

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

NATALIA ALVAREZ RODRIGUES

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DE DIFERENTES MODOS DE OPERAÇÃO DE
UM BIORREATOR DE LEITO EMPACOTADO MULTICAMADAS PARA
PRODUÇÃO DE CELULASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO**

São Carlos - SP

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

NATALIA ALVAREZ RODRIGUES

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DE DIFERENTES MODOS DE OPERAÇÃO DE
UM BIORREATOR DE LEITO EMPACOTADO MULTICAMADAS PARA
PRODUÇÃO DE CELULASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Perpétua Casciotori.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Sanchez Farinas.

São Carlos - SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Natalia Alvarez Rodrigues, realizada em 26/02/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori (UFSCar)

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior (UFSCar)

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela sua presença constante em minha vida e por ter me concedido a força, a proteção, a sabedoria e o discernimento necessários para conclusão dessa etapa.

A todos os meus familiares por toda a motivação e apoio. Em especial, agradeço a minha mãe Cristina, ao meu pai João e ao meu irmão Guilherme que sempre rezaram por mim, sonharam junto comigo e estiveram disponíveis para ajudar de todas as formas. E aos meus priminhos Laura, Luíza e Arthur que me motivam a ser uma pessoa melhor a cada dia.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Perpétua Casciotori, orientadora dessa dissertação, por todo o apoio, incentivo, atenção, ensinamentos, conselhos, preocupação, compreensão e fé na minha capacidade. Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior, ao Prof. Dr. João Cláudio Thoméo e a Prof^a. Dr^a. Cristiane Sanchez Farinas pelas sugestões que contribuíram de forma significativa para o desfecho do presente trabalho.

Aos amigos que a pós-graduação me trouxe, Karine, Luana, Fabrício, Taise, Mayara, Bruna, Camila, Cássia, Felipe, Igor, Laís, Taise, Mayara, Juliana, Marina, Ivan, Mateus, Rauber, Eric, Emanuela, Kaio, Mariane, Thalita, Caroline, Letícia, Laiane, Ana e Ricardo. Aos amigos que me acompanham desde a infância e graduação, Letícia, Larissa, Neryane, Ketilin, Eloá, Laura, Juliana, Giovanna, Sarah, Raquel e Marta. A minha ex professora de cálculo e amiga, Júlia. Ao meu ex professor e orientador de iniciação científica, Natan. Todas essas pessoas me ajudaram de alguma forma durante esse processo, seja por enviar energias positivas, pela companhia para tomar um café, por uma conversa, um conselho, ensinamentos ou por uma ajuda no trabalho, muitas vezes exaustivo, no laboratório.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos e a todo o pessoal envolvido pela infraestrutura e apoio institucional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. 2018/00996-2, 2018/16689-1 e 2018/26097-4), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código de Financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. 430786/2018-2 e 120717/2019-0) pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água do mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Nos últimos anos, o interesse pela fermentação em estado sólido (FES) para as mais diversas aplicações tem aumentado devido à possibilidade de empregar resíduos agroindustriais e pela baixa geração de efluentes. O biorreator de leito empacotado (BLE) é um dos equipamentos mais comumente empregados nesses processos, contudo apresenta problemas na remoção do calor metabólico gerado. Outro desafio é conduzir esses cultivos de forma contínua. Dessa forma, o objetivo principal do presente trabalho foi avaliar diferentes modos de operação de um BLE multicamadas aplicado na produção de endoglucanase por FES. Inicialmente, em embalagens plásticas, foram avaliados a influência da temperatura sobre a cinética de crescimento do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e um método alternativo de inoculação através da mistura entre sólidos fermentados e não fermentados, denominado como inoculação sólido-sólido. Nos ensaios em BLE, foram estudados os efeitos da configuração de escoamento de água na camisa e de ar percolante utilizando o fungo *Aspergillus niger* C e dos modos de operação batelada clássica, batelada com movimentação e contínuo, tendo *M. thermophila* como inóculo. Ao final dos cultivos, foi realizada a extração de proteínas solúveis com água destilada e foi determinada a atividade de endoglucanase. A equação logística ajustou-se bem aos perfis de proteínas solúveis e atividade de endoclucanase; as maiores constantes de taxa foram observadas a 45 °C. O método de inoculação sólido-sólido mostrou-se viável experimentalmente, embora os rendimentos em termos de atividade de endoglucanase tenham sido menores em comparação à inoculação líquida com suspensão de esporos. Os cultivos em BLE mostraram que a mudança da configuração de escoamento de fluidos, bem como os diferentes modos de operação não tiveram influência sobre as temperaturas máximas e médias registradas ao longo do cultivo, e tampouco sobre a atividade de endoglucanase. Além disso, na operação contínua o BLE se comportou como um reator de fluxo pistonado e um estado estacionário foi atingido. Também foi observado que no processo contínuo a taxa de produção máxima de CO₂ foi 42% menor do que nas bateladas, indicando que nesse modo de operação houve menor taxa de geração de calor no pico de crescimento. Portanto, o modo de operação contínuo provou-se aplicável e vantajoso para os processos de FES em BLEs multicamadas.

Palavras-chave: Bioprocessos; Fungos filamentosos; Cultivo em estado sólido; Leitos empacotados; Modo de operação; Biorreatores.

ABSTRACT

In the last years, the interest in solid state fermentation (SSF) for the most diverse applications have been increased due to the possibility of using agro-industrial residues and the low generation of wastewater. The packed bed bioreactor (PBB) is one of the most commonly used equipment in these processes, however it presents problems in removing the metabolic heat generated. Another challenge is to carry these cultivations continuously. Thus, the main objective of the present work was to evaluate different modes of operation of a multilayer PBB applied in the production of endoglucanase by SSF. Initially, in plastic packings, the influence of temperature on the growth kinetics of the fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b and an alternative method of inoculation through the mixture between fermented and non-fermented solids, called solid-solid inoculation, were evaluated. In experiments in the modular PBB, the effects of the flow configuration of water in the jacket and of the percolating air using the fungus *Aspergillus niger* C and of the modes of operation in classic batch, batch with movement and continuous, with *M. thermophila* as inoculum, were evaluated. At the end of all cultivations, extraction of soluble with distilled water was carried out and the endoglucanase activity was determined. The logistic equation fit well to the soluble proteins and endoglucanase activity profiles; the highest rate constants were observed at 45 °C. The solid-solid inoculation method proved to be experimentally feasible, although the yields of in terms of endoglucanase were lower compared to liquid inoculation with spore suspension. The cultivations in PBB showed that changing the fluid flow configuration, as well as the different modes of operation, did not influence on the maximum and average temperatures recorded throughout the cultivation, neither on the endoglucanase activity. In addition, in continuous operation the PBB behaved like a plug flow reactor and a steady state was achieved. It was also observed that in the continuous processes, the maximum CO₂ production rate was 42% lower than in batches, indicating that in this operation mode there was a lower heat generation rate at the peak of growth. Therefore, the continuous operation mode proved to be applicable and advantageous for SSF processes in multilayer BLEs.

Keywords: Bioprocesses; Filamentous fungi; Solid state cultivation; Packed beds; Operation mode; Bioreactors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Biorreatores mais comuns para FES: a) Tambor de parede rotativa; b) Tambor de pás rotativas; c) Bandeja com fundo cego; d) Bandeja com fundo de tela; e) Leito empacotado.....	15
Figura 3.2: Design básico de um BLE tipo Zymotis.....	18
Figura 3.3: Representação esquemática dos biorreatores (a) Prophyta e (b) PlaFactor.....	19
Figura 3.4: Representação de um BLE multicamadas com duas estratégias de inserção de ar: (a) divisão e (b) radial.....	20
Figura 4.1: Embalagem de polipropileno com substrato seco.....	25
Figura 4.2: Aparato experimental empregado nos cultivos em estado sólidos em BLE.....	28
Figura 4.3: Biorreator de leito empacotado modular: (a) imagem real e (b) ilustração esquemática.....	29
Figura 4.4: Representação esquemática dos modos de operação batelada clássica (a), batelada com movimentação (b) e contínuo (c) para 4 módulos fermentativos.....	31
Figura 4.5: Representação esquemática das configurações de escoamento (a) contracorrente e (b) co-corrente.....	33
Figura 4.6: Representação esquemática dos modos de operação batelada clássica (a), batelada com movimentação (b) e contínuo (c) para 8 módulos fermentativos.....	35
Figura 4.7: Sistema utilizado no cultivo submerso (a) representação ilustrativa e (b) imagem real.....	37
Figura 4.8: Representação esquemática do sistema de extração por percolação.....	38
Figura 5.1: Ajuste da equação logística aos pontos experimentais do cultivo em estado sólido de <i>M. thermophila</i> para (a) concentração de proteínas solúveis e (b) atividade de endoglucanase.....	42
Figura 5.2: Ajuste da equação de Arrhenius descrevendo efeito da temperatura sobre as constantes específicas de taxa de produção de proteínas solúveis de atividade endoglucanase.....	44
Figura 5.3: Aspecto do crescimento do fungo <i>M. thermophila</i> após 96 h de cultivo com inoculação líquida de esporos para os meios contendo (a) BC:FT 7:3 e (b) FT.....	47
Figura 5.4: Valores absolutos da atividade de endoglucanase obtidos ao final dos cultivos em estado sólido de <i>M. thermophila</i> com inoculação líquida de esporos e inoculação sólido-sólido.....	48
Figura 5.5: Valores absolutos do número de esporos obtidos ao final dos cultivos em estado	

sólido de <i>M. thermophila</i> com inoculação líquida de esporos e inoculação sólido-sólido.....	49
Figura 5.6: Perfis de temperatura em duplicata do cultivo em estado sólido de <i>A. niger</i> em BLE na composição BC:FT 3:7 para a configuração de escoamento de fluidos co-corrente.....	50
Figura 5.7: Perfis de temperatura em duplicata do cultivo em estado sólido de <i>A. niger</i> em BLE na composição BC:FT 3:7 para a configuração de escoamento de fluidos contracorrente.....	50
Figura 5.8: Perfis de temperatura do cultivo em estado sólido em BC:FT 7:3 de <i>M. thermophila</i> em BLE com 4 módulos fermentativos em batelada clássica.....	53
Figura 5.9: Perfis de temperatura do cultivo em estado sólido em BC:FT 7:3 de <i>M. thermophila</i> em BLE com 4 módulos fermentativos no modo de operação contínuo.....	54
Figura 5.10: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em BLE com 4 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com <i>M. thermophila</i> no modo de operação batelada clássica.....	56
Figura 5.11: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em BLE com 4 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com <i>M. thermophila</i> no modo de operação contínuo.....	56
Figura 5.12: Perfis de temperatura em duplicata dos cultivos em estado sólido em BC:FT 7:3 de <i>M. thermophila</i> em BLE com 8 módulos fermentativos em batelada clássica.....	59
Figura 5.13: Perfis de temperatura em duplicata dos cultivos em estado sólido em BC:FT 7:3 de <i>M. thermophila</i> em BLE com 8 módulos fermentativos em batelada com movimentação.....	59
Figura 5.14: Perfis de temperatura em duplicata em cada módulo fermentativo dos cultivos em estado sólido em BC:FT 7:3 de <i>M. thermophila</i> em BLE com 8 módulos fermentativos no modo de operação batelada com movimentação.....	60
Figura 5.15: Perfis de temperatura em duplicata dos cultivos em estado sólido em BC:FT 7:3 de <i>M. thermophila</i> em BLE com 8 módulos fermentativos nos modo de operação contínuo.....	61
Figura 5.16: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em BLE com 8 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com <i>M. thermophila</i> no modo de operação batelada clássica.....	63
Figura 5.17: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em BLE com 8 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com <i>M. thermophila</i> no modo de operação batelada com movimentação.....	63
Figura 5.18: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em	

BLE com 8 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com <i>M. thermophila</i> no modo de operação contínua.....	64
Figura 5.19: Perfis da concentração de CO ₂ em duplicata na corrente gasosa de saída do BLE dos cultivos nos modos de operação batelada clássica e batelada com movimentação.....	67
Figura 5.20: Perfis da concentração de CO ₂ em duplicata na corrente gasosa de saída do BLE dos cultivos no modo de operação contínuo.....	67
Figura 5.21: Ajuste em duplicata do modelo logístico aos dados de CO ₂ acumulado dos cultivos em batelada clássica.....	69
Figura 5.22: Ajuste em duplicata do modelo logístico aos dados de CO ₂ acumulado dos cultivos em batelada com movimentação.....	69
Figura 5.23: Perfil de CO ₂ acumulado em duplicata dos cultivos em modo de operação contínuo.....	71
Figura 5.24: Ajuste em duplicata do modelo de ordem zero aos dados de CO ₂ acumulado dos cultivos em modo de operação contínuo.....	72
Figura 5.25: Perfil de CO ₂ acumulado e biomassa fúngica do cultivo submerso de <i>M. thermophila</i>	73
Figura 5.26: Perfil de CO ₂ acumulado de acordo com a biomassa fúngica do cultivo submerso de <i>M. thermophila</i>	73
Figura 5.27: Porcentagens de atividade de endoglucanase, atividade de endoglucanase específica e proteínas solúveis extraídas dos sólidos fermentados através do sistema de extração por percolação.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Microrganismos, substratos, condições de cultivo e atividades enzimáticas de processos de FES para produção de hemicelulases.....	10
Tabela 4.1: Planejamento experimental da cinética de <i>M. thermophila</i> em cultivo sólido em diferentes temperaturas.....	24
Tabela 4.2: Posições dos módulos fermentativos no BLE de acordo com o tempo de cultivo para a batelada com movimentação.....	31
Tabela 4.3: Posições dos módulos fermentativos no BLE de acordo com o tempo para um bioprocessamento contínuo de 12 dias e tempo de cultivo do microrganismo de 4 dias.....	32
Tabela 4.4: Tempo e vazão das extrações de proteínas por percolação.....	39
Tabela 5.1: Constante de velocidade específica de produção de proteínas solúveis de acordo com o ajuste da equação logística	43
Tabela 5.2: Constante de velocidade específica de atividade de endoglucanase de acordo com o ajuste da equação logística.....	43
Tabela 5.3: Atividade de endoglucanase, concentração de proteínas solúveis e concentração de esporos obtidas após o cultivo sólido de <i>M. thermophila</i> por inoculação líquida de esporos e por inoculação sólido-sólido.....	45
Tabela 5.4: Conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina e proteína do bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo.....	46
Tabela 5.5: Atividade de endoglucanase, temperaturas médias e temperaturas máximas registradas nos cultivos de <i>A. niger</i> em BLE na composição BC:FT 3:7 para as configurações de escoamento co-corrente e contracorrente.....	51
Tabela 5.6: Temperaturas máximas e médias dos cultivos em BLE com 8 módulos fermentativos empregando <i>M. thermophila</i> em BC:FT 7:3.....	55
Tabela 5.7: Umidade final do BG utilizado nos módulos acessórios de entrada e saída do BLE após os cultivos em estado sólido na proporção BC:FT 7:3 com <i>M. thermophila</i> nos modos de operação batelada clássica e contínuo com 4 módulos fermentativos.....	58
Tabela 5.8: Temperaturas máximas e médias dos cultivos em BLE com 8 módulos fermentativos empregando <i>M. thermophila</i> em BC:FT 7:3.....	61
Tabela 5.9: Atividade de endoglucanase e umidade final médias dos cultivos em BLE com 8 módulos fermentativos empregando <i>M. thermophila</i> em BC:FT 7:3.....	64
Tabela 5.10: Umidade final do BG utilizado nos módulos acessórios de entrada e saída do BLE após os cultivos em estado sólido na proporção BC:FT 7:3 com <i>M. thermophila</i> em	

todos os modos de operação avaliados.....	65
Tabela 5.11: Concentração máxima de CO ₂ registrada na corrente gasosa de saída do BLE.....	68
Tabela 5.12: Constantes específicas de taxa de produção de CO ₂ de acordo com o ajuste do modelo logístico para os dados de CO ₂ acumulado por tempo dos cultivos em batelada clássica e batelada com movimentação.....	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Fermentação em estado sólido (FES).....	4
3.1.1. Microrganismos, substratos e aplicações da FES.....	7
3.1.2. Produção de enzimas hemicelulolíticas por FES	9
3.1.3. Cinética de crescimento na fermentação em estado sólido	12
3.2. Biorreatores para fermentação em estado sólido.....	14
3.2.1. Biorreatores de leito empacotado para FES: estado da arte	17
4. METODOLOGIA	23
4.1. Microrganismos e substratos.....	23
4.2. Cultivos em estado sólido em embalagens plásticas.....	24
4.2.1. Cinética de crescimento de <i>M. thermophila</i> em cultivo em estado sólido e efeito da temperatura.....	24
4.2.2. Avaliação de um método alternativo de inoculação	27
4.3. Cultivos em estado sólido em biorreator de leito empacotado	27
4.3.1. Características do aparato experimental e biorreator	27
4.3.2. Modos de operação do biorreator.....	30
4.3.3. Avaliação da influência do sentido de escoamento da água pela camisa de resfriamento e do ar percolante através do leito.....	33
4.3.4. Avaliação do efeito do modo de operação no desempenho do biorreator	34
4.4. Análise respirométrica	36
4.5. Extração de proteínas solúveis	37
4.6. Determinações analíticas.....	39
4.6.1. Concentração de proteínas solúveis	39

4.6.2. Atividade de endoglucanase, xilanase e papel de filtro	39
4.6.3. Umidade	40
4.6.4. Biomassa celular	40
4.7. Análises estatísticas.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Cultivos em estado sólido em embalagens plásticas.....	42
5.1.1. Cinética de crescimento de <i>M. thermophila</i> em cultivo em estado sólido e efeito da temperatura.....	42
5.1.2. Avaliação de um método alternativo de inoculação	44
5.2. Cultivos em estado sólido em biorreator de leito empacotado	50
5.2.1. Efeito do sentido de escoamento da água da camisa de resfriamento e do ar percolante sobre o desempenho do biorreator	50
5.2.2. Efeito do modo de operação no desempenho do biorreator	52
5.2.2.1. Cultivos com 4 módulos fermentativos.....	52
5.2.2.2. Cultivos com 8 módulos fermentativos.....	58
5.2.2.2.1. Análise respirométrica	66
5.3. Sistema de extração de proteínas solúveis por percolação.....	73
6. CONCLUSÕES.....	76
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	77
8. REFERÊNCIAS	78

1. INTRODUÇÃO

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um bioprocessamento no qual ocorre o crescimento de microrganismos sobre uma matriz sólida porosa e úmida. Embora possa haver gotas de água não absorvidas pela fase sólida, o espaço entre as partículas é preenchido majoritariamente por uma fase gasosa contínua (MITCHELL et al., 2006). Diversas aplicações da FES são relatadas na literatura, como a produção de biofertilizantes, suplementos para ração animal, biopesticidas, biofungicidas, esporos, probióticos, pigmentos, enzimas, dentre outras.

Em especial, o número de trabalhos voltados para a produção de enzimas requeridas no processo de obtenção de biocombustíveis, como o etanol de segunda geração (E2G), tem aumentado nos últimos 20 anos (VANDENBERGHE et al., 2020). Nesse sentido, vários pesquisadores passaram a investigar a produção de celulasas e hemicelulasas por meio da FES (SUN et al., 2010; CASTRO et al., 2015; CASCIATORI et al., 2016; SALOMÃO et al., 2019; MARÍN et al., 2019; PEREZ et al., 2019), uma vez que elas podem ser produzidas nas próprias biorrefinarias, utilizando sub ou coprodutos como substratos, como o bagaço de cana-de-açúcar (BC), tornando possível o compartilhamento de instalações, utilidades e colaboradores (BEHERA; RAY, 2016).

Os fungos filamentosos têm apresentado bons resultados na produção de celulasas e hemicelulasas por FES (PEREZ et al., 2020; FRASSATO et al., 2020), o que está relacionado ao fato de o processo reproduzir seu *habitat* natural de baixa atividade de água, contato direto com a fase gasosa e baixa ou nenhuma agitação (PANDEY, 2003). Todavia, esses microrganismos são sensíveis ao atrito causado por agitação mecânica. Dessa forma, é interessante que os processos de FES empregando fungos filamentosos sejam conduzidos em condições estáticas (PANDEY, 2003). Essas condições podem ser proporcionadas por biorreatores de bandeja ou biorreatores de leito empacotado (BLE).

Os biorreatores de bandeja apresentam projeto simples, porém requerem elevadas área e mão-de-obra e possuem difícil controle das condições de processo, sendo assim, os BLEs se mostram mais apropriados (BRIJWANI et al., 2010). No entanto, considerando a configuração clássica do BLE com fundo perfurado e escoamento de ar unidirecional através do leito, sabe-se que a remoção do calor metabólico é prejudicada devido à baixa condutividade térmica dos substratos e às baixas vazões de ar empregadas (ASHLEY et al., 1999). Como resultado, é comum a ocorrência de gradientes axiais e radiais de temperatura e consequentemente de umidade. De fato, a elevação da temperatura pode ser pronunciada na

região do leito próxima à saída de ar, levando ao retardamento do crescimento ou até mesmo à morte dos microrganismos (GHILDYAL et al., 1993; MITCHELL et al., 2010). Diante disso, vários estudos têm sugerido modificações na configuração e nos modos de operação de BLEs.

Roussos et al. (1993) avaliaram a alocação de placas de resfriamento paralelas ao fluxo de ar em um BLE, porém os autores relataram que não houve um controle eficiente da temperatura na fase de crescimento acentuado dos microrganismos. Anos depois, Lu et al. (1998) propuseram a divisão do leito do BLE em várias camadas ou módulos de fundo perfurado, o que melhorou as transferências de calor e massa. Este foi um avanço importante para diminuir a compactação de leitos em BLEs. Mais recentemente, Perez et al. (2020) avaliaram duas estratégias de injeção de ar em diferentes posições axiais e radiais do BLE em escala piloto, ao invés do modo tradicional de aeração de ponta a ponta. Apesar de os autores terem relatado uma melhor distribuição de gás, não houve alteração na temperatura máxima.

Com respeito às mudanças na operação do BLE, Mitchell et al. (2010), aproveitando o BLE multicamadas ou modular desenvolvido por Lu et al. (1998), avaliaram, por meio de simulação, a movimentação das camadas ou módulos no decorrer do cultivo, o que permitiu inclusive a condução do processo em modo contínuo. As predições mostraram resultados promissores tanto para o desempenho do biorreator, quanto para aspectos práticos de operacionalidade, uma vez que um processo contínuo acarreta na redução dos tempos mortos e possibilidade de empregar equipamentos menores nas etapas *upstream* e *downstream*.

Cabe ressaltar que, no caso do BLE modular, a movimentação das camadas não implica na movimentação da matriz sólida. Dessa maneira, o meio permanece estático e não ocorrem prejuízos às células ou hifas devido ao atrito. Portanto, o processo contínuo para FES idealizado por Mitchell et al. (2010) permite aliar as vantagens de um meio reacional estático às vantagens de uma operação contínua. Entretanto, até o momento essa estratégia carecia de aplicação experimental para se provar operacionalmente viável e possibilitar a transferência da tecnologia para âmbito industrial. Diante do exposto, o presente trabalho teve como intuito principal avaliar experimentalmente a influência dos modos de operação batelada e contínuo em um BLE multicamadas cuja aplicação foi voltada para produção de endoglucanase por FES.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar experimentalmente o efeito de diferentes modos de operação no desempenho de um biorreator de leito empacotado (BLE) modular aplicado na produção de endoglucanase por fermentação em estado sólido (FES).

2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Investigar em embalagens plásticas o efeito da temperatura sobre a cinética de crescimento em cultivo em estado sólido do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b empregando bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT) como substratos;
- Avaliar em embalagens plásticas um método alternativo de inoculação através da mistura entre sólidos fermentados e não fermentados;
- Verificar a influência da configuração de escoamento de ar percolante e água da camisa no desempenho do BLE aplicado na FES do fungo *Aspergillus niger* C empregando BC e FT como substratos;
- Operar o BLE aplicado na FES de *M. thermophila* em BC e FT nos modos de operação batelada clássica, batelada com movimentação e contínuo e avaliar seu desempenho com base na produção de endoglucanase e nos perfis de temperatura e de produção de CO₂;
- Avaliar o efeito das variáveis vazão e tempo na extração sólido-líquido de proteínas solúveis por um sistema de extração por percolação utilizando os próprios módulos do BLE.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fermentação em estado sólido (FES)

Segundo Mitchell et al. (2006), fermentação em estado sólido (FES) é o cultivo de microrganismos sobre partículas sólidas úmidas, de forma que a quantidade de água seja suficiente para assegurar as condições de crescimento e metabolismo microbiano, mas não exceda a capacidade de retenção de água da matriz sólida porosa. O espaço entre as partículas contém uma fase gasosa contínua, que normalmente está saturada em água para manter o teor de umidade adequado. Cabe salientar que esse processo pode ser aeróbio ou anaeróbio, posto que a palavra fermentação pode ser entendida como a quebra de compostos orgânicos por microrganismos na presença ou ausência de oxigênio (BERENJAN; MAHDINIA, 2021).

Ainda que a prática da FES seja antiga, somente nos últimos 50 anos sua evolução foi notável. A partir de 1975, o número de patentes saltou de uma dúzia para milhares por ano. Na última década, esse número foi de 40 mil patentes. Similarmente, o número de artigos sobre FES também apresentou crescimento pronunciado, sendo que na última década foram publicados quase 10 mil trabalhos. No período de 1970 a 2000, os processos de FES foram voltados para produção de enzimas e antibióticos. A partir de 2000, um maior interesse surgiu em organismos geneticamente modificados e na produção de enzimas para E2G. Nesse sentido, o Brasil vem se destacando, o que está relacionado ao fato de o país possuir a agricultura como base de sua economia, em razão do clima predominantemente tropical, disponibilidade de energia solar, terras aráveis e água, resultando em uma geração abundante de resíduos agrícolas. Aliado a esses fatores, existe a necessidade de valorizar os resíduos por meio de bioprocessos, a fim de contribuir com a evolução tecnológica do país de maneira sustentável (VANDENBERGHE et al., 2020).

As etapas básicas dos processos de FES, como seleção e preparação do substrato e do microrganismo, preparação do biorreator, inoculação e carregamento, operação do biorreator, descarregamento, processamento e tratamento de efluentes, são equivalentes a outros tipos de cultivo (MITCHELL et al., 2006).

Normalmente, a matriz sólida é composta por polímeros inertes ou degradáveis. No primeiro caso, o polímero serve somente como um suporte estrutural para a impregnação de substratos sólidos ou líquidos. No segundo caso, o polímero funciona como um suporte e também como o próprio substrato a ser degradado pelo microrganismo.

Rodríguez et al. (2020) avaliaram a produção de biossurfactantes pela levedura *Starmerella bombicola* ATCC 22214 por FES utilizando resíduos agroindustriais (biomassa

lignocelulósica e subprodutos orgânicos) e materiais inertes (perlita e espuma de poliuretano). Os autores relataram que os maiores rendimentos ocorreram ao utilizar biomateriais, principalmente casca de arroz e palha de trigo. Esses resultados foram relacionados à estrutura e rugosidade dos resíduos empregados, fatores que favorecem a fixação dos microrganismos. É importante salientar que, neste caso, os melhores rendimentos não foram associados à assimilação dos biomateriais, uma vez que a levedura *Starmerella bombicola* ATCC 22214 não é capaz de degradar a biomassa lignocelulósica.

O uso de resíduos agroindustriais como suporte pode provocar uma redução de 25 a 50% nos custos do bioprocessamento (SATHYA et al., 2009). Além disso, são materiais de alta disponibilidade, que geralmente estão depositados no meio ambiente de maneira indevida. Posto isso, a maioria dos trabalhos de FES emprega resíduos agroindustriais como suporte e substrato (VANDENBERGHE et al., 2020). Todavia, é comum a umidificação desses biomateriais com solução nutriente de pH corrigido para regular o teor de umidade inicial, suprir a falta de algum componente e adequar o meio às melhores condições de crescimento microbiano (ZANELATO et al. 2012; PEREZ et al. 2019). A adição de agentes sequestrantes também pode ser realizada, com a finalidade de remover íons metálicos que possam afetar negativamente o rendimento do bioprocessamento (PANDEY, 2003).

Além da suplementação da matriz sólida com soluções líquidas, também pode ser realizada a adequação do tamanho das partículas, através de operações como moagem e peneiramento, com intuito de facilitar a atuação dos microrganismos. Quanto menor o tamanho das partículas, maior a área superficial e, conseqüentemente, maior o grau de transformação de substratos em bioprodutos (PANDEY, 2003). Entretanto, é importante que a porosidade do meio seja levada em consideração para permitir a aeração necessária, uma vez que quanto menor a porosidade, maior o risco de ocorrer canalização de ar e mais difíceis são as transferências de calor e de metabólitos gasosos (PEREZ et al., 2020).

O teor ideal de umidade depende do substrato e do microrganismo empregados, sendo crucial que seja identificado individualmente em cada combinação. Valores de umidade excessivamente elevados, nos quais os espaços vazios são preenchidos por água, podem dificultar a difusão gasosa e a transferência de calor (RAGHAVARAO et al., 2003). Em geral, substratos amiláceos (arroz, trigo, centeio, cevada, milho, mandioca, dentre outros) são fermentados entre 25 e 60 % de umidade inicial, enquanto substratos celulósicos (palhas, cascas, bagaço, farelos, dentre outros) permitem trabalhar com teores de umidade mais elevados, de 60 a 80 %, sem a presença de água líquida não retida pela matriz sólida (SOCCOL, 1992).

Por outro lado, a baixa disponibilidade de água pode dificultar o transporte e a absorção de nutrientes, assim como a estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas e carboidratos (GERVAIS; MOLIN, 2003). Ambos os extremos devem ser evitados, pois prejudicam o crescimento e a produção de metabólitos pelos microrganismos. Lu et al. (2003) verificaram que a produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus* em cultivo em estado sólido aumentou proporcionalmente com o aumento da umidade até a faixa de 40 – 50 %, mas valores acima dessa faixa provocaram a diminuição da atividade de xilanase. A umidade da matriz sólida também está relacionada com a porosidade dos leitos. De acordo com Casciatori et al. (2014), a porosidade diminui com o aumento da umidade. Esse fator deve ser considerado ao se avaliar a umidade inicial da matriz, devido à relação com as transferências de calor e de massa.

O controle da umidade e da temperatura dos processos de FES em escala laboratorial é relativamente simples. Contudo, quando é realizada a transposição desses processos para biorreatores em escala piloto e principalmente industrial, manter níveis adequados de umidade e temperatura em FES pode ser uma tarefa difícil (LAURENTINO, 2007). Diferentemente da fermentação submersa (FS), em que o meio de cultivo é considerado homogêneo e o desenvolvimento do microrganismo é limitado apenas pela transferência de oxigênio na interface gás-líquido, os processos de FES são heterogêneos e o crescimento pode ser limitado pelas transferências de calor, oxigênio, nutrientes, metabólitos e água, pelo estágio da fermentação e pelo projeto e operação do biorreator. Devido a esses impasses, a FS ainda é o método mais utilizado comercialmente para produção de enzimas lignocelulolíticas, que são os produtos avaliados como aplicação do presente trabalho, pois permite ampliação de escala com facilidade e maior monitoramento e controle. Contudo, trata-se de um processo oneroso e que gera uma elevada quantidade de efluentes, tornando-se um dos principais gargalos da produção industrial do E2G (ABD-ELHALEM et al., 2015).

