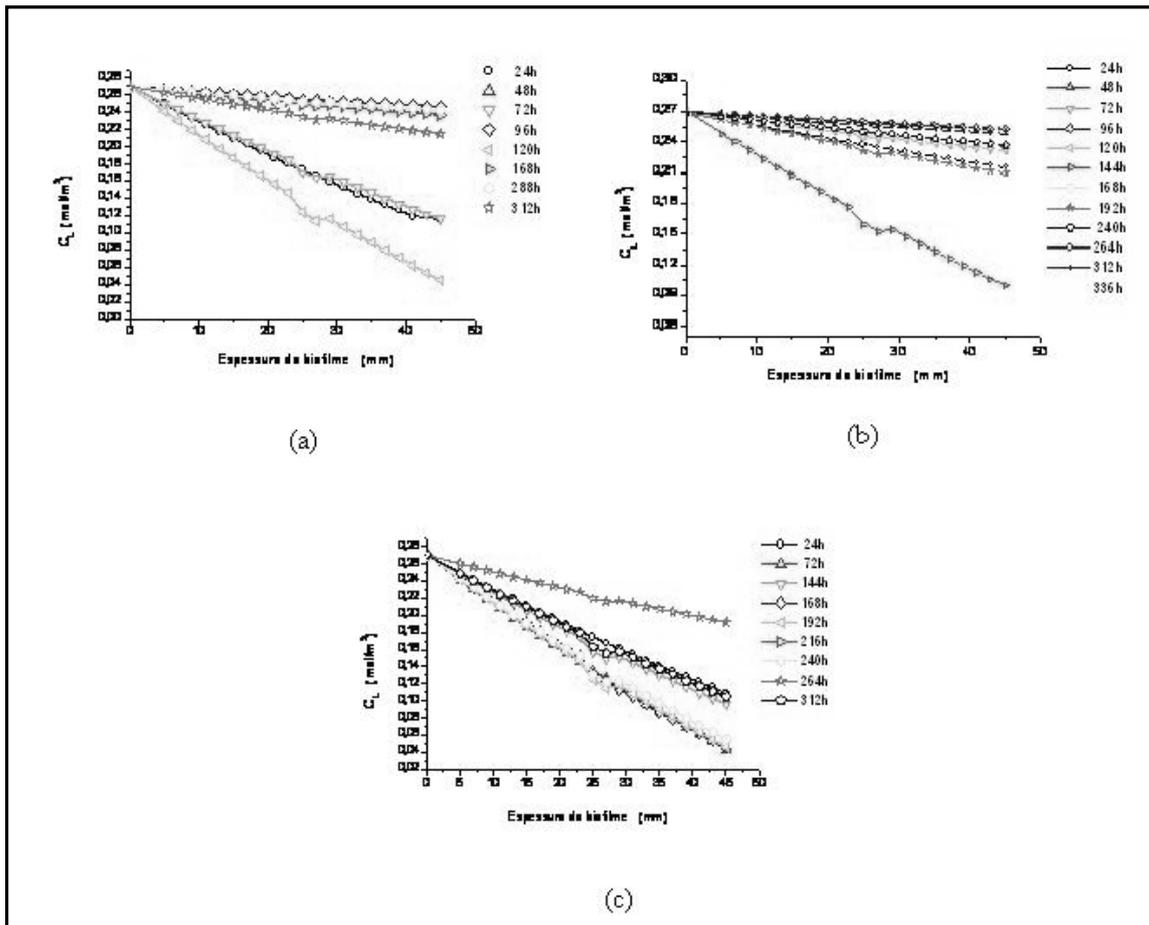


Figura 5.29 Perfis radiais de oxigênio dissolvido no biofilme para as diferentes umidades iniciais do meio sólido com farelo de trigo 0,59 mm: 25% (a); 35% (b) e 45% (c)

Analisando a transferência de oxigênio, observa-se pela Fig. 5.30 uma taxa bem maior ($0,8\text{mol/s.m}^3$) para 35% de umidade em relação a valores menores em torno de $0,3\text{mol/s.m}^3$ para 25 e 45% de umidade inicial. Essa condição produziu K_L as cerca de dez vezes maiores, como mostrado nas Figuras 5.31 a 5.33, onde observa-se também que para espessuras de filmes maiores que 20 μm as variações não são significativas. Pela determinação da espessura do filme líquido obtida por microscopia verifica-se que para todas as umidades testadas há uma influência significativa da espessura no K_L a. Esses dados constataam a importância

da medida analítica do biofilme nestes processos quando se pretende analisar a transferência de oxigênio. Os perfis de K_La apontam para uma melhor transferência de oxigênio para umidade de 35% uma vez que de acordo com a Tab. 5.3, para essa umidade inicial a espessura de biofilme é menor ($8\mu\text{m}$), comparado com $10\mu\text{m}$ a 45% de umidade inicial.

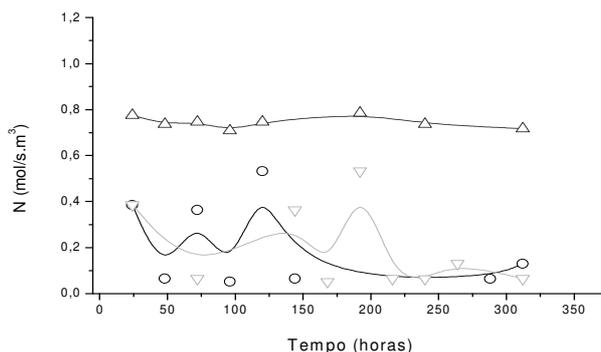


Figura 5.30 Perfis da taxa de transferência de oxigênio para cultivos sobre farelo de trigo 0,59 mm com diferentes umidades iniciais: 25% (∇), 35% (Δ) e 45% (\circ)

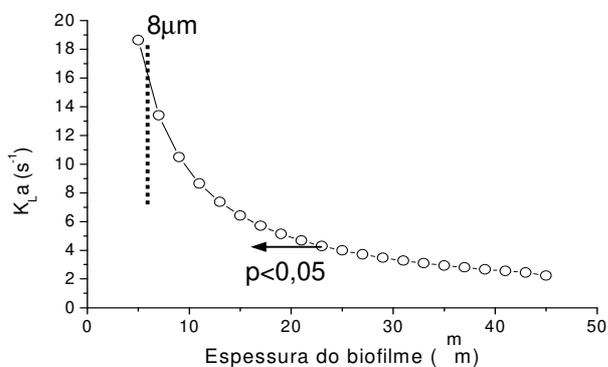


Fig. 5.31 Perfil do K_La para leito de farelo de trigo 0,59 mm com 25% de umidade inicial (a seta indica os dados com diferença significativa ao nível de 5%)

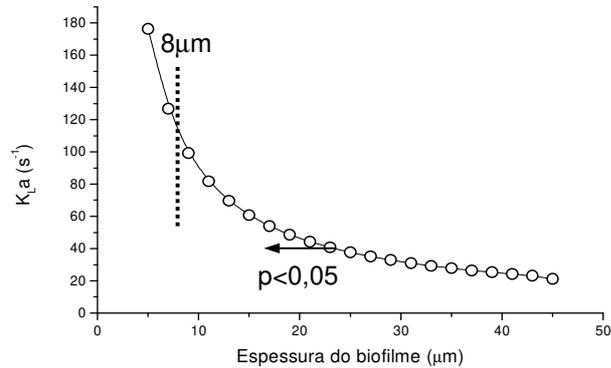


Fig. 5.32 Perfil do K_{La} para leito de farelo de trigo 0,59 mm com 35% de umidade inicial (a seta indica os dados com diferença significativa ao nível de 5%)

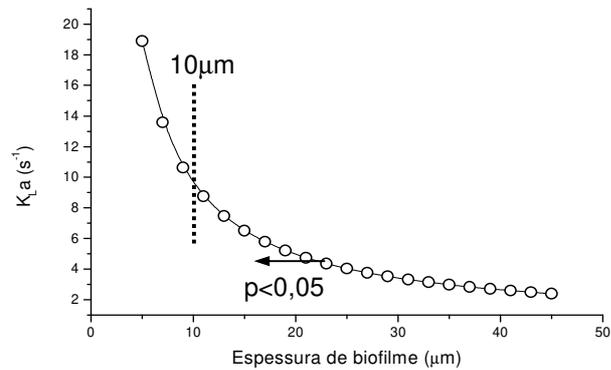


Fig. 5.33 Perfil do K_{La} para leito de farelo de trigo 0,59 mm com 45% de umidade inicial (a seta indica os dados com diferença significativa ao nível de 5%)

A Fig. 5.34 mostra a camada de micélio na superfície das partículas, demonstrando que o fungo se desenvolve não apenas na fase líquida, como um biofilme ao redor das partículas, mas também nos espaços vazios do leito. Rahardjo *et al.* (2002) demonstraram a importância das hifas aéreas na respiração microbiana. Isto significa que a limitação de transferência de oxigênio devido à difusão lenta na fase líquida apresenta uma menor importância para fungos filamentosos que se desenvolvam na fase aérea, como é o caso de *Drechslera*.

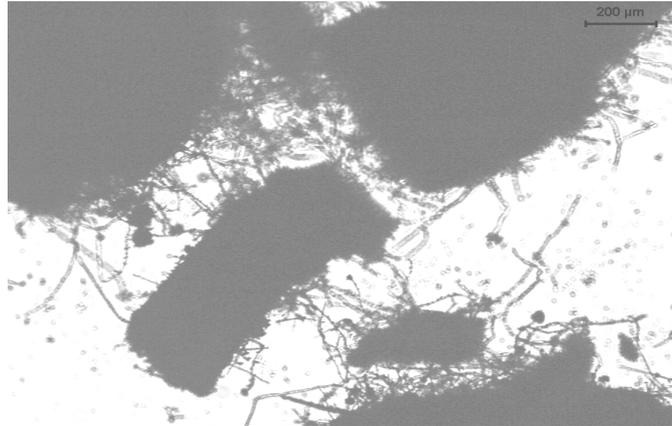


Fig. 5.34 Fotografias das partículas de farelo de trigo 0,59mm com 11 dias de cultivo a 35% de umidade inicial

A Fig. 5.35 apresenta os perfis de umidade do meio sólido para leito de 0,35mm. Verifica-se que para todas as condições iniciais não houve variação considerável na umidade do meio sólido, em consequência das condições de altura de leito e vazão de ar previamente selecionados, conforme o observado anteriormente para leito de partículas de 0,59mm.

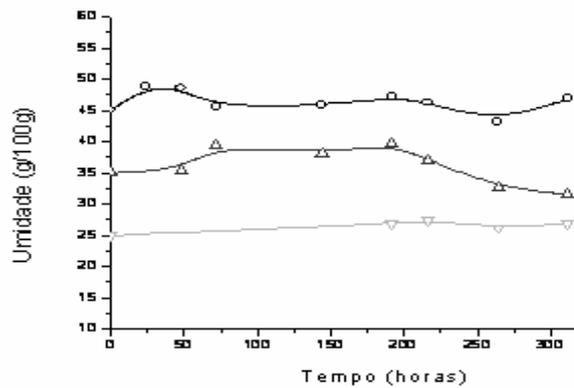


Figura 5.35 Perfis de umidade do meio sólido com farelo de trigo 0,35mm para diferentes umidades iniciais: 25% (▽), 35% (△) e 45% (○) para 30mm e 0,4L/min

A variação da concentração de proteínas solúveis no extrato fúngico é apresentada na Figura 5.36. Hasan *et al.* (2003), trabalhando com *Drechslera* em colunas de leito fixo de aproximadamente 200 mm de altura obtiveram através de um planejamento estatístico a umidade inicial ótima de 45%, sendo encontrados teores de proteínas por volta de 12 mg/g. No entanto, para leito de 30 mm e 0,4 L/min, estimando o comportamento microbiano pela concentração de proteínas solúveis, podemos afirmar que há uma tendência maior de crescimento da atividade metabólica em 35% de umidade inicial do leito de partículas. De acordo com a Fig. 5.5, houve realmente uma maior diminuição do tamanho das partículas a 35% de umidade, resultado da perda de matéria seca devido ao consumo do substrato. Para meio sólido com 25% de umidade não houve praticamente nenhuma modificação da estrutura das partículas, sugerindo crescimento microbiano menor conforme o perfil de proteínas apresentado na Fig. 5.36. Estes resultados são importantes na busca do entendimento dos fenômenos de transferência de massa que ocorrem nos processos em estado sólido, além de contribuir para o escalonamento dos processos.

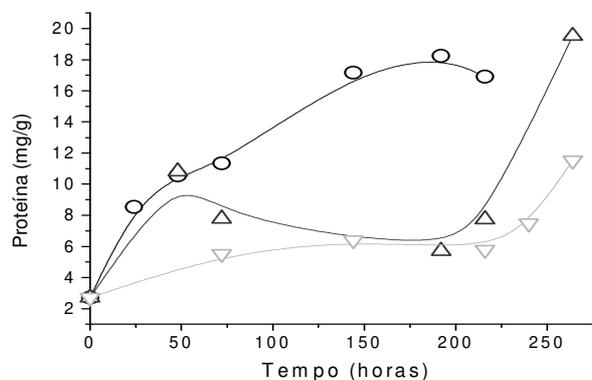


Figura 5.36 Perfis de proteínas solúveis no extrato bruto para diferentes umidades iniciais em leitos de farelo de trigo 0,35mm: 25% (▽), 35% (△) e 45% (○)

A Figura 5.37 apresenta os perfis de concentração de oxigênio para farelo de trigo 0,35mm nas diferentes condições de umidade. Verifica-se que os maiores gradientes de oxigênio ocorreram em 168 e 120 horas de cultivo, decrescendo ao

longo do biofilme para todos os tempos de cultivo. Para espessura de biofilme em torno de 10 μ m observa-se que a concentração de oxigênio diminui aproximadamente 10%. Esta redução está de acordo com os dados mencionados na literatura (Gowthaman *et al.*, 1995). Entretanto, este gradiente não permanece constante durante o cultivo e depende fortemente da espessura do biofilme, podendo ser de até 40% para espessuras de 45 μ m. Neste caso, a variação na concentração é muito superior ao assumido por estes autores, o que fez com que eles obtivessem valores inferiores de $K_L a$.

De acordo com a Tabela 5.2 há uma espessura de filme líquido formado ao redor das partículas de farelo de trigo 0,35mm com 25% de umidade de aproximadamente 5 μ m. Pela análise da Fig. 5.37a, verifica-se que nestas condições há um gradiente de concentração de aproximadamente 8%, o que reflete o baixo consumo de oxigênio. Isto justifica o crescimento lento nesta condição, o que também correspondeu à baixa redução do tamanho das partículas nesta condição (Fig. 5.5).

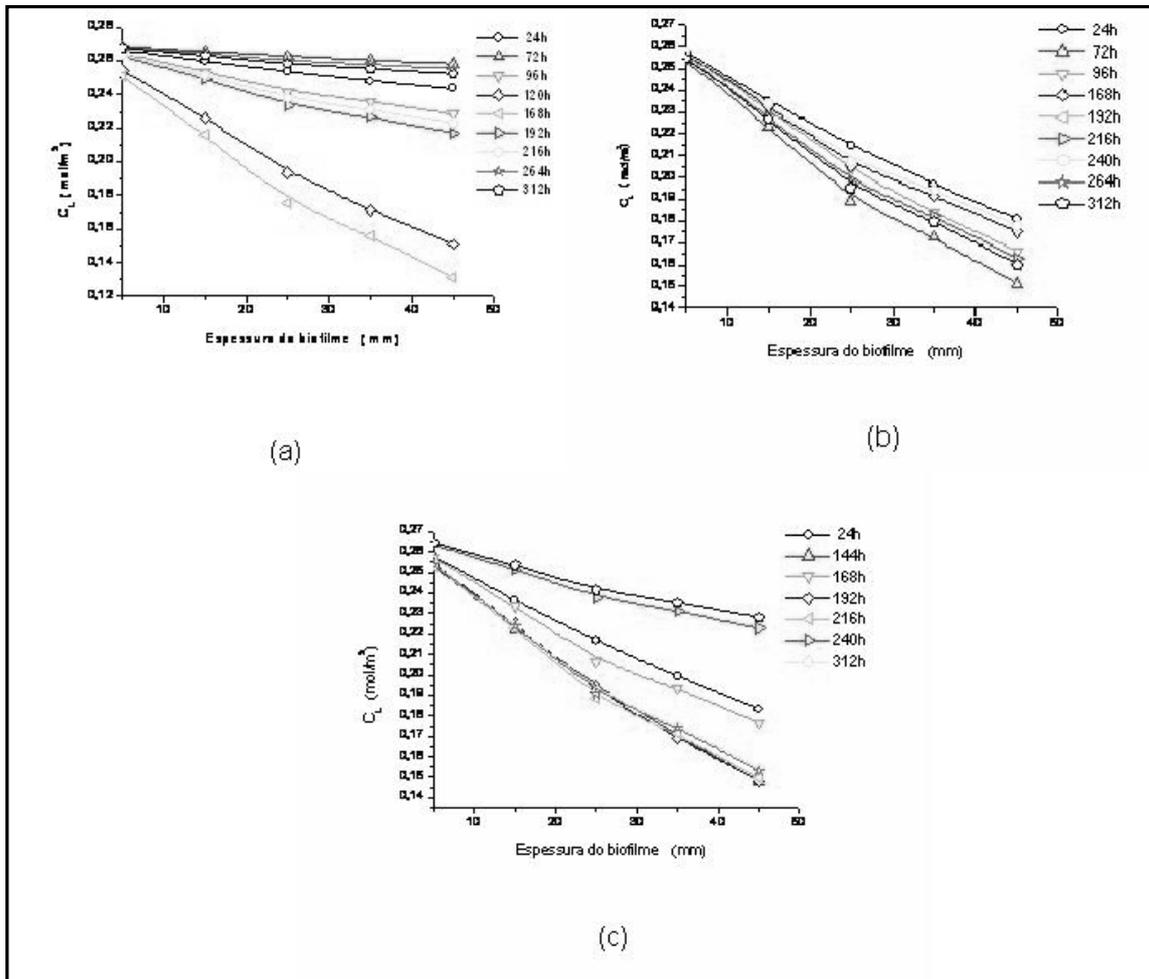


Figura 5.37 Perfis radiais de oxigênio dissolvido no biofilme para as diferentes umidades iniciais do meio sólido com farelo de trigo 0,35 mm: 25% (a); 35% (b) e 45% (c)

A Figura 5.38 apresenta os perfis de N ao longo do tempo para as diferentes condições de umidade. Similarmente ao ocorrido com os gradientes de concentração, os maiores valores de N foram obtidos entre 120 e 168 horas, ficando em torno de 0,7 e 0,4 mol/s.m³ para 45 e 35% de umidade, respectivamente, onde ocorrem os maiores gradientes de concentração de oxigênio (Fig. 5.38b e c). Os valores praticamente constantes de N nestas

condições de umidade demonstram que a distribuição homogênea do ar permitiu transferência de oxigênio eficiente para todos os tempos experimentais.

