

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**CULTIVO DE *ASPERGILLUS NIGER* C EM ESTADO SÓLIDO EM  
BIORREATOR DE LEITO EMPACOTADO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO  
CÍTRICO E BIOFERTILIZAÇÃO DE SOLOS**

Marília Batistella Costa

Trabalho de Graduação apresentado ao  
Departamento de Engenharia Química da  
Universidade Federal de São Carlos

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Perpétua Casciotori  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thais Suzane Milessi Esteves

São Carlos - SP 2024

**BANCA EXAMINADORA**

Trabalho de graduação apresentado no dia 22 de janeiro de 2024 perante a seguinte banca examinadora:

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Perpétua Casciatori

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thais Suzane Milessi Esteves

Convidada: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosineide Gomes da Silva Cruz

Professora da Disciplina: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mônica Lopes Aguiar

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todas as minhas conquistas até o momento e peço a sua benção para a vinda de novas.

Agradeço à minha mãe por toda a dedicação à minha educação, o carinho e o conforto que ela me traz. Agradeço ao meu pai por todo o apoio e os conhecimentos que ele me proporcionou. Agradeço à minha avó, por todo o chamego recebido. Agradeço ao meu irmão por dividir os momentos familiares e contribuir com todo o seu conhecimento tecnológico. Agradeço ao Alê por sempre estar presente nas horas que mais precisei.

Agradeço aos meus amigos Leo, Carol, Sheetos e Polar por todos os momentos compartilhados, as histórias criadas e as risadas.

Agradeço à Natália Rodrigues por toda a experiência compartilhada e amizade durante a realização deste trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento deste projeto pela bolsa de iniciação científica Ref. Proc. FAPESP 2020/05219-4.

Por fim, agradeço aos meus professores, desde a educação infantil, ensino fundamental, ensino médio e graduação, por todo o conhecimento compartilhado. Agradeço em especial à minha Professora Orientadora, Fernanda Casciotori, por me ajudar a realizar este trabalho e a conquistar grandes sonhos,

## RESUMO

Para minimizar impactos ambientais das atividades agrícolas, é mandatório substituir o uso de agroquímicos produzidos por fontes fósseis por fertilizantes de fontes renováveis. Com relação a fertilizantes fosfatados, geralmente necessários como suplementos nas fases iniciais de cultivo, uma alternativa sustentável é empregar microrganismos capazes de promover a solubilização biológica do mineral proveniente de rochas fosfáticas, nas quais o fósforo está presente na forma de complexos estáveis que precisam ser quebrados para que o mineral se torne disponível para as plantas. O principal mecanismo de solubilização de fosfato por microrganismos está associado à produção de ácidos orgânicos. Neste cenário, o fungo *Aspergillus niger* C se destaca por sua já conhecida capacidade de produzir ácido cítrico e solubilizar fosfato a partir de rochas comerciais. A produção de ácido e a solubilização de fosfato por esse fungo pode ser feita via fermentação em estado sólido (FES), bioprocesso que permite empregar resíduos sólidos agroindustriais como substratos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de um processo industrial de produção de biofertilizante capaz de solubilizar o fosfato presente em rochas fosfáticas comerciais brasileiras utilizando fungo filamentosso *Aspergillus niger* em biorreator de leito empacotado (BLE), foram realizados cultivos em batelada e em modo contínuo em BLE, a fim de comparar os resultados provenientes da ampliação de escala com os resultados dos experimentos em escala de frascos obtidos previamente. Os parâmetros analisados no aumento de escala foram: a concentração de ácidos orgânicos, quantificados como ácido cítrico a partir do método de titulação, a concentração de fosfato solúvel, quantificado pelo método Murphy e Riley, a concentração de proteínas solúveis, quantificadas pela metodologia de Bradford, e os perfis de temperatura. Por fim, foram obtidos resultados que demonstraram haver grande desafio no controle de temperatura dos módulos fermentativos na ampliação de escala, tanto nos cultivos em batelada, quanto no cultivo contínuo, o que acarretou uma baixa metabolização de ácidos orgânicos, com consequência direta na solubilização da rocha fosfática comercial.

**Palavras-chave:** biofertilizante fosfatado; sustentabilidade, cultivo em estado sólido; biorreator de leito empacotado.