Por outro lado, a FES permite o emprego de resíduos agroindustriais como substratos, o que pode diminuir os custos da produção de enzimas e gerar bioprodutos de alto valor agregado. A menor proporção da fase líquida no meio de reação faz com que o volume demandado seja menor em relação aos processos submersos, diminuindo a geração de efluentes e o capital inicial investido.

Como resultado, o produto final pode ser obtido de forma mais concentrada. Outra vantagem relevante da FES frente à FS são os maiores rendimentos enzimáticos geralmente alcançados quando são empregados fungos filamentosos como inóculo (JAIN, 1995; AGUILAR et al., 2001; SOUZA et al., 2003; VINIEGRA-GONZALEZ et al., 2003; SAQIB

et al., 2010; COLLA et al., 2010).

3.1.1. Microrganismos, substratos e aplicações da FES

Diferentes tipos de microrganismos podem ser empregados nas diversas aplicações dos processos de FES, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Biofertilizantes, suplementos para ração animal, biopesticidas, biofungicidas, esporos, probióticos, pigmentos e enzimas são algumas das aplicações desses processos. Berikashvili et al. (2018) cultivaram *Bacillus amyloliquefaciens* por FES utilizando espigas de milho enriquecidas com soro de queijo a fim de produzir probióticos. Os autores alcançaram 10^{11} esporos/g de biomassa após 4 dias de cultivo a 37 °C. Mendes et al. (2015) avaliaram a solubilização de uma rocha fosfática por FES empregando BC como substrato e *Aspergillus niger* FS1 como inóculo. Os autores relataram que o material fermentado incinerado a 350 e 500 °C melhorou significativamente ($\alpha = 0,05$) o crescimento das plantas de feijão e a absorção de P.

Todavia, devido às atividades de água (a_w) mais baixas nos sistemas de FES em comparação aos de FS, os microrganismos que mais se adaptam são os fungos filamentosos, uma vez que eles crescem na superfície das partículas e penetram suas hifas através dos espaços inter e intrapartículas, o que os torna mais tolerantes às condições deste cultivo (MITCHELL et al., 2006). De acordo com Mitchell et al. (2000), os meios utilizados em FES possuem valores de a_w por volta de 0,95 a 0,98. Este intervalo é ideal para o crescimento de muitos fungos filamentosos, porém não é favorável para a maioria das bactérias. Todavia, as bactérias possuem uma participação relevante na natureza, especialmente na compostagem e ensilagem.

O sistema reacional de FES possui elevada similaridade com o *habitat* natural dos fungos filamentosos (PANDEY, 2003). Como resultado, as enzimas produzidas são menos susceptíveis a problemas de inibição pelo substrato e são mais estáveis frente a variações de temperatura e pH (HOLKER; LENZ, 2005; BARRIOS-GONZALEZ, 2012). Em especial, os fungos termofílicos se destacam por produzirem enzimas termoestáveis e atuantes em pHs ácidos, tornando-as interessantes do ponto de vista industrial da produção de biocombustíveis, sobretudo quando pré-tratamentos ácidos e/ou a quente são empregados na biomassa lignocelulósica antes da etapa de hidrólise (DA SILVA et al., 2005). Outras vantagens incluem a redução do risco de contaminação por microrganismos competidores, menor superaquecimento devido ao calor metabólico gerado em comparação a fungos mesofílicos e maiores rendimentos enzimáticos (GOMES et al., 2007).

Diversos autores cultivaram espécies termofílicas por FES e não relataram

superaquecimento problemático (GRAJEK, 1988; KALOGERIS et al., 2003; PALMA, 2003). Em contraste, Grajek (1988), Saucedo-Castañeda et al. (1990) e Ghildyal et al. (1994) observaram elevação pronunciada da temperatura ao empregar fungos mesofílicos. Quanto aos rendimentos enzimáticos, culturas termofílicas parecem produzir uma maior quantidade de enzimas que culturas mesofílicas, como relatado por Leite et al. (2008), De Cassia et al. (2016) e Frassato et al. (2020).

De fato, culturas termofílicas isoladas do meio ambiente tendem a ser mais induzidas a produzir enzimas extracelulares. Durante o processo natural de compostagem, desenvolvem-se primeiramente mesófilos, os quais consomem praticamente a totalidade das fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos), o que provoca a geração de calor através das reações metabólicas exotérmicas, elevando a temperatura até valores acima 40 °C, condições nas quais os fungos mesofílicos não são mais capazes de se desenvolver. Então, na segunda fase da compostagem, os esporos dos fungos termofílicos germinam e então esses microrganismos começam a produzir enzimas extracelulares para hidrolisar os polissacarídeos e assimilar açúcares fermentescíveis. Dessa maneira, tem-se que a produção de enzimas hidrolíticas por fungos termofílicos quando cultivados com rejeitos agroindustriais é algo que ocorre naturalmente, o que pode estar associado aos elevados rendimentos comumente observados (MAHESHWARI et al., 2000).

No presente trabalho é empregado o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila*, o qual é frequentemente obtido a partir do solo ou de massas de matéria vegetal em decomposição (DOMSCH et al., 1982). Algumas linhagens recentemente isoladas dessa espécie têm demonstrado atividades celulolíticas promissoras em estudos de FES em escala de frascos e de biorreatores de bancada (ZANELATO et al., 2012; CASCIATORI et al., 2016; FRASSATO et al.2020).

O bagaço de cana-de-açúcar (BC), bagaço de laranja, sabugo de milho, palha de trigo, farelo de trigo (FT), farelo de soja e casca de arroz são alguns dos resíduos agroindustriais comumente empregados como suporte e substrato nos processos de FES. Dentre as características que os tornam interessantes, destacam-se baixo custo, alta disponibilidade e composição rica em celulose, hemicelulose e lignina, sendo, portanto, fontes de açúcares fermentescíveis. Esse é um dos aspectos da FES de maior impacto para que haja um aumento nos investimentos em pesquisa e tecnologia na área, uma vez que os resíduos agroindustriais estão disponíveis em abundância e, se não forem aproveitados, podem se tornar um problema ambiental.

O substrato influencia diretamente no bioproduto de interesse, uma vez que pode ser

fonte de nutrientes, como carbono e nitrogênio, e também pode induzir a produção de algum metabólito de interesse. O BC, por exemplo, é rico em celulose e hemicelulose, e em razão disso induz a produção de celulasas e hemicelulasas. Além disso, o BC tem sido comumente empregado nos processos de FES como um sólido inerte, atuando como suporte fibroso estrutural capaz de garantir a porosidade necessária aos leitos. Somente na safra de 2019/2020, foram gerados, no Brasil, mais de 160 milhões de toneladas de BC (UNICA, 2020), ou seja, trata-se de um subproduto de alta disponibilidade no país. Em vista disso, o BC foi empregado como substrato e suporte no presente trabalho para indução de celulasas e hemicelulasas e para proporcionar a porosidade adequada.

Difícilmente um único resíduo agroindustrial possui todos os componentes nutricionais que favorecem o desenvolvimento ótimo dos microrganismos, por isso é comum a mistura de diferentes substratos, assim como o enriquecimento com soluções salinas e nutrientes, conforme já discutido (ROCHA, 2010). No presente trabalho, foi realizada a mistura do BC com FT, o qual apresenta elevado conteúdo proteico e menores concentrações de lignina, celulose e hemicelulose (RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA et al., 2011).

3.1.2. Produção de enzimas hemicelulolíticas por FES

Conforme mencionado anteriormente, o número de trabalhos de FES voltados para produção de enzimas requeridas na produção de biocombustíveis a partir de resíduos agroindustriais tem aumentado nas últimas duas décadas. Em especial, o Brasil possui uma elevada quantidade de biomassa lignocelulósica ainda inexplorada, a qual pode ser degradada por celulasas e hemicelulasas, gerando açúcares fermentescíveis (PAYNE et al., 2015) ou outras biomoléculas de interesse, como nanocelulose (CAMARGO et al., 2016).

As celulasas são uma classe de enzimas constituídas por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases hidrolisam de forma aleatória as ligações glicosídicas β -1,4 das regiões internas da celulose, diminuindo o grau de polimerização. As exoglucanases clivam progressivamente os polímeros de celulose nas extremidades, formando moléculas de celobiose que são hidrolisadas pelas β -glicosidases e liberam glicose. As hemicelulasas também são uma classe importante de enzimas responsáveis por desestruturar as ligações cruzadas entre a celulose e a hemicelulose. Neste grupo destacam-se as xilanases, que são enzimas responsáveis por hidrolizar o xilano (principal polímero da hemicelulose) e liberar xilose como produto final (BINOD et al., 2019).

Com ênfase na produção de etanol de segunda geração (E2G), essas enzimas são indispensáveis na etapa de hidrólise via bioquímica. Nesse sentido diversos pesquisadores

passaram a investigar a produção dessas enzimas por FES, uma vez que se trata de um método ambientalmente amigável. Diferentes espécies e linhagens de microrganismos, bem como diferentes substratos e condições de cultivo que proporcionassem os maiores rendimentos dessas enzimas têm sido avaliados (BEHERA; RAY, 2016). A Tabela 3.1 apresenta alguns substratos, microrganismos, condições de cultivo e atividades enzimáticas obtidas em processos de FES relatados pela literatura.

Tabela 3.1: Microrganismos, substratos, condições de cultivo e atividades enzimáticas de processos de FES para produção de hemicelulases.

Microrganismo	Substrato	Condições de cultivo	Atividade enzimática (U/gss)*	Referência
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Palha de trigo	Erlenmeyer; T = 49°C	Endoglucanase: 1235,0 β -glicosidase: 105,0	Kalogeris et al. (2003)
<i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1	BC e FT	Erlenmeyer; T = 28°C	FPase: 33,9 Endoglucanase: 282,4 β -glicosidase: 59,0 Xilanase: 10	Camassola e Dillon (2007)
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	Farelo de trigo	Erlenmeyer; T = 30°C	FPase: 22,8 Endoglucanase: 299,6 β -glicosidase: 4,5	Sukumaran et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC 7956	Farelo de trigo	Erlenmeyer; T = 30°C	Endoglucanase: 135,4 β -glicosidase: 21,4	
<i>Myceliophthora</i> sp M.7.7	BC e FT	Embalagens plásticas; T = 45 °C	FPase: 2,0 U/g Endoglucanase: 53,7 Xilanase: 1044,6	Moretti (2010)
Mistura de <i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus oryzae</i>	Casca de soja e FT	Biorreator de bandeja	FPase: 10,8 Endoglucanase: 100,7 β -glicosidase: 10,7 Xilanase: 505,0	Brijwani et al. (2010)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	BC e FT	BLE (diâmetro x altura = 7,62 x 57,5 cm); T = 45 °C	FPase: 8,3 Endoglucanase: 800,0 Xilanase: 900,0	Zanelato et al. (2012)
<i>Trichoderma harzianum</i> PBLA	Serragem de pinheiro	Tambor rotativo (1 rpm); T = 30 °C	Endoglucanase: 0,8 Xilanase: 109,3	Lopez-Ramirez et al. (2018)

*U/gss: unidade de atividade enzimática por grama de substrato seco.

Tabela 3.1: Continuação.

Microrganismo	Substrato	Condições de cultivo	Atividade enzimática (U/gss)*	Referência
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	BC e FT	BLE (diâmetro x altura = 7,62 x 80 cm); T = 45 °C	Endoglucanase: 148,0 Xilanase: 900,0	Perez et al. (2019)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	BC e FT	BLE (diâmetro x altura = 20 x 80 cm); T = 45 °C	Endoglucanase: 80,0 Xilanase: 370,0	
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	BC e FT	Embalagens plásticas; T = 45 °C	FPase: 14,0 Endoglucanase: 644,4 β -glicosidase: 70,0	Frassatto et al. (2020)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> CBMAI756	BC e FT	Embalagens plásticas; T = 50 °C	FPase: 10,1 Endoglucanase: 140,7 β -glicosidase: 35,7	
<i>Trichoderma reesei</i> QM9414	BC e FT	Embalagens plásticas; T = 28 °C	FPase: 5,8 Endoglucanase: 73,7 β -glicosidase: 4,1	
<i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b	BC e FT	BLE (diâmetro x altura = 20 x 80 cm) com modificação na distribuição do fluxo de ar T = 45 °C	Endoglucanase: 78,6 Xilanase: 642,9	Perez et al. (2020)

*U/gss: unidade de atividade enzimática por grama de substrato seco.

De acordo com os trabalhos levantados na Tabela 3.1, os estudos envolvendo a produção de hemicelulases por FES foram realizados majoritariamente empregando fungos filamentosos como microrganismos. Observa-se que as atividades enzimáticas apresentam elevada variabilidade de acordo com o fungo, substrato e condições de cultivo. Até mesmo para os estudos em que foram empregados o mesmo fungo e substratos podem ser notadas diferenças expressivas, como é o caso dos trabalhos com *M. thermophila* I-1D3b, que é o microrganismo utilizado no presente trabalho.

Apesar de um número elevado de trabalhos e patentes já terem sido publicados sobre produção de hemicelulases e outras biomoléculas por FES, a maioria das aplicações ainda não se estabeleceu em âmbito industrial, pelas dificuldades relacionadas ao controle e monitoramento desses processos, conforme já mencionado. Sendo assim, o maior desafio ainda é aumentar a escala desses processos mantendo elevados rendimentos e um custo

competitivo. Fundamentalmente, a solução desse impasse depende do desenvolvimento de equipamentos e processos apropriados.

3.1.3. Cinética de crescimento na fermentação em estado sólido

Diferentemente da FS, na FES, a quantificação da biomassa microbiana de maneira direta, principalmente quando se empregam fungos filamentosos, é impraticável, uma vez que as hifas dos fungos criam uma forte ligação entre a matriz sólida e o micélio, impedindo a separação do microrganismo e do sólido fermentado. Quanto aos métodos indiretos, existem várias abordagens, como a determinação de constituintes celulares, determinação de atividade biológica e determinação de níveis de nutrientes no sistema, como carbono e nitrogênio (DESGRANGES et al., 1991).

O ergosterol é um esteroide predominante na membrana celular de muitos fungos e, normalmente, não está presente em materiais vegetais. A glicosamina compõe a parede celular de muitos fungos e também normalmente não é encontrada em vegetais. Esses componentes podem ser medidos por HPLC, por exemplo, ou por métodos espectrofotométricos, porém, nesse caso, pode haver interferentes (MITCHELL et al., 2006).

Outros importantes constituintes celulares são as proteínas, as quais podem ser utilizadas para estimar a biomassa. Os principais problemas dessa medida estão relacionados à presença dessas moléculas nos próprios substratos, uma vez que não é possível determinar qual parte da proteína presente no substrato não é consumida ou transformada (MITCHELL et al., 2006). Por outro lado, para substratos em que o teor de proteínas é desprezível, trata-se de um método confiável que vem sendo empregado em diversos trabalhos (SANTOS, 2007; PARIS, 2008; CASCIATORI, 2015). Os métodos mais comuns para quantificar a concentração de proteínas podem ser divididos basicamente em determinação de proteínas totais, como o método de Kjeldahl que quantifica a quantidade total de nitrogênio, ou de proteínas solúveis, como o método de Bradford (1976).

A atividade biológica também pode ser uma boa medida indireta da biomassa, especialmente quando a produção de metabólitos é associada ao crescimento. Em cultivos sólidos, o substrato normalmente é um meio complexo e estimula o fungo a produzir uma gama de enzimas extracelulares para conseguir assimilar os nutrientes. Geralmente, a secreção dessas enzimas é mais alta durante a extensão das hifas, ou seja, na fase de crescimento (CAIRNS et al., 2019). No entanto, a relação entre o crescimento de fungos e a secreção de enzimas é complexa. Gomes et al. (2020) estimaram o crescimento de *Myceliophthora thermophila* M.7.7 cultivado em BC e FT e relataram que não foi possível estimar a biomassa

com base na cinética enzimática, uma vez que as enzimas não acompanharam o crescimento do fungo do começo ao fim. Nas fases iniciais do cultivo, houve elevada secreção de amilase e proteases para consumir FT, ao passo que, com o provável esgotamento dessa fonte de carbono, o fungo passou a produzir, em seguida, celulasas e hemicelulasas.

Quanto à quantificação da concentração da corrente gasosa, algumas vantagens podem ser destacadas, como o não requerimento de amostragem para análises físico-químicas e a possibilidade de realizar acompanhamento *online*. Ainda que o consumo de O₂ possa estar relacionado à manutenção celular e nem sempre ao crescimento, alguns pesquisadores utilizaram essa metodologia para avaliar o crescimento fúngico (KOUTINAS et al., 2003; EDUARDO, 2010). Além do acompanhamento do O₂, também é comum o monitoramento da produção de CO₂. Favaro et al. (2020) relataram boa relação entre a produção de CO₂ e a produção de β-mananase. Nenhum método indireto de estimativa da biomassa é universal para toda e qualquer combinação de substratos e microrganismos. O método escolhido deve considerar as particularidades de cada cultivo, além do custo e simplicidade.

A importância do conhecimento da cinética dos processos de FES está relacionada com a obtenção de parâmetros úteis às expressões matemáticas que representem o sistema reacional, as quais são necessárias para o dimensionamento de biorreatores. A taxa de geração de calor, por exemplo, um dos termos dos balanços de energia para FES em leito empacotado, é normalmente associada à cinética do bioprocessamento (SANGSURASAK; MITCHELL, 1998; VON MEIEN; MITCHELL, 2002; CASCIATORI et al., 2016).

Os modelos podem prever como a vazão de ar, sua umidade relativa e temperatura irão afetar a temperatura e o conteúdo de umidade do substrato; um sub-modelo pode ainda prever como essas variáveis irão afetar o crescimento microbiano e a formação de bioprodutos. Todavia, os sub-modelos não são universais. Sendo assim, se faz necessário determinar as curvas cinéticas para cada combinação de microrganismo, substrato, condições de cultivo e bioproduto de interesse (ASHLEY et al., 1999).

Além disso, diante dos problemas térmicos já expostos associados ao BLE, é interessante que também seja avaliado o efeito da temperatura sobre a cinética de crescimento. Para isso, normalmente é empregada a equação de Arrhenius, que permite calcular a variação da constante de velocidade de uma reação com a temperatura (GLENN; ROGERS, 1988; SAUCEDO-CASTANEDA et al., 1990).

3.2. Biorreatores para fermentação em estado sólido

Os estudos sobre FES em laboratório são geralmente realizados em frascos Erlenmeyer, garrafas Roux, béqueres, embalagens plásticas e colunas de Raimbault. Contudo, considerando a ampliação de escala de bioprocessos de FES, tornam-se necessários biorreatores apropriados para condução do processo, os quais devem sustentar a estrutura do substrato, proteger o sistema contra possíveis contaminações e proporcionar condições adequadas de temperatura, composição gasosa e atividade de água para o desenvolvimento microbiano e síntese do bioproduto de interesse (MITCHELL et al., 2006).

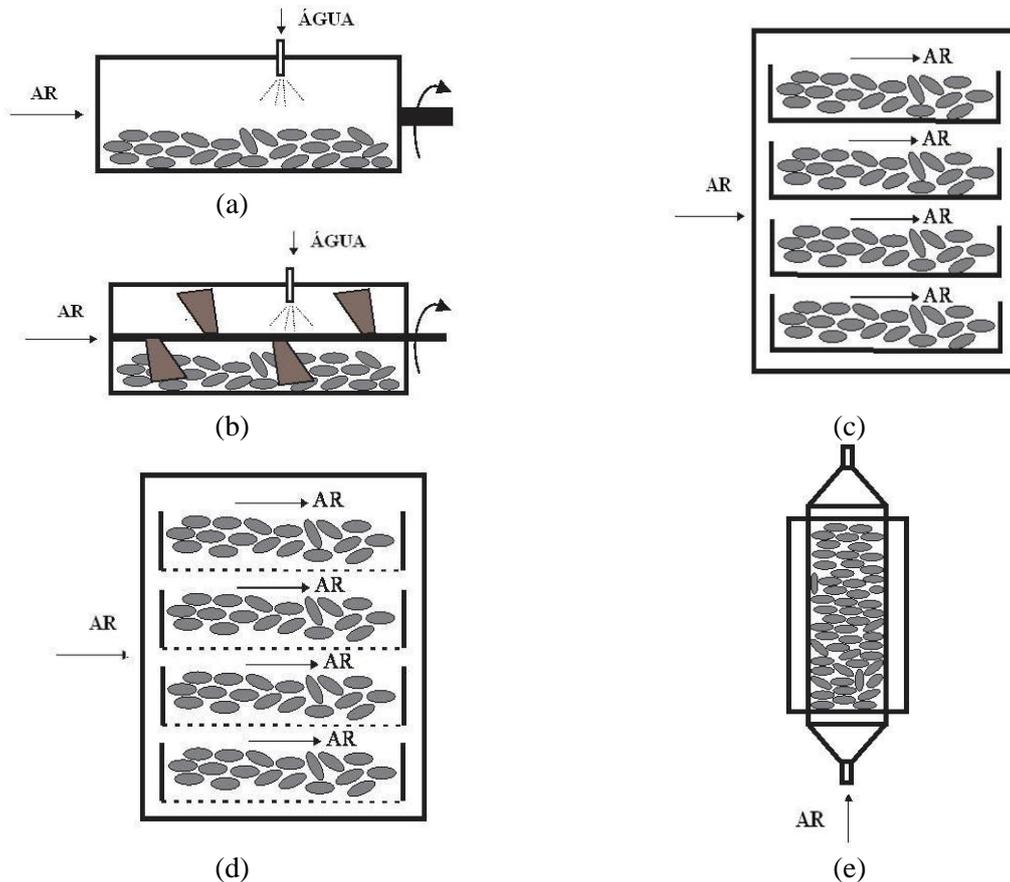
Basicamente, os biorreatores para FES podem ser divididos entre os de leito fixo e os de leito móvel, como apresentado na Figura 3.1. O tambor rotativo é a configuração que melhor representa os biorreatores de leito móvel, o qual pode ser movimentado girando-se a parede, na qual estão instalados defletores que elevam as partículas (Figura 3.1 (a)) ou girando-se um eixo interno dotado de pás (Figura 3.1 (b)). Devido à agitação, esses equipamentos permitem boa uniformidade de temperatura e umidade.

Um aumento de duas vezes na produção de celulase foi relatado por Alam et al. (2009) em um biorreator de tambor de parede rotativa de 50 L em comparação aos estudos em frasco utilizando 4 kg de engaço de dendê como substrato e *Trichoderma harzianum* T2008 como inóculo. A velocidade de rotação foi de 10 rpm e a aeração foi de 0,67 L/kg de sólido seco/minuto. O aumento na produção de celulases foi atribuído às melhores condições de aeração e mistura proporcionadas pelo biorreator. Contudo, diversos pesquisadores que avaliaram o emprego desse tipo de equipamento reportam a queda nos rendimentos no produto de interesse devido à agitação.

Diaz et al. (2009) estudaram o efeito da agitação de um biorreator de tambor de parede rotativa na produção de hidrolases por *Aspergillus awamori* que foi cultivado em bagaço de uva e casca de laranja (1:1). As atividades máximas de xilanase, exopoligalactouronase e endoglucanase foram obtidas com taxas de fluxo de ar altas (120 e 200 mL/min) e em taxa de agitação muito baixa (1 min/dia) ou em condições estáticas. Segundo o trabalho de Dhillon et al. (2013), a mistura contínua resultou na redução de 34 % na produção de ácido cítrico por *A. niger* em bagaço de maçã; a rotação intermitente foi mais favorável. Cassaro et al. (2015) também relataram prejuízos na produção de endoglucanase, glucosidase e xilanase durante a fermentação de FT por *A. niger* em decorrência da agitação. Agudelo (2014) estudou a tolerância ao atrito do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, microrganismo empregado no presente trabalho. A autora comparou o cultivo em embalagens plásticas estáticas e com agitação intermitente, tendo observado que a agitação reduziu a atividade de endoglucanase

obtida.

Figura 3.1: Biorreatores mais comuns para FES: a) Tambor de parede rotativa; b) Tambor de pás rotativas; c) Bandeja de fundo cego; d) Bandeja de fundo perfurado; e) Leito empacotado.



Fonte: Extraído e adaptado de Casciotori e Thoméo (2015).

Sendo assim, a aplicação de biorreatores de tambor rotativo é limitada a microrganismos que não são sensíveis ao atrito. Além disso, em razão do elevado custo e requisitos de manutenção, estes equipamentos são usados somente em processos para os quais o valor agregado do produto justifica o investimento (MITCHELL et al., 2006).

Neste contexto, os biorreatores de leitos fixos são os mais comumente aplicados na FES, pois possuem projeto simples, custo reduzido, baixas exigências de manutenção e evitam danos aos microrganismos devido à ausência de agitação. Os biorreatores de leito fixo ainda podem ser subdivididos entre os de bandeja e os de leito empacotado. Os biorreatores de bandeja podem possuir fundo cego (Figura 3.1 (c)) ou fundo perfurado (Figura 3.1 (d)). As bandejas são colocadas em câmaras com controle de temperatura e umidade relativa. Esses

equipamentos são tradicionalmente usados em países asiáticos na produção de alguns alimentos fermentados, como tempeh, miso e molho de soja. Todavia, ainda que se trate de um sistema simples, possui alto custo operacional em razão da necessidade de elevadas áreas e mão-de-obra. Além disso, camadas espessas nos biorreatores de bandeja podem provocar a elevação da temperatura, a qual é de difícil controle nesse tipo de equipamento, assim como a umidade (ARORA et al., 2018).

Mahmoodi et al. (2019) avaliaram a produção de poligalacturonases por fermentação em estado sólido de bagaço de laranja por *A. niger* em biorreatores de bandeja e tambor rotativo. Os rendimentos de produção de exo e endopectinases em biorreator de bandeja foram 45 e 37 % maiores, respectivamente. Todavia, os ensaios em biorreator de bandeja apresentaram ressecamento do substrato. Vaseghi et al. (2013) realizaram a FES de BC por *Rhizopus oryzae* em biorreator de bandeja e relataram que a atividade da lipase diminuiu com o aumento da altura do substrato de 0,5 a 3 cm devido ao acúmulo de calor.

O biorreator de leito empacotado (BLE), que tradicionalmente consiste em uma coluna de seção transversal cilíndrica encamisada de fundo perfurado para permitir a percolação de ar forçado (Figura 3.1 (e)), é o tipo mais comumente empregado em FES. Além de geralmente ser um equipamento de menor custo, a chance de contaminação nesse biorreator é menor em relação ao de bandeja, dado que sua estrutura é fechada (SOCCOL et al., 2017). Contudo, essa classe de biorreator também pode apresentar gradientes de temperatura, umidade e composição gasosa.

Normalmente, resíduos agroindustriais possuem condutividades térmicas baixas, o que, associado às pequenas vazões de escoamento de ar empregadas no BLE, torna as condutividades térmicas efetivas estática e dinâmica reduzidas, dificultando a remoção do calor gerado (CASCIATORI et al., 2013; CASCIATORI et al., 2018). As baixas vazões de escoamento de ar são necessárias para não ressecar o meio de cultivo. Salgado et al. (2015) e Dilipkumar et al. (2014) observaram o ressecamento do leito do BLE e a ocorrência de estresse aos microrganismos ao aumentar a taxa de fluxo de ar, consequentemente houve a diminuição da produção de celulases e inulinases, respectivamente.

Dessa maneira, gradientes axiais de temperatura são praticamente inevitáveis. Em níveis extremos, o acúmulo de calor pode causar a desnaturação enzimática e prejudicar o crescimento microbiano e a produção de metabólitos (MITCHELL et al., 2010; FIGUEROA-MONTERO et al., 2011). Diversos autores avaliaram o efeito da temperatura para diferentes microrganismos cultivados em meio sólido na produção de lignocelulases e confirmaram sua influência nos rendimentos enzimáticos (JABASINGH; NACHIYAR, 2011; MAHMOOD et

al., 2013; PIROTA et al., 2013; SALOMÃO et al., 2019).

Inevitavelmente, o aumento da temperatura provoca a redução da umidade da matriz sólida em decorrência do não-equilíbrio termodinâmico entre o ar e o substrato. Ainda que o ar percolante esteja saturado ao entrar no leito do biorreator, o aumento da temperatura pode fazer com que o ar passe a ficar abaixo da saturação, adquirindo potencial para remover água do substrato sólido, o que pode reduzir a taxa de crescimento microbiano e a formação dos produtos desejados (ZANELATO et al., 2012; CASCIATORI et al., 2016). Os problemas reportados ainda se acentuam no aumento de escala, uma vez que não há critérios fixos de ampliação, pois devem ser empregadas baixas vazões de ar para não ressecar o meio de cultivo, conforme já mencionado.

Contudo, devido à possibilidade da presença da camisa no BLE e da aeração forçada por todo o leito, esses problemas são mais facilmente controlados em comparação aos reatores de bandeja. Além disso, trata-se de um equipamento que ocupa uma menor área, possui menor consumo de energia e permite o emprego de camadas mais espessas de substrato em relação aos biorreatores de bandeja (MITCHELL et al., 2006).

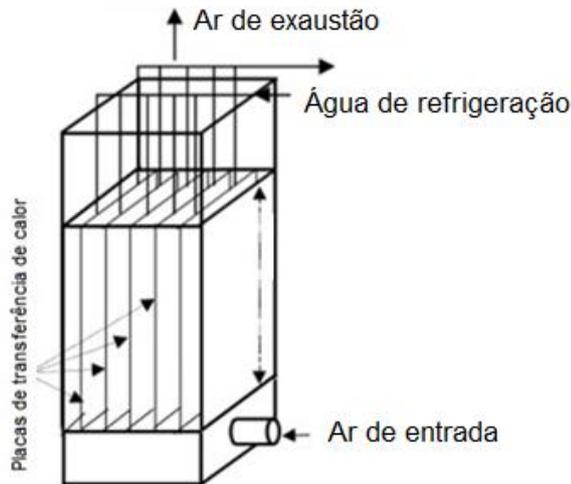
O potencial de aplicação do BLE para produção de enzimas lignocelulolíticas já foi demonstrado em estudos prévios por diversos autores, como Umsza-Guez (2009), Zanelato et al. (2012), Ignácio (2013), Casciatori et al. (2016) e Perez et al. (2019). Contudo, esses equipamentos são raramente operados em grande escala, devido principalmente à remoção deficiente do calor metabólico gerado. Dessa forma, diversos pesquisadores vêm buscando alternativas que minimizem esses problemas e viabilizem a operação em âmbito industrial desses biorreatores. Alguns dos avanços já publicados nesse sentido são apresentados no item seguinte (3.2.1.).