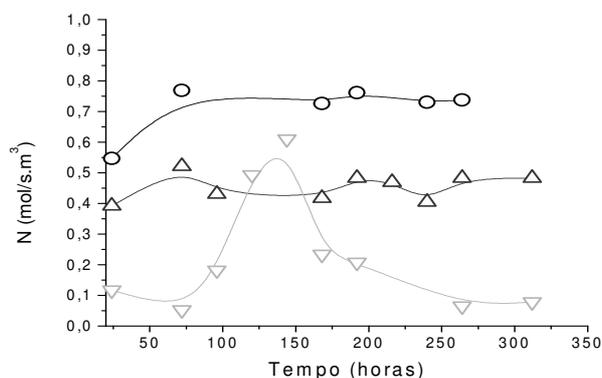


Figura 5.38 Perfis da taxa de transferência de oxigênio para cultivos sobre farelo de trigo 0,35 mm com diferentes umidades iniciais : 25% (▽), 35% (△) e 45% (○)

O $K_L a$ é constante ao longo do período de cultivo, uma vez que não há variação física do sistema, com manutenção da umidade (vide perfil de umidade Fig. 5.35). A variação na taxa N é compensada com uma variação proporcional no gradiente de concentração (Fig. 5.37), mantendo $K_L a$ constante. Entre 120 e 168 horas de cultivo, N e o gradiente apresentaram seus valores máximos, mantendo o valor de $K_L a$ fixo. No entanto, $K_L a$ varia na posição dependendo da espessura do biofilme para todas as condições de umidade testadas, conforme as Fig. 5.39 a 5.41, sendo que a variação é significativa para espessuras de leito menores que $29\mu\text{m}$ ($p < 0,05$). A resistência ao transporte de oxigênio é maior nas maiores espessuras, fazendo com que o $K_L a$ atinja os menores valores, por volta de 5s^{-1} para 25 e 35% de umidade e 10s^{-1} para 45% de umidade.

Os perfis de $K_L a$ com 25 e 35% de umidade são exatamente iguais, sugerindo que o aumento de umidade das partículas de farelo de trigo 0,35mm até 35% não promoveu uma melhor dissolução do oxigênio gasoso para o filme líquido, mas também não resultou num aumento da resistência ao transporte. De

acordo com a determinação experimental da espessura dos filmes por microscopia (Tab. 5.2 e Fig. 5.1), não há variação nesta espessura quando do aumento de umidade de 25 para 35%. Assim, como o K_La depende da difusividade de oxigênio e da espessura do filme, ele mantém-se praticamente constante com a mudança de umidade. K_La não variou significativamente, ao nível de 5% de significância, para espessuras de biofilme acima de $29\mu\text{m}$ para todas as umidades testadas. Como as espessuras determinadas experimentalmente nas diferentes condições de umidade (Tab. 5.2) ficam bem abaixo de $29\mu\text{m}$, há desta forma uma influência significativa das espessuras no valor do K_La , conforme havia sido verificado também para as partículas de farelo de trigo $0,59\text{mm}$. Assim, independente do tamanho de partícula e das condições de umidade, a transferência de oxigênio nos cultivos em estado sólido é afetada pela espessura do filme líquido uma vez que nem a saturação do farelo de trigo permitiria a formação de filmes superiores a $20\mu\text{m}$ (Tab. 5.5).

A taxa de transferência de oxigênio para partículas para 45% de umidade inicial foi superior aos cultivos com umidades inferiores em praticamente todo o período experimental (Fig. 5.38). Partindo destas taxas elevadas durante o cultivo, a curva de K_La , situou-se em nível superior com relação a 25 e 35% de umidade (Fig. 5.41). No entanto, considerando a maior espessura de biofilme constatada pelos resultados de microscopia apresentados na Tab. 5.2 ($8\mu\text{m}$ a 45% e $5\mu\text{m}$ para 25 e 35%), percebe-se que os valores de K_La foram semelhantes para todas as condições de umidade com partículas $0,35\text{mm}$, ficando em torno de 32 s^{-1} .

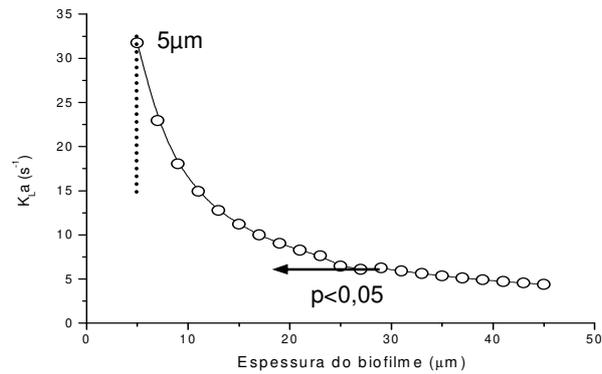


Figura 5.39 Perfil do $K_L a$ ao longo do biofilme com 25% de umidade inicial do meio sólido de farelo de trigo 0,35 mm (a seta indica os dados com diferença significativa ao nível de 5%)

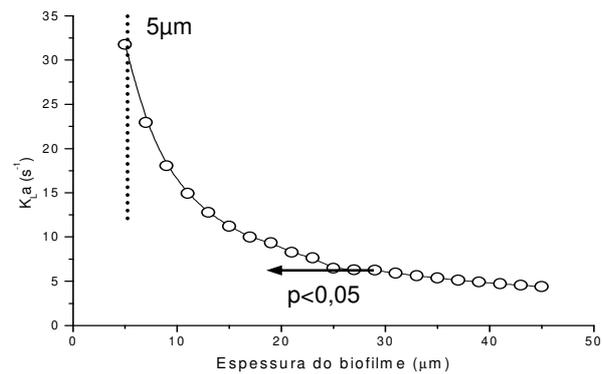


Figura 5.40 Perfil do $K_L a$ com 35% de umidade inicial do meio sólido de farelo de trigo 0,35mm (a seta indica os dados com diferença significativa ao nível de 5%)

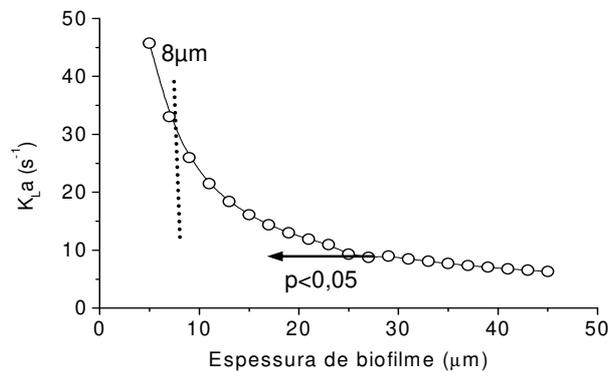


Figura 5.41 Perfil do K_{La} com 45% de umidade inicial do meio sólido de farelo de trigo 0,35 mm (a seta indica os dados com diferença significativa ao nível de 5%)

Comparando-se o comportamento da transferência de oxigênio quando o tamanho de partícula variou de 0,35 a 0,59mm, verifica-se que a 0,35mm, quando o biofilme variou de 5 a 8μm, não houve diferença significativa na transferência de oxigênio com a umidade inicial das partículas. Por outro lado, para partículas de 0,59mm, quando se obtém espessuras entre 8 e 10μm, a umidade inicial influencia a transferência de oxigênio, sendo maior a 35% onde a espessura de biofilme é da ordem de 8μm. Em termos de produção de proteínas houve superioridade para as partículas de 0,59mm. Para esse tamanho de partícula verifica-se também maior porosidade do leito formado e a importância das hifas aéreas na concentração total de proteínas (biomassa). Portanto, esses resultados mostram claramente não só a importância da espessura do biofilme em torno das partículas como também da porosidade do leito formado. Evidentemente que a importância desses fatores só pode ser observada quando não se tem acúmulo de água livre no leito, o que foi produzido a 30mm de altura e 0,4L/min de vazão de ar. Ressalta-se também que essas condições operacionais garantiram as características da fermentação em estado sólido durante todo o período.

5.6 Avaliação da transferência de oxigênio em coluna de leito fixo com maiores dimensões

Os experimentos em coluna com maiores dimensões foram realizados para avaliar a transferência de oxigênio em uma escala diferente, em coluna com 50mm de diâmetro, mantendo a altura de leito em 30mm. A velocidade superficial de ar utilizada nos ensaios anteriores foi mantida, sendo que para esta coluna a vazão ótima 0,4L/min foi ajustada para 0,9L/min para manter as mesmas condições de aeração. A umidade também foi mantida em 35%, a qual dentre as umidades testadas é o valor que maximiza o valor de $K_L a$. A Fig. 5.42 apresenta a variação da taxa média de consumo de oxigênio por volume de biofilme para farelo 0,35mm. Pelas oscilações durante o cultivo, verifica-se que a taxa aumenta após o início do cultivo, atingindo um valor máximo em 192 horas para todas as espessuras testadas. As taxas obtidas por volume de biofilme foram bem inferiores aos valores obtidos no item anterior para colunas menores (30 mm) correspondendo à formação de gradientes de concentração menores (Fig. 5.43). Com exceção ao tempo de 192 horas, nos outros períodos foram obtidos gradientes similares e máximos para 45 μ m.

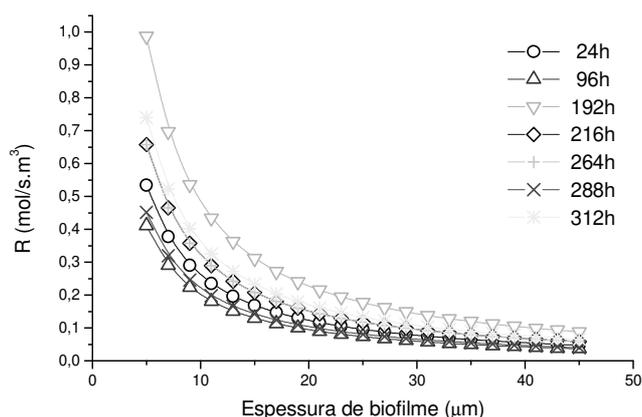


Figura 5.42 Perfis da taxa de consumo de oxigênio por volume de biofilme para partículas de farelo de trigo 0,35mm em coluna de leito fixo com maiores dimensões

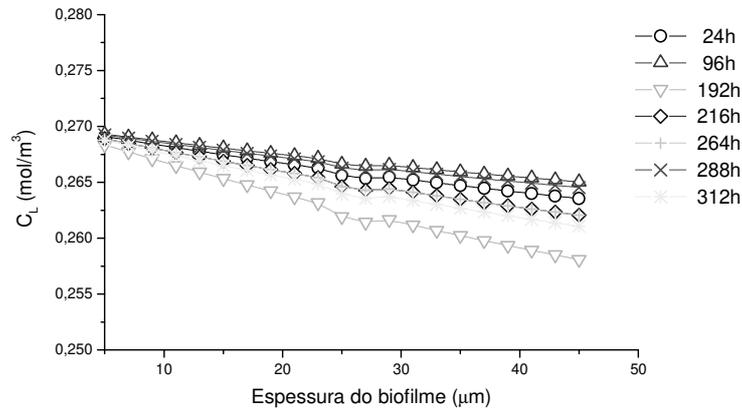


Figura 5.43 Perfis dos gradientes de concentração de oxigênio dissolvido no biofilme para partículas de farelo de trigo 0,35mm em coluna de leito fixo com maiores dimensões

Estes resultados são corroborados pelo perfil da taxa de transferência apresentado na Fig. 5.44, onde pode-se constatar variação devido ao metabolismo microbiano, com valor máximo em 192 horas. As taxas obtidas foram menores do que os resultados obtidos para coluna de menores dimensões, uma vez que N é definido por volume de leito, que neste caso foi bem superior do que nas amostras do item anterior.

O perfil do $K_L a$ apresentado na Fig. 5.45 aponta uma variação significativa com a espessura de biofilme, sendo obtidos valores similares aos encontrados em coluna de menores dimensões. Neste caso, a mudança de escala não favorece a distribuição de oxigênio para partículas de farelo de trigo 0,35mm, uma vez que as condições físicas do sistema, tais como umidade, não foram afetadas, já que a altura de leito e velocidade superficial de ar foram mantidas constantes. As variações apresentadas nas taxas de consumo e de transferência de oxigênio devem-se ao maior volume de meio sólido considerado.

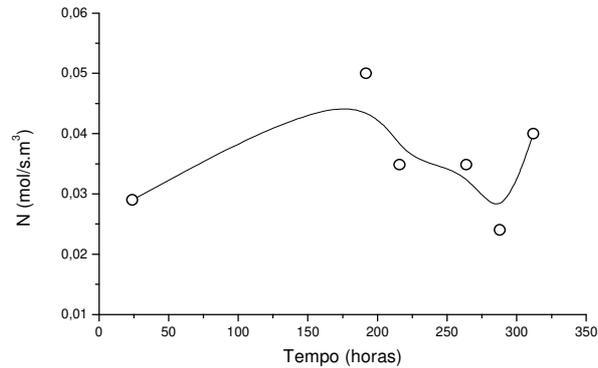


Figura 5.44 Taxa de transferência de oxigênio para partículas de farelo de trigo 0,35mm em coluna de leito fixo com maiores dimensões

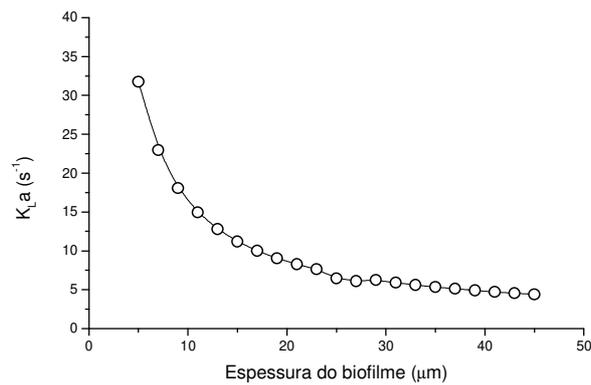


Figura 5.45 Perfis do K_{La} para partículas de farelo de trigo 0,35mm em coluna de leito fixo com maiores dimensões

A Fig. 5.46 apresenta os perfis da taxa de consumo de oxigênio para partículas de farelo de trigo 0,59mm, em coluna com diâmetro 50mm e altura de leito 30mm, para as condições onde foram obtidos maiores valores de K_{La} a 35% de umidade (Fig. 5.35). Verifica-se uma variação na taxa N , com valor máximo obtido em 192 horas (Fig. 5.48). O comportamento foi bem diferente dos

resultados obtidos para esta condição em coluna com menores dimensões. Foram obtidos valores bem menores de R com ponto máximo em 192 horas ($0,35 \text{ mol/s.m}^3$ para $5\mu\text{m}$ de espessura de biofilme). Os perfis radiais de concentração de oxigênio no biofilme são apresentados na Fig. 5.47, onde se verifica que o comportamento foi similar àquele obtido em leito com partículas $0,35\text{mm}$ (Fig. 5.43). O tamanho das partículas não interferiu na taxas de transferência de oxigênio nestas condições e o perfil de K_La obtido foi semelhante ao das partículas com $0,35\text{mm}$, com valores superiores para partículas de $0,59 \text{ mm}$ (Fig. 5.49). No entanto, para partículas de $0,59\text{mm}$ os valores de K_La são aproximadamente a metade dos obtidos para a coluna de menor diâmetro operando nas mesmas condições. Portanto, infere-se que nesse caso, com o maior crescimento microbiano observado anteriormente para partículas de $0,59\text{mm}$, houve provavelmente acúmulo de água na coluna, decrescendo os valores de K_La .

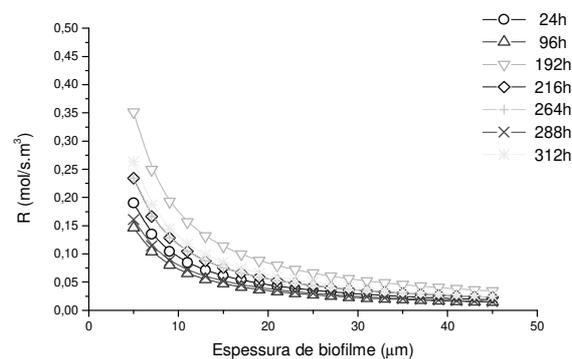


Figura 5.46 Perfis da taxa de consumo de oxigênio por volume de biofilme para partículas de farelo de trigo $0,59\text{mm}$ em coluna de leito fixo com maiores dimensões

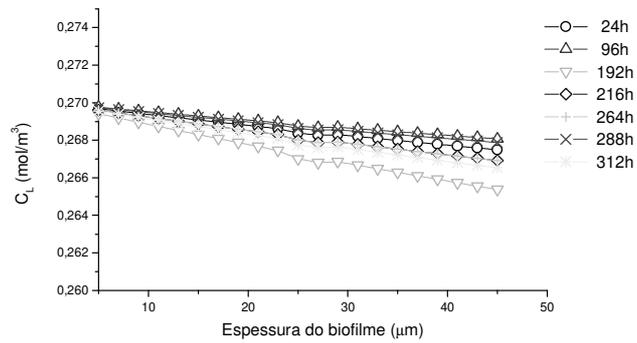


Figura 5.47 Perfis dos gradientes de concentração de oxigênio dissolvido no biofilme para partículas de farelo de trigo 0,59mm em coluna de leito fixo com maiores dimensões

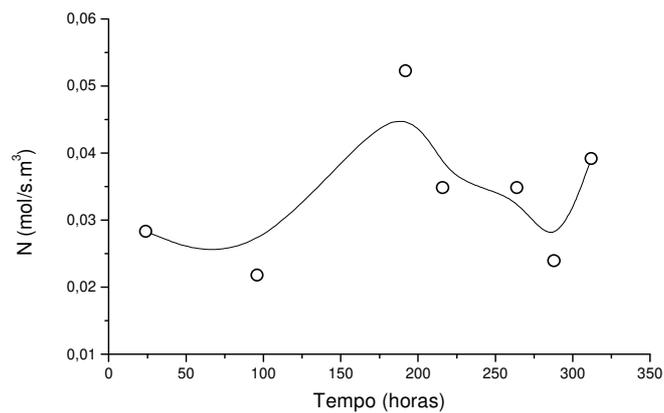


Figura 5.48 Taxa de transferência de oxigênio para partículas de farelo de trigo 0,59mm em coluna de leito fixo com maiores dimensões

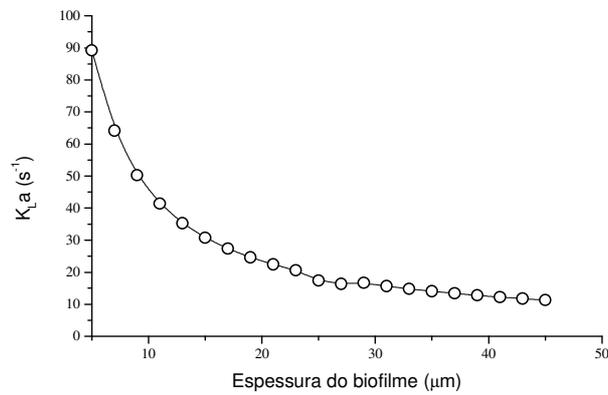


Figura 5.49 Perfis do K_{La} para partículas de farelo de trigo 0,59mm em coluna de leito fixo com maiores dimensões

Esses resultados mostram que a manutenção das condições de transferência de oxigênio representa um ponto crítico no aumento de escala dos processos, mesmo para pequenas alturas de leito, onde há a necessidade de se utilizar vazões bem maiores para contornar o acúmulo de água no sistema.

5.7 Avaliação da transferência de oxigênio em cultivos sobre suporte inerte

Os experimentos em coluna de leito fixo contendo espuma de poliuretano como suporte inerte foram conduzidos com 0,4L/min de vazão de ar e altura de leito 30mm, condições estas que asseguraram a manutenção da umidade do meio sólido, promovendo uma eficiente transferência de oxigênio. A espuma de poliuretano foi testada com 25, 35 e 45% de umidade inicial.