## ABSTRACT

To minimize environmental impacts from agricultural activities, it is mandatory to replace the use of agrochemicals produced by fossil sources with fertilizers from renewable sources. Regarding phosphate fertilizers, generally necessary as supplements in the initial stages of cultivation, a sustainable alternative is to employ microorganisms capable of promoting the biological solubilization of the mineral from phosphate rocks, in which phosphorus is present in the form of stable complexes that need to be broken down, so that the mineral becomes available to plants. The main mechanism of phosphate solubilization by microorganisms is associated with the production of organic acids. In this scenario, the fungus *Aspergillus niger* stands out for its already known ability to produce citric acid and solubilize phosphate from commercial rocks. The production of acid and solubilization of phosphate by this fungus can be done via solid state fermentation (FES), a bioprocess that allows the use of agro-industrial solid waste as substrates. In this context, this work aimed to contribute to the development of an industrial biofertilizer production process capable of solubilizing the phosphate present in Brazilian commercial phosphate rocks by studying the ability of the filamentous fungus *Aspergillus niger* in a packed bed bioreactor (BLE) to solubilize the phosphate present in Brazilian commercial phosphate rocks from bench-scale cultivations. Thus, batch and continuous cultivations were carried out in a BLE in order to compare the results from the scale-up with the results previously obtained in flask-scale experiments. The parameters analyzed in the scale-up were: the concentration of organic acids, quantified as citric acid using the titration method, the concentration of soluble phosphate, quantified by the Murphy and Riley method, the concentration of soluble proteins, quantified by the Bradford methodology, and temperature profiles. Finally, the obtained results demonstrated that there is a great challenge in controlling the temperature of the fermentative modules during scale expansion, both in batch cultivation and in continuous cultivation, which resulted in a low metabolization of organic acids, with a direct consequence in the solubilization of the commercial phosphate rock.

**Keywords:** phosphate biofertilizer; sustainability, solid state fermentation; packed bed bioreactor.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	4
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS .....	10
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Importância do fósforo em plantações e necessidade de suplementação.....	14
3.2 Biossolubilização de rochas fosfáticas.....	17
3.3 Cultivo em estado sólido.....	18
3.4 <i>Aspergillus niger</i> e produção de ácido cítrico.....	20
3.5 Biorreator de leite empacotado (BLE).....	22
4 MATERIAIS E METODOLOGIA.....	25
4.1 Microrganismo.....	25
4.2 Matriz sólida porosa.....	25
4.3 Solução nutriente.....	25
4.4 Rocha fosfática.....	26
4.5 Cultivos em estado sólido.....	26
4.6 Biorreator de leite empacotado.....	27
4.7 Métodos Analíticos.....	30
4.7.1 Proteínas solúveis.....	30
4.7.2 pH e acidez.....	30
4.7.3 Determinação de fosfato solúvel.....	31
4.8 Análise cinética do bioprocesso.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
5.1 Cultivo em estado sólido em biorreator de leite empacotado: processo em batelada.....	32
5.2 Análise respirométrica: processo em batelada.....	38
5.3 Cultivo em estado sólido em biorreator de leite empacotado: processo contínuo.....	41
5.4 Análise respirométrica: processo contínuo.....	46
5.5 COMPARAÇÕES COM A LITERATURA.....	48
6 CONCLUSÕES.....	50

7	REFERÊNCIAS .....	51
---	-------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b>	Esquema de um biorreator de bandeja.	22
<b>Figura 3.2</b>	Esquema de um biorreator de leito empacotado.	23
<b>Figura 4.1</b>	Material cultivado em módulo fermentativo em biorreator de leito empacotado.	27
<b>Figura 4.2</b>	Aparato experimental empregado nos cultivos em estado sólido em BLE, sendo E - módulo de entrada, AE - módulo acessório de entrada, MF1, MF2 e MF3 - módulos fermentativos, AS - módulo acessório de saída e S - módulo de saída	28
<b>Figura 4.3</b>	Biorreator de leito empacotado modular: imagem real.	29
<b>Figura 5.1</b>	Perfis de temperatura em duplicata (a e b) dos cultivos em estado sólido em batelada do microrganismo <i>A. niger</i> em BLE na composição de bagaço de cana e farelo de trigo, na proporção de 3:7 (m/m), respectivamente, sendo M1, M2 e M3 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna.	33
<b>Figura 5.2</b>	Comparação entre os perfis de temperatura em batelada no topo do biorreator e o perfil de Rodrigues (2021) na mesma altura, em ensaio de cultivo de <i>A. niger</i> na composição de bagaço de cana e farelo de trigo, na proporção de 3:7 (m/m), respectivamente, sendo M3 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna no ponto mais alto, nas duas bateladas realizadas.	34
<b>Figura 5.3</b>	Perfis da concentração de CO <sub>2</sub> em duplicata na corrente gasosa de saída do BLE, sendo B1 e B2 os dois cultivos em batelada realizados. Ajuste em duplicata do modelo logístico aos dados de CO <sub>2</sub> acumulado dos cultivos em batelada em BLE, senda a figura (a) referente a primeira batelada e a figura (b) referente a duplicata.	39
<b>Figura 5.4</b>	Perfis de temperatura dos cultivos contínuos em estado sólido do microrganismo <i>A. niger</i> em BLE na composição de bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 3:7 (m/m), respectivamente, sendo M1, M2, M3, M4, M5 e M6 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna.	40
<b>Figura 5.5</b>		42