3.2.1. Biorreatores de leito empacotado para FES: estado da arte

Roussos et al. (1993) avaliaram a alocação de placas de resfriamento paralelas no leito de um BLE. Esse design foi denominado como Zymotis e está representado na Figura 3.2. Os autores realizaram a FES do fungo *Trichoderma harzianum* CCM F-470 em BC e FT na proporção 8:7 m/m. Esse é um dos principais avanços alcançados no controle do surgimento de gradientes de temperatura no leito. Contudo, o controle da temperatura dos sólidos em fermentação pela circulação de água através das placas do trocador de calor foi ineficiente durante a fase de crescimento ativo, em que maiores quantidades de calor metabólico são geradas. Além disso, houve a diminuição significativa na produção de celulasas com o aumento da carga do Zymotis de 26,68 kg para 40,02 kg. As etapas de limpeza, esterilização,

carregamento e descarregamento em grande escala podem ser dificultadas devido ao design do equipamento (ARORA et al., 2018).

Figura 3.2: Design básico de um BLE tipo Zymotis.

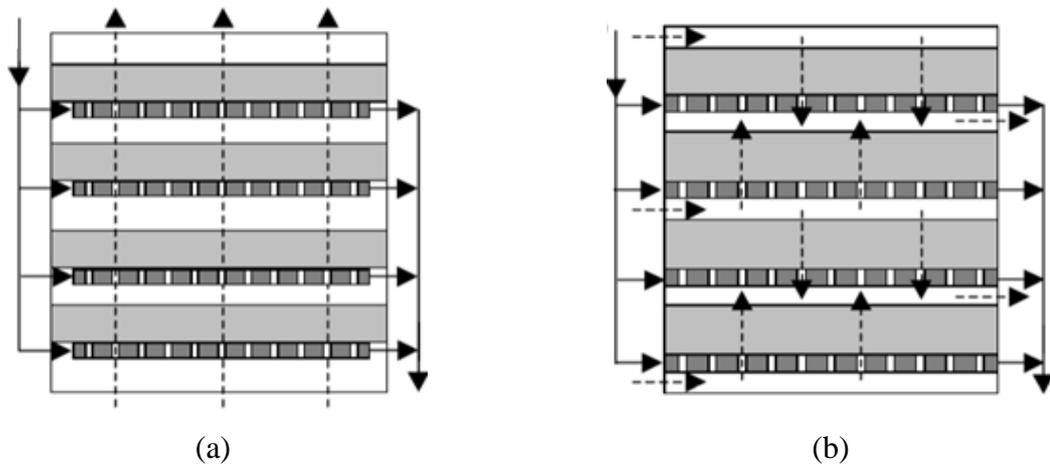


Fonte: Adaptado de Mitchell et al. (2006).

Poucos anos depois, Lu et al. (1998) avaliaram a aplicação de um BLE multicamada na produção de ácido cítrico por FES pelo fungo *Aspergillus niger*. Os resultados indicaram que a divisão do leito em camadas com fundo perfurado permitiu a redistribuição do gás após cada camada. Dessa forma, a canalização de ar no BLE multicamadas foi menor do que no BLE de leito único, o que proporcionou a melhora acentuada na produção de ácido cítrico. Os autores concluíram que a transferência de gás através das fronteiras interfaciais das partículas é limitante nos processos de FES e que a divisão do leito em várias camadas melhora as transferências de calor e de massa. Este trabalho pode ser considerado como um dos primeiros avanços significativos para minimizar os problemas de compactação do leito em BLEs.

Na mesma linha do Zymotis, foram propostos os BLEs Prophyta (LÜTH; EIBEN, 1999) e PlaFractor (SURYANARAYAN, 2003), também dotados de placas resfriadoras em seu interior em ambos os casos. No biorreator Prophyta, o ar passa direto e de forma perpendicular a cada placa e leito, enquanto no biorreator PlaFractor o ar é introduzido separadamente em cada estação, como apresenta a Figura 3.3.

Figura 3.3: Representação esquemática dos biorreatores (a) Prophyta e (b) PlaFactor.



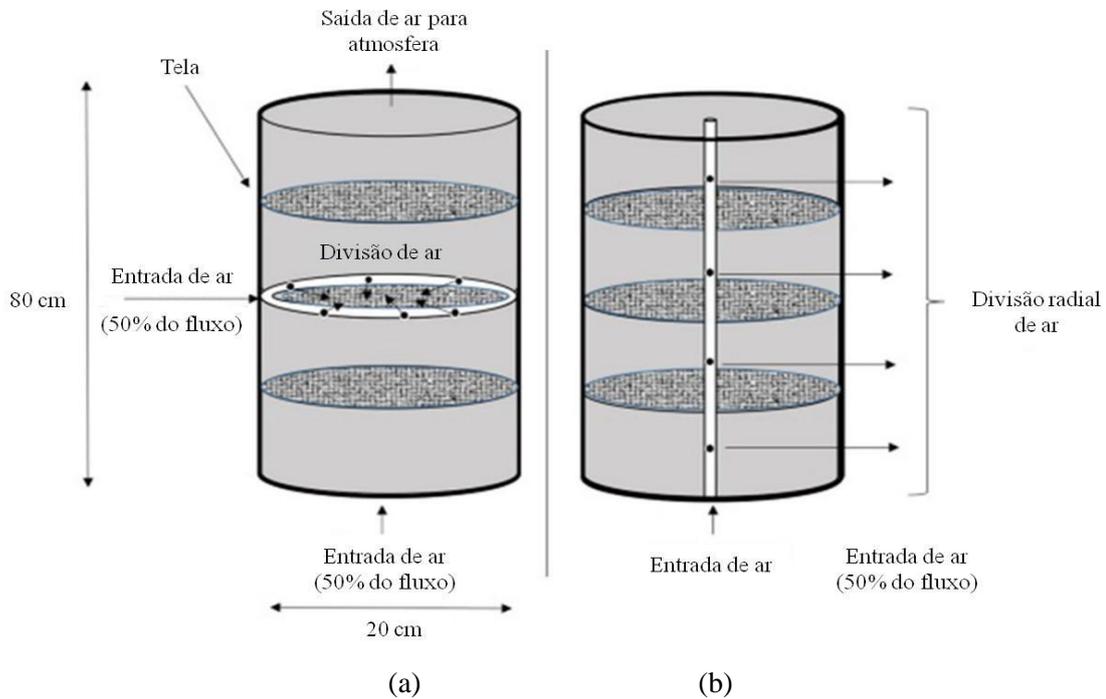
*Em cinza claro, representa-se o leito de substrato; em cinza escuro, as placas de transferência de calor; as linhas contínuas representam fluxo de fluido refrigerante e as pontilhadas o de ar.

Fonte: Adaptado de Mitchell et al. (2006).

Mais recentemente, a estratégia de injetar ar em diferentes posições axiais do biorreator, como é o caso PlaFactor, também foi avaliada por Perez et al. (2020). Os autores avaliaram as seguintes estratégias de injeção de ar em um BLE multicamadas: dividir a taxa de fluxo de ar em dois fluxos iguais, um pelo fundo e outro na seção média da coluna, como mostra a Figura 3.4 (a); e inserir o ar através de um tubo perfurado longitudinalmente colocado no centro da coluna, como mostra a Figura 3.4 (b).

A primeira estratégia foi chamada de “divisão” e a segunda de “radial”. Os resultados indicaram que nenhuma das estratégias teve influência no sobreaquecimento do biorreator, quando os perfis térmicos foram comparados aos da configuração convencional de aeração de ponta a ponta. Contudo, a estratégia radial promoveu uma ligeira melhora na produção enzimática, o que pode estar relacionado com a melhor distribuição de ar, equalizando a oferta de oxigênio ao longo da coluna.

Figura 3.4: Representação de um BLE multicamadas com duas estratégias de inserção de ar: (a) divisão e (b) radial.



Fonte: Adaptado de Perez et al. (2020).

Além de mudanças na configuração do BLE, diversos estudos foram desenvolvidos para avaliar como os parâmetros do processo, como temperatura, umidade e vazão do ar, afetam os rendimentos da FES. Mazutti et al. (2010) realizaram a FES em BLE utilizando bagaço de cana, farelo de soja, melação e licor de maceração de milho como substratos e *Kluyveromyces marxianus* como inóculo para produção de inulinase. Os autores avaliaram o efeito da temperatura e vazão de ar na entrada de um BLE e observaram que o aumento na vazão volumétrica não contribuía de forma significativa na redução da temperatura do sistema, o que é justificado pela baixa capacidade calorífica do ar. Por outro lado, o resfriamento evaporativo teve forte efeito na remoção do calor gerado. Dessa forma, foi proposta a injeção de ar seco em determinados períodos do cultivo, tendo em vista otimizar o resfriamento evaporativo por meio do ajuste da vazão e da temperatura do ar de entrada. No entanto, tal estratégia pode provocar secagem excessiva do leito, sendo difícil fazer reposição da água removida para restabelecer a umidade ideal do substrato.

Ashley et al. (1999) avaliaram por meio de simulações o efeito da reversão do sentido do fluxo de ar e da mistura em diferentes intervalos de tempo durante a FES em um BLE utilizando um substrato amiláceo e *Aspergillus niger* como inóculo. A aplicação das estratégias a cada 1 hora aumentou a temperatura máxima prevista em relação ao processo

normal. O aumento da frequência de reversões de ar poderia acarretar em temperaturas próximas da máxima prevista no meio do leito. Já o aumento da frequência de misturas poderia resultar em temperaturas máximas mais baixas na coluna em comparação com a operação normal, contudo esse método é limitado a microrganismos resistentes ao atrito.

Estratégias alternativas de operação do BLE também foram reportadas. Astolfi et al. (2011) propuseram o modo de operação em batelada alimentada para produção de inulinase por FES, na qual foi avaliada a alimentação de substrato em diferentes frações. Cerda et al. (2016) realizaram um trabalho experimental de produção de amilase por FES em BLEs operados em batelada em série, onde o sólido fermentado de um biorreator era utilizado para realizar a inoculação do substrato seguinte, garantindo facilidades também na etapa de preparação de inóculo.

Outro desafio é tornar os processos de FES contínuos, aumentando sua viabilidade de aplicação industrial por meio de vantagens como redução dos tempos mortos devido a carga, descarga e limpeza e possibilidade de empregar equipamentos menores para as etapas *upstream* e *downstream* (MITCHELL et al., 2010). Até o presente, são encontrados raros estudos de processos contínuos de FES, a maioria deles sendo baseada apenas em modelagem matemática e simulação, carecendo de validação devido à lacuna de estudos experimentais.

Van de Lagemaat e Pyle (2001; 2004) construíram um protótipo de biorreator para a produção contínua de tanase fúngica, consistindo de um cilindro rotativo dotado de defletores e rosca para movimentação contínua do material. No entanto, os autores reportaram problemas de alto atrito, levando a rendimentos de biomassa e enzimas inferiores aos obtidos em cultivo estático.

Mitchell et al. (2010) propuseram um estudo baseado em simulação para avaliar o potencial de BLEs multicamadas para FES, aplicando um modelo matemático desenvolvido para n-tanques em série (SAHIR et al., 2007). Foram simuladas três configurações de operação: batelada clássica ou convencional, batelada com movimentação cíclica das camadas e operação contínua através da remoção de camadas que tivessem o processo fermentativo finalizado e adição de novas camadas recém inoculadas. As predições indicaram que a movimentação contínua das camadas seria capaz de reduzir o sobreaquecimento do sistema, em relação à operação tradicional.

Nessa nova estratégia de operação em modo contínuo, o BLE se comportaria como um reator de fluxo pistonado. Deste modo, todo o material fermentado retirado do sistema dentro do estado estacionário poderia apresentar qualidade uniforme, já que todas as camadas do leito são submetidas às mesmas condições. Outra vantagem importante é a ausência de atrito,

uma vez que se movimentam as camadas ou módulos do biorreator, mas o meio reacional permanece estático. A aplicação experimental dessa estratégia promissora de operação foi avaliada no presente trabalho e alguns resultados parciais já foram publicados por Oliveira et al. (2020), que constataram a operacionalidade do sistema e a redução dos tempos mortos.

4. METODOLOGIA

4.1. Microrganismos e substratos

Foram empregados os fungos *Myceliophthora thermophila* I-1D3b (termofílico) e *Aspergillus niger* C (mesofílico). O primeiro foi isolado pela Prof^a. Dr^a. Daniela Alonso Bocchini a partir de pilhas de bagaço de cana-de-açúcar da Usina Guarani, de Olímpia-SP, e tem apresentado resultados positivos para produção de celulases em escalas de frascos e de biorreatores de bancada (ZANELATO et al. 2012; CASCIATORI et al., 2016; PEREZ et al., 2019). Além disso, por tratar-se de um fungo termofílico, os riscos de contaminação são reduzidos. Já o segundo pertence à coleção do Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação (São Carlos – SP), tendo sido as linhagens de *A. niger* isoladas originalmente de resíduos de manteiga e cedidas pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ). A seleção do *A. niger* C foi realizada em razão do mesmo apresentar elevada geração de calor (MITCHELL et al., 2010) durante o crescimento, o que pode acarretar no aumento pronunciado da temperatura dentro do reator, o qual é desejado para o estudo sobre o efeito da configuração de escoamento de fluidos no comportamento térmico do BLE (item 4.3.3) (GUILDYAL et al., 1994; MITCHELL et al., 2010).

As soluções estoques dos fungos foram mantidas em tubos criogênicos com glicerol a 20 % na temperatura de – 80 °C. Para utilização, as culturas foram repicadas em frascos de Erlenmeyer contendo 60 mL de meio Agar-Sabouraud-Dextrose e 1% de carboximetilcelulose (CMC), os quais foram deixados para solidificar inclinados. Esses frascos foram mantidos em câmara DBO por pelo menos 2 dias a 45 °C para *M. thermophila* I-1D3b e a 30° C para *A. niger* C para crescimento das colônias. Após isso, foi adicionada em cada frasco uma solução nutriente, cujo pH foi ajustado para 5,0, com seguinte composição (m/v): 0,35 % de (NH₄)₂SO₄, 0,3 % de KH₂PO₄, 0,05 % de MgSO₄7H₂O, 0,05 % de CaCl₂ e 0,1 % de Tween 20 (ZANELATO et al., 2012). Em seguida, foi feita a raspagem superficial do ágar para remoção dos esporos crescidos na superfície e as suspensões obtidas em cada frasco foram misturadas e homogeneizadas. Uma alíquota de 1 mL foi retirada em triplicata para contagem de esporos em câmara de Neubauer.

Como substratos, foram empregados bagaço de cana-de-açúcar (BC) e farelo de trigo (FT). O BC foi doado pela Usina São Manoel (São Manoel – SP) e pela Usina Santa Cruz do Grupo São Martinho (Américo Brasiliense – SP). O BC bruto foi inicialmente seco em estufa a 60 °C até massa constante, para não sofrer deterioração. Posteriormente, foi peneirado para uniformização do tamanho das fibras, passando primeiramente por uma peneira com abertura

de 5 x 5 mm, que reteve fibras mais grossas, as quais foram denominadas como bagaço grosso (BG) e, em seguida, por uma peneira com abertura de 4 x 2 mm, que reteve as fibras mais finas, denominadas como bagaço fermentativo (BF), separando-as do pó. O FT foi adquirido no comércio local (Agropecuária Claro, São Carlos – SP).

A umidificação dos substratos foi realizada pela adição da mesma solução nutriente empregada na raspagem dos esporos. A quantidade adicionada foi ajustada de acordo com a máxima absorção de solução nutriente para cada composição de substratos. Os valores exatos da umidade de cada matriz sólida empregada no presente trabalho estão descritos adiante. Os substratos e a solução nutriente foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos separadamente antes de todos os cultivos e foram depois misturados e homogeneizados manualmente, juntamente com o inóculo, dentro de uma câmara de fluxo laminar previamente esterilizada.

4.2. Cultivos em estado sólido em embalagens plásticas

4.2.1. Cinética de crescimento de *M. thermophila* em cultivo em estado sólido e efeito da temperatura

Considerando que o controle térmico é dificultado em BLE, como já mencionado, o sistema de FES pode experimentar variações de temperatura suficientemente grandes para afetar o comportamento cinético do cultivo e, conseqüentemente, a produtividade e o rendimento do bioprocessamento. Dessa forma, é fundamental que seja avaliado o efeito da temperatura sobre a cinética de crescimento. Para isso, foram realizados cultivos de acordo com o planejamento apresentado na Tabela 4.1. As faixas escolhidas de tempo e temperatura foram realizadas considerando os resultados de Zanelato et al. (2012).

Tabela 4.1: Planejamento experimental da cinética de cultivo sólido de *M. thermophila* em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Tempo de retirada as amostras (h)						
	0	24	48	72	96	120	144
35	0	24	48	72	96	120	144
40	0	24	48	72	96	120	144
45	0	24	48	72	96	120	144
50	0	24	48	72	96	120	144
55	0	24	48	72	96	120	144

Os ensaios fermentativos foram realizados em triplicata em embalagens de polipropileno de 12 x 20 cm acoplados com bocal de PVC de 3,6 cm de diâmetro através de fita adesiva, os quais foram tampados com rodilhão de algodão, a fim de garantir a troca gasosa e evitar contaminação, como mostra a Figura 4.1. O esquema adotado nos ensaios cinéticos foi de “amostra sacrifício”, o que significa que as amostras retiradas num determinado tempo para realização das análises não retornaram para a incubadora.

Figura 4.1: Embalagem de polipropileno com substrato seco.



Fonte: Arquivo pessoal.

A massa de substrato em cada embalagem plástica foi de 5 gramas de substrato seco (gss) na proporção de 7:3 BC:FT (massa/massa) e a umidificação foi realizada com solução nutriente até 75 % em base úmida (b.u.) (ZANELATO et al., 2012). A inoculação da suspensão fúngica foi padronizada em 10^6 esporos/gss. As embalagens inoculadas foram incubadas em câmara DBO sob as condições da Tabela 1. Após os tempos determinados de amostragem, foram obtidos os extratos enzimáticos, conforme será descrito no item 4.5. Para o extrato oriundo de cada amostra retirada, foram realizadas análises em duplicata de proteínas solúveis e de atividade de endoglucanase, uma vez que são indicadores que representam o crescimento do microrganismo e a produção da enzima de interesse para a presente aplicação avaliada, respectivamente.

Aos dados cinéticos de proteínas solúveis e de atividade de endoglucanase foram ajustados modelos de reação de ordem zero, primeira ordem e também a equação logística, equações 4.1, 4.2 e 4.3, respectivamente, apontados por Viccini et al. (2001) como as equações empíricas mais usadas na descrição de cinéticas em FES.

$$X = kt + X_0 \quad (4.1)$$

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (4.2)$$

$$X = \frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m}{X_0} - 1\right) e^{-\mu t}} \quad (4.3)$$

onde X representa a variável analisada no tempo t, X_m o seu valor máximo e X_0 o seu valor inicial; k é a constante de velocidade do modelo de ordem zero e μ é a constante de velocidade específica de crescimento dos modelos de primeira ordem e da equação logística.

Em todas as equações já integradas, a condição inicial utilizada foi em $t = 0$, $X = X_0$. Os ajustes foram realizados no *software* Microcal Origin® 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, USA), que emprega o algoritmo de Levenberg-Marquardt para a busca dos valores dos parâmetros. O melhor modelo foi escolhido com base no valor do R^2 (coeficiente de determinação) dos ajustes.

Determinadas as velocidades específicas de produção de proteínas solúveis e de endoglucanase para cada temperatura, foi utilizada a equação de Arrhenius linearizada, dada pela equação 4.4, para obter os parâmetros do modelo de Arrhenius e verificar as zonas de ativação e desativação térmicas.

$$\ln(\mu) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad (4.4)$$

onde A representa o fator de frequência; E_a é a energia de ativação da reação; R é a constante universal dos gases e T é a temperatura absoluta.

Os parâmetros de Arrhenius são necessários para realizar as simulações dos processos de FES em BLE, uma vez que a taxa de geração de calor, um dos termos dos balanços de energia, é normalmente associada à cinética de desenvolvimento do microrganismo. Portanto, são parâmetros úteis tanto para futuros trabalhos de escalonamento do bioprocessamento aqui estudado, assim como para avaliar se as temperaturas atingidas nos ensaios em BLE, como

serão reportados adiante, poderiam prejudicar a produtividade dos bioprocessos.

4.2.2. Avaliação de um método alternativo de inoculação

Com o intuito de aumentar a praticidade e diminuir custos do bioprocessamento contínuo desenvolvido neste trabalho, foi avaliado um método de inoculação através da mistura entre substratos sólidos fermentados e não fermentados. Esse método será denominado como inoculação sólido-sólido no decorrer deste trabalho.

Ao todo, foram testadas, em duplicata, 3 estratégias de inoculação nas seguintes proporções de substrato: BC:FT 7:3 para BC:FT 7:3 (estratégia 1), FT para FT (estratégia 2) e FT para BC:FT 7:3 (estratégia 3). A umidade do substrato na proporção de BC:FT 7:3 foi de 75 % b.u. e de FT puro foi de 55 % b.u..

Os sólidos fermentados utilizados como inóculos foram obtidos através de cultivos em embalagens de polipropileno de 12 x 20 cm contendo 10 gss, de acordo com as estratégias 1, 2 e 3, os quais foram umidificados e inoculados com uma suspensão líquida de esporos de *M. thermophila* na concentração de 10^6 esporos/gss. As amostras foram incubadas a 45 °C em câmara DBO por 96 h. Posteriormente, todo o conteúdo sólido fermentado foi transferido para uma embalagem maior de polipropileno com dimensões de 30 x 40 cm, que continha 90 gss não inoculado e umidificado, de acordo com as estratégias mencionadas, de forma que a massa final nesta embalagem foi de 100 gss. A homogeneização foi realizada manualmente, seguida de incubação por 96 h. Dessa forma, é importante ressaltar que a inoculação líquida com suspensão de esporos foi padronizada, porém não é possível garantir que o mesmo ocorreu na inoculação com sólidos fermentados.

Toda a manipulação foi realizada em ambiente estéril, proporcionado por câmara de fluxo laminar. Ao final de cada cultivo, foram obtidos os extratos enzimáticos para quantificação da atividade de endoglucanase, da concentração de proteínas solúveis e da concentração de esporos.

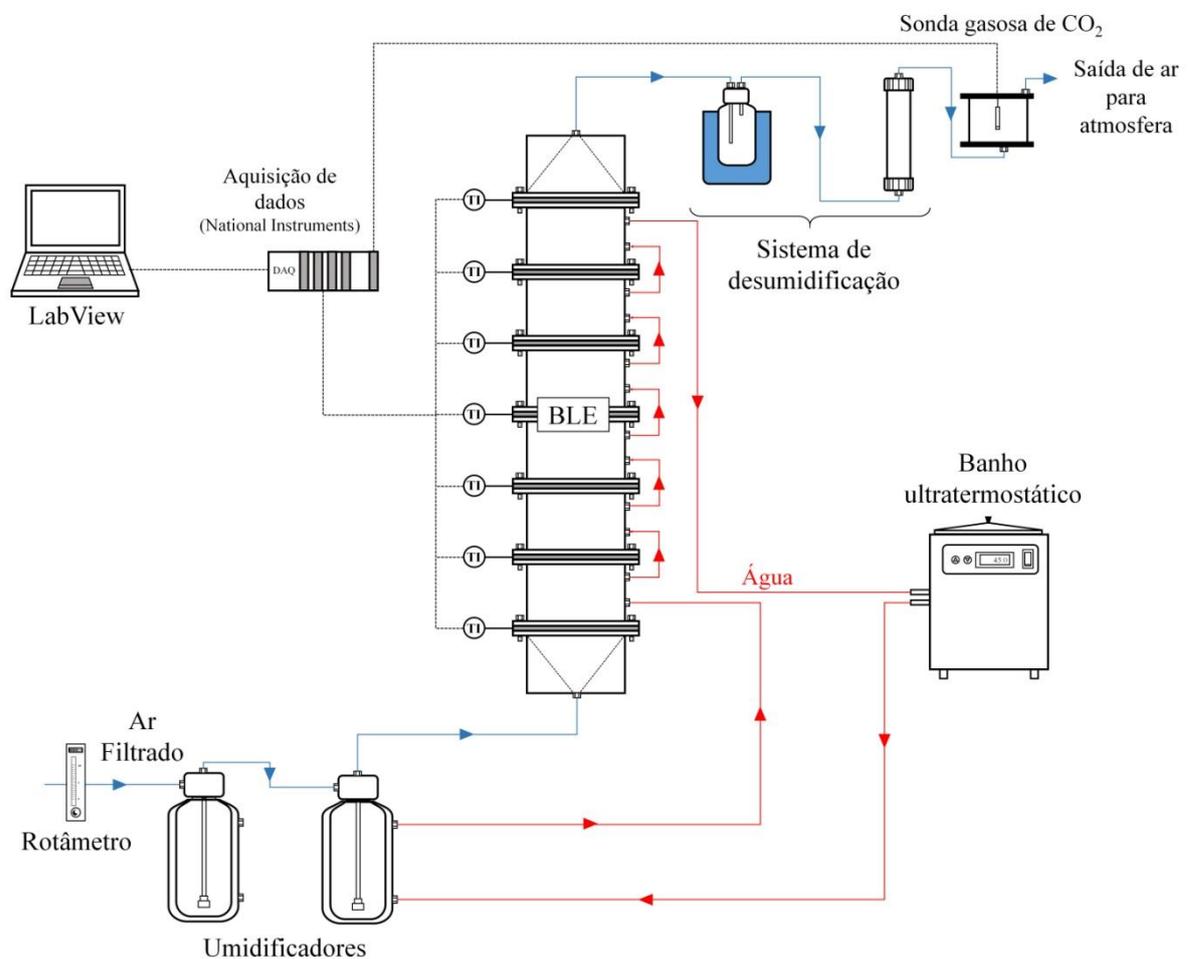
4.3. Cultivos em estado sólido em biorreator de leito empacotado

4.3.1. Características do aparato experimental e biorreator

O aparato experimental empregado nos ensaios de FES está apresentado na Figura 4.2. O ar fornecido por compressor foi filtrado para retirada de impurezas grosseiras, passando, em seguida, por válvula de agulha, filtro biológico, medidor de vazão e dois umidificadores, um a temperatura ambiente e outro encamisado na temperatura de processo, nesta sequência. Os

umidificadores foram recheados com esferas de vidro e o espaço vazio entre as esferas foi preenchido por água destilada, garantindo assim a saturação do ar de entrada. Ao sair do BLE, o ar passava por um sistema de desumidificação composto por um *trap*, no qual a água condensada era coletada por um frasco e, em seguida, passava por uma coluna de sílica com dimensões de 5,2 cm de diâmetro e 39 cm de altura, com o objetivo de baixar a umidade relativa do ar para, no máximo, 15 %, possibilitando assim a leitura da concentração de CO₂ por sonda.

Figura 4.2: Aparato experimental empregado nos cultivos em estado sólido em BLE.

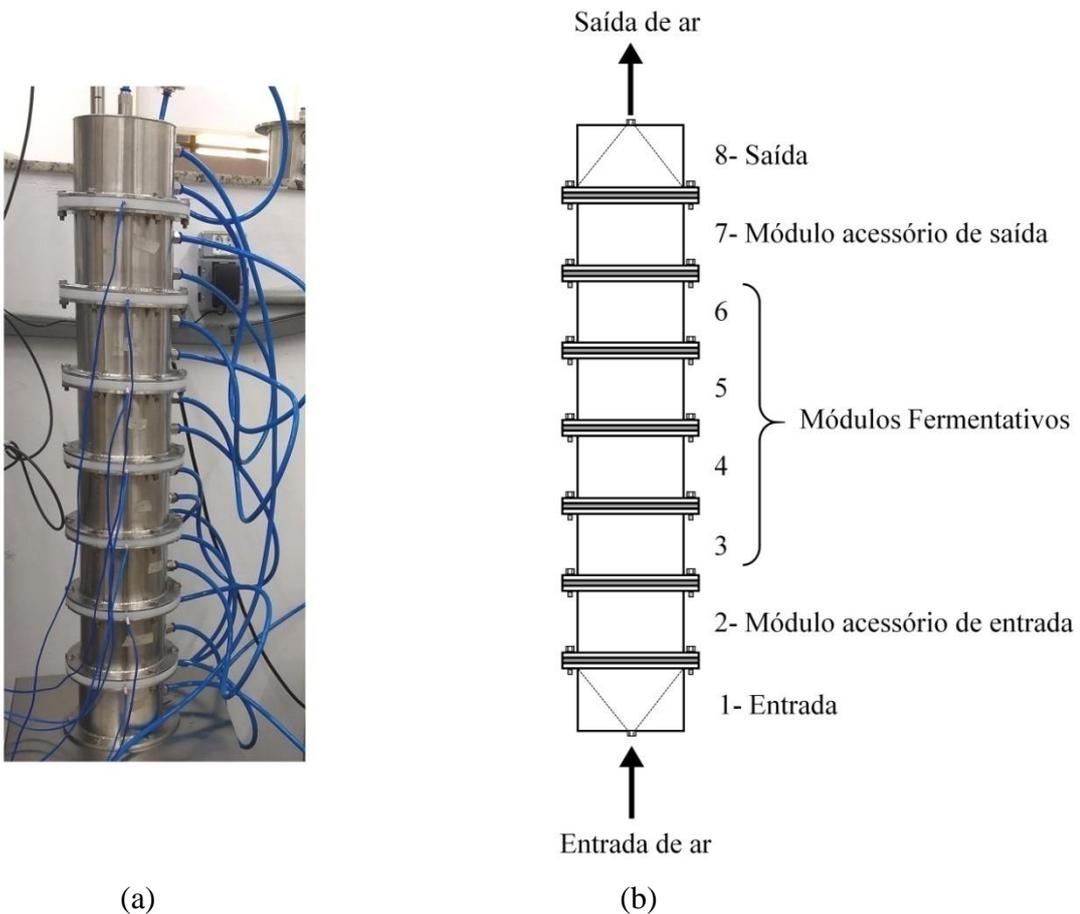


Fonte: Elaborado pela autora.

A configuração do biorreator é similar à empregada nos estudos de Zanelato (2011), Casciadori (2015) e Perez et al. (2019), como mostra a Figura 4.3, na qual os números de 1 a 8 representam os módulos que constituem o equipamento. Trata-se de um BLE modular de aço inoxidável, no qual os módulos de formato cilíndrico possuem 10 cm de altura, 13 cm de diâmetro interno e 15 cm de diâmetro externo. O espaço anular foi utilizado como camisa

para circulação de água a fim de manter a temperatura ideal de processo e evitar sobreaquecimento. Para isso, foram utilizadas mangueiras que conectaram a camisa de um módulo à de outro. Cada módulo possui fundo perfurado para sustentar o meio e permitir a passagem de ar. Além disso, os módulos de entrada e saída apresentam interior cônico para direcionar o escoamento. Entre um módulo e outro foi colocada uma flange, de 1,3 cm de espessura, juntamente com um anel de borracha, para garantir a vedação do equipamento e impedir vazamento de ar, assim como a entrada de ar do ambiente externo, para evitar contaminações.

Figura 4.3: Biorreator de leito empacotado modular: (a) imagem real e (b) ilustração esquemática.



Fonte: (a) Arquivo pessoal e (b) elaborado pela autora.

Na seção de entrada, representada pelo módulo 1 na Figura 4.3 (b), foram colocadas esferas de vidro para permitir o desenvolvimento do perfil de velocidade do ar percolante e garantir que todo o leito recebesse ar igualmente. Na sequência, tem-se o módulo acessório de entrada, o qual foi preenchido por bagaço grosso (BG) umidificado com água destilada na

mesma umidade do meio de cultivo, a fim de garantir que o ar estivesse saturado ao percolar os módulos fermentativos.