A Fig. 5.50 apresenta as fotografias obtidas no microscópio ótico para a amostra de espuma de poliuretano com 11 dias de cultivo com 45% de umidade inicial. Devido às características da matriz sólida (Tab. 5.1), verifica-se crescimento tanto na superfície do suporte como na fase aérea, o que explica os altos teores de proteína obtidos. Além disso, o filme líquido formado na superfície dos poros do material sugere espessuras de biofilme da ordem de 25 μ m.

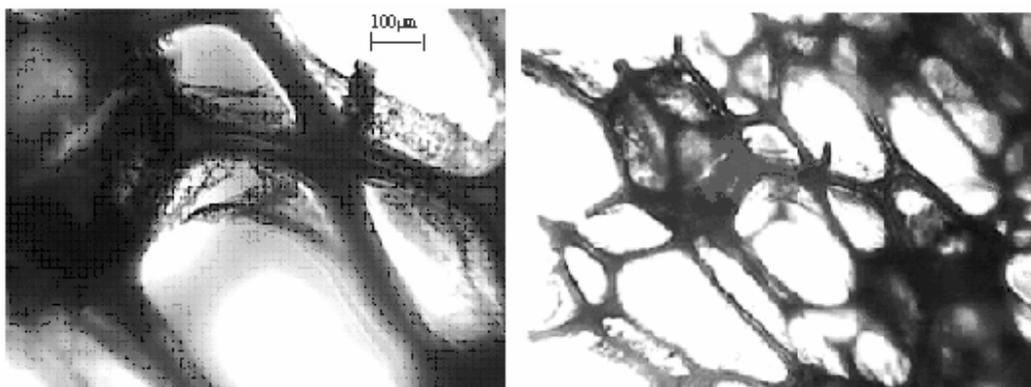


Figura 5.50 Fotografias da espuma de poliuretano com 11 dias de cultivo a 45% de umidade inicial e 0,4L/min de vazão de ar

A Figura 5.51 apresenta a taxa de transferência de oxigênio (M) obtida, a qual foi constante para as umidades utilizadas, indicando que o suporte manteve eficiente distribuição de ar no leito. Lareo *et al.* (2005) verificaram em cultivos com

Mucor bacilliformis em espuma de poliuretano que as maiores taxas de consumo de oxigênio ocorreram nas maiores umidades do meio sólido.

Os perfis de K_La são apresentados na Fig. 5.52, tendo um comportamento bastante similar para as umidades utilizadas. Com o aumento de umidade o material inerte tende a aproximar-se da saturação, sendo que a espessura de filme fica ao redor de $24\mu\text{m}$, conforme ilustrado na Fig. 5.52. De acordo com os dados da Tab. 5.4, para 25, 35 e 45% de umidade, a espessura do biofilme fica em torno de 14, 17 e $18\mu\text{m}$, respectivamente. Assim, é coerente esperar valores de K_La superiores para 25 e 35% no início dos cultivos. No entanto, com o aumento da umidade do suporte sólido e conseqüente aumento da espessura do biofilme em todos os casos, os valores de K_La tendem a ficar por volta de 20s^{-1} .

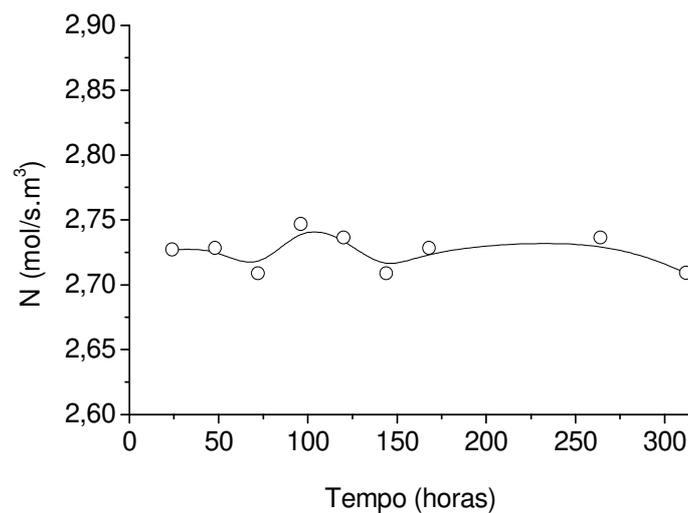


Figura 5.51 Taxa de transferência de oxigênio (N) ao longo do cultivo em espuma de poliuretano para todas as condições de umidades iniciais com $0,4\text{L}/\text{min}$ de vazão de ar

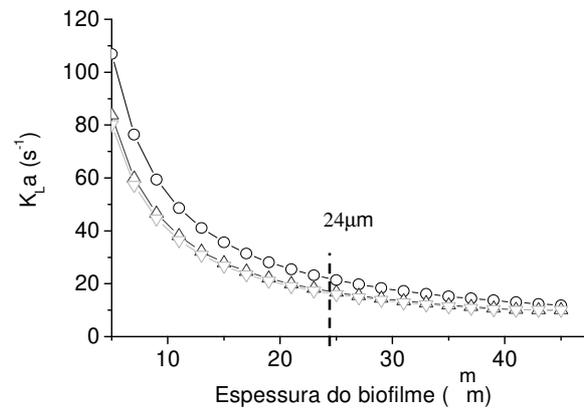


Figura 5.52 Perfis de K_La no cultivo com espuma de poliuretano com 0,4L/min de vazão de ar em diferentes umidades iniciais: 25% (∇), 35% (\triangle) e 45% (\circ)

Como a vazão de ar e altura de leito utilizados foram estabelecidos para farelo de trigo, ocorreu aumento de umidade para espuma de poliuretano (Fig. 5.53), indicando que devem ser utilizadas vazões de ar superiores para promover a manutenção da umidade do meio. Pela análise dos dados experimentais e estimados (Fig. 5.54) verifica-se que após 96 horas o aumento de umidade não está mais associado apenas ao consumo de glicose, havendo acúmulo de água. Ainda assim, o perfil de proteínas no extrato fúngico obtido para espuma de poliuretano com 45% de umidade foi muito superior do que os dados obtidos para farelo de trigo (Fig. 5.55). Estes resultados sugerem um crescimento microbiano mais balanceado na espuma, havendo o desenvolvimento fúngico no filme líquido formado no interior dos poros da matriz sólida e crescimento aéreo, facilitado pela manutenção da porosidade do meio. Assim, como não ocorre a compactação da espuma durante os cultivos, os espaços vazios do leito favorecem o crescimento das hifas aéreas, as quais não são limitadas por oxigênio. Diversos autores indicam o uso deste tipo de suporte inerte impregnado com solução nutriente adequada para o cultivo em estado sólido (Zhu *et al.*, 1996; Pintado *et al.*, 1998). Lareo *et al.* (2005) verificaram considerável produção de esporos utilizando espuma de poliuretano nos cultivos de *Mucor bacilliformis* em colunas de 20cm de

altura. Como conseqüência deste crescimento microbiano acentuado verifica-se um alto consumo de glicose para o cultivo sobre espuma nas primeiras 144 horas (Figura 5.56), resultado das altas taxas de transferência de oxigênio. A Fig. 5.57 indica que, devido ao acúmulo gradativo de água, ocorre uma queda progressiva do rendimento até o consumo total da glicose. Neste caso, a diminuição do rendimento está ligada ao esgotamento de glicose no meio. O rendimento tem uma queda brusca devido ao alto consumo de glicose. No entanto, este consumo não é compensado por um crescimento proporcional, de maneira que o rendimento não apresenta um aumento no período experimental.

Estes resultados mostram que altas produtividades nos cultivos em estado sólido podem ser obtidas devido à estrutura física de suportes inertes que não apresentam compactação, mantendo o filme líquido na superfície dos poros e permitindo desenvolvimento de micélio aéreo.

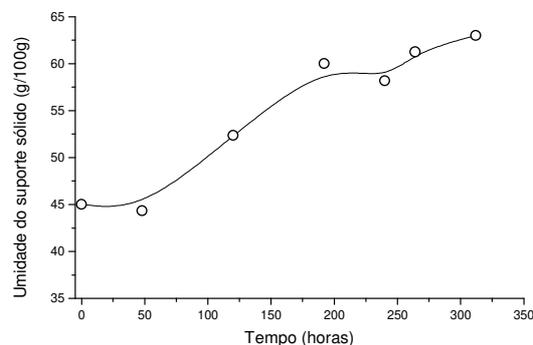


Figura 5.53 Perfil de umidade do suporte inerte durante o cultivo com 0,4L/min de vazão de ar

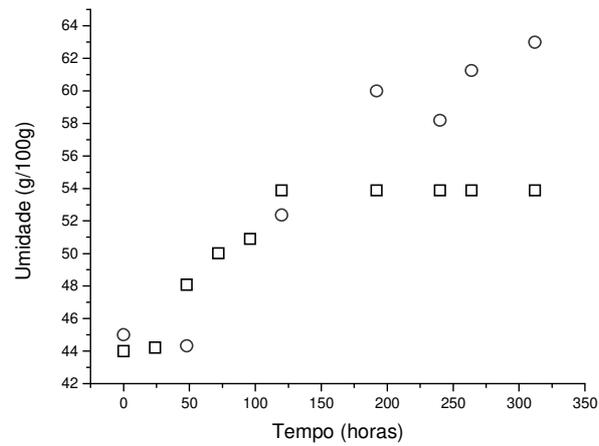


Figura 5.54 Umidade do meio sólido estimada pelo balanço de massa e pela medida experimental para vazão de ar 0,4L/min: dados estimados (o) e experimentais (□)

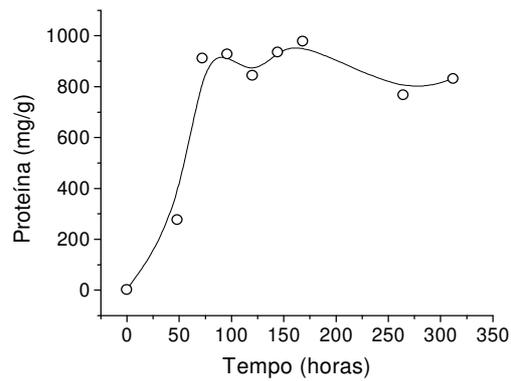


Figura 5.55 Perfil de proteínas no extrato bruto durante o cultivo em suporte inerte com 0,4L/min de vazão de ar

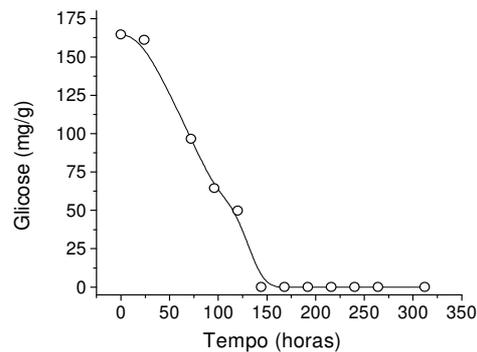


Figura 5.56 Perfil da glicose no extrato bruto durante o cultivo em suporte inerte com 0,4L/min de vazão de ar

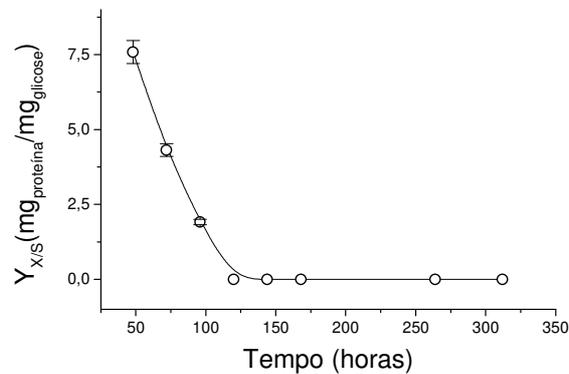


Figura 5.57 Perfil do rendimento no cultivo em suporte inerte com 0,4L/min de vazão de ar

A Fig. 5.58 apresenta o perfil de umidade do meio sólido para experimento com espuma de poliuretano utilizando 1L/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial. Verifica-se um aumento de umidade menos acentuado do que nos experimentos usando 0,4L/min (Fig. 5.55), apesar do desenvolvimento microbiano sugerido pelo perfil de proteínas (Fig. 5.60). Conforme pode-se observar na Fig. 5.59, o conteúdo de umidade estimado pelo consumo de glicose e os dados experimentais indicaram que após aproximadamente 120 horas a umidade do meio sólido estimada deveria ser um pouco superior. No entanto, isso não ocorreu uma vez que a taxa de evaporação conseguiu manter a umidade em

um nível um pouco abaixo, de acordo com a Eq. 4.22. No entanto, os valores máximos de proteína foram inferiores aos encontrados para cultivo com 0,4L/min, o que sugere que a alta vazão pode ter dificultado o desenvolvimento do micélio aéreo, predominando o crescimento no biofilme. Assim, como o teor de proteínas considera o total no extrato fúngico, a presença menos expressiva do micélio aéreo levou a máximos de proteínas menores do que no cultivo a 0,4L/min. O consumo de glicose apresentado na Fig. 5.61 foi similar ao obtido com 0,4L/min, com esgotamento deste nutriente em aproximadamente 96 horas de cultivo, na fase exponencial indicado pelo teor de proteínas. Assim, os resultados indicam que houve um acentuado crescimento microbiano devido à eficiente transferência de oxigênio, o que permitiu um consumo rápido da glicose com formação de água. No entanto, o acúmulo de água foi menos agravante uma vez que a alta vazão de ar permitiu a equilíbrio da umidade por volta de 50%. Nota-se que o rendimento (Fig 5.62) não varia tanto quanto no experimento com menor vazão, indicando que a manutenção do nível de umidade minimiza as limitações do cultivo. Este perfil de rendimento se aproxima mais do apresentado nos cultivos com farelo de trigo, ou seja, uma queda no início devido ao alto consumo de glicose para suprir a adaptação, seguido de uma estabilidade e redução do consumo, o que eleva o rendimento.

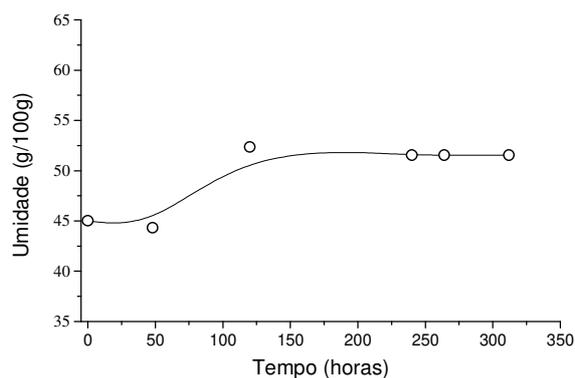


Figura 5.58 Perfil de umidade do meio sólido durante o cultivo em espuma de poliuretano com 1L/min de vazão de ar

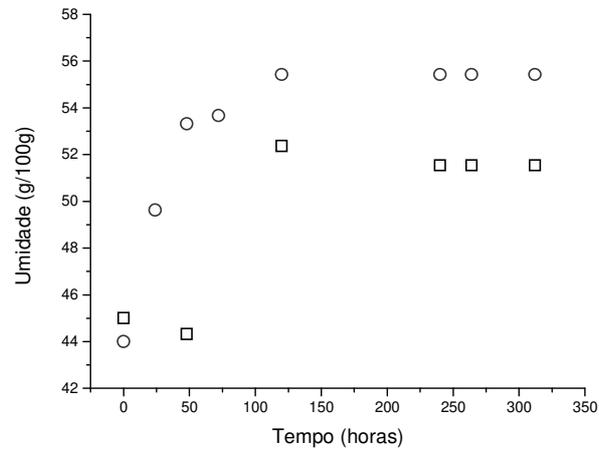


Figura 5.59 Umidade do meio sólido estimada pelo balanço de massa e pela medida experimental para vazão de ar 1L/min: dados estimados (o) e experimentais (□)

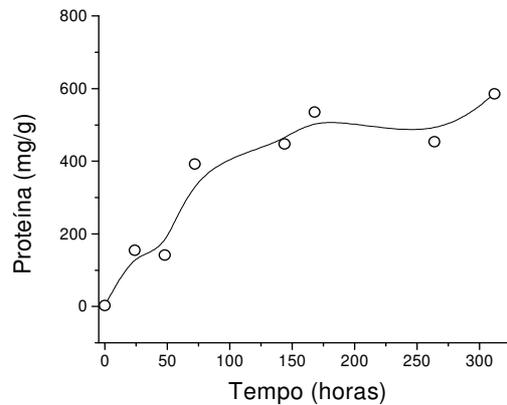


Figura 5.60 Perfil de proteínas no extrato bruto durante o cultivo com espuma de poliuretano a 1L/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial

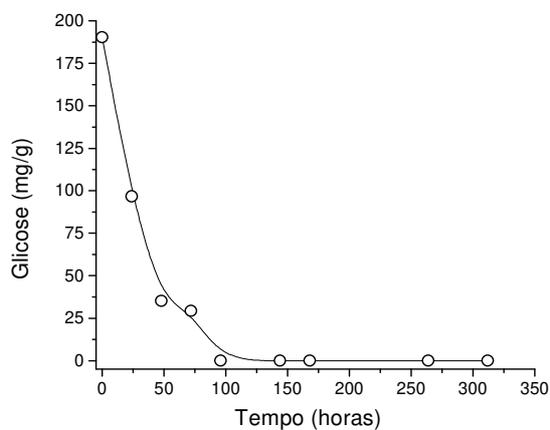


Figura 5.61 Perfil da glicose no extrato bruto durante o cultivo em espuma de poliuretano com 1L/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial

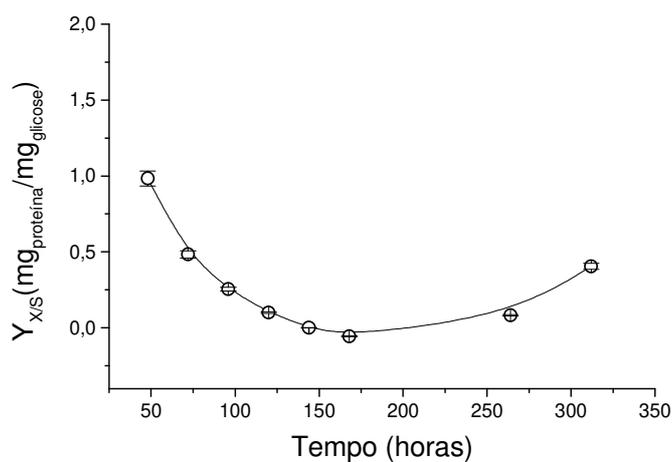


Figura 5.62 Perfil do rendimento do cultivo em espuma de poliuretano com 1L/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial

Com menores limitações de oxigênio devido à manutenção da umidade, os altos valores de N apresentados na Fig. 5.63 refletem as condições de transferência de oxigênio. As taxas apresentam algumas oscilações no início do processo, devido à alta demanda de oxigênio e crescimento microbiano, sendo

constante após aproximadamente 96 horas. De acordo com o perfil do K_La apresentado na Fig. 5.64 verifica-se que com o aumento mais discreto da umidade devido à alta vazão de ar, a espessura do biofilme deve passar dos $18\mu\text{m}$ para aproximadamente $20\mu\text{m}$. Assim, o K_La deve ficar por volta de 25s^{-1} , ou seja, um pouco superior ao obtido no ensaio com $0,4\text{L}/\text{min}$. Como a vazão mais elevada permitiu uma evaporação da água mais acentuada, o aumento do conteúdo de umidade do meio sólido foi menor, levando à formação de filmes líquidos menos espessos, proporcionando valores de K_Las superiores. Desta forma, suportes inertes como espuma de poliuretano são promissores nos cultivos em estado sólido por permitir em melhor distribuição de ar e eficiente transferência de oxigênio desde que haja um controle da umidade do meio.