- Figura 5.6** Perfil de concentração de CO<sub>2</sub> na corrente gasosa de saída do BLE. 46  
Ajuste do modelo logístico aos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do cultivo
- Figura 5.7** contínuo em BLE. 47

## LISTA DE TABELAS

	Formas diferencial, integrada e linearizada dos modelos cinéticos*	
<b>Tabela 4.1</b>	a serem empregados na análise cinética do bioprocessamento de solubilização biológica de fosfato por cultivo sólido.	32
<b>Tabela 5.1</b>	Temperaturas médias e temperaturas máximas registradas nos cultivos em batelada de <i>A. niger</i> em BLE na composição BC:FT 3:7, sendo M1, M2 e M3 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna e B1 e B2 as duas bateladas realizadas.	35
<b>Tabela 5.2</b>	Comparação entre concentração de proteínas solúveis, acidez total, pH e concentração de fosfatos solúveis nos cultivos de <i>A. niger</i> em BLE e em embalagens de polipropileno, na composição BC:FT 3:7, sendo M1, M2 e M3 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna e B1 e B2 as duas bateladas realizadas.	37
<b>Tabela 5.3</b>	Constantes específicas de taxa crescimento celular de acordo com o ajuste da equação da logística para os dados de CO <sub>2</sub> acumulado por tempo dos cultivos em batelada, sendo B1 e B2 os dois cultivos realizados.	40
<b>Tabela 5.4</b>	Temperaturas médias e temperaturas máximas registradas no cultivo contínuo de <i>A. niger</i> em BLE na composição 3:7 (m/m) de bagaço de cana e farelo de trigo, respectivamente, sendo M1, M2, M3, M4, M5 e M6 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna.	43
<b>Tabela 5.5</b>	Comparação entre concentração de proteínas solúveis, acidez total, pH e concentração de fosfatos solúveis nos cultivos de <i>A. niger</i> em BLE. Por módulo (M), com numeração crescente da base para o topo, e em modos de operação C: contínuo ou B: batelada, e em embalagem de polipropileno, sendo M1, M2, M3, M4, M5 e M6 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna durante o cultivo contínuo, M1, M2 e M3 os módulos fermentativos adicionados à coluna durante os cultivos B1 e B2 em batelada.	44

	Constantes específicas de taxa de produção de CO <sub>2</sub> de acordo com	
<b>Tabela 5.6</b>	o ajuste da equação da logística para os dados de CO <sub>2</sub> acumulado por tempo dos cultivos em batelada (B1 e B2) e contínuo (C).	47
	Comparação entre dados da literatura e dados obtidos para este trabalho em relação ao microrganismo empregado, ao tipo de	
<b>Tabela 5.7</b>	fermentação, ao substrato utilizado e produção de ácido cítrico por <i>A. niger</i> .	49

## 1 INTRODUÇÃO

Com os crescentes impactos ambientais presenciados pela humanidade provenientes do uso de recursos fósseis, como as mudanças climáticas provocadas pelo efeito estufa, a mudanças de hábitos e processos provenientes do emprego extensivo dos recursos naturais se mostram cada vez mais necessários (IPCC, 2022). Os impactos ambientais são definidos como todas as alterações físicas, químicas ou biológicas do meio ambiente, causadas pelo desenvolvimento de atividades humanas (CONAMA, 2011) e que tiveram um grande aumento após o desenvolvimento de produtos e processos que empregam fontes fósseis.