Os módulos fermentativos estão representados pelos números 3, 4, 5 e 6 na Figura 4.3 (b), nos quais foram acrescentados os substratos úmidos inoculados com esporos fúngicos. Cabe mencionar que o número de módulos fermentativos não é fixo, podendo variar de acordo com o objetivo do cultivo, sendo limitado somente pela disponibilidade de oxigênio e pelo grau de dificuldade de remoção do calor metabólico gerado. Por fim, tem-se o módulo acessório de saída e o módulo de saída, representados pelos números 7 e 8 na Figura 4.3 (b), respectivamente. No módulo acessório de saída, foi colocado BG seco, com umidade inicial de 7 % em b.u., o qual teve a finalidade de absorver gotículas de água que poderiam surgir no módulo de saída devido à condensação da água presente no ar percolante. Dessa forma, foram minimizados os riscos da ocorrência de água não absorvida pelos substratos nos módulos fermentativos.

É importante salientar que o empacotamento de todos os módulos foi realizado utilizando a técnica *loose packing* (LP) proposta por Casciatori et al. (2014), na qual os substratos são acomodados suavemente sem provocar a compressão do leito. Além disso, previamente aos cultivos, todos os módulos, assim como o filtro e os umidificadores, foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

O monitoramento *online* da temperatura foi realizado através da instalação de termopares por meio de flanges na posição radial central do biorreator em várias posições longitudinais. Também foi realizado o monitoramento *online* da concentração de CO₂ através do *Analog Output Transmitter* Indigo 201 da marca VAISALA, cuja sonda foi mantida dentro de um tubo fechado hermeticamente, impedindo que o ar ambiente alterasse a composição do ar de saída. Os sinais foram registrados pelo sistema de aquisição de dados da *National Instruments* COMPAQ-DAQ, gerenciado por rotina do *software Labview* (*National Instruments*, Austin, EUA).

4.3.2. Modos de operação do biorreator

Visando avaliar a operacionalidade da condução da FES de forma contínua no BLE proposto e também o efeito dos diferentes modos de operação no desempenho do bioprocessamento, foram realizados cultivos em três regimes: batelada clássica, batelada com movimentação e contínuo. Nos cultivos em batelada, representados pela Figura 4.4 (a), o BLE foi montado com todos os módulos fermentativos no início do cultivo, os quais permaneceram na mesma posição até o tempo final de fermentação. Similarmente, na batelada com movimentação,

todos os módulos fermentativos foram acrescentados no início do cultivo, entretanto foram movimentados a cada 24 horas no sentido indicado pela a Figura 4.4 (b). Dessa forma, para um cultivo de 4 dias com 4 módulos fermentativos nomeados como M1, M2, M3 e M4, as movimentações resultariam na disposição de módulos ao longo do tempo total de cultivo conforme apresentado na Tabela 4.2.

Figura 4.4: Representação esquemática dos modos de operação batelada clássica (a), batelada com movimentação (b) e contínuo (c) para 4 módulos fermentativos.

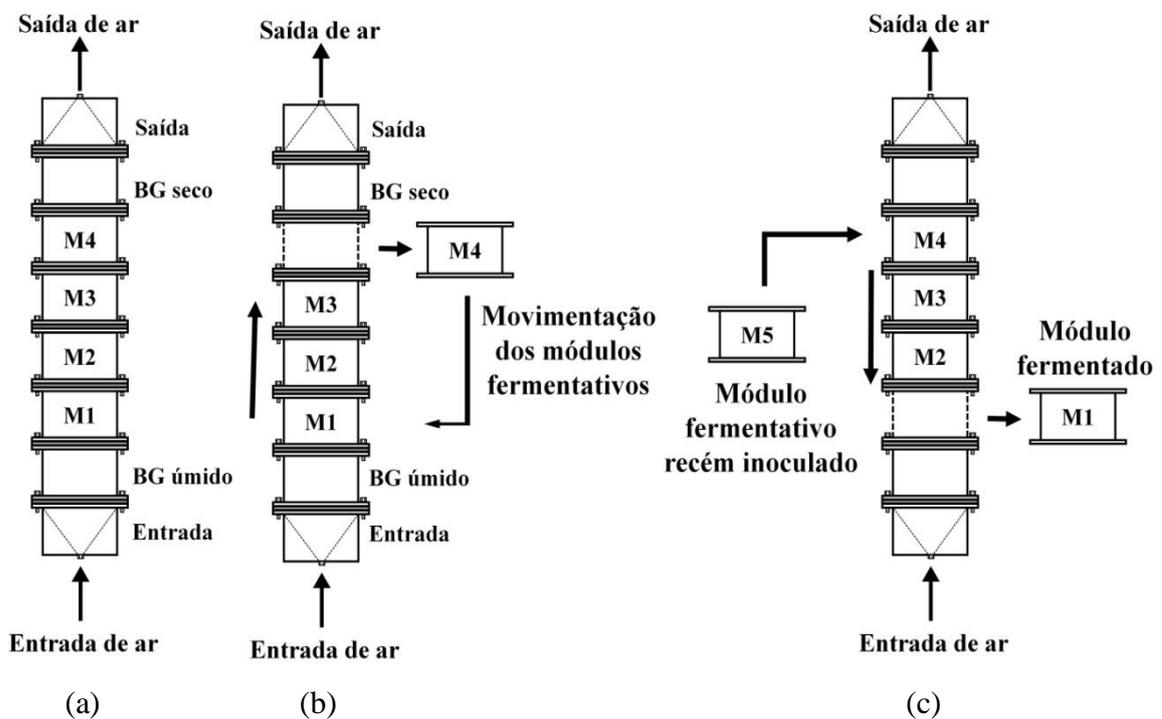


Tabela 4.2: Posições dos módulos fermentativos no BLE ao longo do tempo de cultivo para a batelada com movimentação.

Altura (cm)*	Tempo de cultivo (dias)			
	1	2	3	4
45,2	M4	M3	M2	M1
33,9	M3	M2	M1	M4
22,6	M2	M1	M4	M3
11,3	M1	M4	M3	M2

*A altura é referente somente à zona fermentativa do BLE, onde 0 cm é correspondente à base do primeiro módulo fermentativo (M1).

No modo de operação contínuo, os módulos fermentativos foram acrescentados a cada 24 horas, ou seja, a cada 24 horas foi realizada a inoculação, o empacotamento e a adição de um ou mais módulos no BLE. Dessa maneira, a altura do leito aumentou até que o tempo de cultivo do(s) primeiro(s) módulo(s) adicionado(s) foi completado. A partir desse momento, a altura do leito se manteve fixa, uma vez que passou-se também a retirar a mesma quantidade de módulos adicionados a cada 24 horas. A Figura 4.4 (c) ilustra um caso em que foi realizada a adição e a remoção de 1 módulo por vez. Dessa maneira, o modo de operação contínuo poderia ser conduzido indefinidamente, até que, ao final (parada do processo), os módulos são apenas retirados e não mais acrescentados. Para maior entendimento, pode ser observada a Tabela 4.3, que apresenta a disposição dos módulos fermentativos (M1, M2, M3...) ao longo do tempo para um bioprocessamento contínuo com duração total de 12 dias, caso fosse adicionado 1 módulo fermentativo por vez, e o tempo de cultivo do microrganismo fosse de 4 dias.

Tabela 4.3: Posições dos módulos fermentativos no BLE de acordo com o tempo para um bioprocessamento contínuo com duração de 12 dias e tempo de cultivo do microrganismo de 4 dias.

Altura (cm)*	Tempo (h)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
45,2	-	-	-	M4	M5	M6	M7	M8	-	-	-	-
33,9	-	-	M3	M3	M4	M5	M6	M7	M8	-	-	-
22,6	-	M2	M2	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	-	-
11,3	M1	M1	M1	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	-

*A altura é referente somente à zona fermentativa do BLE, onde 0 cm é correspondente à base do primeiro módulo fermentativo (M1)

Os sólidos em processo fermentativo contidos no BLE ficaram expostos ao ar ambiente do laboratório durante todas as manipulações que foram realizadas (adição, remoção e movimentação dos módulos). Contudo foram tomadas as devidas precauções para evitar contaminações. Os substratos e solução nutriente foram autoclavados previamente aos cultivos, conforme descrito no item 4.1., assim como o filtro de ar e os umidificadores. Os demais módulos foram higienizados com álcool 70°GL antes de serem empacotados. Além disso, todo o processo de inoculação e empacotamento foi realizado dentro de uma câmara com fluxo laminar antecipadamente esterilizada com luz ultravioleta.

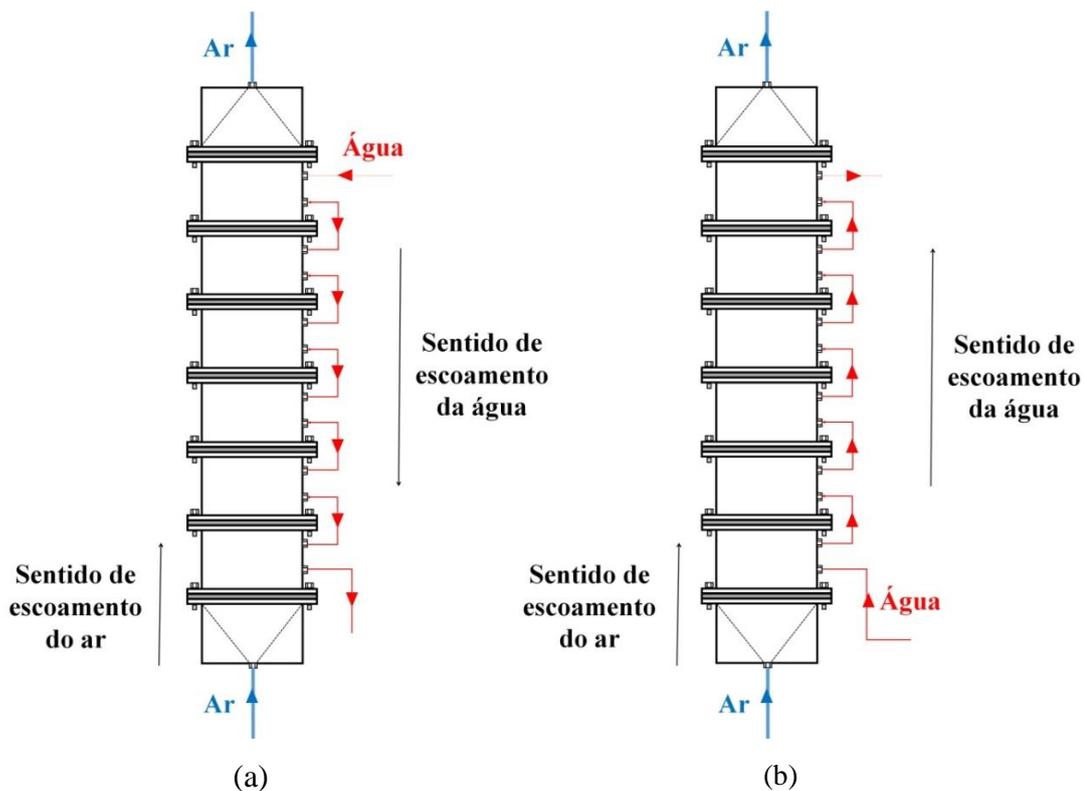
No presente trabalho, o termo “tempo de processo” é utilizado para se referir ao tempo total de ocorrência do bioprocessamento de FES, enquanto que o termo “tempo de cultivo” é utilizado para se referir ao tempo em que os módulos fermentativos adicionados permanecem

no biorreator para crescimento do microrganismo e produção das enzimas desejadas. Dessa forma, para as operações em batelada, o tempo de processo sempre será igual ao tempo de cultivo; para os processos contínuos, o tempo de processo sempre será maior que o tempo de cultivo.

4.3.3. Avaliação da influência do sentido de escoamento da água pela camisa de resfriamento e do ar percolante através do leito

Nos trabalhos de modelagem e simulação de FES em BLE, a temperatura da parede é considerada constante durante o bioprocessamento e independente da posição. Contudo, a literatura não reporta uma avaliação experimental sobre a influência do sentido de escoamento da água, através da camisa de resfriamento, e do ar percolante, através do leito, sobre o comportamento térmico do equipamento. Dessa forma, com intuito de preencher essa lacuna e investigar fatores que possam minimizar os problemas de sobreaquecimento do BLE, foi avaliado o efeito da configuração de escoamento desses fluidos. Foram testadas duas configurações de escoamento em duplicata: contracorrente (CT) e co-corrente (CC), ilustradas pela Figura 4.5.

Figura 4.5: Representação esquemática das configurações de escoamento (a) contracorrente e (b) co-corrente.



Fonte: Elaborado pela autora.

Nos cultivos com configuração CT (Figura 4.5 (a)), o ar percolou o leito no sentido ascendente e a água circulou através da camisa no sentido descendente, enquanto que nos cultivos com configuração CC (Figura 4.5 (b)) ambos escoaram no sentido ascendente. Os cultivos foram realizados em batelada clássica com tempo de processo de 3 dias, utilizando o fungo *A. niger* na concentração de 10^7 esporos/gss. O meio foi composto por BC:FT 3:7 (massa/massa) com umidade de 65 % em b.u. Essa composição foi escolhida por apresentar baixa porosidade, uma vez que é composta majoritariamente por FT. Segundo Casciadori et al. (2014), um leito composto somente por FT com 65 % de umidade possui porosidade de 0,505. Dessa maneira, a aeração é dificultada, fazendo com que o biorreator sofra sobreaquecimento, conforme desejado para a análise pretendida com esses experimentos. O BC foi acrescentado para impedir a formação de canais preferenciais de escoamento, assim como evitar sobreaquecimento excessivo, uma vez que a morte do microrganismo não era desejada.

Em cada módulo fermentativo, foram colocados 195 gss seguindo a técnica LP. A temperatura da água da camisa foi de 30 °C e a vazão do ar percolante foi de 350 L/h. Durante esses cultivos, foi realizado o monitoramento *online* da temperatura e, ao final do processo, foi determinada a atividade de endoglucanase do extrato obtido conforme será descrito no item 4.5.

4.3.4. Avaliação do efeito do modo de operação no desempenho do biorreator

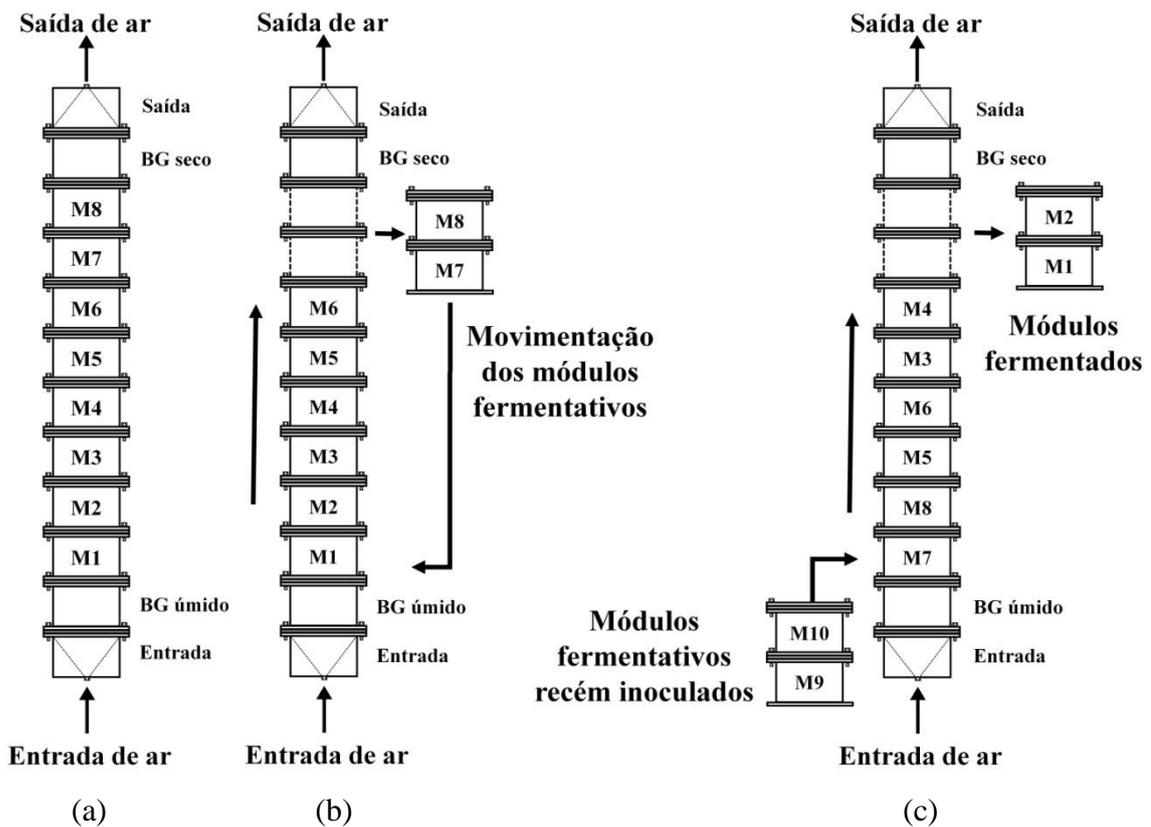
Para avaliar o efeito dos modos de operação no desempenho do biorreator, foi empregado o fungo *M. thermophila* na concentração de 10^6 esporos/gss. A proporção de substrato foi de 7:3 BC:FT (m/m) com umidade de 75 % (b.u.), cuja massa seca empacotada em cada módulo fermentativo foi de 130 g, utilizando a técnica LP. Os cultivos foram conduzidos com temperatura da água da camisa igual a 45 °C e vazão de ar de 350 L/h. O tempo de processo dos cultivos em batelada foi de 4 dias, enquanto que dos cultivos em modo contínuo foi de 16 dias. Em ambos os casos, o tempo de cultivo foi de 4 dias.

Inicialmente, foram avaliados os modos de operação batelada clássica e contínuo com uma altura máxima da zona fermentativa equivalente a 4 módulos (45,2 cm). Desse modo, ao final da batelada clássica, foram obtidos 4 módulos fermentados. Por outro lado, ao final do modo contínuo, foram obtidos 12 módulos fermentados, uma vez que o tempo de cultivo do microrganismo empregado foi de 4 dias. A movimentação dos módulos fermentativos no processo contínuo foi realizada da mesma forma representada pela Figura 4.4 (c), com os módulos recém inoculados sendo acrescentados sempre no topo da zona fermentativa.

Durante esses cultivos, foi realizada a aquisição *online* de temperatura e, ao final, foi obtido o extrato enzimático, no qual se fez análise da atividade endoglucanase. Além disso, foi determinada a umidade final dos sólidos fermentados.

Posteriormente, foram avaliados, em duplicata, os três modos de operação (batelada clássica, batelada com movimentação e contínuo) com altura máxima da zona fermentativa correspondente a 8 módulos (90,4 cm), como mostra a Figura 4.6, tendo-se obtido 8 e 24 módulos fermentados ao final das bateladas e da operação contínua, respectivamente.

Figura 4.6: Representação esquemática dos modos de operação batelada clássica (a), batelada com movimentação (b) e contínuo (c) para 8 módulos fermentativos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Na batelada com movimentação, foram movimentados 2 módulos conjuntamente a cada 24 horas, como mostra a Figura 4.6 (b). No modo contínuo, foram acrescentados 2 módulos fermentativos a cada 24 horas, de forma que, após os primeiros 4 dias de processo, passou-se também a retirar 2 módulos por dia, até que, a partir do 12^o dia, os módulos fermentativos foram apenas retirados e não mais acrescentados. Nesse caso, ao contrário do

que foi feito no processo contínuo com 4 módulos fermentativos, os módulos foram acrescentados sempre na base da zona fermentativa, como mostra a Figura 4.6 (c). Dessa forma, todos os módulos fermentativos receberam ar fresco nas suas primeiras 24 horas na coluna.

Durante os cultivos em maior escala, foi realizada a aquisição *online* de temperatura e de concentração de CO₂ ao longo do processo, e ao final foram determinadas a atividade de endoglucanase do extrato enzimático e a umidade final do material fermentado. A enzima endoglucanase foi escolhida como indicador devido a sua importância fundamental na etapa de hidrólise enzimática da cadeia produtiva do etanol de segunda geração (E2G). Em adição, para o processo contínuo com 8 módulos fermentativos, também foram medidas as atividades de xilanase e FPase.

4.4. Análise respirométrica

Com intuito de estimar a produção de biomassa do fungo *M. thermophila* nos ensaios com 8 módulos fermentativos, foram realizados ajustes aos dados de CO₂ acumulado por tempo segundo os modelos de ordem zero, de primeira ordem e da equação logística, representados pelas equações 2, 3 e 4, respectivamente. O melhor ajuste foi selecionado com base no maior valor de R² (coeficiente de determinação).

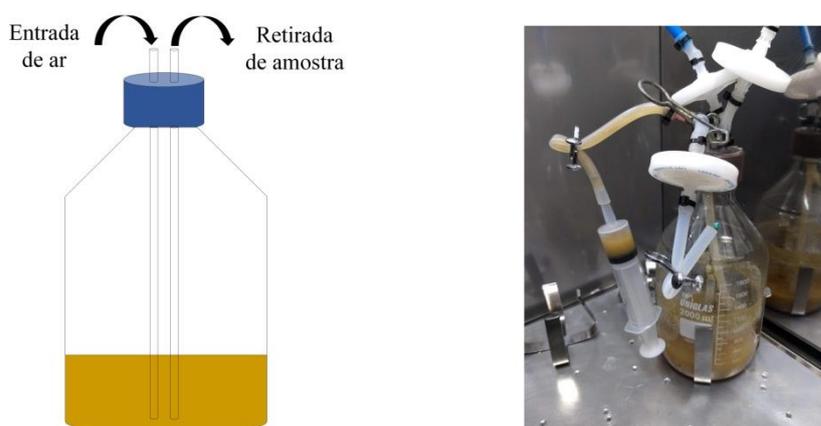
Além disso, visando obter uma relação entre produção de CO₂ e biomassa celular, foi realizado um cultivo submerso com monitoramento *online* de CO₂ e amostragem para determinação da biomassa fúngica por massa seco. Para tanto, foi utilizado um frasco Schott de 2 L contendo 600 mL de caldo com uma concentração inicial de inóculo de 10⁶ esporos/mL. A composição do caldo foi semelhante à do Agar-Sabouraud-Dextrose: 40 g/L de dextrose e 10 g/L de peptona de soja. O ar utilizado na aeração passou por filtro de algodão e em seguida por filtro HEPA na vazão de 0,6 L/min. Ao sair do frasco, o ar foi seco por uma coluna de sílica e então passou pelo sensor de CO₂.

A entrada de ar e a amostragem foram realizadas através de mangueiras que foram colocadas até o fundo do frasco, como mostra a Figura 4.7 (a). A retirada de amostras foi realizada utilizando uma seringa, sendo que antes e após esse procedimento foi injetado ar, também através de uma seringa, a fim de limpar a mangueira de amostragem e impedir a coleta de amostra não representativa. Para evitar contaminações, o sistema foi mantido vedado pelo emprego de uma tampa hermética e de pinças nas mangueiras de amostragem. Filtros HEPA foram colocados em todas as mangueiras de entrada e saída de ar, como mostra

a Figura 4.7 (b). O frasco, o caldo, os filtros e todas as mangueiras foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos previamente aos cultivos.

A agitação do meio, assim como o controle da temperatura foram realizados através de um *shaker* (incubadora com mesa de agitação orbital). A temperatura foi mantida em 45 °C e a velocidade de agitação foi de 250 rpm. O tempo total do cultivo foi de 72 h e um volume de 10 mL foi retirado nos tempos de 8,6, 13,3, 23,1, 32,6, 48,1 e 72 h de cultivo, para determinação da biomassa fúngica pelo método do peso seco, em duplicata. A partir dos dados obtidos ao longo do tempo de cultivo, foi plotado um gráfico de CO₂ acumulado por biomassa fúngica, a fim de determinar a relação entre as duas variáveis. A mesma relação foi empregada para estimar a velocidade de massa celular produzida no processo contínuo com 8 módulos fermentativos.

Figura 4.7: Sistema utilizado no cultivo submerso (a) representação ilustrativa e (b) imagem real.



Fonte: (a) Elaborado pela autora; (b) arquivo pessoal.

4.5. Extração de proteínas solúveis

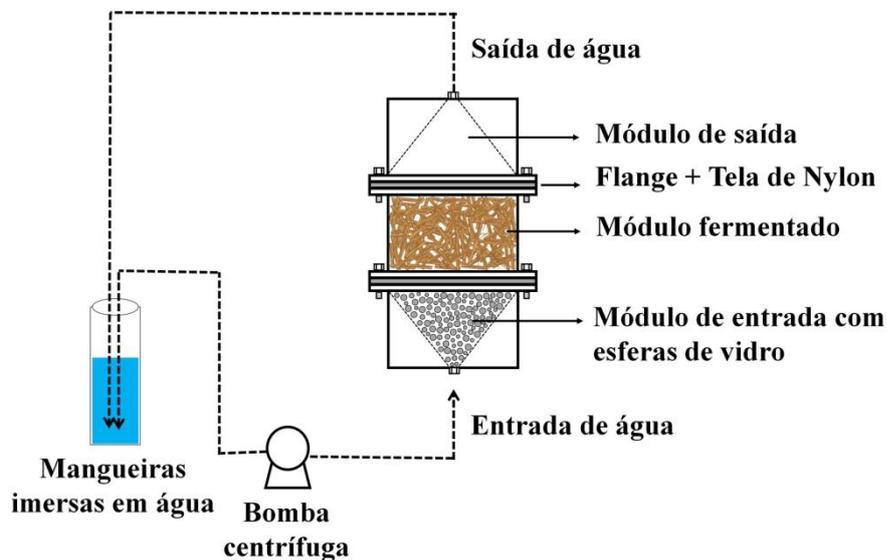
Ao final de todos os cultivos em estado sólido, foi realizada uma operação de extração sólido-líquido, para recuperação das proteínas. Para tanto, empregou-se água destilada na proporção de 10 mL/gss. Essa proporção, também empregada por Klaic et al. (2018), foi escolhida em razão de permitir a obtenção de um extrato com alta concentração de enzimas, sem prejudicar a eficiência da extração. A água e todo o material sólido fermentado (contido em cada embalagem, no caso dos cultivos em frascos, ou em cada módulo, no caso dos cultivos em BLE) foram misturados e agitados manualmente durante 10 minutos em

embalagens de polipropileno. Este processo foi denominado extração tipo tanque de mistura, como descrito por Oliveira et al. (2020).

Nos ensaios em BLE com *A. niger* em que foi estudado o efeito da configuração de escoamento da água na camisa e do ar percolante através do leito, também foi avaliado um sistema de extração de proteínas solúveis por percolação forçada de líquido através do material cultivado. Para isso, foram empregados os mesmos módulos do biorreator.

O sistema consistiu em um módulo de entrada, um módulo intermediário, contendo o material a ser extraído, e um módulo de saída. Logo, a extração foi realizada empregando um módulo por vez, como mostra a Figura 4.8. O módulo de entrada foi preenchido com esferas de vidro, a fim de distribuir o líquido através da seção transversal do leito. A flange de separação entre os módulos de entrada e o intermediário foi modificada pela colagem de uma tela de nylon e do acoplamento de uma placa perfurada de metal, para evitar o arraste das esferas de vidro pelo líquido. A placa e a tela também foram adicionadas à flange do módulo de saída, evitando a movimentação do substrato para fora do sistema.

Figura 4.8: Representação esquemática do sistema de extração por percolação.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após a montagem do aparato, foi realizada a recirculação, com auxílio de uma bomba centrífuga, de 3,5 L de água destilada, a qual foi mantida dentro de um tubo de PVC. Esse volume foi o mínimo suficiente para impedir a entrada de ar no sistema. Dessa forma, a proporção de água e substrato seco foi de 26,9 mL de água destilada/gss. As vazões e o tempo

de percolação testados foram escolhidos com base no estudo preliminar de Oliveira et al. (2020), que mostrou que, para vazões e tempos de percolação maiores, a extração é mais eficiente. As combinações de tempo e vazão testadas estão apresentadas na Tabela 4.4. Finalizada a percolação de líquido, o sólido também foi submetido à extração convencional em embalagem de polipropileno tipo tanque de mistura por 10 minutos, a fim de recuperar as proteínas que eventualmente não haviam sido extraídas por percolação, permitindo assim verificar a eficiência do sistema de extração proposto.

Tabela 4.4: Tempo e vazão das extrações de proteínas por percolação.

Estratégia de extração	Vazão de água destilada (L/h)	Tempo de percolação (h)
Estratégia 1	60	2
Estratégia 2	2400	0,5

Ao final de todas as extrações, foi realizada a filtração dos extratos em tecido TNT e, em seguida, a centrifugação a 10000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos às análises de proteínas solúveis e de atividade de endoglucanase.

4.6. Determinações analíticas

4.6.1. Concentração de proteínas solúveis

A concentração de proteínas solúveis foi analisada pelo método modificado de Bradford (1976), no qual 20 µL das amostras de extrato reagiram com 1 mL do reagente de Bradford por 5 minutos a temperatura ambiente. A concentração de proteínas foi determinada por espectrofotometria a 595 nm, utilizando uma curva-padrão do reagente de Bradford com solução de soro albumina bovina.

4.6.2. Atividade de endoglucanase, xilanase e papel de filtro

As atividades enzimáticas de endoglucanase (CMCase) e xilanase foram determinadas de acordo com os métodos adaptados de Ghose (1987) e Ghose e Bisaria (1987), respectivamente, reagindo-se 0,1 mL de solução enzimática e 0,9 mL de solução de substrato, quais sejam, respectivamente, carboximetilcelulose (CMC) e xilana. A reação ocorreu em banho termostático a 60 e 45 °C para os extratos de *M. thermophila* e de *A. niger*, respectivamente, por 10 minutos, sendo interrompida por adição de 1 mL do reagente DNS (ácido-1,3-dinitrosalicílico). Nos tubos controles, o extrato enzimático foi adicionado depois

do DNS.

A quantificação dos açúcares redutores liberados foi realizada segundo a metodologia de Miller (1959). A solução foi mantida em banho de água em ebulição por 10 minutos, após o que foi imediatamente transferida para banho de gelo, para interromper a reação com DNS. Durante a ebulição, o reagente DNS, ao reagir com os açúcares redutores presentes no meio, altera sua coloração inicialmente amarela para tons castanhos. A intensidade de cor após fervura é diretamente proporcional à concentração de açúcares no meio. Por fim, foram adicionados 8,0 mL de água destilada e foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm. A curva-padrão para determinar a atividade de endoglucanase foi realizada com uma solução de glicose, enquanto que a curva-padrão para determinar a atividade de xilanase foi realizada com uma solução de xilose.