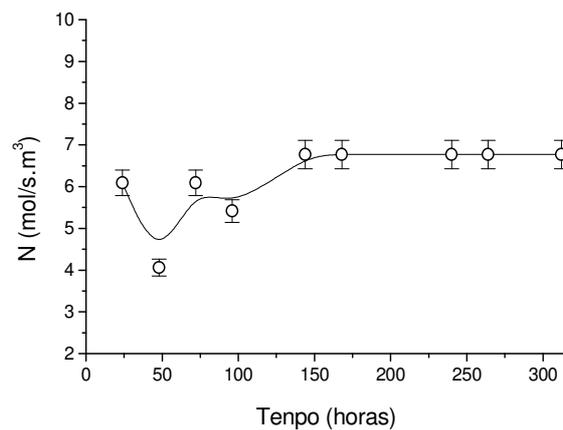


Figura 5.63 Taxa de transferência de oxigênio (N) ao longo do cultivo em espuma de poliuretano para $1\text{L}/\text{min}$ de vazão de ar e 45% de umidade inicial

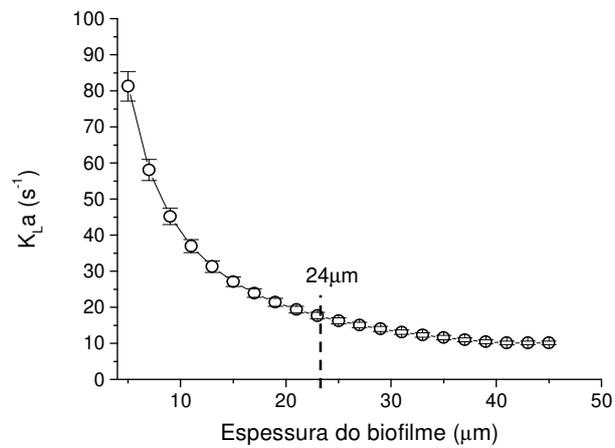


Figura 5.64 Perfis de K_La no cultivo com espuma de poliuretano com 1L/min de vazão de ar e 45% de umidade inicial

5.8 Caracterização das proteínas produzidas por eletroforese SDS-PAGE

As Figuras 5.65 e 5.66 apresentam os perfis eletroforéticos das amostras de extratos fúngicos obtidos a partir de farelo de trigo e espuma de poliuretano com marcador de alta e baixa massa molar, respectivamente. Foram analisadas amostras de farelo de trigo 0,59 e 0,35mm com 11 dias de cultivo. Pode-se verificar que no extrato obtido para farelo de trigo 0,59mm foram identificadas 18 proteínas de massa molecular entre 139 a 15 kDa, sendo que as mais intensas foram 139, 129, 119, 103, 91, 81, 73, 70, 59, 48, 32, 26 e 13kDa. No extrato obtido com 11 dias de cultivo sobre farelo de trigo 0,35mm foram identificadas 15 proteínas entre 129 a 29kDa, sendo que as mais intensas foram 129, 119, 89, 88, 81, 60, 59, 40 e 32kDa.

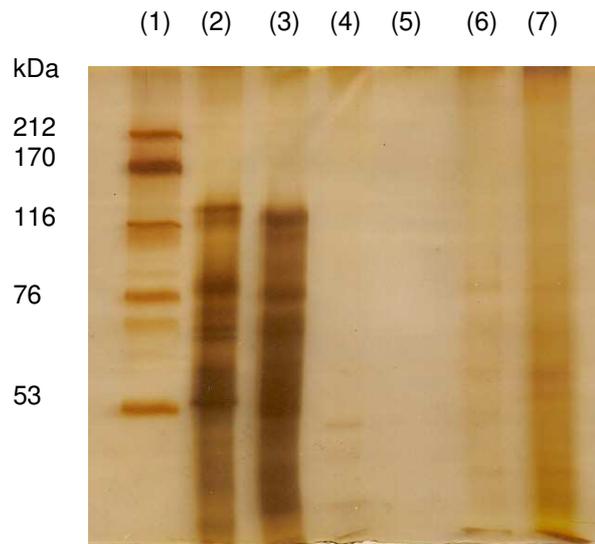


Fig. 5.65 Eletroforetograma das amostras de extratos fúngicos nas diferentes condições de cultivo em gel com 7,5% de poliacrilamida e marcadores de alta massa molecular (1) padrão de massa molecular; (2) farelo de trigo 0,59mm - 11 dias; (3) farelo de trigo 0,35mm - 11 dias; (4) espuma de poliuretano - 4 dias - 0,4L/min; (5) espuma de poliuretano - 11 dias - 0,4L/min; (6) espuma de poliuretano - 4 dias - 1L/min; (7) espuma de poliuretano - 11 dias - 1L/min

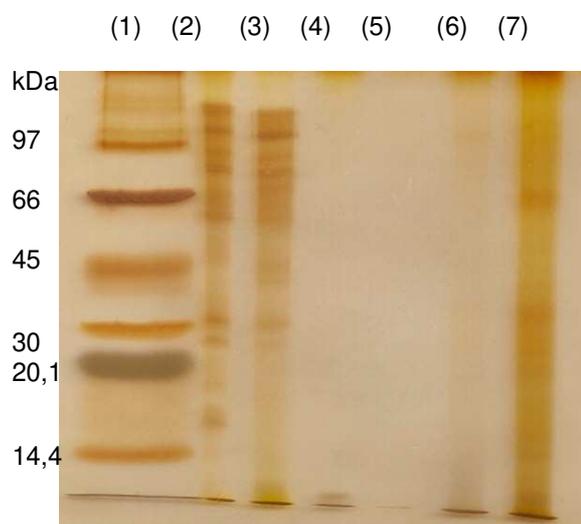


Fig. 5.66 Eletroforetograma das amostras de extratos fúngicos nas diferentes condições de cultivo em gel com 12,5% de poliacrilamida e marcadores de baixa massa molecular (1) padrão de massa molecular; (2) farelo de trigo 0,59mm - 11 dias; (3) farelo de trigo 0,35mm - 11 dias; (4) espuma de poliuretano - 4 dias - 0,4L/min; (5) espuma de poliuretano - 11 dias - 0,4L/min; (6) espuma de poliuretano - 4 dias - 1L/min; (7) espuma de poliuretano - 11 dias - 1L/min

De acordo com Marques (1997), a qualidade e quantidade das frações alergênicas da biomassa está associada aos substratos e condições de cultivo. Nos cultivos com farelo de trigo foram identificadas 18 proteínas, sendo duas similares ao reportado por Menezes *et al.*, 1995 (14,4 e 60kDa) a partir da biomassa de *Drechslera* produzida por fermentação submersa, e três proteínas de massas moleculares similares ao obtido por Hasan *et al.*, 2003 (27,8, 60 e 36kDa), utilizando colunas de Raimbault. No entanto, as condições selecionadas de altura de leito e vazão de ar que mantiveram as características da fermentação em estado sólido levaram à identificação de proteínas com massas molares diferentes. Com o controle da umidade, houve um balanço entre o crescimento do fungo em biofilme e na forma aérea, o que sugere a obtenção de diferentes proteínas. Guitiérrez-Correa & Villena (2003) reportam que a aderência dos fungos em superfícies está ligada à presença de determinadas proteínas chamadas de

hidrofobinas. Wösten & De Vocht (2000) afirmaram que as hidrofobinas são proteínas excretadas por fungos durante o seu desenvolvimento, estando diretamente envolvidas na formação de estruturas aéreas hidrofóbicas como hifas, esporos e corpos de frutificação, além de controlar a adesão das hifas em superfícies. Sendo assim, nas condições que cultivo que possibilitam o crescimento aéreo intenso devido ao controle de umidade, é coerente a identificação de proteínas diferentes das obtidas em trabalhos anteriores com *Drechslera* (Menezes *et al.*, 1995; Hasan *et al.*, 2003). Dentre as proteínas com o maior potencial alergênico, foram identificadas no farelo de trigo com controle de umidade proteínas de massas moleculares similares tanto ao produzido em cultivo submerso (36 e 60kDa) como em estado sólido (103 e 60kDa).

As amostras de extrato obtido a partir do cultivo sobre espuma de poliuretano com 45% de umidade inicial a 0,4L/min de alimentação de ar apresentou proteínas de massa molecular com 43 e 28 kDa, ou seja, predominantemente de baixa massa molecular. De acordo com Linder *et al.* (2005), as hidrofobinas são proteínas de massa molecular baixa (por volta de 10kDa), sendo responsáveis pela formação da estrutura das hifas aéreas. Assim, como a estrutura do suporte inerte beneficia o crescimento aéreo por manter a compactação do meio, isto pode ter influenciado a produção destas proteínas pelo fungo. Com 11 dias de cultivo na mesma vazão de ar (0,4L/min) não foram identificadas proteínas, o que sugere que as condições de aumento de umidade não possibilitaram a produção de proteínas na faixa de massa molecular analisada. Além disso, de acordo com Wessels (1999), algumas proteínas presentes nas paredes das hifas aéreas e, por vezes secretadas no meio, são insolúveis em solução de SDS aquecida. Desta forma, estas proteínas podem não ser detectadas pela análise SDS-Page convencional. No entanto, acredita-se que os fungos concentrem grande parte da sua atividade para sintetizar estas hidrofobinas.

O extrato obtido com 4 dias de cultivo sobre espuma de poliuretano com 45% de umidade inicial a 1L/min de alimentação de ar apresentou 4 proteínas de massa molar 139, 88, 40 e 34kDa. Com 11 dias foram identificadas 20 proteínas

entre 244 e 11 kDa, sendo que as mais intensas foram 244, 91, 74, 58, 48, 35, 26, 24, 20, 16 e 14kDa. As massas molares identificadas foram bem diferentes dos cultivos com vazão de ar de 0,4L/min, onde houve aumento considerável da umidade e nota-se que apenas uma proteína de alta massa molecular foi obtida (244kDa). De acordo com o proposto por Wessels (1996), estes resultados sugerem que *D. monoceras* tenha produzido uma grande quantidade de proteínas de baixa massa molecular com características anfífilas pra facilitar sua aderência na superfície inerte da espuma e para formação intensa das hifas aéreas. Este desenvolvimento da fase aérea deve-se à alta porosidade do leito de espuma de poliuretano, mantida pelo aumento discreto da umidade. Nesta condição foram identificadas proteínas de alto potencial alergênico (14,4, 36, 60kDa), encontradas tanto no cultivo submerso como em estado sólido. Desta forma, a utilização de espuma de poliuretano com vazão de ar adequada leva a melhores rendimentos, alta produtividade e obtenção de proteínas com características alergênicas.

De acordo com os resultados, o controle da umidade através da altura de leito e vazão de ar melhora as condições de transferência de oxigênio nos cultivos com partículas de farelo de trigo, possibilitando rendimentos e produtividades superiores, mantendo a produção de proteínas alergênicas por *Drechslera*. Da mesma forma, a utilização de espuma de poliuretano como suporte inerte para cultivo em estado sólido leva a um crescimento balanceado do crescimento no biofilme e na fase aérea devido à estrutura física do suporte, e mantêm a produção de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera*.

5.9 Estimativa da biomassa celular

Os ensaios em cubetas com banho agitado e termostatzado contendo meio nutriente Czapeck líquido possibilitaram a determinação das taxas de consumo de oxigênio para diferentes concentrações celulares, conforme Fig. 5.67:

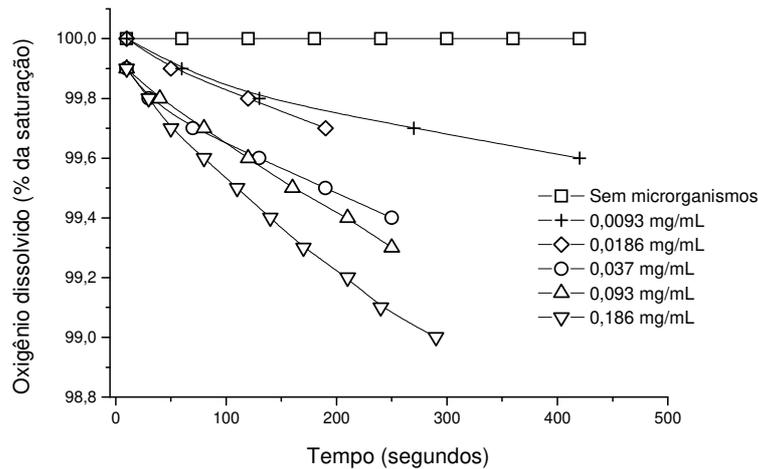


Figura 5.67 Perfis de oxigênio dissolvido para as diferentes concentrações de inóculo

A taxa de consumo de oxigênio foi calculada conforme Eq. 4.14. Com estes resultados, foi possível calcular a taxa específica de consumo de oxigênio a partir da curva R vs X (Fig. 5.68) como sendo o coeficiente angular da curva. Assim, foi obtida uma taxa específica $0,0234 \text{ (mmol/s.m}^3\text{)}/(\text{mg/mL})$, ou seja, $0,39 \text{ mmol}_{\text{oxigênio}} / (\text{s.g}_{\text{biomassa}})$. Considerando este parâmetro constante para as diferentes condições de cultivo, pode-se estimar a concentração de biomassa (X) pela Eq. 4.15. Assim, para a condição de maior $K_L a$ com farelo de trigo, ou seja, partículas de $0,59\text{mm}$ com 35% de umidade, temos a curva de crescimento apresentada na Fig. 5.69. As variações na concentração de biomassa constatadas já haviam sido mencionadas por Viccini & Mitchell (2003), uma vez que há perda de matéria seca durante os cultivos, o que causa erros na determinação da concentração de microrganismos nos cultivos em estado sólido. As partículas de

farelo de trigo apresentam redução dos diâmetros médios, conforme verificado na Fig 5.5. Assim, esta variação no meio sólido pode levar a variações na estimativa da biomassa pela demanda biológica em substratos naturais. Isto fica bastante evidente quando analisamos a Fig. 5.70, que apresenta a curva de crescimento em espuma de poliuretano. O comportamento da curva é bem definido, havendo um aumento gradativo na concentração celular até 144 horas, seguido de uma fase estacionária. Além disso, foram verificadas maiores concentrações de biomassa para esta condição, concordando com o perfil de proteína apresentado na Fig. 5.55. Assim, a curva típica de crescimento celular foi visualizada para espuma de poliuretano devido à preservação das propriedades físicas do suporte sólido. Além disso, as maiores concentrações celulares registradas na Fig. 5.70 para espuma de poliuretano indicam, conforme havia sido verificado pela alta demanda de oxigênio (Fig. 5.51), que a melhor distribuição de ar no suporte e conseqüente consumo intenso de oxigênio promovem um maior crescimento fúngico.

Outra condição que determina o crescimento microbiano nos cultivos em estado sólido é o grau de compactação (ψ), ou seja, a razão entre o volume de células pelo volume disponível no leito para crescimento celular. De acordo com Laukevics *et al.* (1985), para fungos que crescem no filme líquido e na fase aérea, este valor fica em torno de 0,25. Sendo assim, partindo dos dados apresentados nas Fig. 5.69 e 5.70 e analisando a Eq. 4.16, temos que o volume disponível para crescimento celular na espuma é no mínimo 2,2 vezes maior que no farelo de trigo, o que corresponde a um grau de compactação de aproximadamente 0,55. Deste modo, as células poderiam ocupar desta forma 55% do leito de sólidos, resultando num maior crescimento destacado nos perfis de proteína apresentados no item 5.7 e na curva de crescimento estimada pela demanda de oxigênio (Fig. 5.70).

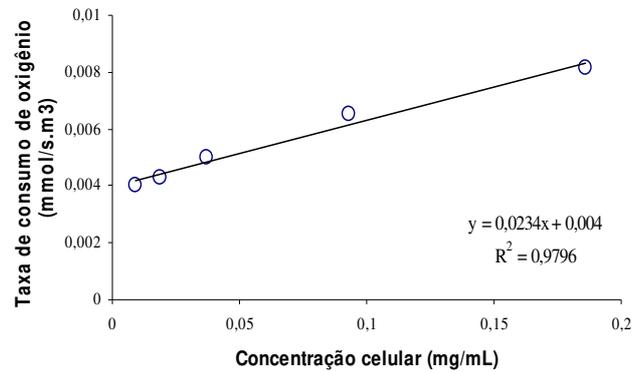


Figura 5.68 Relação entre a taxa de consumo de oxigênio e concentração de biomassa

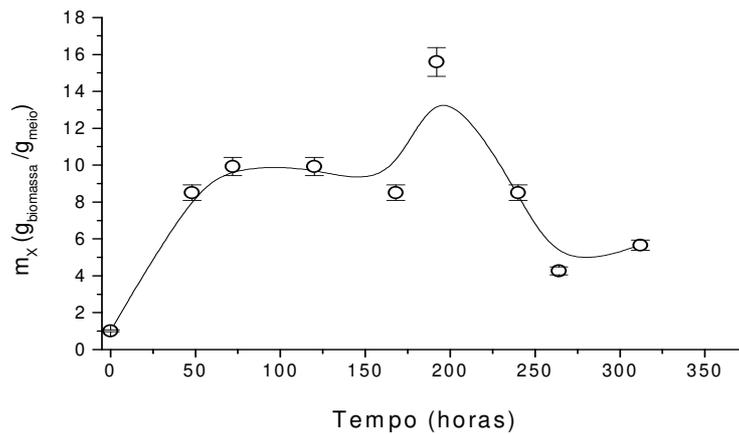


Figura 5.69 Curva de crescimento em farelo de trigo estimada pela demanda de oxigênio (condições de cultivo: partículas 0,59mm, umidade inicial 35%, altura de leito 30mm, vazão de ar 0,4L/min, coluna 30mm x 200mm)

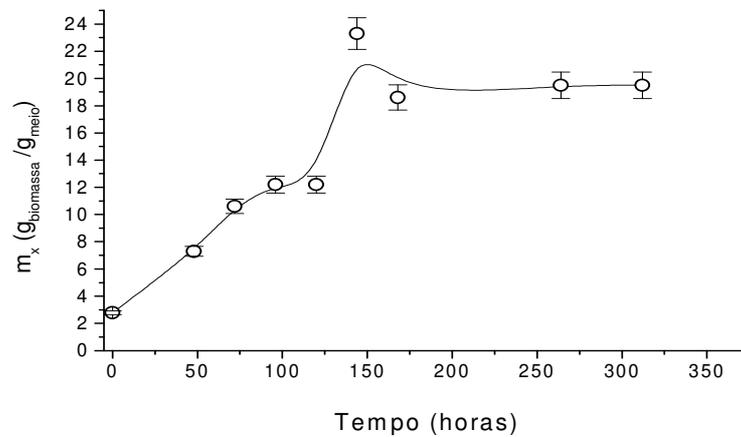


Figura 5.70 Curva de crescimento em espuma de poliuretano estimada pela demanda de oxigênio (condições de cultivo: umidade inicial 45%, altura de leito 30mm, vazão de ar 0,4L/min)

De acordo com o balanço do grau de redução de substrato e biomassa (item 4.9.3), podemos estimar o quociente respiratório (RQ), a quantidade de gás carbônico produzida e a concentração celular, assumindo glicose como fonte de carbono e nitrato como fonte de nitrogênio. De acordo com a Fig. 5.71, a produção de gás carbônico estimado é muito superior nos experimentos com espuma de poliuretano. Isto indica acentuado crescimento celular, conforme já havia sido evidenciado pelo perfil de proteína e glicose (Fig. 5.55 e 5.56).