Neste contexto, o setor agroindustrial tem fundamental importância para a sobrevivência humana, para a economia global e na emissão de gases do efeito estufa. Como exemplo, tem-se a amônia como fertilizante mais utilizado e que é a maior fonte adicional de nitrogênio aplicado, principalmente na forma de ureia e nitratos, na maior parte dos cultivos realizados na superfície do globo. Tal fertilizante é amplamente produzido a partir de gás natural, grande vilão na emissão gases, mas que já há rotas alternativas renováveis de produção em escala industrial.

O fertilizante fosfatado é outro tipo de fertilizante fundamental nas etapas iniciais de crescimento das plantações. No processo produtivo industrial, há o emprego de grande quantidade de ácido sulfúrico, responsável por solubilizar o fósforo em rochas comerciais, presente na forma de complexos estáveis que precisam ser quebrados para que o mineral se torne disponível para as plantas (MENDES E REIS JÚNIOR, 2003). Entretanto, o mecanismo de solubilização pode ser mais sustentável com o emprego de ácidos orgânicos metabolizados por microrganismos, com destaque para o fungo filamentoso *Aspergillus niger* C. Dentre os ácidos orgânicos relatados, o ácido cítrico se destaca por promover uma solubilização da rocha fosfática comparável àquela alcançada pelo ácido sulfúrico convencionalmente usado (KLAIC et al., 2021).

A produção biotecnológica de biofertilizantes fosfatados utilizando *A. niger* pode ser realizada por fermentação submersa ou por fermentação em estado sólido (FES), sendo a FES vantajosa por simular o habitat natural destes microrganismos (KLAIC et al., 2021). Adicionalmente, a FES possui as vantagens de utilizar resíduos e subprodutos da agroindústria como substrato, como o bagaço de cana-de-açúcar, o qual é o subproduto obtido em maior quantidade no Brasil devido ao setor sucroenergético bem estabelecido (CHANDEL et al., 2021).

Um dos principais desafios da FES é o aumento de escala, devido à dificuldade de controle de condições do processo, como a temperatura. Visando superar estes desafios, um

biorreator de leito empacotado (BLE) dotado de módulos fermentativos móveis foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa liderado pela Profa. Fernanda P. Casciotori (RODRIGUES et al., 2022). Este biorreator possui o diferencial de ter a coluna seccionada por módulos onde há a adição de substrato inoculado para realização do processo de fermentação, permitindo a de adição de mais módulos fermentativos durante sua operação, e consequentemente a operação da FES de forma contínua. Entretanto, os processos de transferência de oxigênio e troca de calor apresentam maior resistência à medida que a altura da coluna aumenta, necessitando de estudos.

Neste contexto, considerando os desafios atrelados ao aumento de escala de FES, este trabalho teve como objetivo contribuir com o desenvolvimento de um processo de produção de um biofertilizante fosfatado a partir de meio contendo bagaço de cana por FES em BLE dotado de módulos fermentativos móveis utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger*. A viabilidade do aumento de escala e a capacidade do fungo de metabolizar ácido cítrico responsável por solubilizar o fosfato presente em rochas fosfáticas comerciais brasileiras foi avaliada, visando a contribuir para a obtenção de um material capaz de substituir o fertilizante fosfatado atualmente aplicado nas lavouras, por um composto sustentável capaz de suplementar os solos, seja com a aplicação do composto sólido obtido ao final da fermentação ou de um composto líquido oriundo de uma etapa de extração subsequente à etapa de fermentação.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho de graduação teve como objetivo geral contribuir com o desenvolvimento de um processo de produção de um biofertilizante fosfatado a partir de uma matriz sólida porosa composta por farelo de trigo (FT) e bagaço de cana (BC) por FES em BLE dotado de módulos fermentativos móveis utilizando o fungo filamentosso *Aspergillus niger* visando aplicação para suplementação de fósforo em solos.

Os objetivos específicos foram:

- Realizar cultivos do fungo *Aspergillus niger* C em BLE no modo batelada;
- Realizar cultivos do fungo *Aspergillus niger* C em BLE no modo contínuo;
- Comparar os dois modos de operação e seu potencial para a ampliação de escala
- Avaliar os desafios da ampliação de escala para a fermentação em estado sólido pela comparação dos resultados obtidos e de outros trabalhos da literatura.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção é apresentada uma revisão bibliográfica dos principais conceitos relacionados ao objetivo deste trabalho. Visando fornecer o conhecimento prévio necessário para o entendimento do projeto realizado, assim como o estado da arte do tema, são abordados os seguintes tópicos: fósforo como fertilizante; biossolubilização de rochas fosfáticas; fermentação em estado sólido; *Aspergillus niger* e a produção de ácido cítrico; e biorreator de leito empacotado.