A atividade papel de filtro ou FPase foi quantificada seguindo-se a metodologia empregada por Pinto (2010). Como substrato da reação, foi utilizado papel de filtro Whatman nº1 cortado em tiras 1 x 6 cm (50 mg) imerso em 0,9 mL de tampão acetato 0,2 M (pH 5,0) e 0,1 mL de extrato enzimático bruto. A reação se deu em banho termostático com agitação a 60 °C para os extratos do fungo *M. thermophila* por 60 minutos, sendo paralisada por 1,0 mL de DNS. O restante do procedimento foi similar ao exposto para a determinação da atividade endoglucanase.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose ou xilose por minuto de reação por mL de enzima. Com base no volume de água utilizado para extração das enzimas, na massa de substrato empacotado e na curva-padrão do DNS empregado, os resultados das atividades enzimáticas foram convertidos em unidades por grama de substrato seco (U/gss).

4.6.3. Umidade

Para determinar a umidade final dos sólidos fermentados, foi utilizado um analisador de umidade por infravermelho da marca Bel Engineering, no qual foram colocados 2 g de amostra, os quais foram secos até 0,1 % de umidade a 110 °C. A amostragem foi feita coletando-se, de forma randômica, uma pequena porção do material contido em cada módulo do BLE, já depois de o fermentado ter sido transferido para a embalagem de extração.

4.6.4. Biomassa celular

Ao longo dos testes de cultivo submerso (descritos no item 4.4), a biomassa celular foi determinada através da pesagem da massa seca retida em papel de filtro qualitativo. Os papéis

de filtro qualitativos foram secos em estufa a 60 °C por 24 horas, posteriormente foram esfriados até a temperatura ambiente dentro de um dessecador, a fim de evitar o ganho de umidade, e pesados em balança analítica com precisão de 4 casas decimais. Então, um volume de 4 mL de amostra foi passado pelo papel de filtro qualitativo, com o auxílio de uma bomba que promoveu vácuo. Por fim, os papéis contendo o sólido retido das amostras filtradas foram novamente secos e pesados. A biomassa celular foi obtida pela diferença entre a massa do papel de filtro qualitativo antes e após a filtragem de 4 mL de amostra.

4.7. Análises estatísticas

O software Minitab® 16 (Minitab Inc., State College, USA) foi utilizado para realizar as análises de variância (ANOVA) e as comparações entre médias pelo teste de Tukey, com um nível de confiança de 95 %.

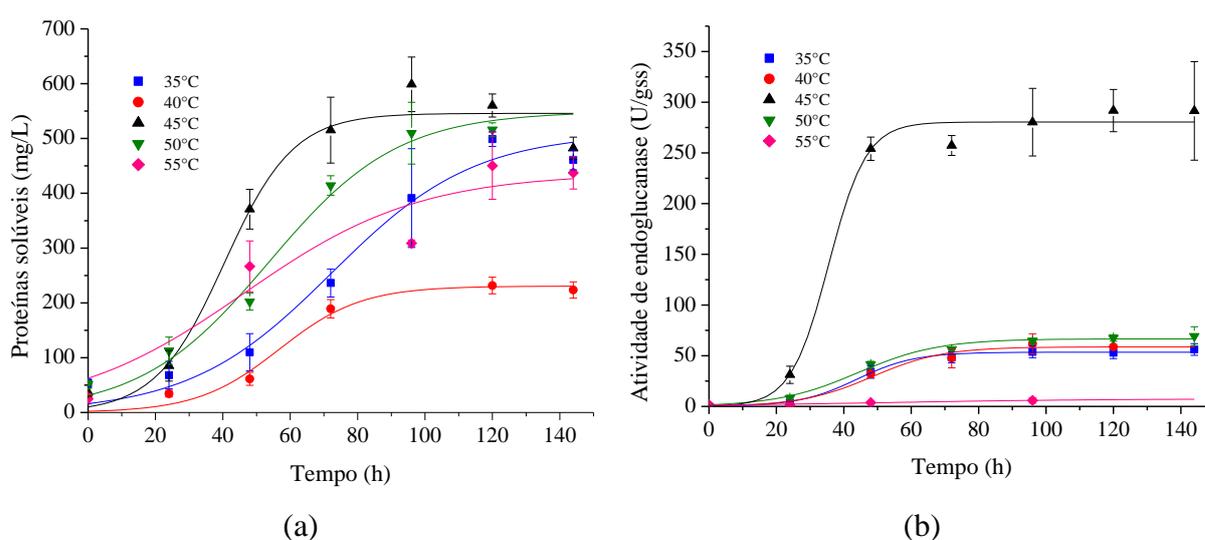
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivos em estado sólido em embalagens plásticas

5.1.1. Cinética de crescimento de *M. thermophila* em cultivo em estado sólido e efeito da temperatura

As Figuras 5.1 (a) e (b) apresentam ajustes da equação da logística para concentração de proteínas solúveis e atividade de endoglucanase, respectivamente. Dentre os três modelos testados (ordem zero, primeira ordem e equação da logística), a equação logística foi a que melhor descreveu os pontos experimentais em todas as temperaturas estudadas. Os maiores valores de concentração de proteínas solúveis e atividade de endoglucanase foram 598,82 mg/L e 291,75 U/gss, respectivamente, ambos obtidos na temperatura de incubação de 45 °C. Essa temperatura favoreceu principalmente a produção de endoglucanase, pois foi observada uma diferença maior que 200 U/gss em relação às demais. A produção de endoglucanase foi acentuada nas primeiras 48 horas de cultivo e praticamente se estabilizou após 96 horas, evidenciando que a produção foi associada ao crescimento.

Figura 5.1: Ajuste da equação da logística aos pontos experimentais do cultivo em estado sólido de *M. thermophila* para (a) concentração de proteínas solúveis e (b) atividade de endoglucanase.



As Tabelas 5.1 e 5.2 apresentam os valores das velocidades específicas de produção de proteínas solúveis (μ_{ps}) e de endoglucanase (μ_{ae}), respectivamente. Os maiores valores de μ_{ps}

e μ_{ae} foram obtidos a 45 °C, indicando que essa temperatura, dentre as demais estudadas, é a mais favorável para o desenvolvimento do microrganismo e produção de endoglucanase. A mesma temperatura ótima e perfil de produção de endoglucanase foram relatados por Zanelato et al. (2012), que cultivou o mesmo fungo em BC:FT 7:3. Diante disso, a temperatura de 45 °C e o tempo de 96 horas foram aplicados nos cultivos em BLE com *M. thermophila*.

Tabela 5.1: Constante de velocidade específica de produção de proteínas solúveis (μ_{ps}) de acordo com o ajuste da equação da logística.

Temperatura (°C)	μ_{ps} (h ⁻¹)	Coefficiente de regressão (R ²)
35	0,047 ± 0,011	0,978
40	0,082 ± 0,028	0,966
45	0,098 ± 0,027	0,993
50	0,052 ± 0,010	0,970
55	0,039 ± 0,026	0,917

Tabela 5.2: Constante de velocidade específica de atividade de endoglucanase (μ_{ae}) de acordo com o ajuste da equação da logística.

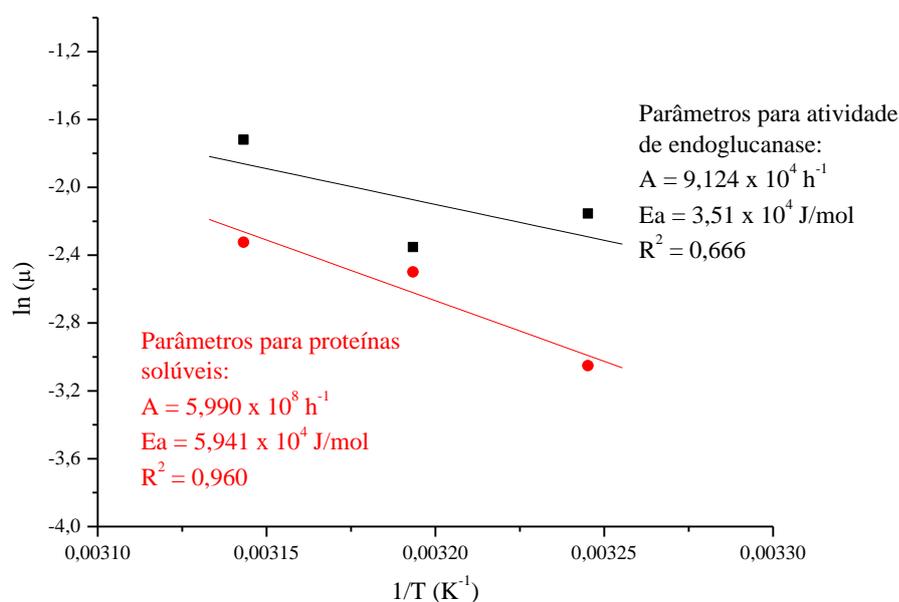
Temperatura (°C)	μ_{ae} (h ⁻¹)	Coefficiente de regressão (R ²)
35	0,116 ± 0,020	0,994
40	0,095 ± 0,034	0,980
45	0,179 ± 0,033	0,992
50	0,084 ± 0,014	0,991
55	0,031 ± 0,019	0,969

Para as temperaturas estudadas maiores que 45 °C (50 e 55 °C), observa-se que os valores de μ_{ps} e μ_{ae} para concentração de proteínas solúveis e atividade de endoglucanase passam a decair. Dessa forma, pode-se afirmar que as temperaturas de 50 e 55 °C correspondem à zona de desativação térmica do crescimento do fungo, ou seja, a partir de 50 °C, o aumento da temperatura causa a diminuição da velocidade específica de reação. As constantes obtidas a 50 °C correspondem a aproximadamente 53 e 47 % das constantes a 45 °C para proteínas solúveis e atividade de endoglucanase, respectivamente. Portanto, visando evitar prejuízos aos microrganismos e queda na produção de hemicelulases, deve-se evitar

atingir a temperatura de 50 °C ou maiores, inclusive nos cultivos em biorreatores. Para determinar o ponto de inflexão com mais exatidão, é interessante que em trabalhos futuros sejam exploradas mais temperaturas entre 45 e 50 °C.

Considerando as constantes obtidas a 35, 40 e 45 °C, que são as constantes referentes à zona de ativação térmica (aumento da velocidade de reação com o aumento da temperatura), foi ajustado o modelo de Arrhenius linearizado, conforme apresenta a Figura 5.2, na qual também constam os valores dos parâmetros do modelo. Os valores de E_a e A empregados por Casciadori et al. (2016) simulando o cultivo sólido de *M. thermophila* no mesmo substrato aqui empregado para a zona de ativação térmica foram $7,02 \times 10^4$ J/mol e $2,69 \times 10^{11}$ h⁻¹, respectivamente. Logo, o valor da E_a obtida neste trabalho condiz com a empregada na simulação, já o valor de A difere em várias ordens de grandeza, tanto para proteínas totais solúveis, quanto para endoglucanase. Todavia, os valores utilizados por Casciadori et al. (2016) foram adaptados de Saucedo-Castañeda et al. (1990), que simularam transferência de calor no cultivo sólido de *A. niger* em FT, o que reitera a necessidade de conduzir experimentos cinéticos específicos para cada bioprocessos.

Figura 5.2: Ajuste da equação de Arrhenius linearizada descrevendo o efeito da temperatura sobre as constantes específicas de taxa de produção de proteínas e de atividade endoglucanase.



Esses parâmetros serão utilizados nos trabalhos futuros de modelagem e simulação do processo contínuo em BLE aqui estudado, assim como permitem inferir sobre o efeito das temperaturas experimentadas nos BLEs sobre os rendimentos dos cultivos neste trabalho.

5.1.2. Avaliação de um método alternativo de inoculação

A Tabela 5.3 apresenta os resultados da inoculação direta com solução líquida de esporos, bem como da inoculação sólido-sólido para as três estratégias estudadas. Analisando em um primeiro momento os resultados para inoculação líquida, observa-se que houve diferença significativa segundo o teste de Tukey, com nível de confiança de 95 %, entre os dois meios de cultivo. A atividade de endoglucanase e a concentração de esporos foram maiores para o meio com proporção BC:FT 7:3, já a concentração de proteínas foi maior para o meio composto somente por FT. Cabe lembrar que a quantidade de esporos inoculada foi 10^6 esporos/gss.

Tabela 5.3: Atividade de endoglucanase, concentração de proteínas solúveis e concentração de esporos obtidas após o cultivo sólido de *M. thermophila* por inoculação líquida com suspensão de esporos e por inoculação sólido-sólido.

Substrato	Atividade de endoglucanase (U/gss)	Proteínas solúveis (mg/L)	Concentração de esporos (esporos/mL)
Inoculação líquida com suspensão de esporos			
BC:FT 7:3 (10 gss)	242,9 ± 0,6 ^a	289,3 ± 29,4 ^b	1,8x10 ⁸ ± 3,5x10 ^{6a}
FT (10 gss)	136,9 ± 23,7 ^b	436,0 ± 20,6 ^a	4,0x10 ⁷ ± 7,1x10 ^{6b}
Inoculação sólido-sólido			
Estratégia 1 - BC:FT 7:3 para BC:FT 7:3 (100 gss)	92,6 ± 17,6 ^{bc}	-	1,1x10 ⁸ ± 1,3x10 ^{7c}
Estratégia 2 - FT para FT (100 gss)	55,5 ± 10,1 ^c	-	4,9x10 ⁷ ± 4,6x10 ^{6c}
Estratégia 3 - FT para BC:FT 7:3 (100 gss)	58,1 ± 14,6 ^c	-	3x10 ⁷ ± 3,5x10 ^{6c}

* Letras minúsculas diferentes e letras minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as estratégias de inoculação, respectivamente.

De acordo com a Tabela 5.4, o BC tem maior fração de celulose do que o FT, o que é vantajoso para induzir a produção de celulasas. Contudo, o BC também é rico em lignina, fazendo com que seu uso como fonte de carbono seja mais difícil em comparação ao FT, o qual possui concentrações menores de celulose e lignina e é rico em proteínas e açúcares facilmente assimiláveis, como amido, o que favorece o crescimento acentuado do microrganismo e poderia explicar a maior concentração de proteínas solúveis obtida, que é uma medida indireta do crescimento da biomassa na FES. Todavia, sabendo que o próprio substrato também contém um elevado conteúdo proteico, a medida isolada da concentração de

proteínas não é suficientemente conclusiva. Nesse sentido, é interessante analisar a concentração de esporos obtida, a qual indica que o desenvolvimento do fungo, na verdade, pode ter sido mais favorecido pelo meio composto somente por FT.

Tabela 5.4: Conteúdo de celulose, hemicelulose, lignina e proteína do bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo.

Substrato	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Proteína (%)
Bagaço de cana-de-açúcar	46,62	26,51	21,7	1,52
Farelo de trigo	10,86	28,88	4,89	17,61

Fonte: Rodríguez-Zúñiga et al. (2011).

De fato, ainda que a composição do FT propicie boas condições de crescimento, trata-se de um meio mais compacto, no qual a aeração é dificultada; conseqüentemente, o desenvolvimento do fungo, que é dependente de oxigênio, é prejudicado. De acordo com Casciadori et al. (2014), a porosidade de um leito empacotado com a técnica *loose packing* LP para um meio composto somente por FT com 55 % de umidade é de 0,545, enquanto que para um meio composto por BC:FT 7:3 com 75 % de umidade é de 0,764. Perez et al. (2020) cultivaram *M. thermophila* em um leito composto por BC e FT em diferentes porosidades e observaram que as maiores atividades enzimáticas ocorreram em leitos com maior porosidade. Por essas razões, a maior atividade de endoglucanase ocorreu no meio composto por BC:FT 7:3.

O prejuízo causado pela falta de oxigênio no crescimento do fungo fica evidente na Figura 5.3 (b). A parte mais escura vista no canto inferior esquerdo da embalagem plástica apresenta somente a cor do substrato (FT) úmido. O restante, com coloração esbranquiçada, mostra o substrato colonizado pelo microrganismo, como visto na Figura 5.3 (a). Neste caso, não foi observado nenhum ponto com ausência de crescimento, o que é devido à presença do BC na composição da matriz, proporcionando maior fração de vazios ao meio e, portanto, favorecendo a oxigenação mais homogênea.

Diante desses resultados para inoculação líquida, optou-se por verificar somente a atividade de endoglucanase e a concentração de esporos para os experimentos de inoculação sólido-sólido, visto que os resultados de proteínas solúveis são fortemente influenciados pela composição do substrato.

Figura 5.3: Aspecto do crescimento do fungo *M. thermophila* após 96 h de cultivo com inoculação líquida de esporos para os meios contendo (a) BC:FT 7:3 e (b) FT.



Fonte: Arquivo pessoal.

Conforme a Tabela 5.3, todas as estratégias de inoculação sólido-sólido apresentaram valores de atividade de endoglucanase e de concentração de esporos significativamente menores que a inoculação líquida no meio composto por BC:FT 7:3. Por outro lado, em relação à inoculação líquida no meio composto por FT, a estratégia 1 apresentou uma concentração de esporos significativamente maior e uma produção de endoglucanase sem diferença significativa. As demais estratégias mostraram atividades de endoglucanase significativamente menores.

Quanto à concentração de esporos, as estratégias 2 e 3 apresentaram valores significativamente superiores e inferiores ao da inoculação líquida no meio composto por FT, respectivamente. Todavia, comparando as três estratégias entre si, não houve diferença significativa para as duas variáveis resposta avaliadas.

Dessa maneira, pode-se afirmar que a estratégia 1 apresentou os melhores resultados, o que pode estar relacionado com a maior atividade de endoglucanase no sólido fermentado utilizado como inóculo e também com a maior oxigenação proporcionada pelo meio BC:FT 7:3. Contudo, tendo em vista que no cultivo de interesse do presente estudo é utilizada a proporção de substrato BC:FT 7:3, o ideal seria que a estratégia 1 tivesse apresentado resultados iguais ou significativamente superiores aos da inoculação líquida em BC:FT 7:3. Sendo assim, nenhuma das 3 estratégias avaliadas apresentaram resultados satisfatórios o suficiente para que a técnica de inoculação sólido-sólido fosse empregada nos ensaios deste trabalho.

Todavia, com o intuito de verificar o quanto o fungo foi capaz de se desenvolver através desse método alternativo de inoculação, os resultados foram avaliados em termos absolutos, ou seja, foram determinadas as quantidades totais de endoglucanase e de esporos

em cada embalagem. Para isso, os valores de atividade de endoglucanase foram multiplicados pela massa seca contida em cada embalagem, e os valores de concentração de esporos foram multiplicados pelo volume de água destilada utilizado na extração. Cabe salientar que não necessariamente a quantidade de esporos aqui apresentada se refere realmente ao total produzido, uma vez que não é possível garantir que todos os esporos tenham se despreendido da matriz sólida. Contudo, para fins de comparação, os valores são válidos, uma vez que todos foram submetidos ao mesmo método de extração.

Feito isso, foi observado que o microrganismo foi capaz de se desenvolver através da mistura entre substratos sólidos fermentados e não fermentados, visto que as produções totais de endoglucanase e de esporos foram maiores do que as obtidas nos cultivos por inoculação de suspensão líquida de esporos, como mostram as Figuras 5.4 e 5.5, respectivamente. A estratégia 1 foi a que proporcionou os maiores valores absolutos, com um aumento de 3,8 e 5,9 vezes para a atividade de endoglucanase e para o número de esporos, respectivamente.

Figura 5.4: Valores absolutos da atividade de endoglucanase obtidos ao final dos cultivos em estado sólido de *M. thermophila* com inoculação líquida e inoculação sólido-sólido.

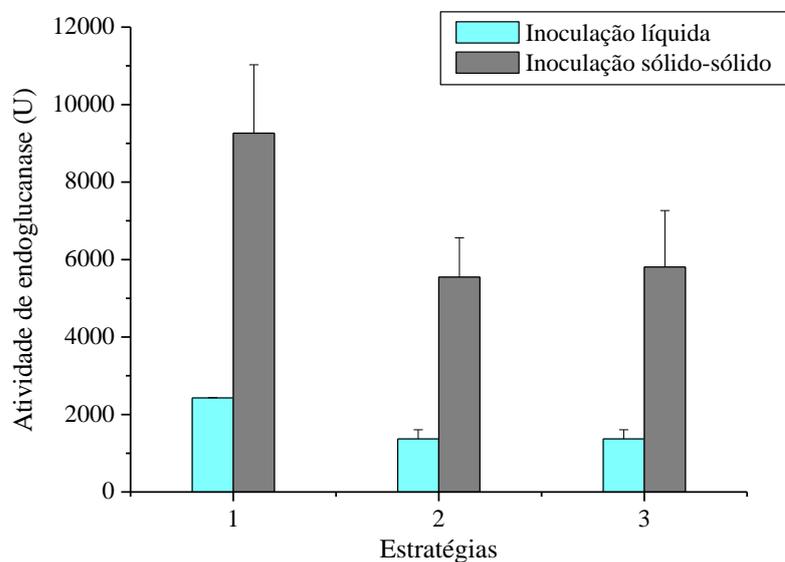
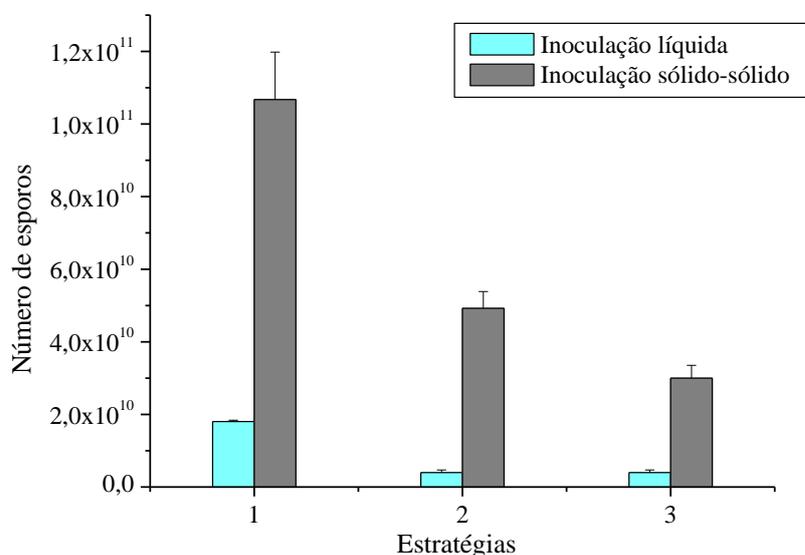


Figura 5.5: Valores absolutos do número de esporos obtidos ao final dos cultivos em estado sólido de *M. thermophila* com inoculação líquida e inoculação sólido-sólido.



Conforme mencionado no item 3.2.2., Cerda et al. (2016) realizaram cultivos em estado sólido empregando *Thermomyces* sp em bateladas em série, fazendo com que parte do sólido fermentado obtido em cada batelada fosse usado como inóculo da batelada seguinte na proporção de 10 % m/m. Diferentemente dos resultados aqui apresentados, os autores reportaram um aumento da atividade de amilase de 500 % para a estratégia de inoculação em que foi empregado o sólido fermentado correspondente ao final da batelada anterior, que foi a mesma estratégia aqui adotada. O processo de mistura entre os sólidos fermentados e não fermentados pode ser uma das possíveis razões para tal discrepância, uma vez que, as células vegetativas podem ter sofrido injúrias. Outro fator que pode ter colaborado para os resultados da inoculação sólido-sólido terem sido inferiores ao da inoculação líquida é a baixa disponibilidade de oxigênio nas embalagens contendo 100 gss. Dessa forma, é interessante que sejam realizados testes de inoculação sólido-sólido no BLE com aeração, conforme descrito no item 7.

Em especial, a inoculação sólido-sólido pode trazer vantagens importantes para o modo de operação contínuo desenvolvido no presente trabalho, visto que é necessário realizar a etapa de inoculação a cada adição de um novo módulo. Além dos ganhos em praticidade, o método alternativo de inoculação pode diminuir os custos totais do bioprocessamento, uma vez que dispensa gastos com meios ou caldos de cultivo e com incubação.

5.2. Cultivos em estado sólido em biorreator de leito empacotado

5.2.1. Efeito do sentido de escoamento da água da camisa de resfriamento e do ar percolante sobre o desempenho do biorreator

As Figuras 5.6 e 5.7 apresentam os perfis de temperatura em duplicata dos cultivos em configuração de escoamento de água pela camisa e de ar percolante co-corrente e contracorrente, respectivamente.

Figura 5.6: Perfis de temperatura em duplicata do cultivo em estado sólido de *A. niger* em BLE na composição BC:FT 3:7 para a configuração de escoamento de fluidos co-corrente.

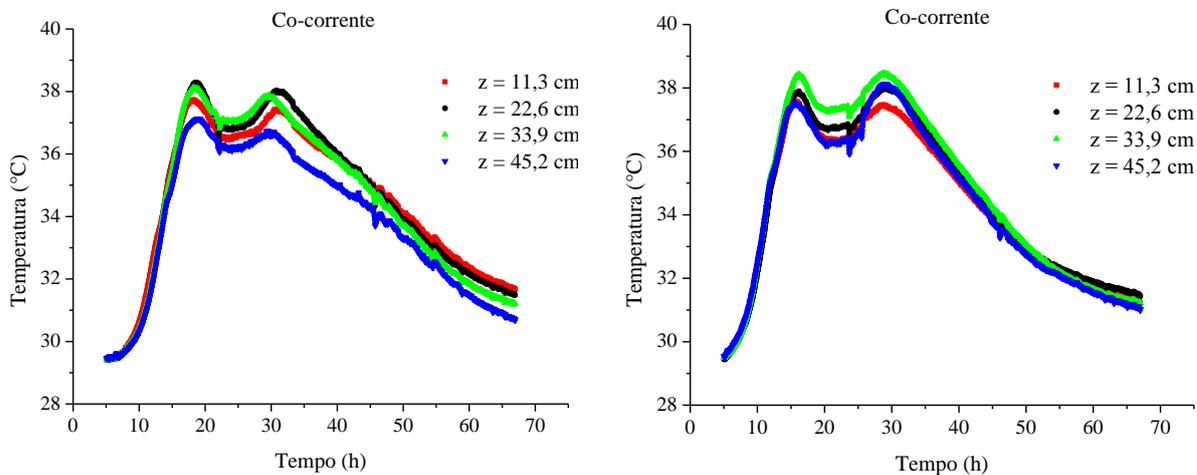
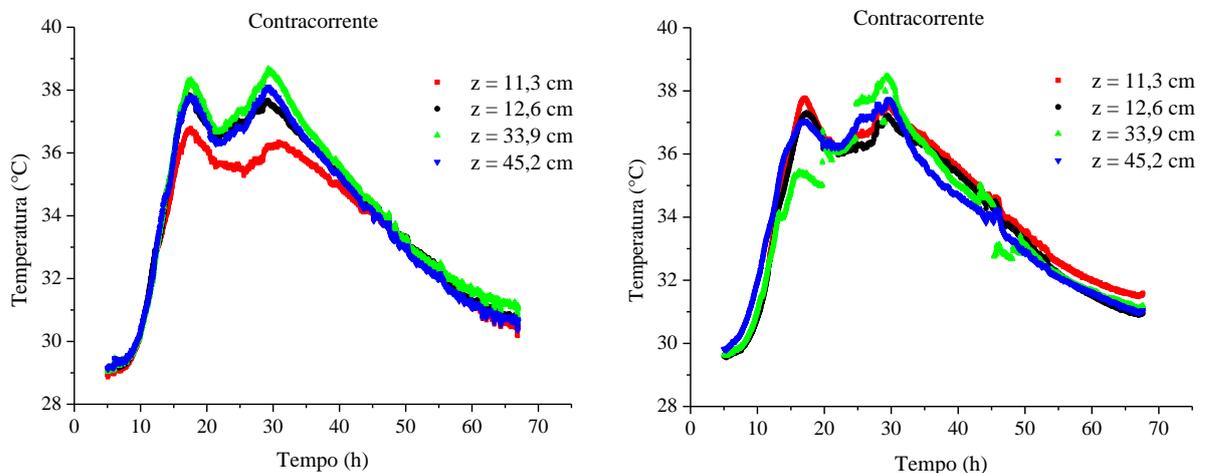


Figura 5.7: Perfis de temperatura em duplicata do cultivo em estado sólido de *A. niger* em BLE na composição BC:FT 3:7 para a configuração de escoamento de fluidos contracorrente.



Esses ensaios foram realizados em um BLE com um comprimento da seção fermentativa de 45,2 cm empregando *A. niger* como inóculo. Os perfis de temperatura obtidos indicam um possível crescimento diáuxico, evidenciado pelos dois picos de temperatura, o primeiro em torno de 15 h e o segundo em torno de 30 h de cultivo. Tal comportamento decorre, provavelmente, da composição do substrato, que contém uma fonte de carbono facilmente assimilável (FT) e uma fonte complexa (BC). Depois de consumir inicialmente FT, o fungo tem de passar por uma segunda fase lag, até adaptar-se ao consumo de BC.

As médias das temperaturas máximas registradas foram 38,3 e 38,6 °C para as configurações co-corrente e contracorrente, respectivamente, e ambas se deram na posição $z = 33,9$ cm, como mostra a Tabela 5.5, que apresenta as temperaturas máximas, médias e a atividade de endoglucanase para cada configuração e posição axial do BLE. Todavia, não houve diferença significativa entre as temperaturas máximas ao longo do comprimento do biorreator, nem entre as temperaturas máximas das duas configurações de escoamento para cada posição, segundo o teste de Tukey, evidenciando que a mudança no sentido do escoamento dos fluidos não teve influência significativa nos picos de temperatura.

Tabela 5.5: Atividade de endoglucanase, temperaturas médias e temperaturas máximas registradas nos cultivos de *A. niger* em BLE na composição BC:FT 3:7 para as configurações de escoamento co-corrente e contracorrente.

Posição axial (cm)	Configuração de escoamento	Temperatura média (°C)	Temperatura máxima (°C)	Atividade de endoglucanase (U/gss)
11,3	Co-corrente	34,4 ± 0,2 ^{aAα}	37,7 ± 0,1 ^{aAα}	15,3 ± 1,2 ^{aAα}
	Contracorrente	33,9 ± 0,5 ^{aAα}	37,3 ± 0,7 ^{aAα}	16,0 ± 2,5 ^{aAα}
22,6	Co-corrente	34,6 ± 0,0 ^{bAα}	38,2 ± 0,2 ^{aAα}	17,4 ± 3,6 ^{aAα}
	Contracorrente	34,1 ± 0,1 ^{aAα}	37,6 ± 0,4 ^{aAα}	11,7 ± 2,3 ^{aAα}
33,9	Co-corrente	34,6 ± 0,2 ^{aAα}	38,3 ± 0,2 ^{aAα}	18,0 ± 1,9 ^{aAα}
	Contracorrente	34,2 ± 0,3 ^{aAα}	38,6 ± 0,2 ^{aAα}	16,3 ± 1,5 ^{aAα}
45,2	Co-corrente	34,1 ± 0,4 ^{aAα}	37,6 ± 0,7 ^{aAα}	17,9 ± 4,6 ^{aAα}
	Contracorrente	34,0 ± 0,0 ^{aAα}	37,9 ± 0,3 ^{aAα}	13,1 ± 3,3 ^{aAα}

* Letras minúsculas diferentes e letras minúsculas iguais em uma mesma linha indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para cada posição entre as duas configurações de escoamento, respectivamente; letras maiúsculas diferentes e letras maiúsculas iguais em uma mesma coluna indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as posições axiais da configuração co-corrente, respectivamente; letras gregas diferentes e letras gregas iguais em uma mesma coluna indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as posições axiais da configuração contracorrente, respectivamente.