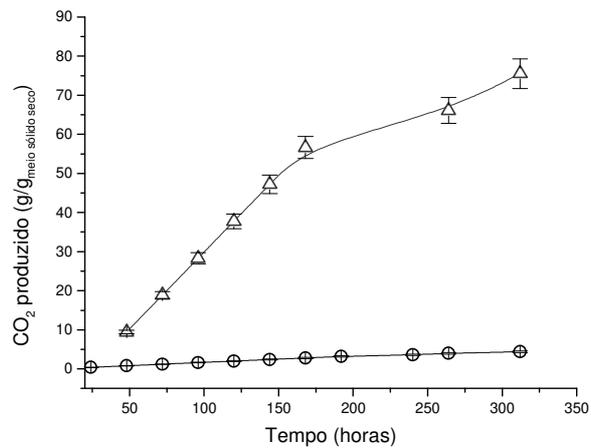


Figura 5.71 Perfil de gás carbônico produzido nos cultivos com suporte inerte e natural: espuma de poliuretano (△) farelo de trigo (○)

Se considerarmos a Eq. 4.24, a qual permite o cálculo da produção de água pela taxa de produção de gás carbônico (CO₂) durante os cultivos, são obtidos os resultados apresentados na Tab. 5.9, com fator de conversão (k_w) 1,15 kg_{água}/kg CO₂ (Lekanda & Pérez-Correa, 2004). A massa de sólido (M_S) foi calculada pela densidade do suporte e volume do leite. A taxa de produção de CO₂ (R_{CO_2}) foi calculada pela regressão linear das curvas apresentadas na Fig. 5.66, obtendo-se a taxa pelo coeficiente angular (Fig. 5 e 6 dos Anexos). Desta forma, temos que a taxa de produção de água nos cultivos com espuma de poliuretano é muito superior ao apresentado com farelo de trigo, cerca de cem vezes maior, levando ao acúmulo de água apresentado nas Fig. 5.53 e 5.58. Assim, altas taxas de evaporação são necessárias pra manter a umidade constante em cultivos com espuma de poliuretano. Caso contrário, em algumas horas de cultivo o acúmulo de água pode saturar o suporte, prejudicando a transferência de oxigênio.

Tabela 5.9 Estimativa da produção de água a partir da taxa de produção de gás carbônico

Suporte	k_w ($\text{gH}_2\text{O/gCO}_2$)	M_s (g_{meio})	CPR ($\text{gCO}_2/\text{g}_{\text{meio}}\cdot\text{h}$)	R_w ($\text{gH}_2\text{O/h}$)
Farelo de trigo	1,15	3,78	0,0142	0,00388
Espuma de poliuretano	1,15	0,56	0,2385	0,4898

O crescimento microbiano é caracterizado pela Fig. 5.72, onde são apresentadas as curvas de crescimento para espuma e farelo de trigo e verifica-se que altas concentrações celulares são obtidas para o suporte inerte. Este comportamento na espuma foi similar ao obtido na estimativa da biomassa pela demanda de oxigênio (Fig. 5.70) sendo obtidos os máximos de biomassa na mesma ordem de grandeza, por volta de 25 - 30 g/g. Para farelo de trigo, verifica-se que também foram obtidos valores máximos de biomassa na mesma ordem de grandeza (10 g/g), embora deva-se considerar que a perda de matéria seca e a redução no tamanho das partículas de farelo de trigo influenciam fortemente este tipo de estimativa (Nandakumar *et al.*, 1996).

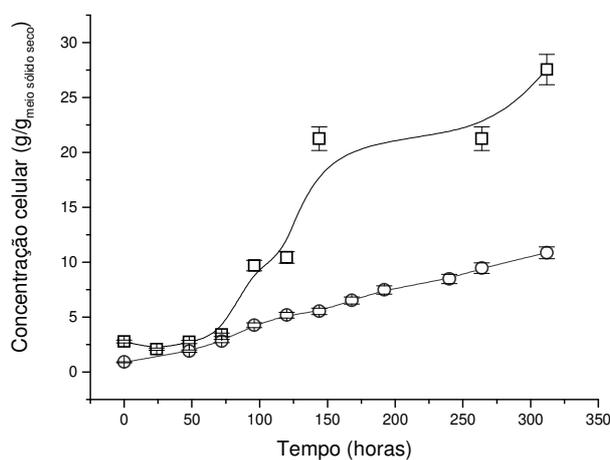


Figura 5.72 Estimativa da concentração celular para cultivo com suporte inerte e natural através do balanço do grau de redução: espuma de poliuretano (\triangle) farelo de trigo (\circ)

As Fig. 5.73 e 5.74 apresentam as correlações entre o teor de proteínas solúveis no extrato fúngico e as estimativas de biomassa pela demanda de oxigênio e pelo grau de redução do substrato. De acordo com os resultados, verifica-se que há uma alta correlação entre a produção de proteínas determinadas no extrato fúngico pelo método de Bradford e a estimativa da biomassa pelo grau de redução para farelo de trigo. Esta evidência é importante uma vez que a estimativa da biomassa na fermentação em estado sólido é um problema a ser contornado e objeto de diversos estudos, constituindo-se numa das principais dificuldades de monitoramento destes processos (Desgranges *et al.*, 1991; Durand *et al.*, 1997; Scotti *et al.*, 2001; Webber *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001; Viccini & Mitchel, 2003). Para espuma de poliuretano, verifica-se uma correlação entre todos os casos, embora menor do que apresentado para farelo de trigo. Esses resultados indicam que a estimativa do crescimento celular nos cultivos em estado sólido pode ser realizada de forma simples, através determinação de proteínas solúveis por Ensaio de Bradford.

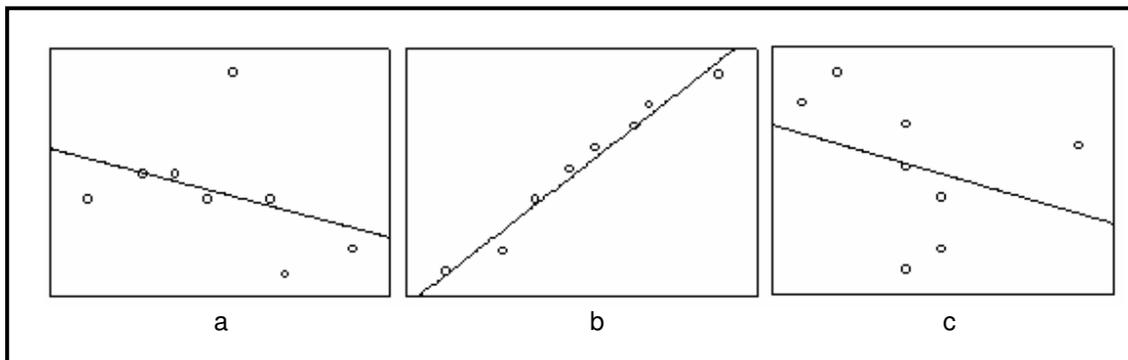


Fig. 5.73 Matriz de correlações das estimativas de biomassa para farelo de trigo

(a) Teor de Proteína versus demanda de oxigênio: $R^2 = -0,37$

(b) Teor de Proteína versus balanço do grau de redução: $R^2 = 0,99$

(c) Demanda de oxigênio versus balanço do grau de redução: $R^2 = -0,34$

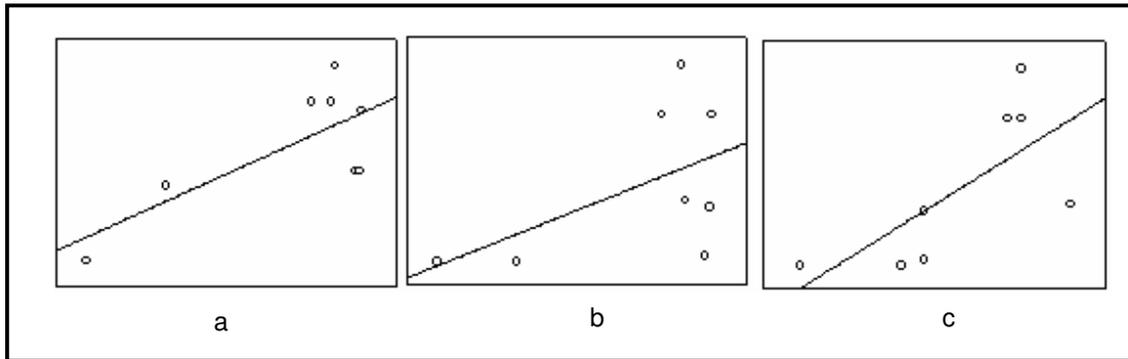


Fig. 5.74 Matriz de correlações das estimativas de biomassa para espuma de poliuretano

(a) Teor de Proteína versus demanda de oxigênio: $R^2 = 0,74$

(b) Teor de Proteína versus balanço do grau de redução: $R^2 = 0,53$

(c) Demanda de oxigênio versus balanço do grau de redução: $R^2 = 0,70$

6 CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados conclui-se que:

- Para partículas de farelo de trigo, a altura de leito 30mm e altas vazões de ar (0,4L/min) mantém a umidade do meio sólido praticamente constante, o que minimiza a compactação do meio, assegura K_L as elevados e permite crescimento na fase aérea, mantendo assim as características da fermentação em estado sólido;

- O cultivo em espuma de poliuretano apresentou produção de proteínas superior aos ensaios com farelo de trigo, resultado da manutenção das propriedades físicas da matriz sólida que permite crescimento balanceado no filme líquido e na fase aérea;

- Os ensaios em farelo de trigo e espuma de poliuretano indicam que nos cultivos em estado sólido tanto a espessura de filme líquido formado na superfície da matriz sólida como os espaços vazios do leito são fundamentais para minimizar as limitações de oxigênio e para aumentar a produtividade do processo;

- A eletroforese SDS-Page permitiu identificação de proteínas com potencial alergênico no cultivo de *Drechslera* (*Helminthosporium*) monoceras com farelo de trigo e espuma de poliuretano;

- A determinação do teor de proteínas do extrato fúngico pelo ensaio de Bradford pode ser utilizada para prever o crescimento microbiano nos cultivos em estado sólido em farelo de trigo.

- Com base nos resultados, o controle da umidade do meio sólido e da porosidade do leito durante a fermentação são variáveis fundamentais para o escalonamento dos processos.

7 SUGESTÕES

- Determinar a altura de leito e vazão de ar que mantêm a umidade praticamente constante ao longo dos cultivos sobre espuma de poliuretano;

- Avaliar o cultivo de *Dreschlera monoceras* sobre diferentes suportes inertes, identificando as proteínas produzidas;

- Caracterizar experimentalmente as proporções da fase aérea e do biofilme no crescimento fúngico, relacionando-as com a demanda de oxigênio, consumo de glicose e coeficiente global de transferência de oxigênio no meio.

- Estimar o impacto do crescimento da fase aérea no consumo de oxigênio, produção de biomassa e das proteínas alergênicas.

- Explorar o controle da umidade no aumento de escala dos cultivos em estado sólido, com a utilização de coluna de maiores dimensões.

- Estudar condições operacionais que produzam relações semelhantes entre o crescimento aéreo e em superfície em coluna de maior dimensão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARAZ-SANDOVAL, V.; SAUCEDO-CASTANEDA, G. & HUERTA-OCHOA, S. Mannanase produciton by filamentous fungi by solid-state fermentation. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B.K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, França. p.311-321. 1997.

ANDRÉ, G., MOO-YOUNG, M. & ROBISON, C.W. Improved method for the dynamic measurement of mass transfer coefficient for application to solid-substrae fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 23. p. 1611–1622. 1981.

AURIA, R.; MORALES, M.; VILLEGAS, E. & REVAH, S. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid-state fermentators. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 41, p. 1007-1013. 1993.

BASOMBA, A. Situation actual del empleo de antígenos em alergia. In: **Publication and estandarización del alérgenos**. Madrid, 1982.

BIO-RAD LABORATORIES. **Mini-protean[®] Electrophoresis Cell: Instruction manual**. Bio-rad Laboratories, California. 1988.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, V.72, (248), p. 248-254. 1976.

BRODKEY, R.S. & HERSHEY, H.C. **Transport phenomena**. Mc Graw-Hill – Chemical Engineering Series, 1988.

BUSH, R.K. Fungal extracts in clinical practice. **Allergy**, v.14, p.385-390, 1993

CABALEIRO, D.R.; RODRÍGUEZ-COUTO, S.; SANROMÁN, A. & LONGO, M.A. Comparison between the protease production ability of lignolytic fungi cultivated in solid state media. **Process Biochemistry**, V.37, p.1017-1023. 2002.

CABRAL, E.C.M.; ZOLLNER, R.L. & SANTANA, M.H.A. Preparation and Characterization of Liposomes Entrapping Allergenic Proteins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, V.21 (2), p.137-146. 2004.

DERMICI, A. & POMETTO, A.L. Repeated fed-batch fermentation in biofilm reactor with plastic composite supports for lactic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 43 (4), p.585-589. 1995.

DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M. & DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol. 35. p.200–205. 1991.

DOMÌNGUEZ, A.; RIVELA, I.; RODRÌGUEZ COUTO, S. & SANROMÁN, M.A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. **Process Biochemistry**, V.37, p.549–554, 2001.

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

DURAND, A., RENAUD, R., MARATRAY, J.,ALMANZA, S. The INRA-Dijon reactors: Designs and applications. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B.K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, França. p.75-92. 1997.

FAVELA-TORRES, E.; GARCIA-RIVERO, M.; CORDOVA-LOPEZ, J.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; GUNASEKARAN, P.; HUERTA-OCHOA, S. Kinetics of *Aspergillus niger* growth at high glucose concentrations in different types of the cultures. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B.K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, França. p. 49-58. 1997.

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

GELMI, C.; PÉREZ-CORREA, R. & AGOSTIN, E. Modelling *Gibberella fujikuroi* growth and GA₃ production in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, V. 37, p.1033-1040. 2002.

GEORGIU, G. & SHULER, M.L. A computer model for the growth and differentiation of a fungal colony on solid substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, V.28, p.405-416. 1986.

GOWTHAMAN, M.K.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S.; GHIDYAL, N.P. & KARANTH, N.G. Estimation of K_La in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. **Process Biochemistry**. V.30, p.9-15. 1995.

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

GUITIÉRREZ-CORREA, M. & VILLENA, G.K. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. **Rer. peru biol.** V. 10 (2), p.113-124, 2003.

HAMIDI-ESFAHANI Z.; SHOJAOSADATI S. A. & RINZEMA A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, V.21 (3), p.265-272, 2004.

HASAN, S.D.M. Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* obtida por fermentação em estado sólido. **Tese de Doutorado FEQ – UNICAMP**. Campinas, 2002.

HASAN, S.D.M.; ZOLNER, R. & SANTANA. M.H.A. Fungi Allergens Produced by Solid-State Fermentation Process: Optimization and Allergen Characterization **Applied Biotechnology and Biochemistry**, V.106, p. 403-412. 2003.

HENDERSON, S.M. & PERRY, M.E. **Agricultural Process Engineering**. The AVI Publ. Com., Chapter 6: Size Reduction. 1976.

HO, K.L.; POMETTO, A.L.; HINZ, P.N.; DICKSON, J.S. & DEMIRCI, A. Ingredient selection for plastic composite supports for L-(+)-lactic acid biofilm fermentation by *Lactobacillus casei rhamnosus*. **Applied Environmental Microbiology**, V. 63 (7), p. 2516-2523, 1997.

HOFFMAN, D.R. Mold allergens. **Mold Allergens**. Ed. Y. Aldoory & J.F.Dombson, Philadelphia, Lea & Febriger, p.104-116, 1984.

KUNII, D. & LEVENSPIEL, O. Circulating fluidized-bed reactors. **Chemical Engineering Science**, V. 52, p.2471-2482. 1997.

LAREO, C.; SPOSITO, A.F.; BOSSIO, A.L. & VOLPE, D.C. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 38, p. 391-400, 2005.

LAUKEVICS, J.J.; APSITE, A.F.; VIESTURS, U.S. & TENGARDY, R.P. Steric hindrance of growth of filamentous fungi in solid state fermentation of wheat straw. **Biotechnology and Bioengineering**, V. 27, p.1687-1691. 1985.

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

LINDER, M.B.; SZILVAY, G.R.; NAKARI-SETÄLÄ, T. & PENTTILÄ, M.E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. **Federation European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews**, V.29, p.877-896. 2005.

LONSANE, B.K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALES, G.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up strategies for solid state fermentation system. **Process Biochemistry**, V.27, p.259-273, 1992.

MARIANO, G.R.; RICHARD, A.; CLAUDE, B.J.; SERGIO, R. A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert support. **The Chemical Engineering Journal**, V. 60, p.189-198. 1995.

MARQUES, S.P.O. Extratos alergênicos brutos obtidos por extração com líquidos de coca e Tris-HCl das fases vegetativa e reprodutiva de *Pleurotus ostreatus*: análise bioquímica e alergênica. **Tese de mestrado ICB – USP**. 1997

MENEZES, E.A. Fracionamento e caracterização alergênica do extrato de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. **Tese de doutorado ICB – USP**, São Paulo, 1995.

MENEZES, E.A.; GAMBALE, W.; MACEDO, M.C.; ABDALLA, D.S.P.; PAULA, C.R.; CROCE, J. Biochemical, antigenic and allergenic characterization of crude extracts of *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. **Biological Advances**, V.101, p.75-81, 1995.

MITCHELL, D.A.; DO, D.D.; GREENFIELD, P.F. & DOELLE, H.W. A semimechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporium* 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 the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, V. 35, p.1211-1255. 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 (2), p.137-147. 2003.

MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, V.117, p.307-310. 1981.

NAGENDRA PRABHU, G. & CHANDRASEKARAN, M. Impact of process parameters on L-glutaminase production by marine *Vibrio costicola* in solid state fermentation using polystyrene as an inert support. **Process Biochemistry**, V.32, p.285-289, 1997.

NANDAKUMAR, M.P.; THAKUR, M.S.; RAGHVARAO, K.S.M.S. & GUILDYAL, N.P. Substrate particle size reduction by *Bacillus coagulans* in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, V.18, p.121-125, 1996.

OOIJKAAS, L.P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **Trends in Biotechnology**, V.18. p.355-360. 2000a.

OOIJKAAS, L.P.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J. & RINZEMA, A. Growth and sporulation stoichiometry and kinetics of *Coniothrium minitans* on agar media. **Biotechnology and Bioengineering**. V.69, n.3, p.292-300. 2000b.

OOSTRA, J.; COMTE, E.P.I.; VAN DER HEUVEL, J.C.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. V.75, n.1, p.13-24. 2001.

PANDEY, A. & RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme Microbiology Technology**, V.14, p.486-488. 1992.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON & NIGAM, P. **Solid-state fermentation in biotechnology. Fundamentals and Applications**. Asiatech Publishers, INC. New Delhi. 2001.

PINTADO, J.; TORRADO, A.; GONZÁLES, M.P. & MURADO, M.A. Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foam. **Enzyme Microbiology Technology**, V.23, p.149-156. 1998.

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.

RAHARDJO, Y.S.P.; TRAMPER, J. & RINZEMA, A. Modelling conversion and transport phenomena in solid state fermentation: a review and perspectives. **Biotechnology Advances**, V. 24, p.161-179. 2006.