Além das temperaturas máximas, é relevante analisar as médias das temperaturas durante todo o cultivo. As maiores temperaturas médias também se deram na posição $z = 33,9$ cm, com valores de $34,6$ e $34,1$ °C para as configurações de escoamento co-corrente e contracorrente, respectivamente. Comparando os resultados das duas configurações para cada posição, houve diferença significativa apenas para a posição $z = 22,6$ cm, o que está relacionado ao baixo desvio padrão para esta posição. Todavia, cabe destacar que todas as temperaturas médias se apresentaram entre $33,9$ e $34,6$ °C, diferença menor que 1 °C, confirmando que o sentido do escoamento de água na camisa não influenciou a temperatura do biorreator. Logo, confirma-se como apropriada a condição de contorno de temperatura constante na parede de BLEs, comumente empregada em estudos de transferência de calor na FES para esse tipo de equipamento (MITCHELL et al., 2010; CASCIATORI et al., 2016; PEREZ et al., 2019).

Quanto às atividades de endoglucanase dos extratos, não houve diferença significativa entre as duas configurações de escoamento e ao longo do comprimento do biorreator, o que condiz com os resultados com respeito ao perfil térmico. Portanto, o rendimento do bioprocessamento também não foi afetado pela configuração de escoamento. Dessa forma, optou-se por realizar todos os demais cultivos em contracorrente, uma vez que é a configuração de escoamento que proporciona a menor perda de carga.

5.2.2. Efeito do modo de operação no desempenho do biorreator

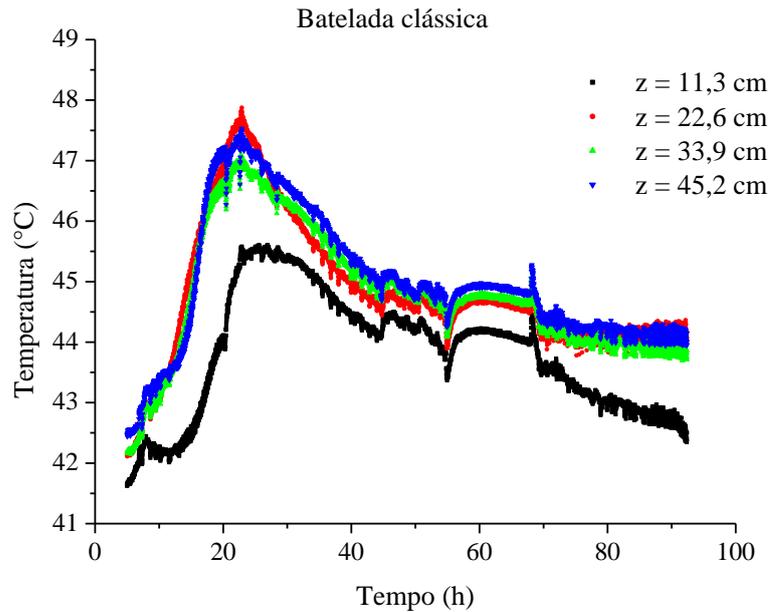
Conforme mencionado anteriormente, o estudo do efeito do modo de operação no desempenho do BLE foi realizado empregando o fungo *M. thermophila* I-1D3b na proporção de substrato de BC:FT 7:3. Para apresentação dos resultados, os módulos fermentativos foram denominados com a inicial M seguida de um número, de acordo com a Figura 10. Já os módulos acessórios contendo BG seco e úmido foram denominados como BGs e BGu, respectivamente.

5.2.2.1. Cultivos com 4 módulos fermentativos

A Figura 5.8 apresenta os perfis de temperatura do cultivo em batelada clássica com 4 módulos fermentativos no BLE, na qual observa-se que, por volta de 23 h, houve um pico de temperatura. Além disso, houve diferenças nas temperaturas de acordo com a posição axial do equipamento e com o tempo. Na posição $z = 11,3$ cm, que é a mais próxima da entrada de ar, as temperaturas foram mais baixas em relação às demais durante todo o tempo de cultivo e o sobreaquecimento foi pouco pronunciado. Isso pode ser atribuído ao contato direto desse

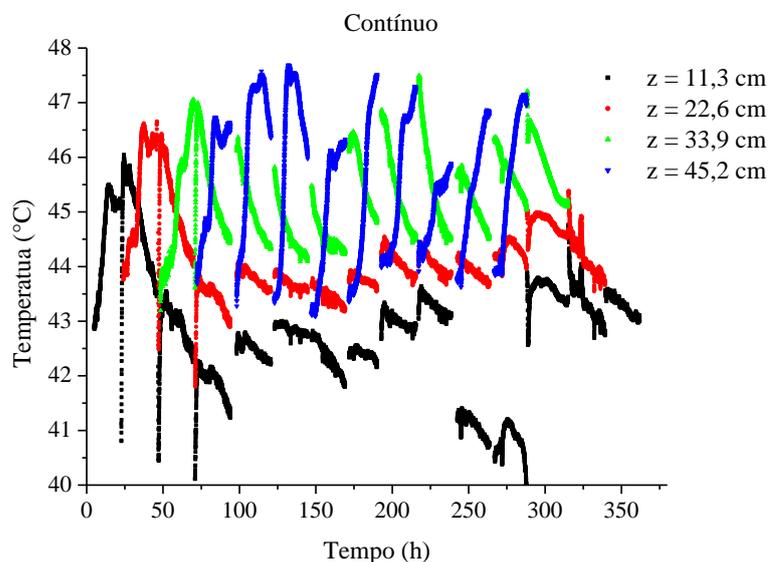
módulo fermentativo com ar fresco, ou seja, ar que ainda não transporta o calor metabólico gerado. Gowthaman et al. (1993), Mazzutti (2009), Zanelato (2011) e Perez et al. (2019) também observaram temperaturas menores na posição mais baixa do leito.

Figura 5.8: Perfis de temperatura do cultivo em estado sólido em BC:FT 7:3 de *M. thermophila* em BLE com 4 módulos fermentativos em batelada clássica.



Por outro lado, no processo contínuo, após um período inicial transiente de 96 h (correspondente ao período em que os módulos fermentativos estavam sendo apenas acrescentados), foi atingida uma condição típica de operações em estado estacionário, na qual os perfis de temperatura apresentaram um comportamento repetitivo no decorrer do tempo para cada posição, conforme apresenta a Figura 5.9. Pode-se afirmar que, entre 96 e 288 h, período em que foi realizada a adição e a remoção de 1 módulo fermentativo a cada 24 h, o BLE se comportou como um reator de fluxo pistonado, no qual cada módulo fermentativo foi equivalente a um *cluster* que percorreu o equipamento no sentido axial descendente. Dessa forma, o tempo de cultivo entre um módulo fermentativo e outro em um dado instante de processo era diferente.

Figura 5.9: Perfis de temperatura do cultivo em estado sólido em BC:FT 7:3 de *M. thermophila* em BLE com 4 módulos fermentativos no modo de operação contínuo.



Na Figura 5.9, repetidas quedas de temperatura a cada 24 h se justificam pelo caráter intermitente da operação, pois correspondem aos momentos em que foi realizada a adição, remoção e movimentação dos módulos. Além disso, é importante observar que os picos se deram nas posições mais elevadas do biorreator, uma vez que os módulos recém inoculados foram colocados na posição $z = 45,2$ cm. Dessa forma, nas posições mais próximas da entrada ($z = 11,3$ e $z = 22,6$ cm), a amplitude de variação das temperaturas com o tempo foi menor, visto que o pico de temperatura se dá por volta de 23 h de cultivo, conforme já mencionado.

Comparando-se os resultados térmicos dos dois modos de operação, apresentados na Tabela 5.6, não houve influência sobre as temperaturas máximas e médias, visto que as diferenças observadas foram de somente 0,2 e 0,1 °C, respectivamente, menores do que a precisão assumida para os termopares (0,5 °C). Tais resultados já foram publicados por Oliveira et al. (2020) e são os únicos em âmbito experimental que avaliaram o modo de operação contínuo em BLE. Nas simulações de Mitchell et al. (2010), que consideraram o fungo *A niger* cultivado em FT em um BLE modular composto por 10 módulos de 10 cm de altura e 1 m de diâmetro, as predições indicaram que, para a operação de um BLE, no qual a temperatura do ar foi mantida a 33 °C (dada como 5 °C abaixo da temperatura ideal), a temperatura máxima poderia atingir 45,6 e 41,1 °C nas operações em batelada clássica e contínua, respectivamente, ou seja, o modo contínuo proporcionou uma redução importante da temperatura máxima prevista, que inclusive impediu a morte do microrganismo. Sendo

assim, as pequenas diferenças observadas nas temperaturas máximas entre os dois modos de operação aqui avaliados podem ser explicadas principalmente pela elevada porosidade do leito (0,764), uso de microrganismo termofílico e intervalo de movimentação adotado para o modo contínuo.

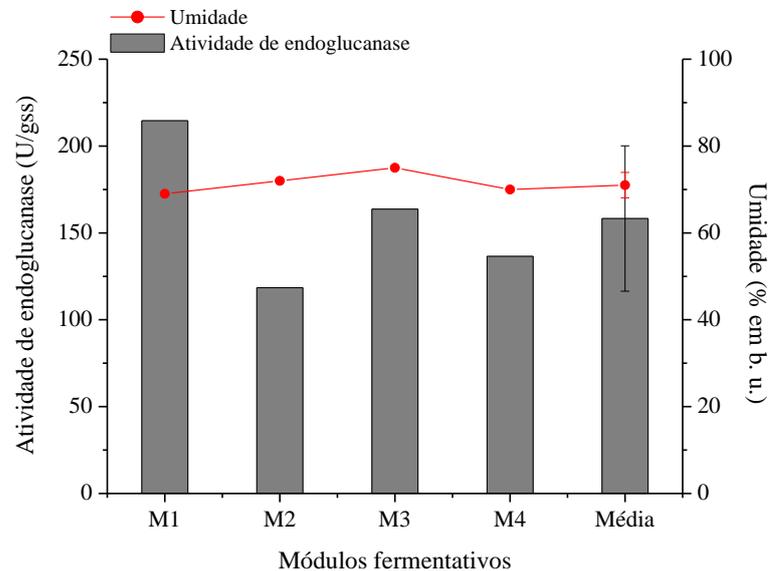
Tabela 5.6: Temperaturas máximas e médias dos cultivos em BLE com 8 módulos fermentativos empregando *M. thermophila* em BC:FT 7:3.

Modo de operação	Temperatura máxima (°C)	Temperatura média (°C)
Batelada clássica	47,9	44,6
Contínuo	47,7	44,5

Como já discutido previamente, um leito composto somente por FT possui menor porosidade do que o leito composto por BC:FT 7:3 e, portanto, está mais sujeito ao sobreaquecimento pronunciado. A dificuldade em remover o calor metabólico em leitos de baixa porosidade pode ainda ser acentuada pelo emprego de fungos mesofílicos, que tendem a gerar mais calor que fungos termofílicos. Ghildyal et al. (1994) cultivaram *A. niger* em FT em um BLE e relataram um aumento de temperatura de 15 °C. Por outro lado, Perez et al. (2020) cultivaram *M. thermophila* em um leito composto por BC e FT com porosidade de 0,55 (próxima da porosidade de um leito composto somente por FT) e relataram um aumento na temperatura de somente 2 °C. A velocidade específica de crescimento utilizada por Mitchell et al. (2010) para *A. niger* nas simulações foi 0,236 h⁻¹, enquanto que a velocidade específica de crescimento aqui determinada para *M. thermophila* a 45 °C, segundo a produção de proteínas solúveis, foi de 0,098 h⁻¹, ou seja, 2,4 vezes menor.

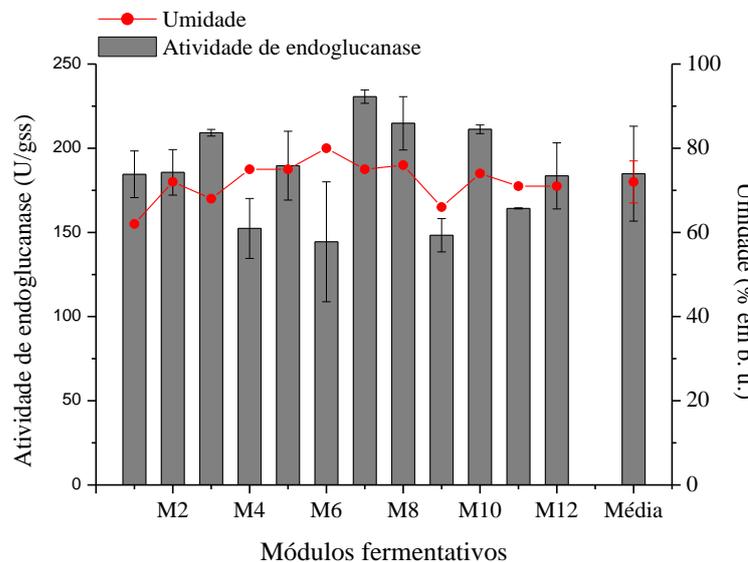
Quanto ao intervalo de movimentação, Mitchell et al. (2010) simularam a operação contínua com adição e remoção de camadas a cada 1 h, porém isso se mostrou impraticável experimentalmente, de modo que no presente trabalho os módulos de 10 cm de altura foram movimentados a cada 24 h. Como resultado, os picos de temperatura entre os dois modos de operação foram semelhantes, uma vez que, de acordo com Calixto (2019), que simulou cultivos com *M. thermophila* I-1D3b em BC:FT 7:3 em um BLE modular com as mesmas dimensões empregadas neste trabalho, quanto maior o intervalo entre uma movimentação e outra, maior a temperatura máxima atingida. Com relação à atividade de endoglucanase em cada módulo fermentativo, foram obtidos os valores apresentados nas Figuras 5.10 e 5.11 nos modos de operação batelada clássica e contínuo, respectivamente.

Figura 5.10: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em BLE com 4 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com *M. thermophila* no modo de operação batelada clássica.



*Os barras de erro das médias representam os desvios-padrão dentre os módulos fermentativos

Figura 5.11: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em BLE com 4 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com *M. thermophila* no modo de operação contínuo.



*As barras de erro das médias representam os desvios-padrão dentre os módulos fermentativos.

Os valores médios de atividade de endoglucanase foram $158,3 \pm 41,9$ U/gss e $184,9 \pm 28,2$ U/gss para batelada clássica e operação contínua, respectivamente. Observa-se que o desvio-padrão dentre os módulos fermentativos para o processo contínuo foi menor,

concordando com as predições de Mitchell et al. (2010) de que a movimentação dos módulos promove uma maior homogeneidade no biorreator. Isso se deve ao fato de que, no processo contínuo, no qual o BLE se comporta como um reator de fluxo pistonado, todos os módulos fermentativos são expostos à mesma composição gasosa e condições térmicas de acordo com o tempo de cultivo. Dessa forma, os módulos fermentados tendem a apresentar maior uniformidade entre si.

Soni et al. (2008) avaliaram o cultivo em estado sólido utilizando palha de arroz como substrato de diferentes espécies do gênero *Myceliophthora* (*Myceliophthora* sp. V2A2, *Myceliophthora fergusii* T41 e *Myceliophthora* sp. MYC) e obtiveram atividades de endoglucanase menores que 40 U/gss. Moretti (2010) cultivou *Myceliophthora* sp. M.7.7 em BC:FT 9:1 e obteve uma atividade de endoglucanase de 54 U/gss. Por outro lado, Perez et al. (2019), que cultivaram *M. thermophila* I-1D3b também em BC:FT 7:3, relataram um valor de atividade de endoglucanase igual a 144 U/gss, semelhante ao obtido no presente trabalho, indicando que o fungo *M. thermophila* I-1D3b, bem como a proporção de BC:FT 7:3, favorecem a produção de endoglucanase. Porém, não foi o foco deste trabalho avaliar as condições que melhorassem a produção de celulasas, mas sim avaliar o desempenho do biorreator perante os diferentes modos de operação. A atividade de endoglucanase foi utilizada basicamente como um indicador ao considerar a aplicação proposta, visto que é uma enzima indispensável na cadeia de produção do E2G pela rota puramente bioquímica.

Os valores médios de umidade final dos módulos fermentativos foram $71 \pm 2,9$ e $72 \pm 4,9$ % (b.u.) na batelada clássica e no modo contínuo, respectivamente. Sabendo-se que a umidade inicial dos módulos fermentativos foi de 75 % (b.u.) em ambos os modos de operação, pode-se afirmar que ocorreu secagem pouco pronunciada do meio durante o cultivo. Todavia, analisando somente a zona em que foi atingido o estado estacionário no modo contínuo (módulos fermentativos 5, 6, 7 e 8), a média foi de 77 ± 3 % (b.u.), indicando que a movimentação impediu a secagem e manteve a umidade mais próxima do valor inicial. O aumento da umidade, nesse caso, pode ser atribuído à condensação de água na saída no biorreator, que pode não ter sido absorvida pelo módulo contendo bagaço grosso seco, ou o ar pode ter arrastado gotículas de água da coluna de umidificação.

Com relação ao BG contido nos módulos acessórios, foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 5.7. Observa-se que o efeito de secagem e absorção de água pelo BGu e pelo BGs, respectivamente, foram mais intensos no modo contínuo. Tal comportamento já era esperado, uma vez que o tempo da operação em regime contínuo foi 4 vezes maior que da

batelada clássica. Diante disso, no próximo cultivo contínuo, apresentado adiante e realizado em maior escala, foi efetuada a troca do conteúdo dos módulos acessórios a cada 96 horas.

Tabela 5.7: Umidade final do BG utilizado nos módulos acessórios de entrada e saída do BLE após os cultivos em estado sólido na proporção BC:FT 7:3 com *M. thermophila* nos modos de operação batelada clássica e contínuo com 4 módulos fermentativos.

Modo de operação	Módulo acessório	Umidade (% em b. u.)
Batelada	BGu	32
	BGs	12
Contínuo	BGu	14
	BGs	39

Apesar disso, o emprego dos módulos acessórios foi capaz de proteger os fermentativos como desejado, uma vez que não foi observado nenhum padrão relacionando as atividades de endoglucanase e os valores de umidade final. Casciatori (2015), que cultivou *M. thermophila* em BLE nas mesmas condições aqui empregadas, também utilizou os módulos acessórios e não relatou nenhum problema de secagem do leite. Outro fator essencial para garantir a saturação do ar e impedir a secagem excessiva dos módulos fermentativos foi a reposição diária de água nos umidificadores do ar percolante, além da umidificação em dois estágios, inicialmente à temperatura ambiente e depois à temperatura de processo.

Além disso, também é importante verificar que o módulo 1 (M1), em ambos os modos de operação, foi o que apresentou a secagem mais acentuada. Isso provavelmente ocorreu devido ao não equilíbrio termodinâmico entre o ar e a água como consequência da geração de calor metabólico, de modo que o ar removeu parte da água contida na matriz sólida. Entretanto, as secagens aqui observadas não afetaram negativamente o metabolismo do fungo, uma vez que os primeiros módulos não apresentaram as menores atividades enzimáticas. Umsza-Guez (2009) relatou secagens mais intensas, porém não utilizou módulos acessórios.

5.2.2.2. Cultivos com 8 módulos fermentativos

As Figuras 5.12 e 5.13 apresentam os perfis de temperatura em duplicata das bateladas clássica e com movimentação com 8 módulos fermentativos, respectivamente. Observa-se que ambos os perfis apresentaram o mesmo comportamento da batelada clássica com 4 módulos fermentativos (Figura 5.8), ou seja, houve diferença nas temperaturas de acordo com a posição e com o tempo e, em $z = 11,3$ cm, as temperaturas foram sempre mais baixas devido

ao contato direto com ar fresco, conforme já discutido. As temperaturas máximas registradas foram de $48,1 \pm 0,4$ e $48,2 \pm 0,0$ °C para as operações em batelada clássica e batelada com movimentação, respectivamente.

Figura 5.12: Perfis de temperatura em duplicata dos cultivos em estado sólido em BC:FT 7:3 de *M. thermophila* em BLE com 8 módulos fermentativos em batelada clássica.

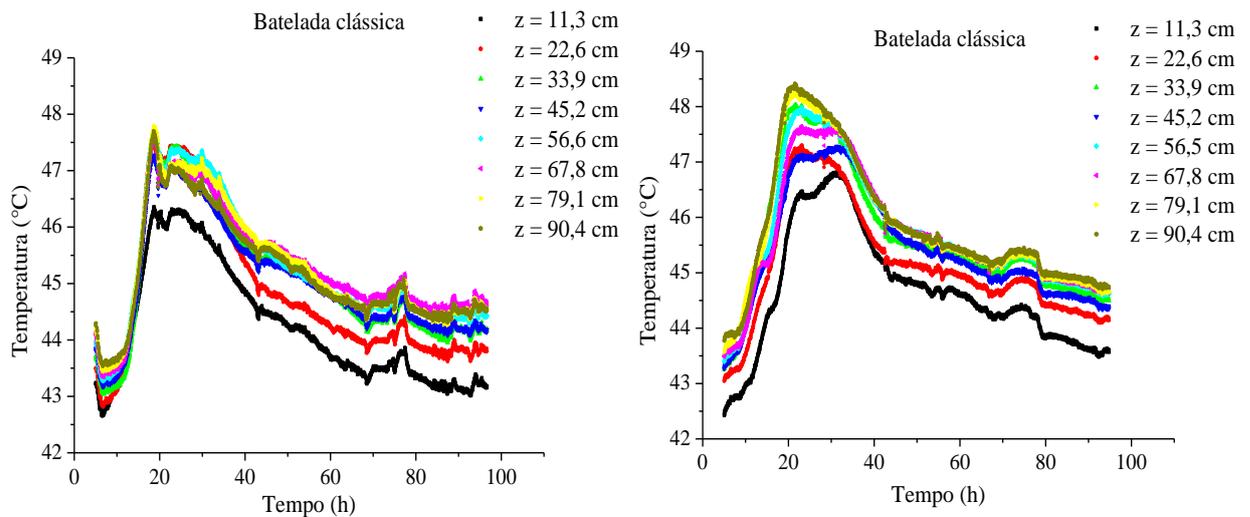
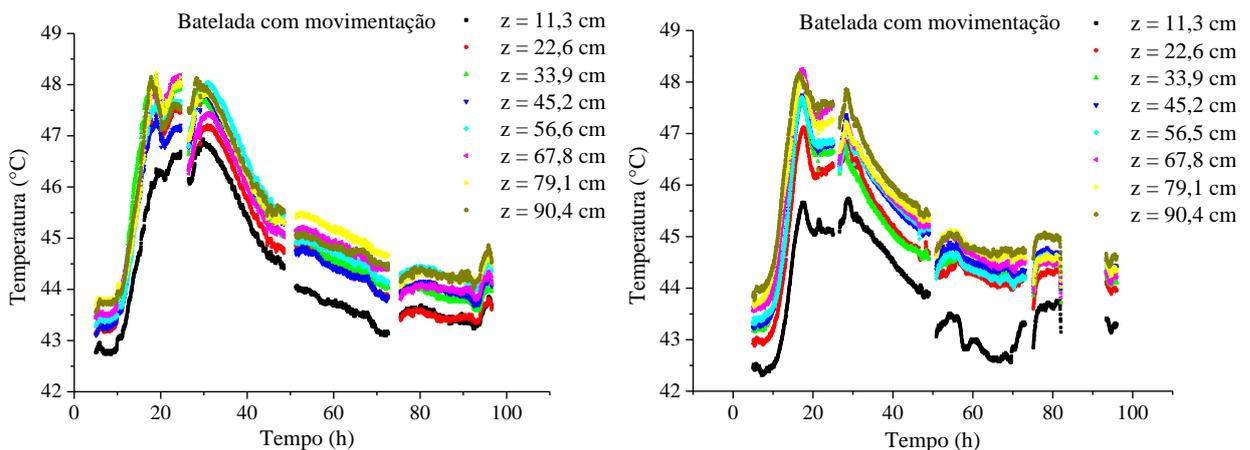


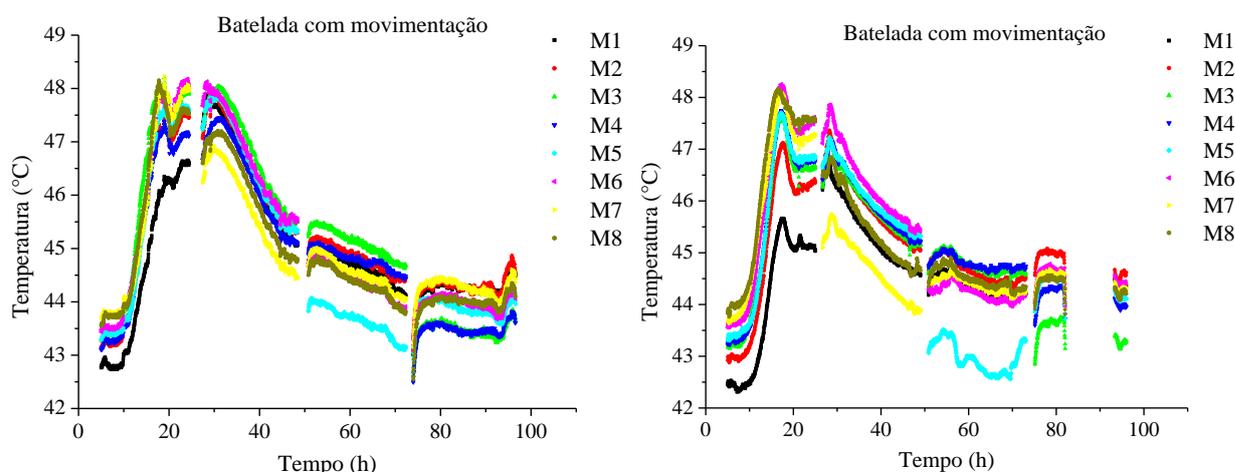
Figura 5.13: Perfis de temperatura em duplicata dos cultivos em estado sólido em BC:FT 7:3 de *M. thermophila* em BLE com 8 módulos fermentativos em batelada com movimentação.



Esses resultados concordam com a simulação de Mitchell et al. (2010), segundo a qual a operação em batelada com movimentação cíclica dos módulos não teve influência sobre o pico de temperatura atingido, apesar de ter equilibrado a exposição dos módulos às altas temperaturas. Esse efeito pode ser verificado na Figura 5.14, que apresenta as temperaturas

correspondentes à saída de cada módulo fermentativo em função do tempo de cultivo nas bateladas com movimentação. Cabe lembrar que, neste caso, a posição axial de um dado módulo varia ao longo do processo.

Figura 5.14: Perfis de temperatura em duplicata em cada módulo fermentativo dos cultivos em estado sólido em BC:FT 7:3 de *M. thermophila* em BLE com 8 módulos fermentativos no modo de operação batelada com movimentação.

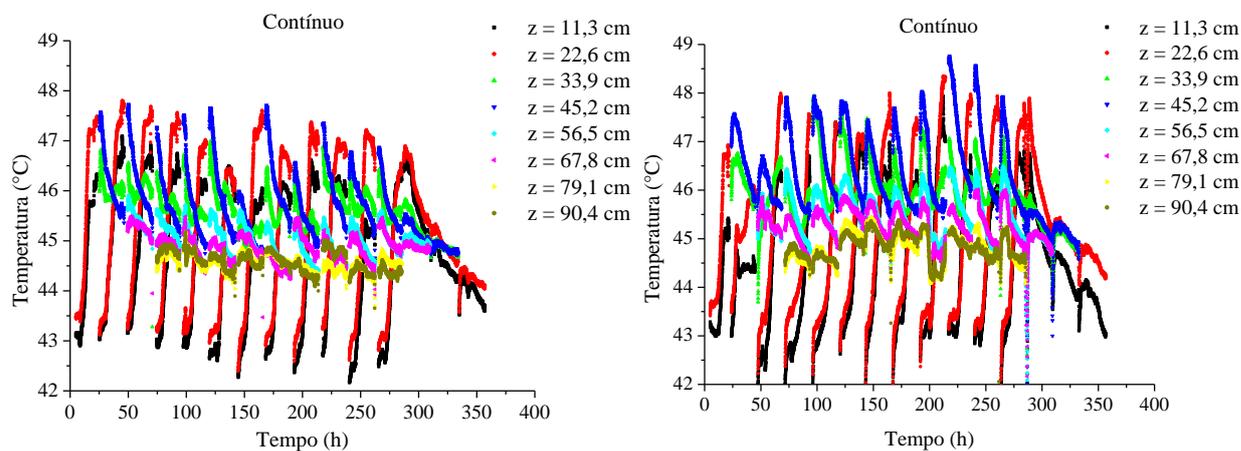


Observa-se que, diferentemente da batelada clássica, a operação em batelada com movimentação impediu que cada módulo ficasse exposto durante todo o tempo cultivo a sub ou sobreaquecimento, implicando em uma maior homogeneidade térmica, conforme relatado por Mitchell et al. (2010) com base nos resultados de suas simulações. Cabe salientar que na batelada clássica a temperatura de cada posição é equivalente à temperatura registrada na posição axial de saída de cada módulo, onde é possível fazer a inserção radial do termopar até o centro do leito.

Tal efeito é ainda mais pronunciado no regime contínuo, uma vez que todos os módulos fermentativos percorrem o BLE pelo mesmo trajeto. A Figura 5.15 apresenta os perfis de temperatura em duplicata do processo contínuo com 8 módulos fermentativos, os quais apresentaram o mesmo comportamento repetitivo que o processo contínuo com 4 módulos fermentativos, de acordo com o esperado. Também é importante destacar que no processo contínuo em maior escala os picos de temperatura se deram sempre nas posições $z = 22,6$ e $45,2$ cm, diferente do que foi observado para a menor escala (Figura 5.9), na qual os picos se deram nas posições mais elevadas do biorreator. Essa diferença é devido aos módulos recém inoculados terem sido acrescentados sempre na posição mais baixa da zona

fermentativa na operação contínua com 8 módulos fermentativos.

Figura 5.15: Perfis de temperatura em duplicata dos cultivos em estado sólido em BC:FT 7:3 de *M. thermophila* em BLE com 8 módulos fermentativos no modo de operação contínuo.



Conforme já esclarecido anteriormente, as quedas de temperatura a cada 24 horas correspondem aos momentos em que foi realizada a adição, remoção e movimentação de módulos fermentativos. A temperatura máxima registrada foi $48,3 \pm 0,7$ °C, confirmando novamente que o regime contínuo não teve influência no pico de temperatura. A Tabela 5.8 traz os valores das temperaturas máximas e médias de todos os cultivos em BLE com 8 módulos fermentativos em que se avaliou o efeito do modo de operação sobre o desempenho do bioprocessamento, bem como as comparações estatísticas.

Tabela 5.8: Temperaturas máximas e médias dos cultivos em BLE com 8 módulos fermentativos empregando *M. thermophila* em BC:FT 7:3.

Modo de operação	Temperatura máxima (°C)	Temperatura média (°C)
Batelada clássica	$48,1 \pm 0,4^a$	$45,3 \pm 0,3^a$
Batelada com movimentação	$48,2 \pm 0,0^a$	$45,1 \pm 0,0^a$
Contínuo	$48,3 \pm 0,7^a$	$45,1 \pm 0,2^a$

* Letras minúsculas diferentes e letras minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os modos de operação, respectivamente.

De acordo com o esperado, não houve diferença significativa entre os três modos de operação considerando as temperaturas máximas e médias, o que pode ser atribuído principalmente ao intervalo de movimentação escolhido de 24 h, conforme já discutido. Também é interessante notar que as temperaturas médias de todos os modos de operação

apresentaram valores praticamente iguais à temperatura ideal de cultivo, de 45 °C, avaliada neste trabalho como a temperatura que proporciona a maior velocidade de crescimento, bem como de produção de endoglucanase. Entretanto, as temperaturas máximas atingiram valores que não foram compreendidos na faixa de análise da influência da temperatura sobre a cinética. Sendo assim, não é possível afirmar se a 48 °C a velocidade da reação apresentaria um valor superior ou inferior que a determinada a 45 °C.

Ao comparar esses resultados com os obtidos com 4 módulos fermentativos (Tabela 5.6), as maiores diferenças observadas foram inferiores a 1 °C. A partir disso, infere-se que o aumento da altura do biorreator não teve influência no sobreaquecimento. A temperatura máxima registrada por Casciadori (2015) que empregou um BLE de 7,62 cm de diâmetro interno, 10 cm de altura por módulo e altura total da sessão fermentativa de 60 cm, foi somente de 47,2 °C. A temperatura máxima observada por Perez et al. (2019), em um BLE de 20 cm de diâmetro, 20 cm de altura por módulo e altura total da sessão fermentativa equivalente ao de Casciadori (2015), foi de 54,3 °C. Em ambos os trabalhos, a temperatura da camisa também foi mantida a 45 °C. Dessa maneira, observa-se que o aumento do diâmetro do BLE foi mais problemático que o aumento da altura, uma vez que o sobreaquecimento observado por Perez et al. (2019) foi 7,1 °C maior que o de Casciadori (2015).

Sendo assim, pode-se afirmar que o diâmetro interno do BLE aqui estudado, de 13 cm, permitiu que a camisa tivesse contribuição importante para a remoção do calor metabólico gerado no processo. De acordo com o modelo de duas fases e bidimensional que descreve a transferência de calor e água em um BLE para FES proposto por Casciadori et al. (2016), a camisa tem efeito até determinado diâmetro, de modo que, para diâmetros superiores, a remoção de calor pela camisa torna-se insignificante. O valor do diâmetro em que a camisa passa a não ter influência depende de cada cultivo individualmente. Todavia, o bom controle térmico observado não se deve apenas à ação da camisa, mas sim a um conjunto de fatores, como a utilização de uma cepa termofílica e de uma matriz sólida com alta porosidade.

Em decorrência desse conjunto de fatores, a atividade de endoglucanase e a umidade final dos sólidos fermentados apresentaram baixa variação entre os módulos fermentativos, como pode ser observado nas Figuras 5.16, 5.17 e 5.18 para os processos em batelada clássica, batelada com movimentação e contínuo, respectivamente. Para esta escala (8 módulos fermentativos), os cultivos de cada modo de operação foram realizados em duplicata, de modo que as médias apresentadas para cada módulo fermentativo se referem as médias obtidas entre as duas repetições.

Figura 5.16: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em BLE com 8 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com *M. thermophila* no modo de operação batelada clássica.

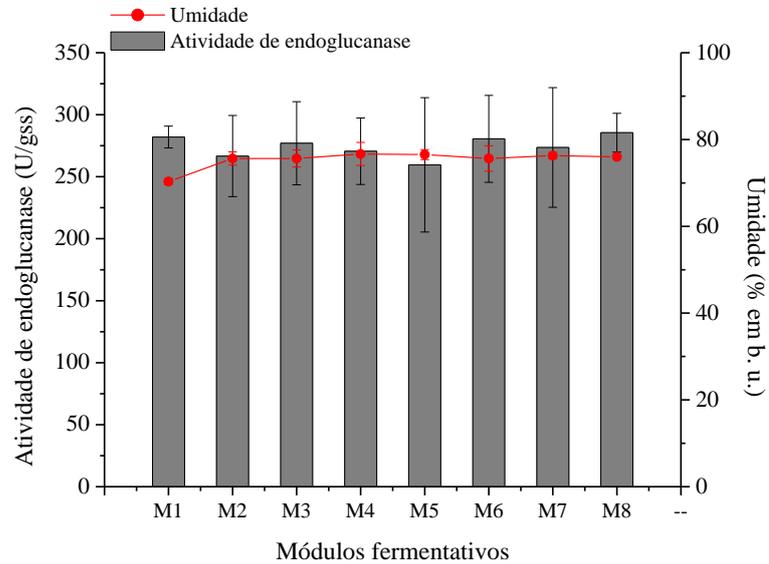


Figura 5.17: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em BLE com 8 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com *M. thermophila* no modo de operação batelada com movimentação.

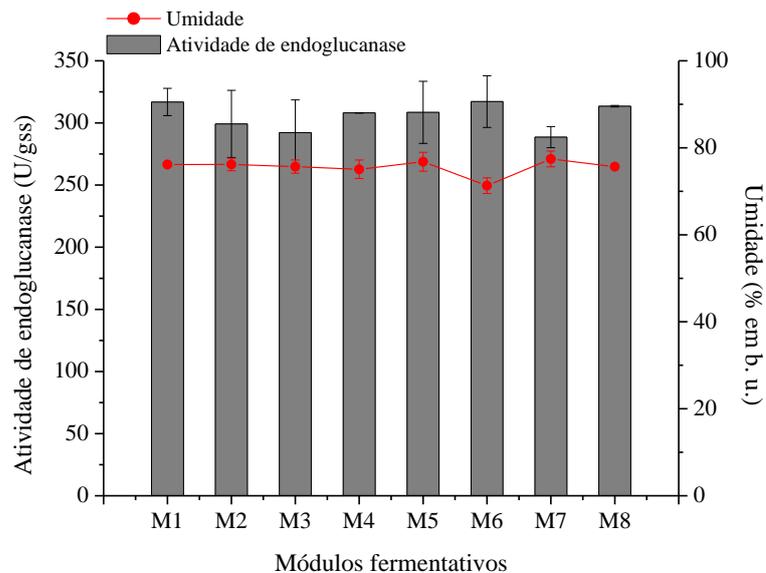
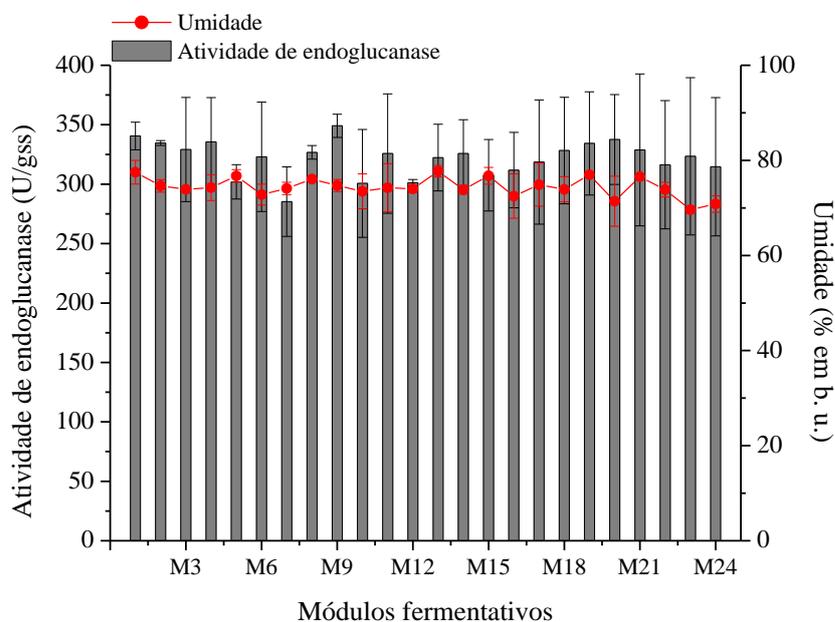


Figura 5.18: Atividade de endoglucanase e umidade final dos cultivos em estado sólido em BLE com 8 módulos fermentativos na proporção BC:FT 7:3 com *M. thermophila* no modo de operação contínua.



A partir do cálculo da média dentre todos os módulos fermentativos de cada modo de operação considerando as duplicatas, observa-se que a maior atividade de endoglucanase média foi obtida no cultivo contínuo. Contudo, pelo teste de Tukey, não foi observada diferença significativa entre os três modos de operação, como mostra a Tabela 5.9.

Tabela 5.9: Atividade de endoglucanase e umidade final médias dos cultivos em BLE com 8 módulos fermentativos empregando *M. thermophila* em BC:FT 7:3.

Modo de operação	Atividade de endoglucanase média (U/gss)	Umidade final média (% em b. u.)
Batelada clássica	274,4 ± 23,1 ^a	75,3 ± 1,0 ^a
Batelada com movimentação	305,51 ± 24,0 ^a	75,5 ± 0,5 ^a
Contínuo	321,8 ± 39,6 ^a	74,4 ± 0,1 ^a

* Letras minúsculas diferentes e letras minúsculas iguais numa mesma coluna indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os modos de operação, respectivamente.

Esses resultados indicam que, para o presente caso aqui estudado, o modo de operação não teve efeito significativo sobre a produção de endoglucanase. Além disso, em todos os modos de operação, foi observado o bom controle da umidade, uma vez que os valores se apresentaram próximos da umidade inicial (75 % em b.u.). A estratégia de trocar o BG dos

módulos acessórios a cada 96 h resultou na menor secagem do BGu, conforme desejado, e dessa forma a umidade final foi semelhante entre os três modos de operação, como mostra a Tabela 5.10. Em todos os casos, o BGs apresentou elevado ganho de umidade, porém ela não foi problemática, visto que os sólidos fermentados não apresentaram umidades finais superiores a 75 % (b.u.).

Tabela 5.10: Umidade final do BG utilizado nos módulos acessórios de entrada e saída do BLE após os cultivos em estado sólido na proporção BC:FT 7:3 com *M. thermophila* nos três modos de operação avaliados.

Modo de operação	Módulo acessório	Umidade final média (% em b. u.)
Batelada	BGu	62,2 ± 0,1
	BGs	60,6 ± 10,8
Batelada com movimentação	BGu	50,9 ± 6,1
	BGs	60,8 ± 11,9
Contínuo	BGu	66,1 ± 5,9
	BGs	63,5 ± 7,2

Sendo assim, os maiores ganhos observados da operação contínua foram a redução dos tempos mortos, pois o processo pode ser conduzido indefinidamente, e a geração diária de produto. Essas vantagens são relevantes em âmbito industrial, visto que permitem que as etapas *upstream* e *downstream* sejam realizadas diariamente utilizando equipamentos menores, evitando-se assim longos tempos de inatividade dos mesmos, como acontece nos processos em batelada. Cabe lembrar que a matriz sólida permanece estática durante o processo contínuo aqui avaliado e, dessa forma, o desenvolvimento dos microrganismos não é prejudicado por nenhum tipo de atrito, diferentemente dos outros processos contínuos já relatados na literatura (VAN DE LAGEMAAT; PYLE, 2004; KHANAHMADI et al., 2006). Também é importante comentar que em nenhum dos cultivos houve contaminação, tornando o processo contínuo ainda mais atrativo em âmbito industrial. As características do processo de baixa atividade de água e alta temperatura contribuíram esse resultado, bem como as precauções realizadas para minimizar esse risco.

Além disso, devido aos módulos percorrerem o BLE nas mesmas condições de tempo de cultivo e temperatura em cada posição durante o estado estacionário, há um menor risco de os materiais fermentados apresentarem diferenças entre si em comparação aos cultivos em batelada clássica, nos quais os produtos de interesse podem apresentar-se em diferentes concentrações a depender da posição no equipamento (PEREZ et al., 2020). A versatilidade

da operação contínua também pode ser considerada como um ponto positivo, visto que pode ser definido se o substrato recém inoculado irá entrar em contato com o ar mais rico ou mais pobre em O₂, assim como em condições de temperaturas mais elevadas ou mais amenas. Para o caso avaliado no presente trabalho, observou-se que o pico de temperatura ocorreu em torno de 23 h de cultivo; sendo assim, a adição dos módulos recém inoculados na base do biorreator (Figura 4.6) se mostrou como uma estratégia mais interessante, pois o microrganismo foi exposto à maior concentração de O₂ do ar e a temperaturas mais amenas no seu período de crescimento acentuado.

Pensando na aplicação do bioprocessamento estudado, também foram determinadas as atividades de xilanase e FPase do extrato enzimático correspondente ao módulo fermentativo 9 do processo contínuo, visto que foi o que proporcionou a maior atividade de endoglucanase. Os valores médios obtidos foram $2145,1 \pm 354,0$ U/gss para xilanase e $34,9 \pm 3,4$ U/gss para FPase. Soni et al. (2008) obtiveram atividades de xilanase e FPase de 900 e 2,4 U/gss, respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados por Moretti (2010), os quais foram 1044,6 e 2,0 U/gss para xilanase e FPase, respectivamente, enquanto Casciatori (2015), que também cultivou *M. thermophila* I-1D3b em BC:FT 7:3, obteve atividades de 2394,6 e 16,1 U/gss para xilanase e FPase, respectivamente. Portanto, pode-se afirmar que o extrato enzimático obtido a partir do processo contínuo avaliado no presente trabalho possui grande potencial para ser aplicado na etapa de hidrólise da rota bioquímica de produção do E2G. Todavia, cabe ressaltar que diversas outras aplicações e combinações de microrganismos e substratos podem ser empregadas no processo e equipamento desenvolvidos.

5.2.2.2.1. Análise respirométrica

Conforme mencionado no item 4.4, para os cultivos com 8 módulos fermentativos também foi realizada a aquisição *online* da concentração de CO₂ do ar de saída do biorreator. As Figuras 5.19 e 5.20 apresentam em duplicata os perfis de concentração de CO₂ na corrente gasosa de saída do BLE de acordo com o tempo de processo das bateladas e do modo de operação contínuo, respectivamente. Observa-se que os perfis de concentração de CO₂ na corrente de saída apresentaram o mesmo comportamento dos perfis de temperatura, indicando que a elevação da temperatura nos cultivos com *M. thermophila* foi, de fato, devido à geração de calor metabólico.

Figura 5.19: Perfis da concentração de CO₂ em duplicata na corrente gasosa de saída do BLE dos cultivos nos modos de operação batelada clássica e batelada com movimentação.

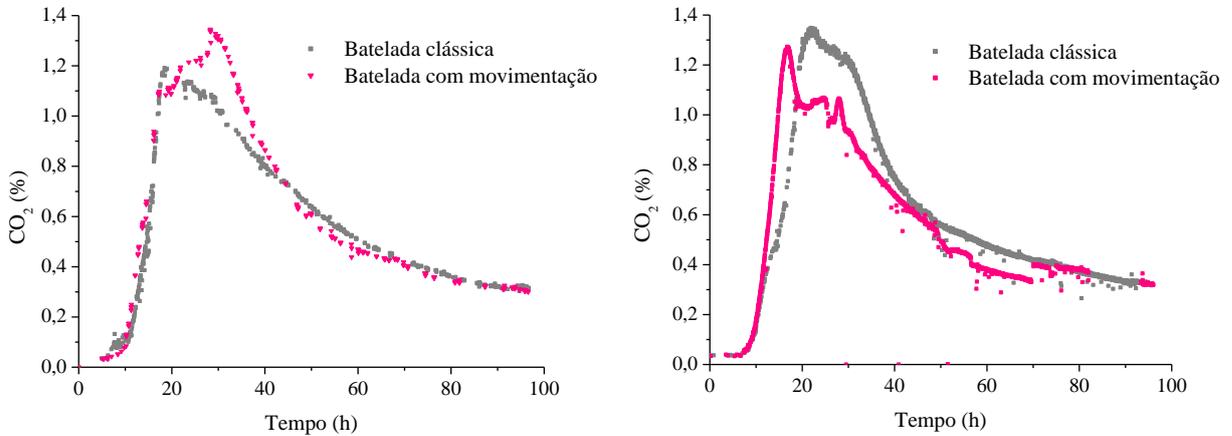
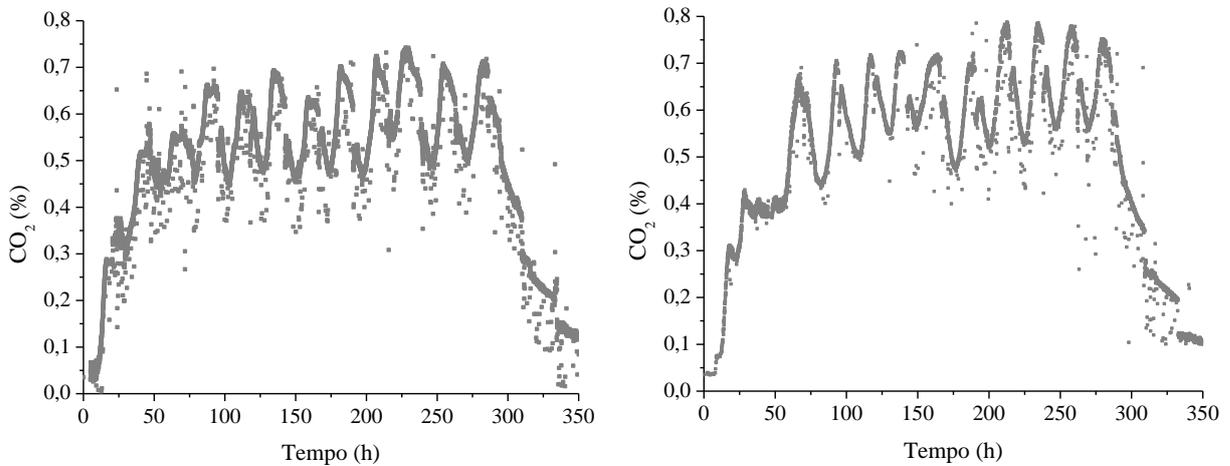


Figura 5.20: Perfis da concentração de CO₂ em duplicata na corrente gasosa de saída do BLE dos cultivos no modo de operação contínuo.



De acordo com o esperado, as concentrações máximas de CO₂ registradas nos processos em batelada não apresentaram diferença significativa entre si, enquanto que no processo contínuo o valor correspondeu a 58 % da média das bateladas, conforme mostra a Tabela 5.11. Assumindo que a produção de CO₂ é diretamente relacionada à geração de calor metabólico, pode-se afirmar que esses resultados concordam com as previsões de Mitchell et al. (2010), as quais indicaram que a taxa de geração de calor metabólico quando o BLE se comportasse como um reator de fluxo pistonado corresponderia a 57 % do valor de pico previsto para a operação em batelada clássica.

Tabela 5.11: Concentração máxima de CO₂ registrada na corrente gasosa de saída do BLE.

Modo de operação	Batelada clássica	Batelada com movimentação	Contínuo
CO ₂ máximo (% v/v)	1,27 ± 0,11 ^a	1,31 ± 0,05 ^a	0,76 ± 0,03 ^b

* Letras minúsculas diferentes e letras minúsculas iguais numa mesma linha indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os modos de operação, respectivamente.

Durante as operações em batelada, todos os módulos fermentativos estão sincronizados no mesmo estágio fermentativo, ou seja, todos eles entram na fase de crescimento acelerado ao mesmo tempo. Em contraste, durante o período estacionário do processo contínuo, os módulos fermentativos se apresentam em diferentes fases crescimento entre si; enquanto alguns estão na fase de aceleração, outros estão na fase lag, de desaceleração ou estacionária. Como resultado, a taxa de geração de calor metabólico e, conseqüentemente, a produção de CO₂ no processo contínuo são menores do que as observadas no pico de crescimento dos processos em batelada.

Mitchell et al. (2010) relataram que a diminuição de 4,5 °C na temperatura máxima predita para o processo contínuo em relação à batelada clássica seria decorrente da menor geração de calor metabólico e da movimentação dos módulos. Contudo, os autores não consideraram a transferência de calor no sentido radial, ou seja, não foi considerado que houvesse remoção de calor metabólico pela camisa. Dessa maneira, tendo em vista que nos cultivos realizados no presente trabalho houve a remoção de calor metabólico pela camisa, mesmo que a geração de calor tenha sido inferior para o processo contínuo, não houve influência na temperatura máxima.

Todavia, conforme discutido anteriormente, a proximidade dos valores de temperatura máxima entre os três modos de operação não é decorrente apenas da ação da camisa, mas sim de um conjunto de fatores, como intervalo de movimentação de 24 h, leito de alta porosidade e emprego de um fungo termofílico. Dessa forma, pode-se inferir que para o biorreator aqui estudado com diâmetro estreito, a contribuição do termo do balanço de energia para FES em BLE proposto por Sangsurasak e Mitchell (1998) correspondente à geração de calor metabólico possui menor interferência sobre a temperatura máxima atingida do que os termos correspondentes à convecção, advecção e condução.

A partir dos dados de CO₂, também é possível determinar as velocidades da reação através do ajuste de um modelo de cinética aos dados de CO₂ acumulado com o tempo. Dentre os modelos testados (equações 4.1, 4.2 e 4.3), a equação da logística foi o que apresentou o melhor ajuste para as bateladas. As Figuras 5.21 e 5.22 apresentam os ajustes em duplicata

para os ensaios em batelada clássica e com movimentação, respectivamente.

Figura 5.21: Ajuste em duplicata do modelo logístico aos dados de CO₂ acumulado dos cultivos em batelada clássica.

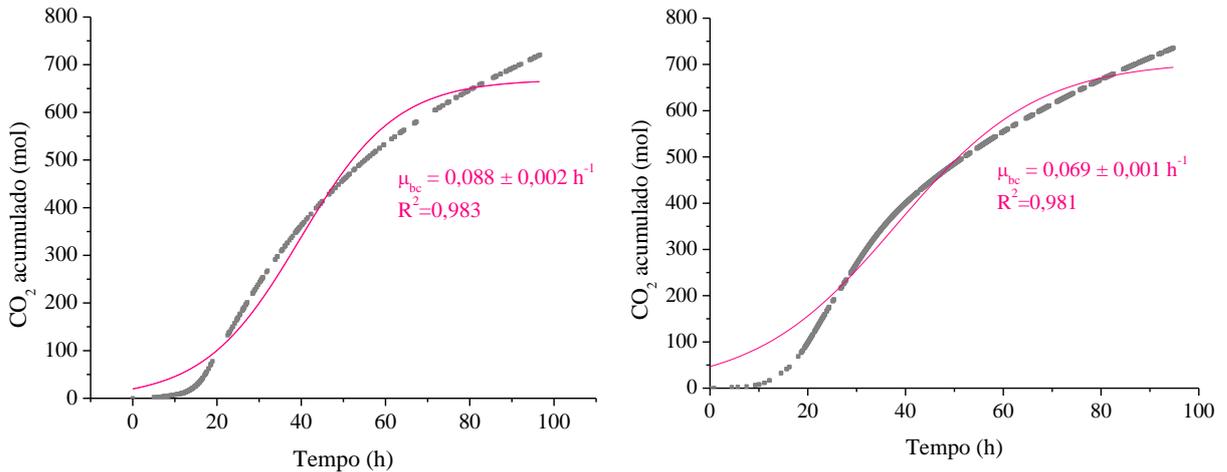
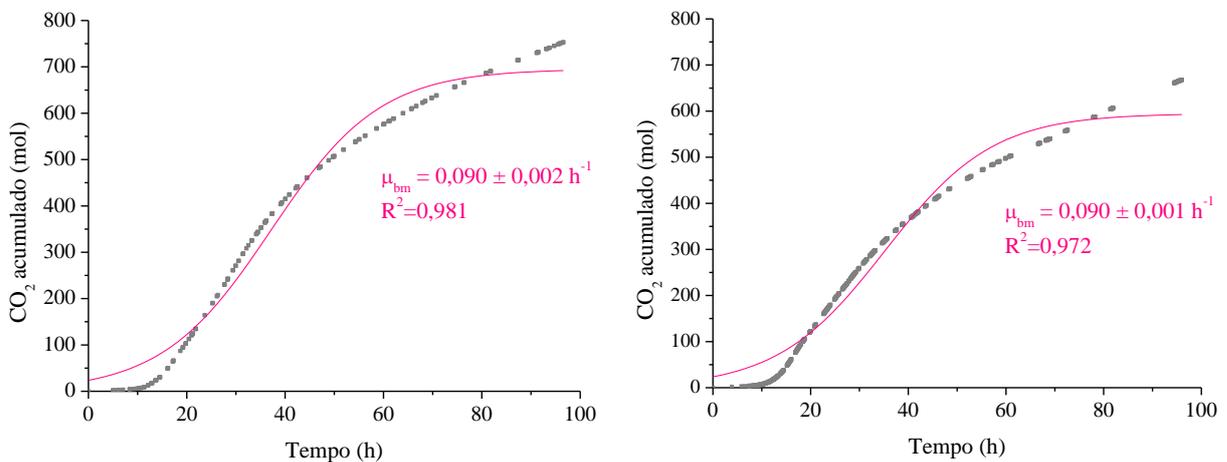


Figura 5.22: Ajuste em duplicata do modelo logístico aos dados de CO₂ acumulado dos cultivos em batelada com movimentação.



A Tabela 5.12 apresenta os valores médios das velocidades de produção de CO₂ para ambos os modos de operação. Observa-se que não houve diferença significativa entre os valores de μ nas duas bateladas (μ_{bc} e μ_{bm}). Além disso, esses resultados são próximos do valor de μ_{ps} anteriormente obtido em embalagens plásticas a 45 °C segundo o ajuste para o perfil de concentração de proteínas (0,098 h⁻¹). Já o valor de μ_{ae} segundo o ajuste do perfil de endoglucanase foi de 0,179 h⁻¹, aproximadamente 2 vezes superior aos demais. Casciatori

(2015) estimou um valor de μ igual a $0,06 \text{ h}^{-1}$ para *M. thermophila* I-1D3b nas mesmas condições aqui empregadas. Gomes et al. (2020) avaliaram experimentalmente a cinética de crescimento de *Myceliophthora thermophila* M.7.7 por determinação da concentração de N-acetilglicosamina também em BC:FT 7:3 e obtiveram um valor de μ de $0,120 \text{ h}^{-1}$.

Tabela 5.12: Constantes específicas de taxa de produção de CO_2 de acordo com o ajuste da equação logística para os dados de CO_2 acumulado por tempo dos cultivos em batelada clássica e batelada com movimentação.

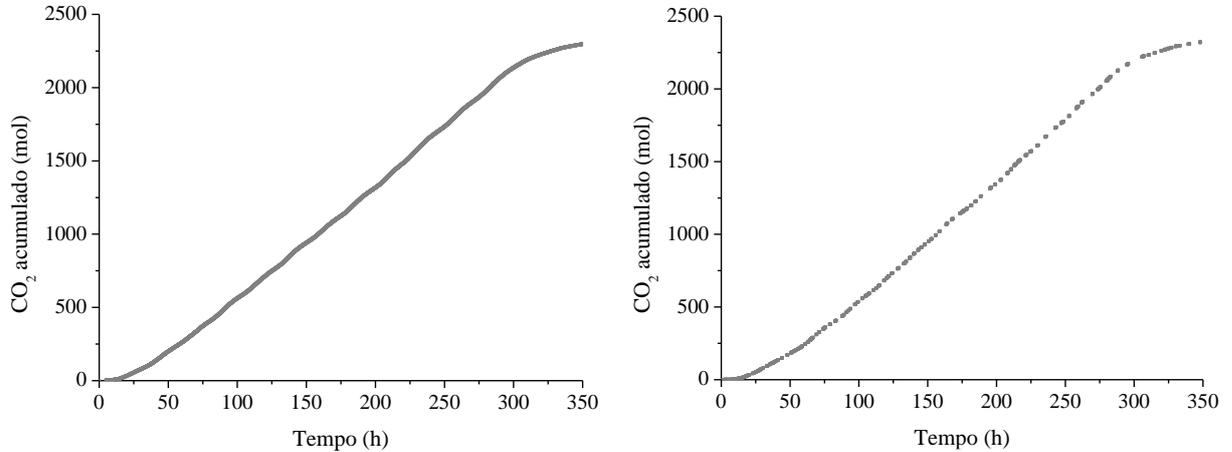
Modo de operação	Batelada clássica (μ_{bc})	Batelada com movimentação (μ_{bm})
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$0,079 \pm 0,002^a$	$0,09 \pm 0,002^a$

* Letras minúsculas diferentes e letras minúsculas iguais numa mesma linha indicam que há e que não há diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os modos de operação, respectivamente.

Diante disso, as estimativas de velocidade de crescimento segundo o perfil de CO_2 acumulado e proteínas solúveis parecem ter sido mais adequados que a estimativa segundo a atividade de endoglucanase. Conforme já discutido no item 3.2.3, a produção de enzimas pode realmente não ser uma boa estratégia de estimativa da biomassa, em razão de, muitas vezes, acompanhar o crescimento fúngico somente em algumas fases e não durante todo o processo de fermentação. O fato de a análise respirométrica ter se apresentado como uma boa estimativa da biomassa é especialmente interessante em cultivos em estado sólido em BLEs, nos quais não é possível realizar amostragem.

Com respeito ao perfil de CO_2 acumulado para o regime contínuo, uma maior quantidade de CO_2 foi produzida, conforme mostra a Figura 5.23, o que se deve ao tempo de processo ter sido 4 vezes maior em relação às bateladas. Além disso, entre 96 e 288 horas, observa-se que a quantidade de CO_2 acumulado teve uma relação linear com o tempo, evidenciando o comportamento do BLE como um reator de fluxo pistonado.

Figura 5.23: Perfil de CO₂ acumulado em duplicata dos cultivos em modo de operação contínuo.



Foi realizado um ajuste aos dados experimentais entre 96 e 288 h utilizando o modelo de ordem zero apresentado pela equação 5.1, a qual foi integrada e dividida por X_m dos dois lados, resultando na equação 5.2.

$$\frac{dX}{dt} = k \quad (5.1)$$

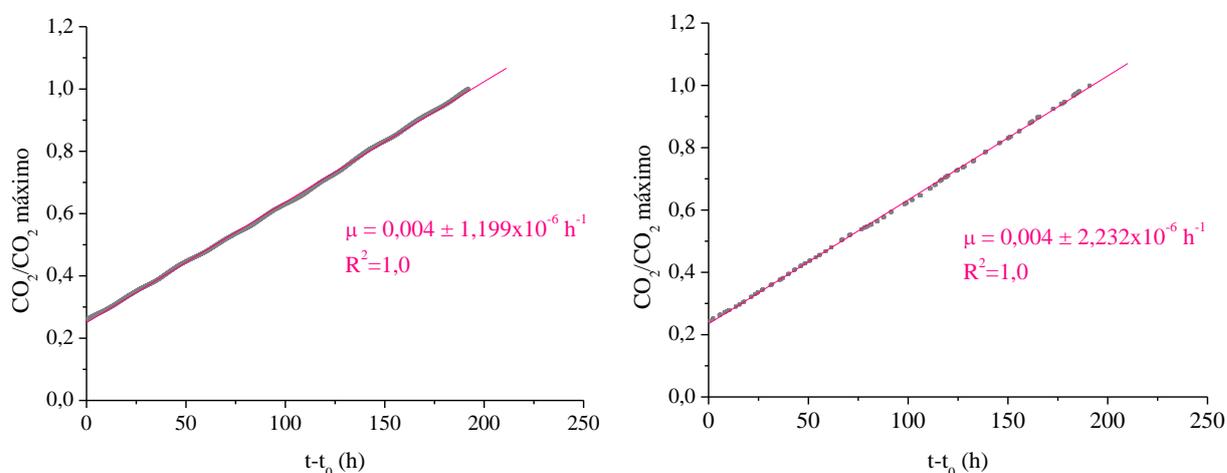
$$\frac{X}{X_m} = \frac{k}{X_m} (t - t_0) + \frac{X_0}{X_m} \quad (5.2)$$

onde X é a quantidade de CO₂ acumulada no tempo t , X_m é o seu valor máximo, X_0 é a quantidade de CO₂ acumulada no tempo t_0 e k é a constante de taxa de produção de CO₂.