RAHARDJO, Y.S.P.; WEBER, F.J.; PAUL LE COMTE, E.; TRAMPER, J. & RINZEMA, A. Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology and Bioengineering**, V. 78: 539-544. 2002.

RAJAGOPALAN, S. & MODAK, J.M. Evaluation of relation growth limitation due to depletion of glucose and oxygen during fungal growth on a spherical solid particle. **Chemical Engineering Science**, V. 50: 803-811. 1995

RAMANA MURTHY, M.V.; KARANTH, N.G.; RAGHAVA RAO, K.S.M.S. Biochemical Engineering: aspects of solid-state fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, v.38, p.99-147. 1993.

RINZEMA, A., DE REU, J.C., OOSTRA, J., NAGEL, F.J., SCHEEPERS, B., NOUT, M.J.R., TRAMPER, J. Models for solid-state cultivation of *Rhizopus oligosporus*. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B.K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. **Advances in Solid State Fermentation**. Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, França. p.143-154. 1997.

RIVELA, I.; COUTO, S.R. & SANROMAN, A. Extracellular ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in a new solid-state bioreactor. **Biotechnology Letters**, V.22, p.1443-1447, 2000.

RODRIGUEZ COUTO S.; DOMINGUEZ A. & SANROMÁN A. Utilization of lignocellulosic wastes for lignin peroxidase production by semisolid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium* **Biodegradation** V. 12, p.283–289. 2001.

SABU, A.; KEERTHI, T.R.; RAJEEV KUMAR, S. & CHANDRASEKARAN, M. L-Glutaminase production by marine *Beauveria sp.* under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, V.35, p.705-710, 2000.

SARAIVA, C.P. Extração de proteínas com potencial alergênico da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* produzida por fermentação em estado sólido. **Tese de Mestrado FEQ – UNICAMP**. Campinas, 2001.

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

SHARMA, P.D.; FISHER, P.J. & WEBSTER, J. Critique of the chitin assay technique for the estimation of fungal biomass. **Trans. Br. Mycol. Soc.** V. 69, p. 479 – 483. 1977.

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

SOCCOL, C.R. & VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied of solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, V13, p.205-218, 2003.

TANAKA, M.; KAWAIDE, A.; MATSUNO, R. Cultivation of microorganisms in an air-solid fluidized bed reactor with agitators. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, p.1294-1301. 1986.

TEREBIZNIK, M.R. & PILOSOFF, A.M.R. Biomass estimation in solid state fermentation y modeling dry matter weight loss. **Biotechnology Techniques**, V.13(3), p.215-219,1999.

THIBAUT, J.; POULIOT, K.; AGOSIN, E. & PÉREZ-CORREA, R. Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and K_La in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. V. 36, p. 9-18. 2000.

VICCINI, G. & MITCHELL, D.A. Conversão entre as unidades usadas para expressar a concentração de biomassa em estudos cinéticos de fermentação em estado sólido. **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermentações**. 2003.

VINIEGRA-GONZALES, G. Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring. **Advances in Solid State Fermentation**. Proceedings

of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, França p.16 - 18. 1997.

WEBBER, F.J., TRAMPER, J., RINZEMA, A. A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, V.65, pp. 447-458. 1999.

WESSELS, J.G.H. Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. **Trends in Plant Science**. V.1 (1), pp.9-15. 1996.

WESSELS, J.G.H. Fungi on their own right. **Fungal Genetics and Biology**, V.27, pp.134-145. 1999.

WÖSTEN, H.A.B. & DE VOCHT, M.L. Hydrofobins, the fungal coat unraveled. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1469, pp.79-86, 2000.

YUNGINGER, J.W. Allergens: recent advances. **Pediatric Clinical N. Annals**, V.35, p.981-993, 1988.

YUNGINGER, J.W.; JONES, R.T.; NEIHEIM, M.E. & GELLER, M. Studies on *Alternaria* allergens III: Isolation as a major allergenic fraction (Alt-1). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, V.66, p.138-147, 1980.

ZHAO, H.ZHANG, X. & ZUOHU, L. Growth of *Rhizobium leguminosarum* in a periodic pressure oscillating solid-state fermentation of wheat straw. **Biotechnology Letters**, V.23, pp.827-829, 2001.

ZHU, Y.; KNOL, W.; SMITHS, J.P. & BOL, J. Medium optimization for nuclease P1 production by *Penicillium citrinum* in solid-state fermentation using polyurethane foam as inert carrier. **Enzyme and Microbial Technology**, V.18, pp.108-112, 1996

ANEXOS

Anexo I – Perfil de concentração de oxigênio no filme líquido

A concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida pode ser estimada partindo das seguintes considerações:

1) Transferência de massa e consumo de oxigênio ocorrendo no filme líquido formado ao redor de partículas esféricas;

2) As partículas são isotérmicas, sendo assim os gradientes de temperatura são desprezíveis;

3) A transferência de massa ocorre apenas por difusão, uma vez que a convecção dentro dos poros é desprezível; são considerados sólidos não porosos (volume de poro desprezível);

4) A difusão pode ser descrita pela Lei de Fick com difusividade efetiva constante, sendo assim a interação do substrato com outros gradientes de concentração ou outros fenômenos é desprezível;

5) A difusividade do oxigênio é constante e independente da concentração de substrato na partícula, sendo função apenas das características de difusão molecular e do volume de partícula disponível para o transporte;

6) As partículas são homogêneas;

7) As partículas estão em regime permanente, ou seja, o oxigênio transportado é consumido no filme líquido, não havendo acúmulo;

8) A concentração de oxigênio varia numa única direção, sendo considerada radial para partículas esféricas, difundindo-se da superfície externa do filme para a superfície das partículas.

Desta forma, o balanço de oxigênio pode ser escrito:

$$\left[\begin{array}{l} \text{Massa que} \\ \text{entra no sistema} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Massa que} \\ \text{sai do sistema} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Massa} \\ \text{gerada} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Massa} \\ \text{consumida} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Massa} \\ \text{acumulada} \end{array} \right] \quad (\text{Eq.1})$$

Taxa de oxigênio que entra pela difusão: $\left(D_{O_2,L} \frac{dC_L}{dr} 4\pi r^2 \right) \Big|_{r+\Delta r}$

Sendo $D_{O_2,L}$ difusividade de oxigênio; C_{O_2} concentração de oxigênio no filme líquido; $4\pi r^2$ área para transferência de massa; Δr espessura de filme líquido.

Taxa de oxigênio que sai pela difusão: $\left(D_{O_2,L} \frac{dC_L}{dr} 4\pi r^2 \right) \Big|_r$

Taxa de geração de oxigênio: Nula;

Taxa de consumo de oxigênio: $R_{O_2} 4\pi r^2 \Delta r$; sendo que $4\pi r^2 \Delta r$ corresponde ao volume de filme líquido;

Taxa de acúmulo de oxigênio: Nula.

Desta forma, temos que:

$$\left(D_{O_2,L} \frac{dC_L}{dr} 4\pi r^2 \right) \Big|_{r+\Delta r} - \left(D_{O_2,L} \frac{dC_L}{dr} 4\pi r^2 \right) \Big|_r - R_{O_2} 4\pi r^2 \Delta r = 0 \quad (\text{Eq. 2})$$

Dividindo os termos por $4\pi \Delta r$, temos que:

$$\frac{\left(D_{O_2,L} \frac{dC_L}{dr} \right) \Big|_{r+\Delta r} - \left(D_{O_2,L} \frac{dC_L}{dr} \right) \Big|_r}{\Delta r} - R_{O_2} r^2 = 0 \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\frac{\Delta \left(D_{O_2,L} \frac{dC_L}{dr} r^2 \right)}{\Delta r} - R_{O_2} r^2 = 0 \quad (\text{Eq. 4})$$

Assim, aproximando $\Delta r \rightarrow 0$, temos:

$$\lim_{\Delta r \rightarrow 0} \frac{\Delta \left(D_{O_2,L} \frac{dC_L}{dr} r^2 \right)}{\Delta r} - R_{O_2} r^2 = 0 \quad (\text{Eq. 5})$$

Pela definição de derivada, o primeiro termo da equação leva a equação diferencial de 2ª ordem:

$$\frac{d}{dr} \left(D_{O_2,L} \frac{dC_L}{dr} r^2 \right) - R_{O_2} r^2 = 0 \quad (\text{Eq. 6})$$

Assumindo $D_{O_2,L}$ constante e independente de r :

$$D_{O_2,L} \frac{d}{dr} \left(\frac{dC_L}{dr} r^2 \right) - R_{O_2} r^2 = 0 \quad (\text{Eq. 7})$$

Expandindo o termo da esquerda, temos:

$$D_{O_2,L} \left(\frac{d^2 C_L}{dr^2} r^2 + 2r \frac{dC_L}{dr} \right) - R_{O_2} r^2 = 0 \quad (\text{Eq. 8})$$

Condições de contorno:

$$r = 0 \text{ (centro da partícula; condição de simetria)} \rightarrow \frac{dC_L}{dr} = 0 \quad (\text{Eq. 9})$$

$$r = R_1 \text{ (superfície da partícula)} \rightarrow D_{O_2,L}^F \frac{dC_L^F}{dr} = D_{O_2,L}^S \frac{dC_L^S}{dr} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$r = R_2 \text{ (superfície do filme líquido)} \rightarrow D_{O_2,L}^F \frac{dC_L^F}{dr} = k_G (C_G - C_G^i) \quad (\text{Eq. 11})$$

Os índices “F” e “S” indicam filme líquido e partícula sólida, respectivamente. A concentração de oxigênio na superfície do líquido ($r=R_2$) é a concentração de saturação na pressão e temperatura considerada. Integrando a Eq. 8 com as condições de contorno apresentadas (Equações 9 e 10), temos o perfil radial de concentração de oxigênio no filme líquido. Considerando reação de consumo de oxigênio de ordem zero, temos a Eq. 12. Esta expressão foi utilizada no cálculo da concentração de oxigênio no filme líquido na superfície da partícula sólida (C_L), de acordo com a Eq. 4.12.

$$C_L = C_L^* + \frac{R_{O_2} R_2}{6D_{O_2,L}} \left(\frac{r^2}{R_2^2} - 1 + \frac{2R_1^3}{rR_2^3} - \frac{2R_1^3}{R_2^3} \right) \quad (\text{Eq. 12})$$

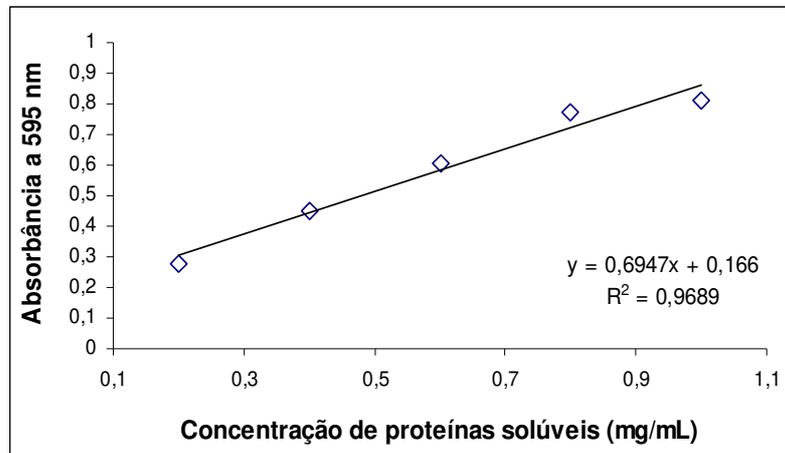
Anexo II – Curvas-padrão e de calibração

Fig. 1 Curva padrão de proteína solúveis no extrato fúngico obtidas pelo ensaio de Bradford usando BSA como padrão

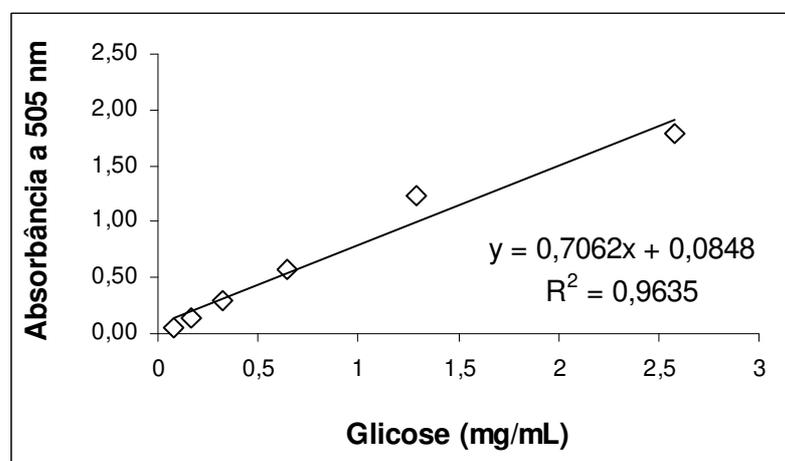


Fig. 2 Curva padrão de glicose no extrato fúngico pelo método enzimático glicose - oxidase

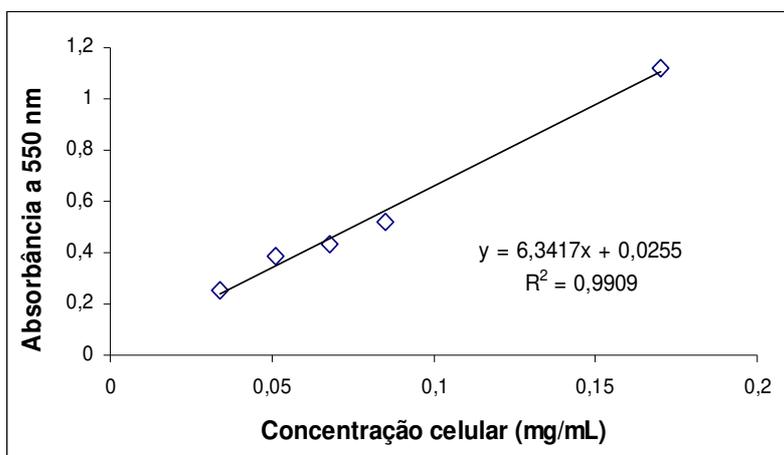
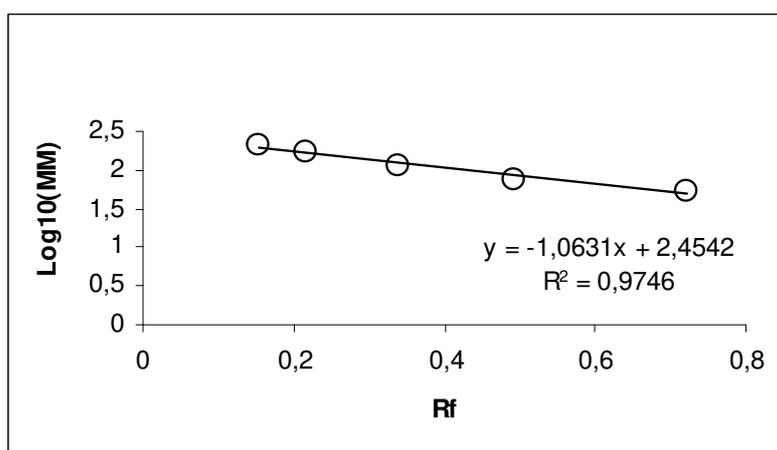
Fig. 3 Curva padrão da biomassa de *D. monoceras*

Fig. 4 Curva de calibração do marcador de alta massa molar para identificação de proteínas por SDS-PAGE

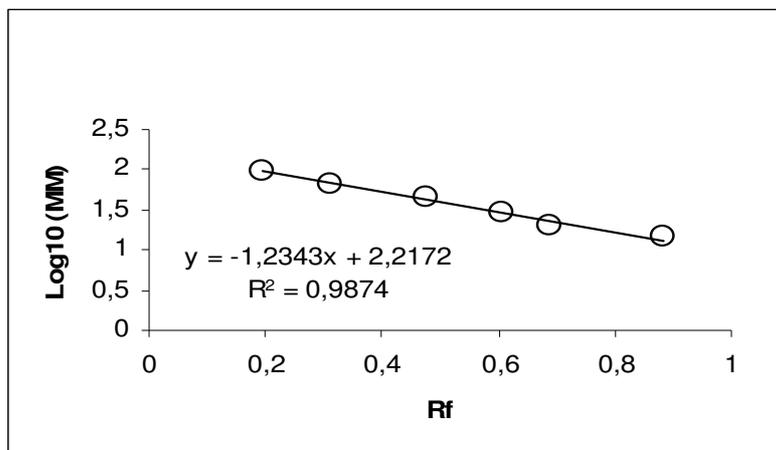


Fig. 5 Curva de calibração do marcador de baixa massa molar para identificação de proteínas por SDS-PAGE

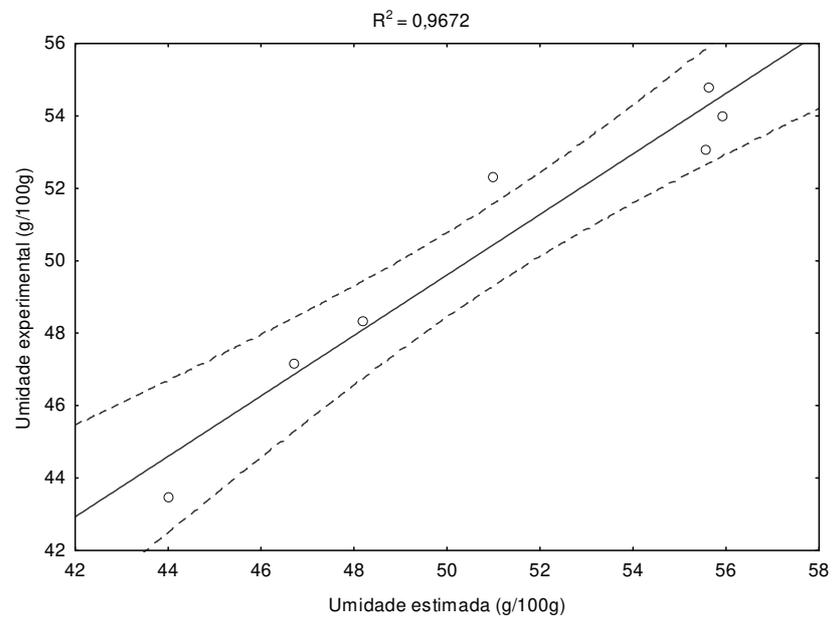
Anexo III – Correlações

Fig. 6 Correlação entre dados de umidade experimental e estimados para farelo de trigo

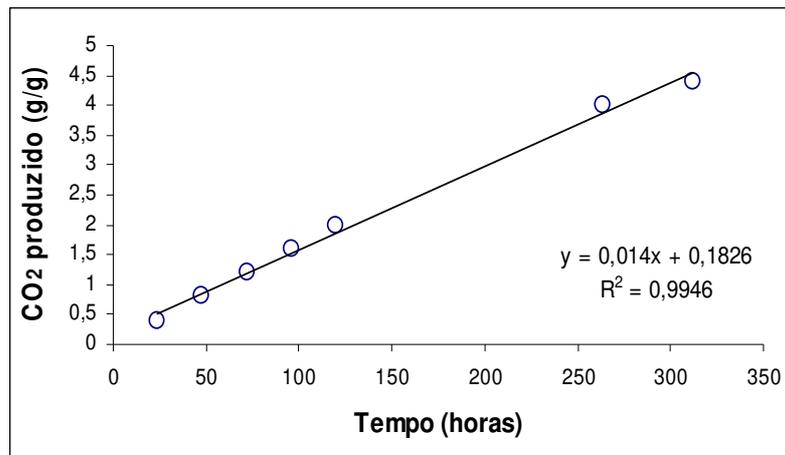


Fig. 7 Regressão linear para estimativa da taxa de produção de gás carbônico com cultivo em farelo de trigo (35% de umidade; 0,4L/min; partículas 0,59mm)

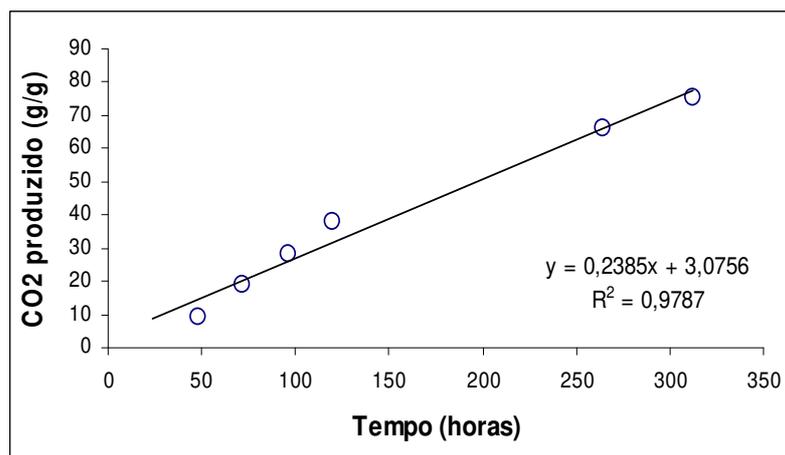


Fig. 8 Regressão linear para estimativa da taxa de produção de gás carbônico com cultivo em espuma de poliuretano (45% de umidade; 0,4L/min)

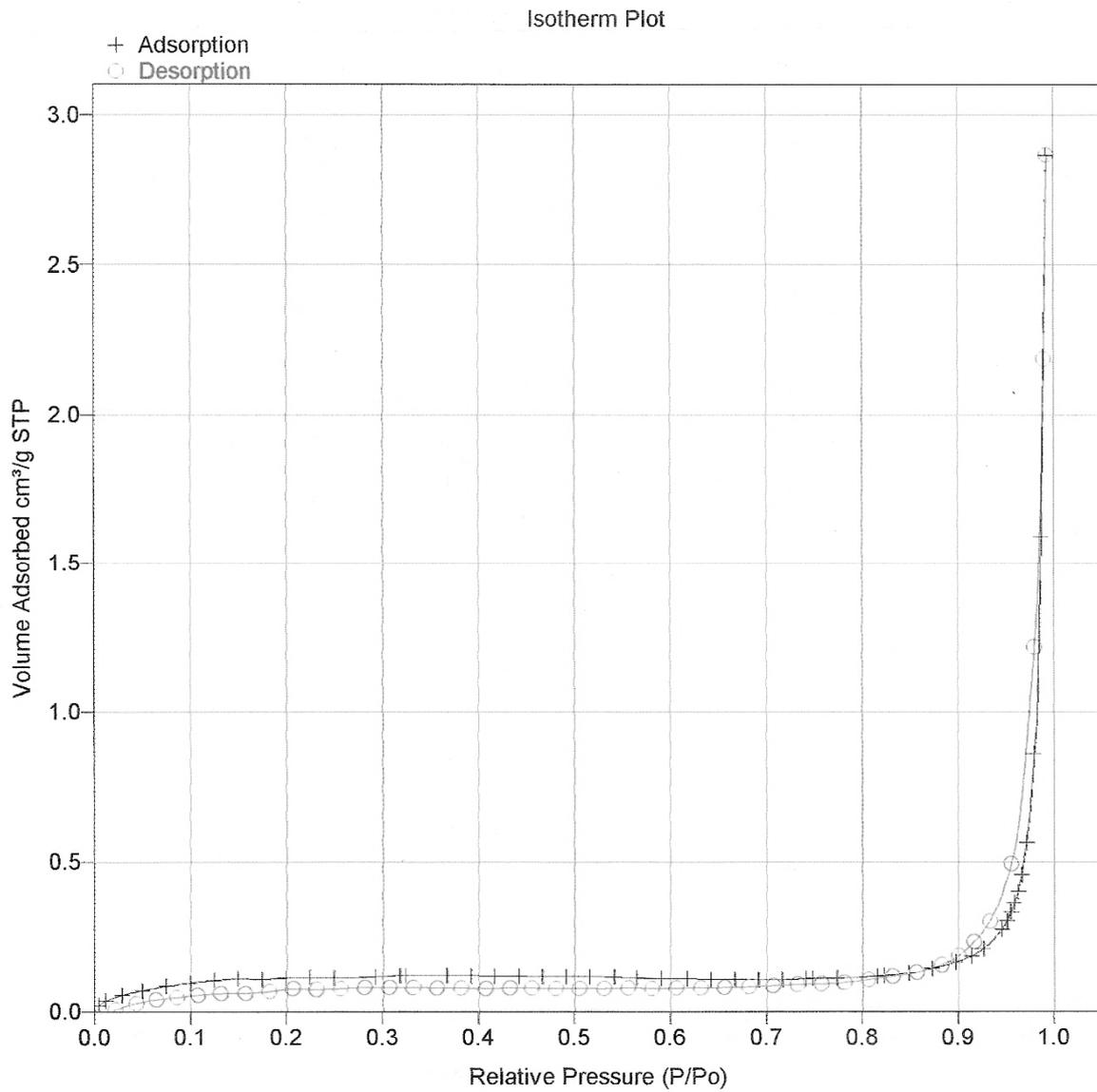
Anexo IV – Isotermas de BET para os suportes inertes

Fig. 9 Isoterma BET para amostras de farelo de trigo 0,35mm

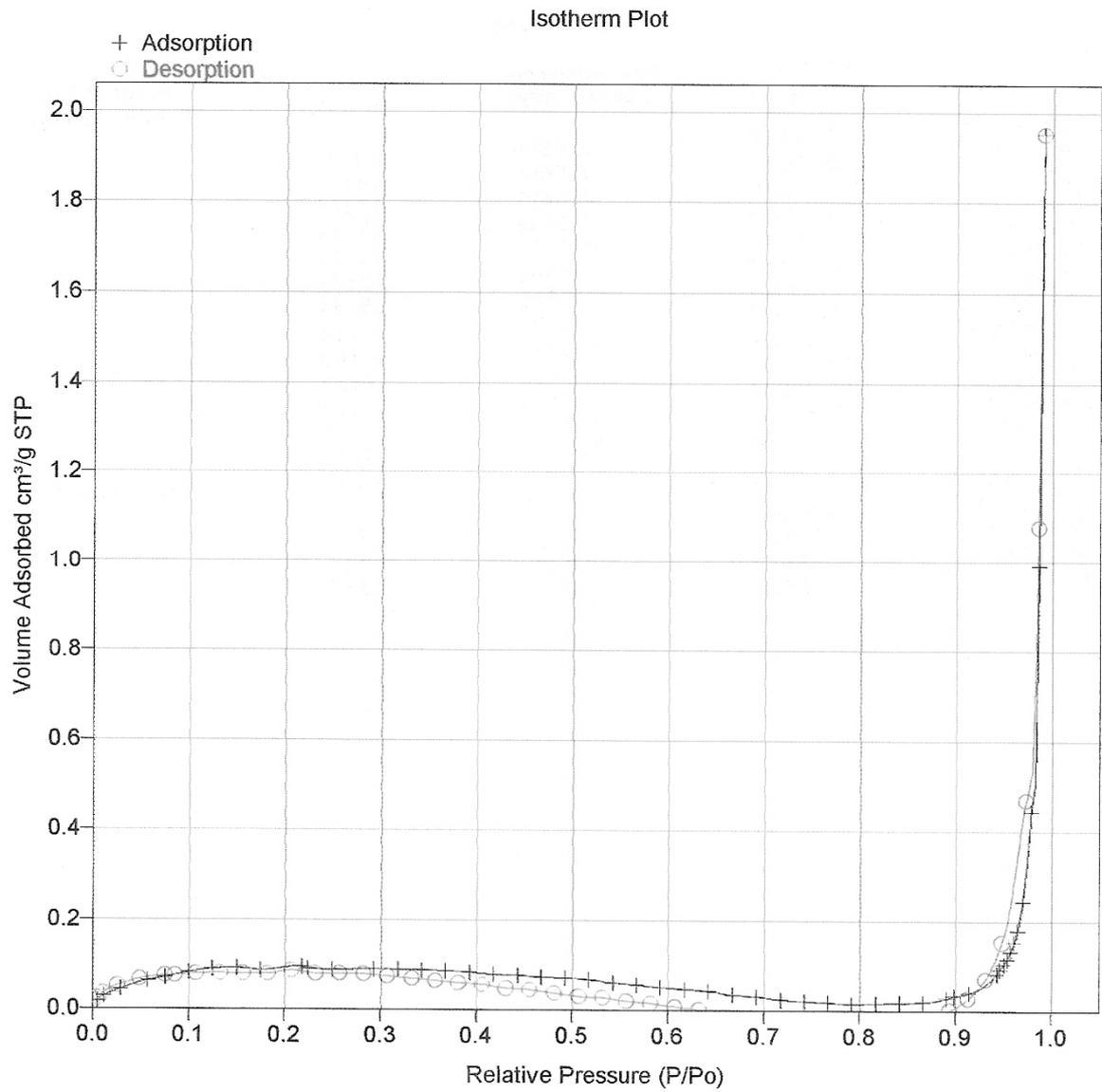


Fig. 10 Isotherma BET para amostras de farelo de trigo 0,59mm

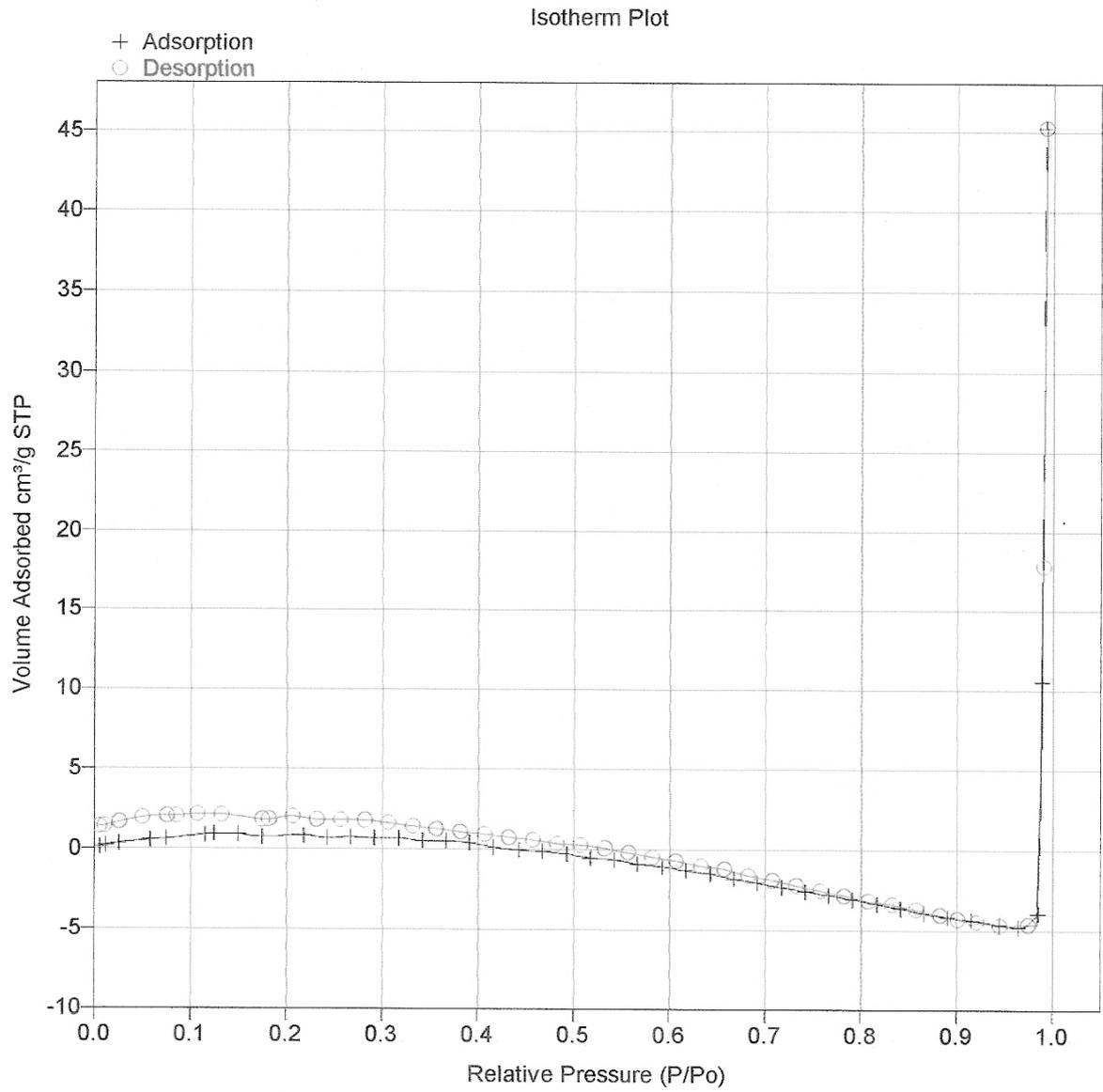


Fig. 11 Isotherma BET para amostras de espuma de poliuretano

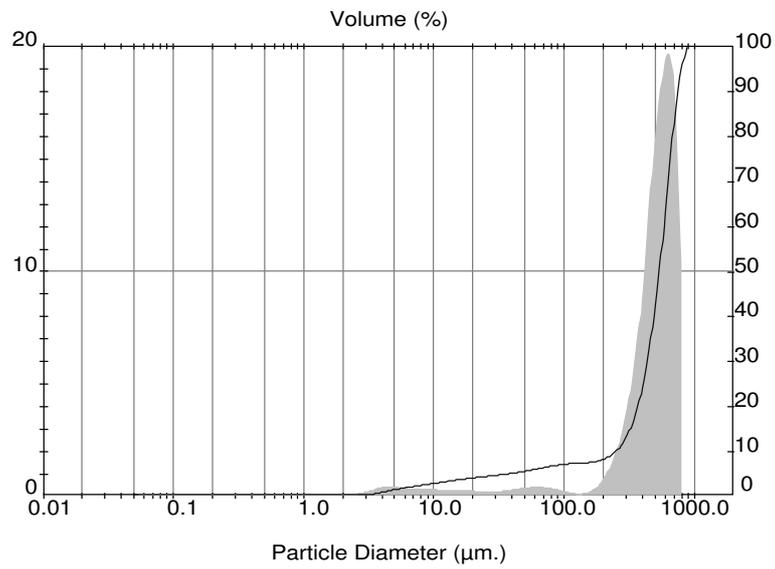
Anexo V – Distribuição de tamanho de partículas

Fig. 12 Distribuição de tamanho obtida no Mastersizer S (Malvern) para farelo de trigo 0,35 mm com 11 dias de cultivo com 35% de umidade inicial

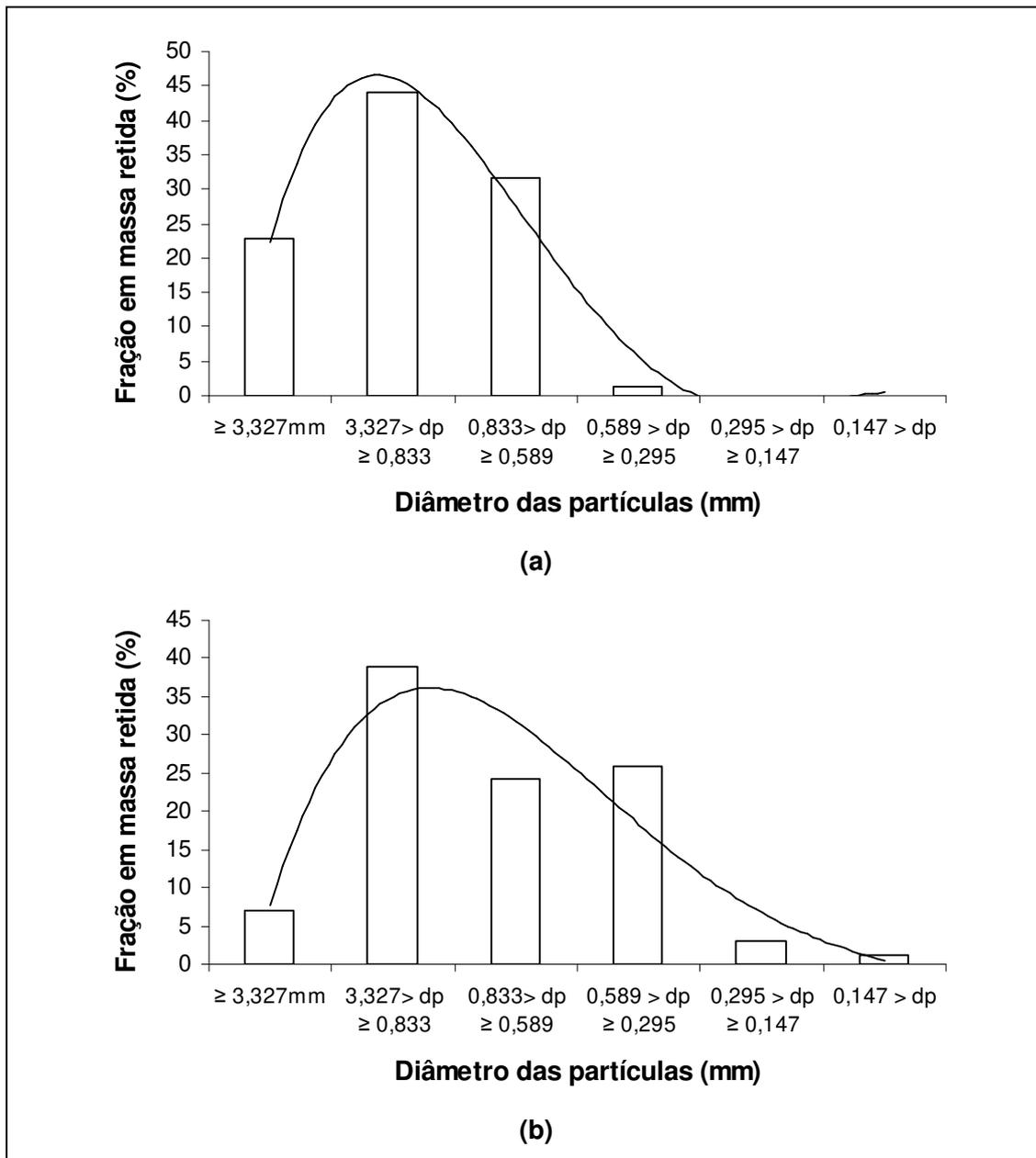


Fig. 13 Distribuição de tamanhos obtida pelo conjunto de peneiras para farelo de trigo 0,35mm no tempo zero (a) e com 11 dias (b) com 35% de umidade