A equação 5.2 pode ser ainda reescrita de acordo com a equação 5.3, onde k/X_m equivale a μ . Dessa forma, foram plotados gráficos de X/X_m por $(t - t_0)$, onde X_m é o valor de CO₂ acumulado até 288 h e t_0 é igual a 96 h. Ajustes lineares foram realizados aos dados experimentais, conforme apresenta a Figura 5.34.

$$\frac{X}{X_m} = \mu(t - t_0) + \frac{X_0}{X_m} \quad (5.3)$$

Figura 5.24: Ajuste em duplicata do modelo de ordem zero aos dados de CO₂ acumulado dos cultivos em modo de operação contínuo.



De acordo com a Figura 5.24, a taxa de produção de CO₂ no modo de operação contínuo é de 0,004 h⁻¹, menor do que as velocidades obtidas para os processos em batelada. Esse resultado é devido aos módulos fermentativos se apresentarem em diferentes estágios de fermentação no processo contínuo, conforme já discutido. Sabendo-se que μ é igual a k/X_m , o valor de k é, portanto, 8,3 mols de CO₂/h, e esse resultado pode ser utilizado para estimar a taxa de produção de biomassa fúngica.

Para isso, foi verificada a relação entre a quantidade de CO₂ acumulada e a biomassa fúngica obtida a partir do cultivo submerso, como mostra a Figura 5.25. Observa-se que as curvas de quantidade acumulada de CO₂ e biomassa fúngica apresentaram o mesmo comportamento até o ponto de 32,6 h, ou seja, até esse momento a produção de CO₂ ocorreu majoritariamente devido ao crescimento microbiano. Dessa forma, foi plotado um gráfico de CO₂ por biomassa fúngica no período de 0 a 32,6 h de cultivo, como mostra a Figura 5.26.

Durante esse período, a produção de CO₂ apresentou um comportamento linear com a produção de biomassa fúngica. Sendo assim, foi realizado um ajuste linear, conforme mostra a Figura 5.26, onde Y representa a produção de CO₂ em mols por grama de biomassa fúngica. Dividindo-se k por Y , obtém-se a taxa de produção de biomassa fúngica no estado estacionário do processo contínuo, que é de 0,03 g/h. Esse pode ser um resultado bastante útil para trabalhos futuros focados na modelagem e simulação de processos contínuos em BLE, tendo em vista realizar previsões e escalonamento.

Figura 5.25: Perfil de CO₂ acumulado e biomassa fúngica do cultivo submerso de *M. thermophila*.

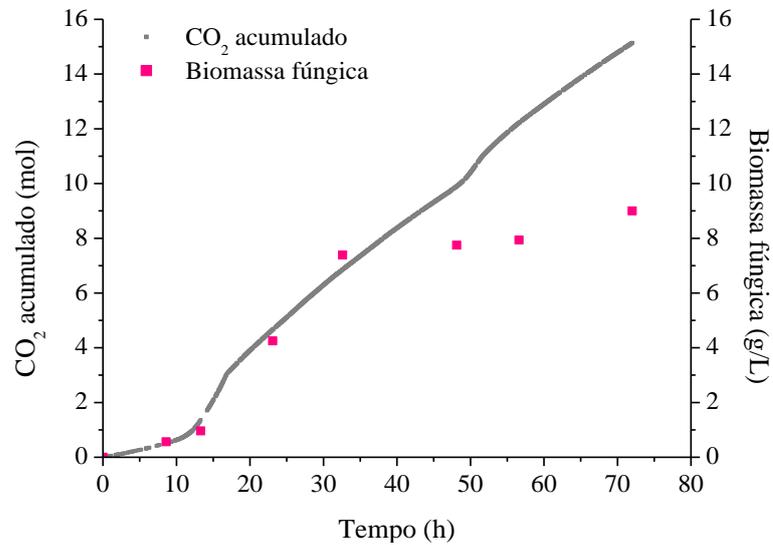
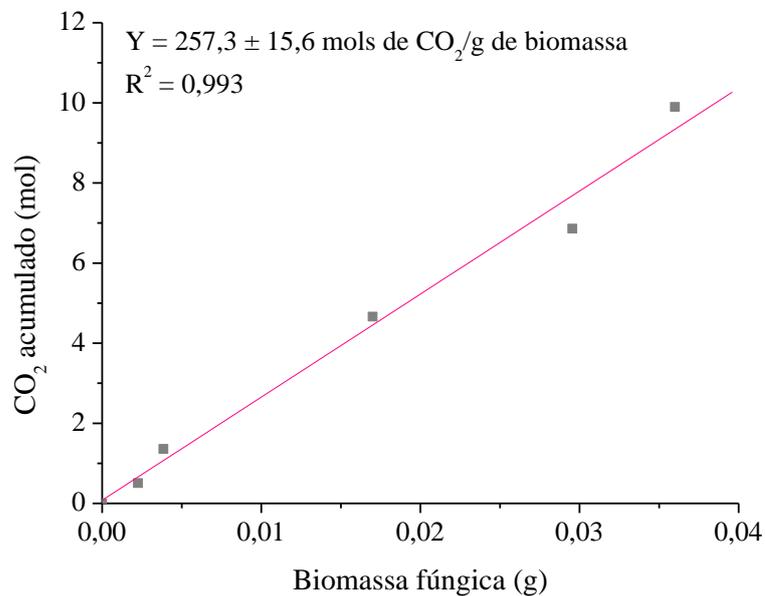


Figura 5.26: Perfil de CO₂ acumulado de acordo com a biomassa fúngica do cultivo submerso de *M. thermophila*.



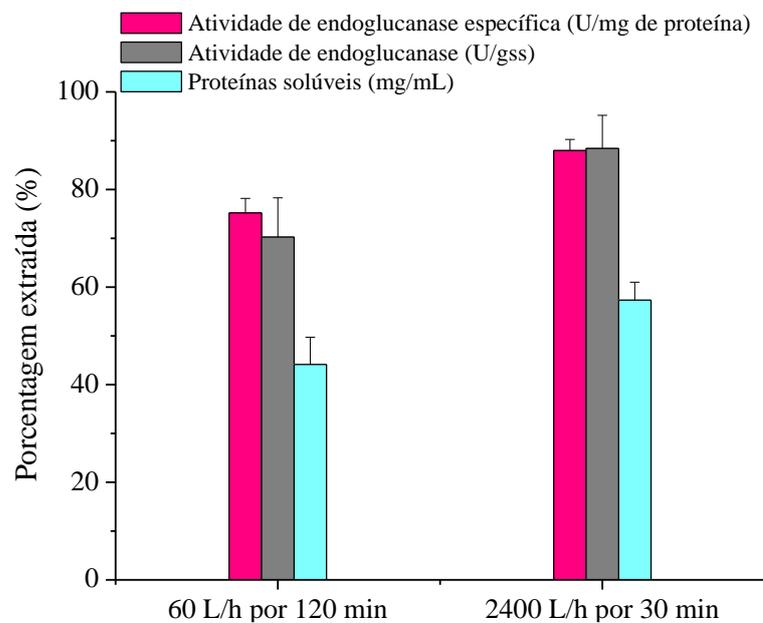
5.3. Sistema de extração de proteínas solúveis por percolação

Conforme mencionado anteriormente, foi avaliada a extração de proteínas solúveis através da percolação de água destilada em diferentes condições: 60 L/h por 120 minutos (estratégia 1) e 2400 L/h por 30 minutos (estratégia 2). Durante os ensaios, foi observado que não houve a compactação do sólido fermentado, nem a formação de canais preferenciais para

o escoamento da água.

A Figura 5.27 apresenta as porcentagens de proteínas solúveis, atividade de endoglucanase e atividade de endoglucanase específica que foram extraídas através do sistema proposto perante as quantidades totais determinadas dessas proteínas. Cabe lembrar que, após a extração por percolação, os sólidos fermentados foram extraídos através do sistema convencional tipo tanque agitado, a fim de determinar as quantidades totais de proteínas solúveis e endoglucanase produzidas.

Figura 5.27: Porcentagens de atividade de endoglucanase, atividade de endoglucanase específica e proteínas solúveis extraídas dos sólidos fermentados através do sistema de extração por percolação.



Observa-se que, para todas as respostas avaliadas, a estratégia 2 de 2400 L/h por 30 minutos foi a mais eficiente, uma vez que as porcentagens extraídas foram maiores que da estratégia 1, de 60 L/h por 120 minutos. Todavia, a extração por percolação se mostrou especialmente interessante para recuperar proteínas com atividade de endoglucanase. Nas percolações em que foi empregada a estratégia 2, a recuperação de proteínas solúveis totais foi de 57 %, enquanto que a recuperação de proteínas com atividade de endoglucanase foi de 88 %, o que é extremamente vantajoso, pois permite obter o produto de interesse (endoglucanase) com maior pureza. Esse resultado fica ainda mais evidente ao observar que a porcentagem de extração de atividade de endoglucanase específica pela estratégia 2 foi

significativamente maior que pela estratégia 1.

De acordo com Oliveira et al. (2020), o aumento da vazão de percolação do líquido extrator aumentou significativamente a recuperação de proteínas com atividade de endoglucanase. Contudo, o aumento do tempo da percolação não demonstrou influência sobre a porcentagem de recuperação. Segundo Fenila e Shastri (2016), as enzimas lignocelulolíticas produzidas por FES são fortemente ligadas ao substrato, indicando que vazões mais altas são necessárias para transferir as enzimas da matriz sólida para o líquido extrator.

De modo geral, o sistema avaliado se mostrou eficiente para extração sólido-líquido de endoglucanase, uma vez que quase 90 % das enzimas foram recuperadas pela percolação ao aplicar a estratégia 2. Esses resultados se mostram ainda mais atrativos ao se considerar a utilização do sistema proposto após o processo contínuo de FES em BLE aqui estudado, uma vez que os próprios módulos fermentados podem compor o sistema de extração, como foi realizado no presente trabalho e é passível de ampliação de escala.

6. CONCLUSÕES

O foco do presente trabalho foi avaliar diferentes modos de operação de um biorreator de leito empacotado (BLE) aplicado na produção de hemicelulases por fermentação em estado sólido (FES). Diante dos resultados apresentados, conclui-se que a batelada com movimentação não apresentou vantagens operacionais e no controle do sobreaquecimento do BLE perante à operação clássica. Já operação em modo contínuo provou-se aplicável e vantajosa para os processos de fermentação em estado sólido (FES), uma vez que o tempo de inatividade do processo foi menor, ocorreu a obtenção diária de produto, as etapas *upstream* e *downstream* foram facilitadas e a taxa de produção de CO₂ e, conseqüentemente, de geração de calor metabólico foram menores do que os demais modos de operação.

Além disso, foi demonstrado que os processos de FES em BLEs podem ser conduzidos com eficiente controle térmico quando são combinados alguns fatores, como uso de um microrganismo termofílico, matriz sólida com elevada porosidade e diâmetro estreito. O fato da abertura do biorreator para realizar a movimentação dos módulos não ter resultado em contaminação também é importante de ser ressaltado, contudo cabe salientar que a elevada temperatura de processo (45 °C) provavelmente teve grande contribuição nesse sentido. Todavia, em âmbito industrial, caso seja necessário, podem ser adotadas algumas medidas para evitar contaminações, como uma sala contendo luz UV e barreira com fluxo de ar, por exemplo. Sendo assim, trata-se de um processo promissor para conduzir os bioprocessos de FES de maneira contínua sem causar danos aos microrganismos.

Com respeito à mudança do sentido de escoamento de ar percolante e de água pela camisa, observou-se que não houve influência nos perfis de temperatura. Dessa forma, a escolha da configuração de escoamento poderia ser baseada somente nas perdas de carga. Quanto à estratégia de inoculação sólido-sólido, observou-se que embora não tenha sido mais eficiente que a inoculação líquida, mostrou-se como técnica viável, que pode ser útil em escala industrial. O sistema de extração enzimática por percolação também mostrou potencial para ser aplicado em âmbito industrial, uma vez que permitiu recuperar quase 90 % das proteínas com atividade de endoglucanase com maior pureza em comparação ao método de extração convencional.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante das lacunas que surgiram no decorrer deste trabalho, é importante que sejam realizados alguns estudos, sendo eles:

- Cultivo em estado sólido em biorreator de leito empacotado (BLE) na operação contínua em maior escala e com fungo mesofílico;
- Simulação do cultivo em estado sólido em BLE na operação contínua com adição de módulos recém inoculados na região em contato com ar fresco (contrário da simulação realizada por Mitchell et al. (2010) e por Calixto (2019));
- Avaliação experimental da reversão no sentido da percolação de ar durante o cultivo em estado sólido em BLE;
- Avaliação da inoculação sólido-sólido em BLE com variação da quantidade e do tempo de fermentação dos sólidos fermentados utilizados como inóculo;
- Determinar a cinética do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em temperaturas entre 45 e 50 °C.

8. REFERÊNCIAS

ABD-ELHALEM, B. T.; EL-SAWY, M.; GAMAL, R. F.; ABOU-TALEB, K. A. Production of amylases from *Bacillus amyloliquefaciens* under submerged fermentation using some agro-industrial by-products. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, p. 193–202. 2015.

AGUDELO, L. M. G. Desenvolvimento de um biorreator rotativo para produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido. 2014. **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2014.

AGUILAR, C.N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 296–302. 2001.

ALAM, M. Z.; MAMUN, A. A.; QUDSIEH, I. Y.; MUYIBI, S. A.; SALLEH, H. M.; OMAR, N. M. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor, **Biochem. Eng. J.**, v. 46, p. 61-64. 2009.

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

ASTOLFI, V.; JORIS, J.; VERLINDO, R.; OLIVEIRA, J. V.; MAUGERI, F.; MAZUTTI M. A.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58, p. 39-49, 2011.

BAKRI, Y.; JACQUES, P.; THONART, H. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10c in solid state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, p. 737-748. 2003.

BARRIOS-GONZÁLEZ, Javier. Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 175-185, 2012.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International Journal Biological Macromolecule**.v. 86, p. 656–669. 2016.

BERENJIAN, A.; EHSAN, M. **Special Issue "Novel Processes for Development of Fermentation-Based Products"**. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2021.

Disponível em: < https://www.mdpi.com/si/processes/fermentation_processes>. Acesso em fevereiro de 2021.

BERIKASHVILI, V.; SOKHADZE, K.; KACHLISHVILI, E.; ELISASHVILI, V.; CHIKINDAS M. L. *Bacillus amyloliquefaciens* spore production under solid-state fermentation of lignocellulosic residues. **Probiotics Antimicrob Proteins**. v. 10, p. 755–61. 2018.

BRADFORD, M. M. Um método rápido e sensível para a quantificação de quantidades de microgramas de proteína utilizando o princípio da ligação proteína-corante. **Bioquímica analítica**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRIJWANI, K.; OBEROI H. S.; VADLANI, P.V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran, **Process Biochem**. v. 45, p. 120–128, 2010.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process. Biochem**, v. 45, p. 120–128. 2010.

CAIRNS, T. C.; ZHENG, X.; ZHENG, P.; SUN, J.; MEYER, V. Moulding the mould: Understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. **Biotechnology for Biofuels**. v. 12, p. 1–18. 2019.

CALIXTO, L. O. Simulação da transferência de calor em um biorreator de leito empacotado operado em modo pseudo-contínuo (BLEPC) para fermentação em estado sólido (FES). **Trabalho de conclusão de curso**. Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

CAMACHO, F. P.; GONZALEZ-TELLO, E. J.; ROBLES, A. Microcrystalline-cellulose hydrolysis with concentrated sulphuric acid. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology: International Research in Process, Environmental and Clean Technology**, v. 67, p. 350-356. 1996.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2196-2204, 2007.

CASCIATORI, F. P. Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido: ampliação de escala de biorreatores de leito fixo. **Tese (Doutorado)**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.

CASCIATORI, F. P.; BÜCK, A.; THOMÉO, J. C.; TSOTSAS, E. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 103-116. 2016.

CASCIATORI, F. P.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Cellulase production in packed bed bioreactor by solid-state fermentation. **In: European Biomass Conference and Exhibition Proceedings**, v. 1.13, p. 1539-1546. 2013.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; TABOGA, S. R.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. **Chemical Engineering Journal**.v. 255, p. 214-224. 2014.

CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Utilização de resíduos agro-industriais para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido. In: **Tópicos em tratamento de resíduos e meio ambiente**. FREIRE, F. B.; FREIRE, F. B.; FREIRE, J. T. (Eds.). Saabrucken: Novas Edições Acadêmicas, p. 99-128. 2015.

CASSARO, E. G.; FONSECA, R. F.; FARINAS, C. S. Assessment of the effects of intermittent mixing on solid-state fermentation for biomass-degrading enzymes production by different fungal strains. **J. Bioprocess. Chem.**, v. 3, p. 1-7. 2015.

CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Multivariate optimization and supplementation strategies for the simultaneous production of amylases, cellulases, xylanases, and proteases by *Aspergillus awamori* under solid-state fermentation conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, p. 1588-1602. 2015.

CERDA, A.; EL-BAKRY, M.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Long term enhanced solid-state fermentation: Inoculation strategies for amylase production from soy and bread wastes by *Thermomyces* sp. in a sequential batch operation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, p. 2394 – 2401, 2016.

COLLA, L.; RIZZARDI, M.; PINTO, J.; REINEHR, M. H.; BERTOLIN, C. O.; JORGE ALBERTO, T. E.; VIEIRA COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 8308–8314. 2010.

DA SILVA, R.; LAGO, E. S.; MERHEB, C. W.; MACCHIONE, M. M.; PARK, Y. K. Production of Xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in Different Residues by *Thermoascus aurantiacus* Miede. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 235-241, 2005.

DE CASSIA, P. J.; MARQUES, N. P.; RODRIGUES, A.; OLIVEIRA, T. B.; BOSCOLO, M.;

DA SILVA, R.; GOMES, E.; MARTINS, D. B. A. *Thermophilic* fungi as new sources for production of cellulases and xylanases with potential use in sugarcane bagasse saccharification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 928-939. 2015.

DERAKHTI, S.; SHOJAOSADATI, S. A.; HASHEMI, M.; KHAJEH, K. Process parameters study of α -amylase production in a packed-bed bioreactor under solid- state fermentation with possibility of temperature monitoring. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, p. 203-216, 2012.

DESGRANGES, C.; VERGOIGNAN, C.; GEORGES, M.; DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation. 1. Manual biochemical methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 200-205, 1991.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERMA, M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 78-84. 2013.

DÍAZ, A. B.; DE ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. **Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes**. In The Ninth International Conference on Chemical and Process Engineering, Rome. 2009.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOCHAN, N. Utilization of copra waste for the solid state fermentative production of inulinase in batch and packed bed reactors. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 662-668. 2014.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of Soil Fungi. **Taxon**, v. 31, 1982.

FENILA, F.; SHASTRI, Y. Optimal control of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, p. 96-104. 2016.

FIGUEROA-MONTERO, A.; ESPARZA-ISUNZA, T.; CASTAÑEDA SAUCEDO, G.; HUERTA-OCHOA, S.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; FAVELA-TORRES, E. Improvement of heat removal in solid state fermentation tray bioreactors by forced air convection. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 1321–1331. 2011.

FRASSATTO, P. A. C.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; SILVA, R. Produção de β -glucosidase por *Trichoderma reesei* e *Thermoascus aurantiacus* por cultivo em estado sólido e aplicação de coquetel enzimático para sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p.1-11. 2020.

GERVAIS P, MOLIN P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 85–101. 2003.

GHILDYAL, N. P.; GOWTHAMAN, M. K.; RAO, K. R.; KARANTH, N. G. Interação de resistências de transporte com reação bioquímica em fermentadores de estado sólido de leito fixo: efeito de gradientes de temperatura. **Enzyme and Microbial technology**, v. 16, p. 253-257. 1994.

GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; LONSANE, B K.; KARANTH, N. G.; KRISHNAIAH, M M. Temperature variations and amyloglucosidase levels at different bed depths in a solid state fermentation system. **The Chemical Engineering Journal**, v. 51, p. B17–B23. 1993.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

GLENN, D. R.; ROGERS, P. L. A solid substrate process for an animal feed product: Studies on fungal strain improvement. **Australian Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 50-57, 1988.

GOMES, A. C. S.; CASCIATORI, F. P.; GOMES, E.; NUNES, C. C. C.; MORETTI, M. M. S.; THOMÉO, J. C. Growth kinetics of *Myceliophthora thermophila* M.7.7 in solid-state cultivation. **Journal of Applied Microbiology**. 2020.

GOMES, E.; UMSZA-GUEZ, M. A.; MARTINS, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

GOWTHAMAN, M. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; GHILDYAL, N. P.; KARANTH, N. G. Gas concentration and temperature gradients in a packed bed solid-state fermentor. **Prunled in Great Britain**, vol. 11, p. 611-620, 1993.

GRAJEK, W. Cooling aspects of solid-state cultures of mesophilic and thermophilic fungi. **Journal of Fermentation Technology**.v. 66, p. 675-679. 1988.

HOLKER U.; LENZ J. Solid-state fermentation – Are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301–306. 2005.

IGNÁCIO, E. O. Produção de lipase por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo. 2013. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2013.

JABASINGH, S.; NACHIYAR, C. Utilization of pretreated bagasse for the sustainable bioproduction of cellulase by *Aspergillus nidulans* MTCC344 using response surface methodology. **Industrial Crops and Products**. v. 34, p. 1564–71. 2011.

JAIN, A. Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS68. **Process Biochemistry**, v. 30, p. 705–709. 1995.

KALOGERIS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; ALEXIOU, A.; VLACHOU, S.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1099- 1104, 2003.

KANG, S. W.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Produção de celulasas e hemicelulasas por *Aspergillusniger* KK2 a partir de biomassa lignocelulósica. **Bioresource technology**. v. 91, p. 153-156. 2004.

KHANAHMADI, M., MITCHELL, D. A., BEHESHTI, M., ROOSTAAZAD, R., and SÁNCHEZ, L. R. Continuous solid-state fermentation as affected by substrate flow pattern. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 2675-2687.2006.

KOUTINAS, A. A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 93-100, 2003.

LAURENTINO, C. L. Transferência de calor em leitos fixos com aplicação em reatores de fermentação em estado sólido. 2007. 105f. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2007.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production and characteristics comparison of cru de β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 43, p. 391–395. 2008.

LOPEZ-RAMIREZ, N.; VOLKE-SEPULVEDA, T.; GAIME-PERRAUD, I.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Effect of stirring on growth and cellulolytic enzymes production by *Trichoderma harzianum* in a novel bench-scale solid-state fermentation bioreactor. **Bioresource technology**, v. 265, p. 291-298, 2018.

LU, M. Y.; MADDOX, I. S.; BROOKS, J. D. Application of a multi-layer packed-bed reactor to citric acid production in solid-state fermentation using *Aspergillus niger*. **Process biochemistry**, v. 33, n. 2, p. 117-123. 1998.

LU, W.; LI, D.; WU, Y. Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 305-311. 2003.

LÜTH, P.; EIBEN, U. **Solid-state fermenter and method for solid-state fermentation**, World Patent No. WO 99/57239. 1999.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MAHMOOD, R. T.; ASAD, M. J.; MEHBOOB, N.; MUSHTAQ, M.; GULFRAZ, M.; ASGHER, M, MINHAS, N. M.; HADRI, S. H. Production, purification, and characterization of exoglucanase by *Aspergillus fumigatus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 170, p. 895–908. 2013.

MAHMOODI, M.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHAMMADI, M. Bioconversion of agroindustrial wastes to pectinases enzyme via solid state fermentation in trays and rotating drum bioreactors. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101280, 2019.

MARÍN, M.; SÁNCHEZ, A.; ARTOLA, A. Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes. **Journal of cleaner production**, v. 209, p. 937-946. 2019.

MAZZUTTI, M. A.; ZABOT, G.; BONI, G.; SKOVRONSKI, A.; OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F.; TREICHEL, H. Mathematical modeling of *Kluyveromyces marxianus* growth in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 391-400, 2010.

MENDES, G. D. O.; SILVA, N. M. R. M.; ANASTÁCIO, T. C.; VASSILEV, N. B. RIBEIRO-JUNIOR, J. I.; SILVA, I. R.; COSTA, M. D. Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of the resulting product as a P fertilizer. **Microbial Biotechnology**, v. 8, p. 930 - 939, 2015.

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

MITCHELL, D. A., KRIEGER, N., BEROVIC, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors - Fundamentals of Design and Operation**. 1^a ed. Germany: Springer. 2006.

MITCHELL, D. A.; CUNHA, L. E. N.; MACHADO, A. V. L.; LUZ JUNIOR, L. F. L.; KRIEGER, N. A model-based investigation of potential advantages of multi-layer packed beds in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 195-203, 2010.

MOHARRERI, E.; JAFARI, T.; SUIB, S. L.; SRINIVASAN, N.; GHOBADI, A. F.; JU, L.; ELLIOTT, J. R. Improved understanding of CO₂-water pretreatment of guayule biomass by high solids ratio experiments, rapid physical expansion, and examination of textural properties. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 56, p. 645–652. 2017.

MORETTI, M. M. de S. Isolamento de fungos termofílicos produtores de celulases, xilanases e ferruloil esterase para bioconversão de bagaço de cana de açúcar em açúcares fermentescíveis. 2010. 112f. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

OLIVEIRA, S. P.; RODRIGUES, N. A.; CASCIATORI-FRASSATTO, P. A.; CASCIATORI, F. P. Solid-liquid extraction of cellulases from fungal solid-state cultivation in a packed bed bioreactor. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 9, p. 1530-1540 2020.

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. **Tese (doutorado)**. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil. 2003.

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

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current science**, p. 149-162. 1999.

PARIS, L. D. Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânica, transgênica e convencional. 2008. 115f. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2008.

PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. “Strategies for scaling-up packed-bed bioreactors for solid-state fermentation: The case of cellulolytic enzymes production by a thermophilic fungus”. **Chemical Engineering Journal**. v. 361, p. 1142–1151. 2019.

PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Improving enzyme production by solid-state cultivation in packed-bed bioreactors by changing bed porosity and airflow distribution. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1-12. 2020.

PINTO, T. O. P. Produção de Enzimas Celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e Aplicação na sacarificação do bagaço de cana de açúcar com diferentes pré-tratamentos. 2010. 91f. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; FONSECA, R. F.; PAIXAO, D. A. A.; BALEEIRO, F. C. F.; BERTUCCI NETO, V.; FARINAS, C. S. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465–71. 2013.

RAGHAVARAO, K.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 127–35. 2003.

ROCHA, C. P. Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido. **Dissertação (mestrado)**. Uberlândia: Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia. 2010.

RODRÍGUEZ, A.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A.; FONT, X. Agro-wastes and Inert Materials as Supports for the Production of Biosurfactants by Solid-state Fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-14. 2020.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 46, p. 912-919. 2011.

ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; PREBOIS, J. P.; LONSANE, B. K.. Zymotis, um fermentador de estado sólido em grande escala, projeto e avaliação. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 1, p. 37-52. 1993.

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

SAKDAPETSIRI, C.; FUKUTA, Y.; ARAMSIRIRUJIWET, Y.; SHIRASAKA, N.; TOKUYAMA, S.; KITPREECHAVANICH V. Solid state fermentation, storage and viability of *Streptomyces similanensis* 9X166 using agro-industrial substrates against *Phytophthora palmivora* - induced black rot disease in orchids. **Biocontrol Sci Technol**. v.29, p.276–92. 2019.

SALGADO, J. M.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; BELO, I. Enhancing the bioconversion of winery and olive mill waste mixtures into lignocellulolytic enzymes and animal feed by *Aspergillus uvarum* using a packed-bed bioreactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 42, p. 9306-9314. 2015.

SALOMÃO, G. S. B.; AGNEZI, J. C.; PAULINO, L. B.; HENCKER, L. B.; LIRA, T. S.; TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 17, p. 1-6. 2019.

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

SANTOS, S. F. M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. 151f. **Tese (Doutorado)**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SAQIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**. v. 45, p. 641–646. 2010.

SATHYA, R.; PRADEEP, B.V.; ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** v. 14, n. 6, p. 788–794, 2009.

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

SCULLY SM, ORLYGSSON J. Recent Advances in second generation ethanol production by thermophilic bacteria. **Energies**.v. 8, p. 1–30. 2015.

SHOJAOSADATI, S. A.; BABARIPOUR, 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. Physiologie et métabolisme de *Rhizopus* en culture solide et submergée en relation avec la dégradation d'amidon cru et la production d'acide L (+) lactique. **Tese de Doutorado**. Compiègne. 1992.

SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F. da; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 52-71. 2017.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA B. S.; SAINI, H. S. Novel sources of fungal cellulases for efficient deinking of composite paper wast. **Bio Resources**, v.3, p. 234-246. 2008.

SOUZA, J. V. B.; SILVA, E. S.; MAIA, M. L. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavissporus* 2 A.UMIDA.1. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 455–458. 2003.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, p. 421-424, 2009.

SUN, H.; GE, X.; HAO, Z.; PENG, M. Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 163-166. 2010.

SURYANARAYAN S. Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 189-195, 2003.

SURYANARAYAN, S.; MAZUMDAR, K. **Solid state fermentation**, World Patent No. WO 00/29544. 2000.

UMSZA-GUEZ, M. A. Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucorindicae seudaticae* N31 em escala de frascos e bioreator de leito fixo. 2009. 106f. **Tese (Doutorado)**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

UNICADATA. **Histórico de Produção e Moagem**. Disponível em: <<https://bit.ly/2uIY6Nw>>. Acesso em janeiro de 2020.

VAN DE LAGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. **Chemical Engineering Journal**, v. 84, p. 115-123, 2001.

VAN DE LAGEMAAT, J.; PYLE, D. L. Solid-state fermentation: A continuous process for fungal tannase production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 87, p. 924-929, 2004.

VANDENBERGHE, L. P.; PANDEY, A.; CARVALHO, J. C.; LETTI, L. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; KARP, S. G.; MARTÍNEZ-BURGOS, W. J.; PENHA, R. O.; HERRMANN, L. W.; RODRIGUES, A. O.; SOCCOL, C. R. Solid-state fermentation technology and innovation for the production of agricultural and animal feed bioproducts. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, p. 1-24. 2020.

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

VINIEGRA-GONZALEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; ROMERO-GOMEZ, S.; DIAZGODINEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 157–167. 2003.

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

ZANELATO, A. I. Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em bioreator de leito fixo. 2011. 116f. **Dissertação (Mestrado)**. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; SILVA, R.; THOMÉO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3B in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 43, p. 1536-1544. 2012.