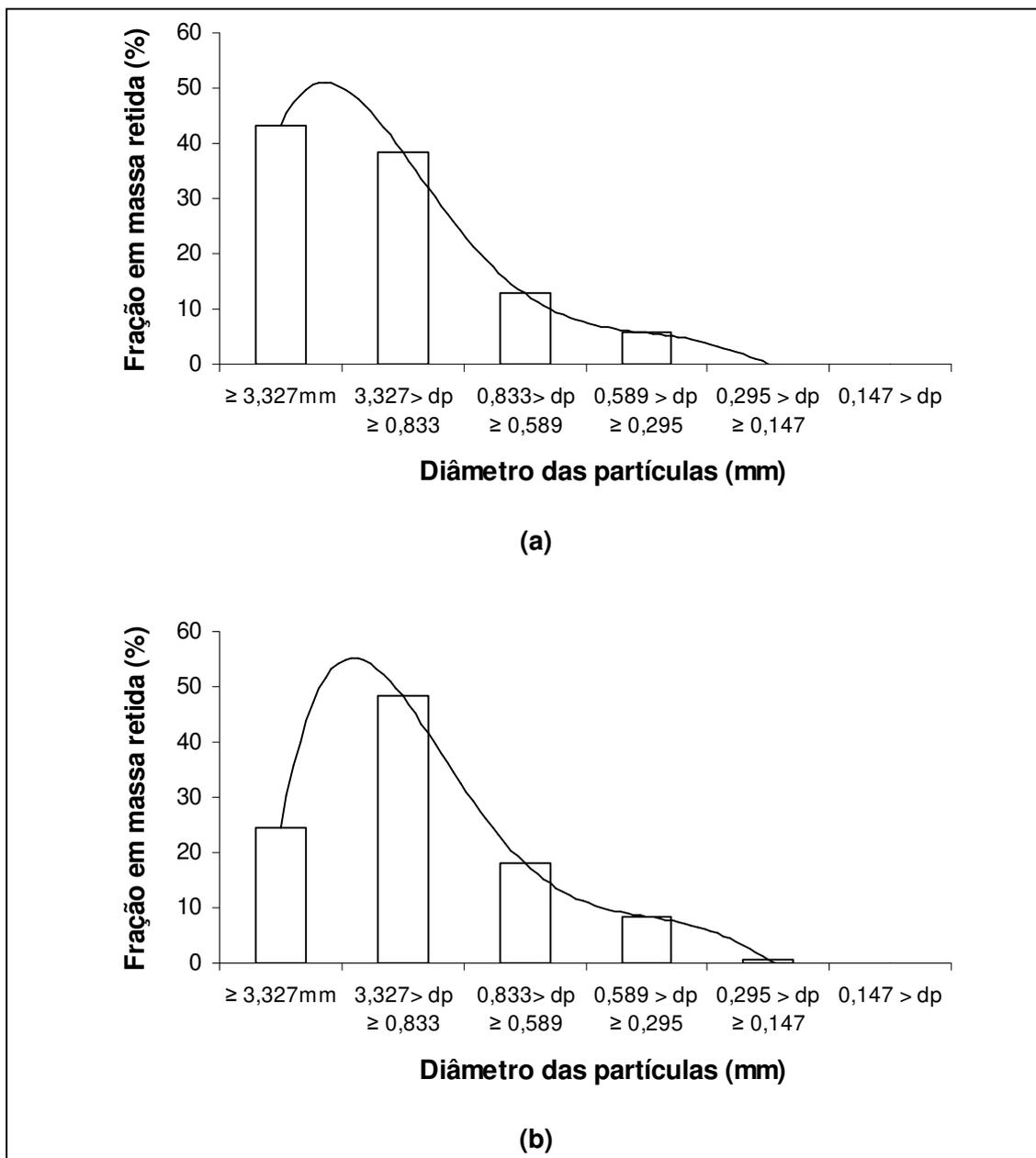


Fig. 14 Distribuição de tamanhos obtida pelo conjunto de peneiras para farelo de trigo 0,59mm no tempo zero (a) e com 11 dias (b) com 35% de umidade

Anexo VI – Perfis de umidade do meio sólido, proteína e glicose do extrato fúngico, rendimento de glicose em proteínas e taxa de transferência de oxigênio para diferentes alturas de leito

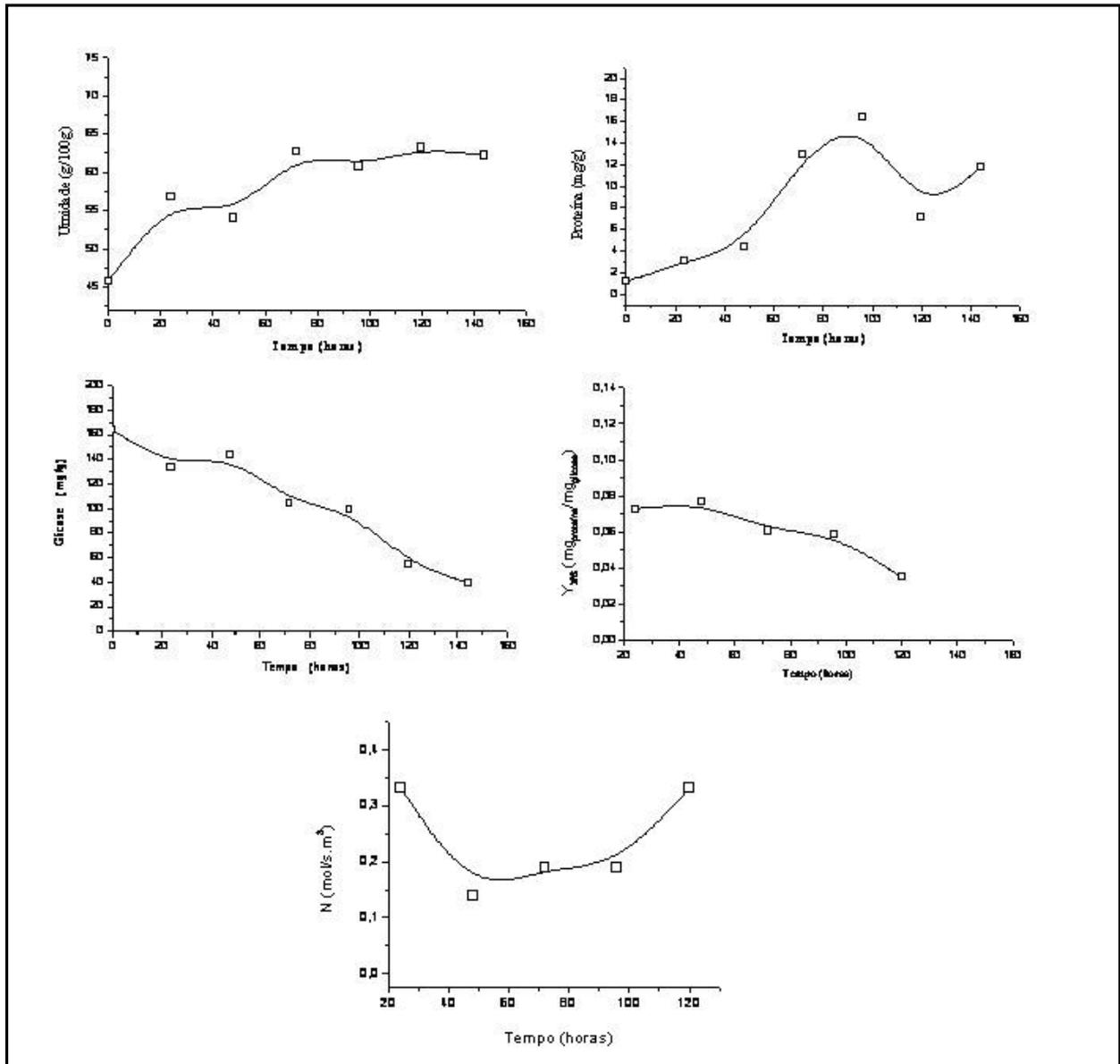


Fig. 15 Comportamento do cultivo sobre farelo de trigo com 30 mm de altura de leito (vazão 1L/min; farelo de trigo 0,59mm)

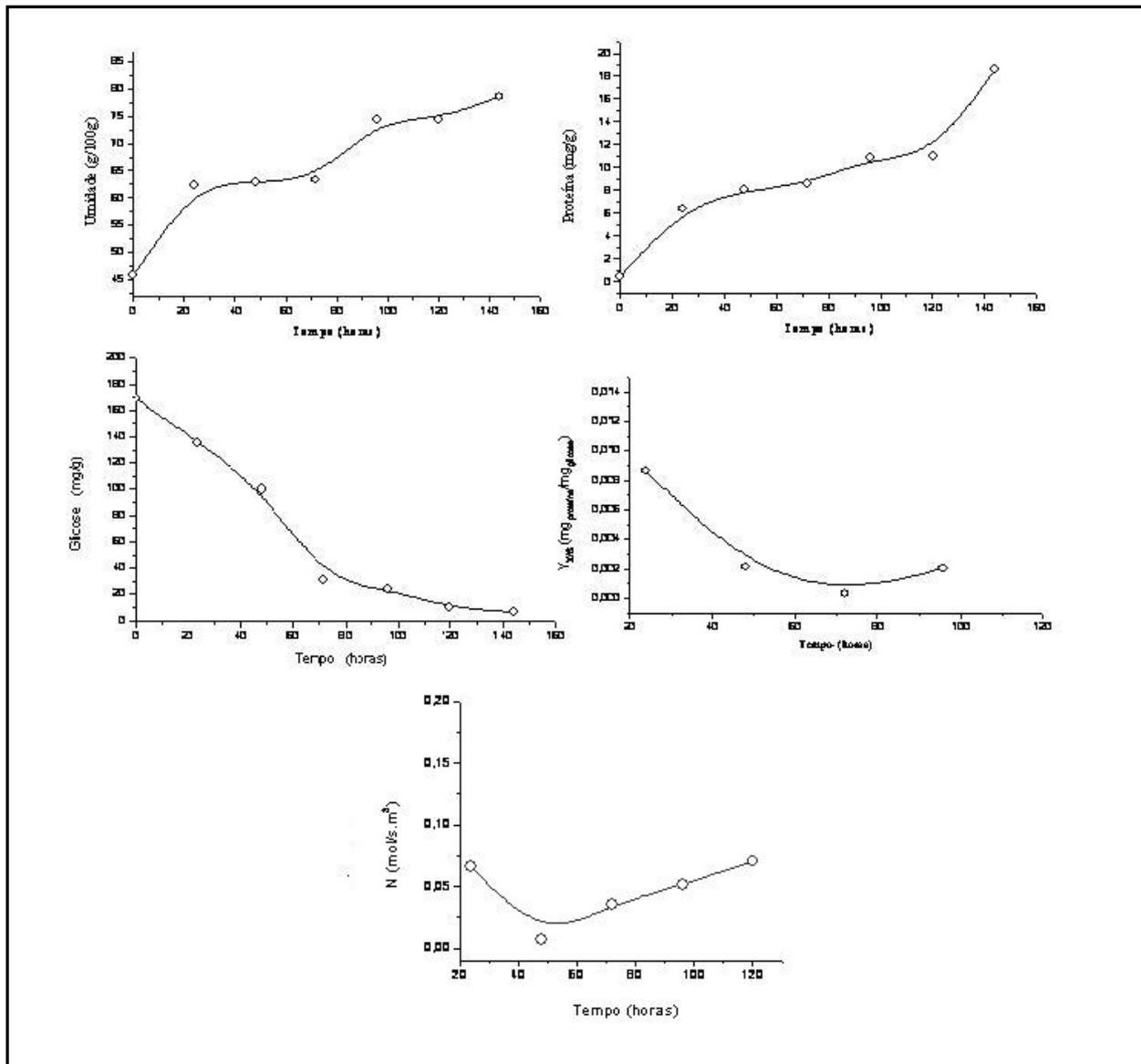


Fig. 16 Comportamento do cultivo sobre farelo de trigo com 80 mm de altura de leito (vazão 1L/min; farelo de trigo 0,59mm)

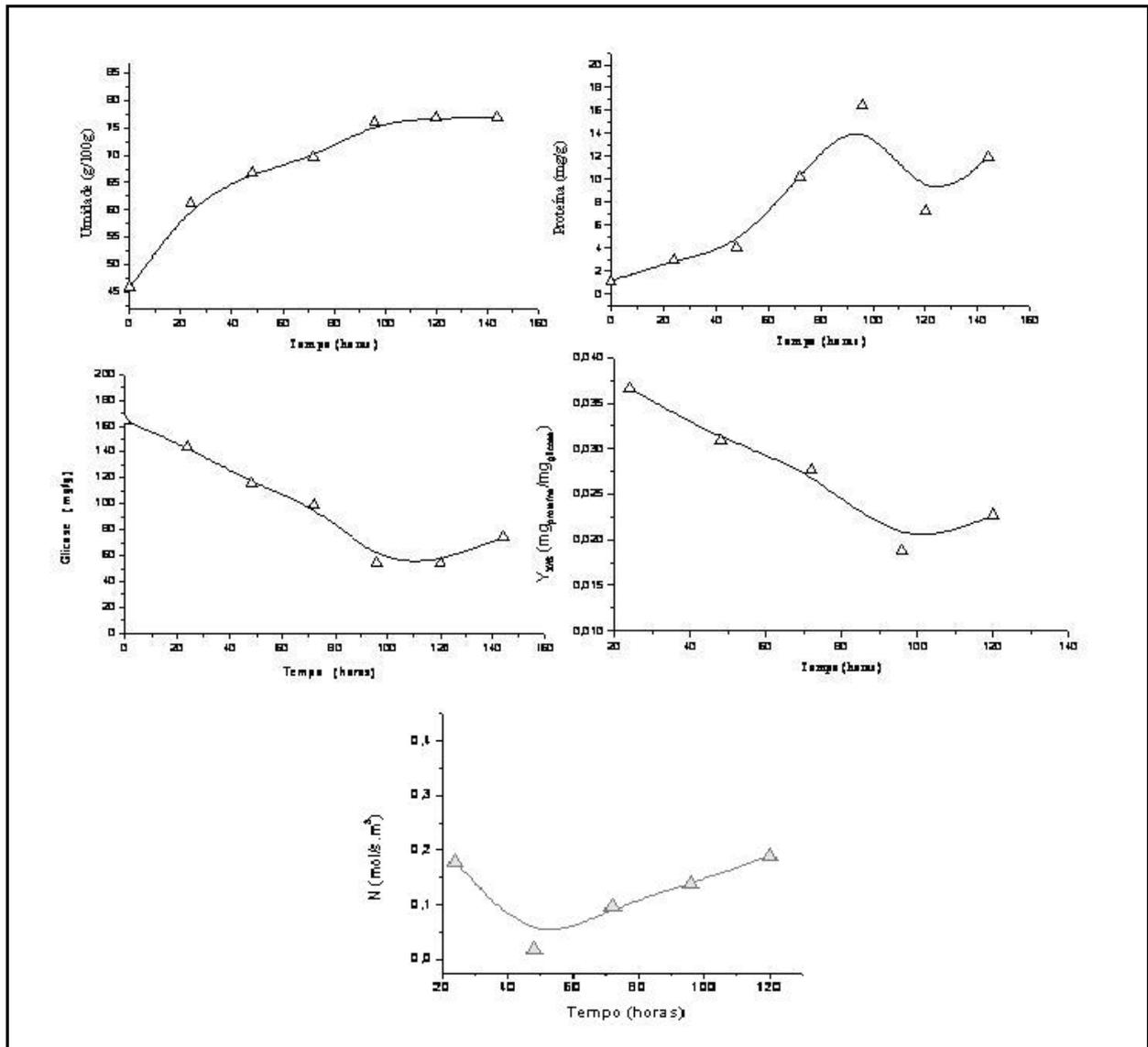


Fig. 17 Comportamento do cultivo sobre farelo de trigo com 130 mm de altura de leito (vazão 1L/min; farelo de trigo 0,59mm)

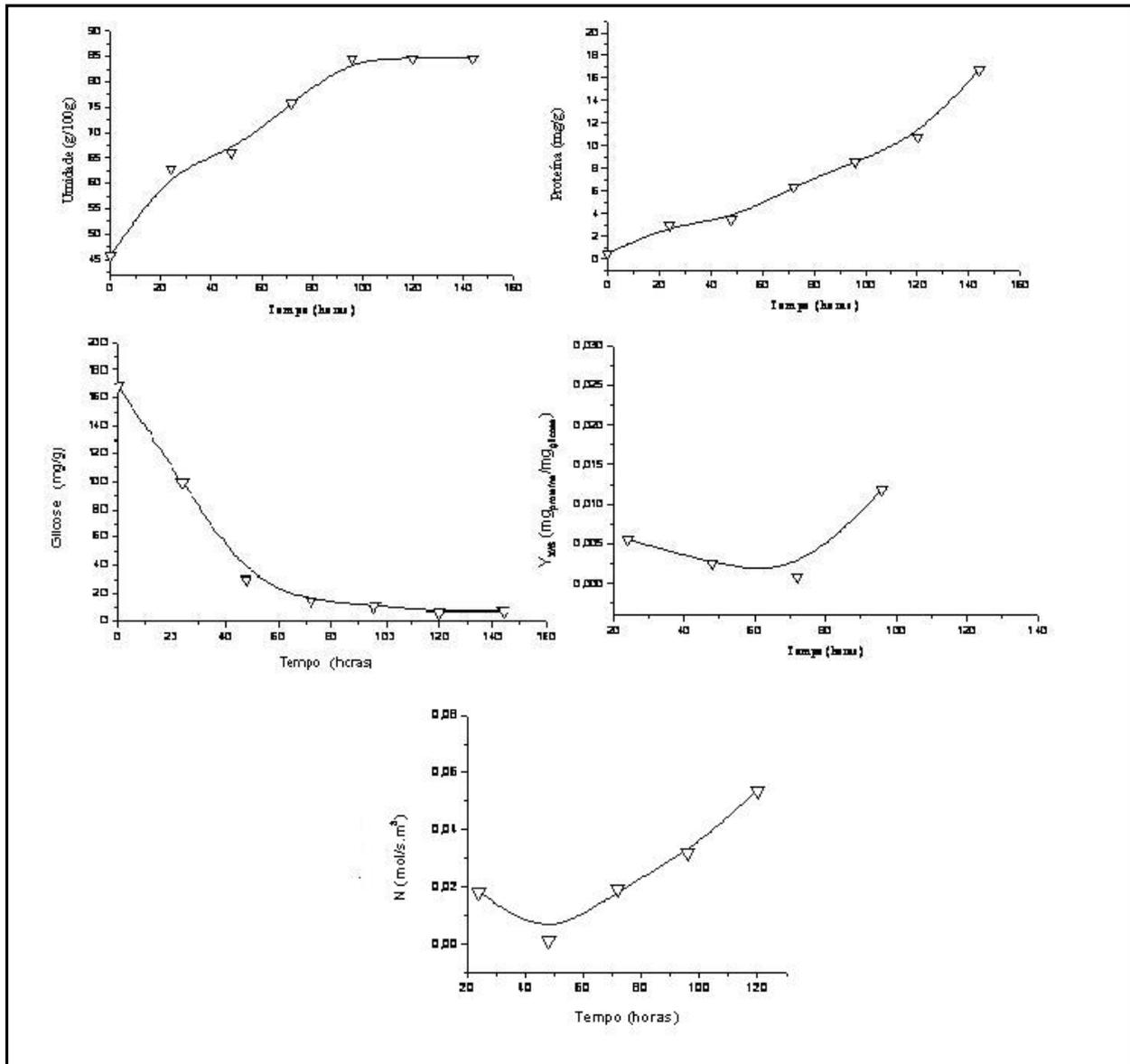


Fig. 18 Comportamento do cultivo sobre farelo de trigo com 180 mm de altura de leite (vazão 1L/min; farelo de trigo 0,59mm)