### 3.1 Importância do fósforo em plantações e necessidade de suplementação

O fósforo (P) é um componente importante das células vegetais, incluindo fosfolípidos e fosfocarboidratos, que compõem as membranas vegetais de todas as plantas, o que o torna um dos nutrientes essenciais para o crescimento delas (GOLDSTEIN et al., 1993). Este elemento está envolvido nas reações de transferência de energia, respiração e fotossíntese. Ademais, a energia absorvida pela clorofila durante a fotossíntese é convertida em adenosina trifosfato (ATP) e atua como primeira fonte de energia requerida nos processos biológicos. Assim, a ausência de P pode afetar a floração, a formação e a maturação de frutos, o crescimento das raízes e a multiplicação das células, sendo que o fósforo deve estar dissolvido na água e presente em uma forma inorgânica simples (ânions  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ ) para que possa ser assimilado pelas plantas (PAULIO et al., 2015). O desenvolvimento de manchas arroxeadas nas folhas mais velhas, além do atraso no florescimento, surgimento de

folhas quebradiças e pequeno número de frutos e de sementes são indícios de falta de fósforo (KRISHNARAJ E DAHALE, 2014). Logo, o nutriente é indispensável para o bom desenvolvimento vegetal.

No entanto, estudos têm demonstrado que a concentração de P solúvel na maioria dos solos é baixa, devido a reações de complexação que ocorrem com elementos como ferro, alumínio e cálcio, de forma que realizar uma fertilização ou suplementação fosfatada adequada é fundamental para aumentar o rendimento e a produtividade de diversas culturas agrícolas. Estima-se que, para obter bons rendimentos para culturas como milho e soja, a concentração de P solúvel deve estar entre 200 e 300 mg/kg de solo, entretanto essas concentrações podem variar dependendo do solo e das condições iniciais em que este se encontra (NOVAIS et al., 1991).

No Brasil, a cultura canavieira recebe destaque, particularmente na região de São Carlos e Araraquara. A cana-de-açúcar apresenta sistema radicular diferenciando de outras culturas, uma vez que, não havendo impedimentos físicos ou químicos, atinge camadas profundas do solo. Facilitar o crescimento das raízes em profundidade contribui para o aumento da produtividade da cultura, já que aumenta o volume de solo explorado para a retirada de água e nutrientes. Por isso, P é exigido no início de desenvolvimento das plantas, para assegurar um adequado crescimento de raízes e para impulsionar perfilhamento. As culturas extraem em torno de 15 a 20 kg de fósforo para cada 100 toneladas de cana. Com isso, a adubação fosfatada é imprescindível para a otimização da produção de cana (ROSSETO E SANTIAGO, 2020).

A adubação fosfatada para a cana-de-açúcar é amplamente reconhecida como uma prática eficaz para elevar a produtividade dos canaviais, principalmente nos solos brasileiros, que são, em geral, pobres em fósforo (DA COSTA, 2012). O fósforo faz parte das moléculas de ATP e ADP, participando, portanto, de todos os processos metabólicos que utilizam energia. O elemento também é constituinte de fosfolipídios e moléculas de ácidos nucleicos (DNA e RNA), participando dos processos de divisão celular e transmissão dos caracteres genéticos. Embora o elemento seja um dos macronutrientes menos exigidos pela cana-de-açúcar, as dosagens utilizadas estão entre 100 e 150 kg de  $P_2O_5$  por hectare, sendo que, geralmente, o fósforo é aplicado uma única vez, no sulco de plantio. Essa dose de fósforo satisfaz, portanto, a necessidade da cultura por cinco anos (ROSSETO E SANTIAGO, 2020).

No entanto, o solo da região de São Carlos caracteriza-se por ser do tipo latossolo vermelho-escuro. Os latossolos apresentam pequena reserva de nutrientes para as plantas,

pH entre 4,0 e 5,5 e teores de fósforo disponível extremamente baixos, quase sempre inferiores a  $1\text{mg/dm}^3$  (DE SOUSA E LOBATO, 2021). Em geral, são solos com grandes problemas de fertilidade. Os latossolos são passíveis de utilização com culturas anuais, perenes, pastagens e reflorestamento. Normalmente, são profundos, porosos, bem drenados, bem permeáveis mesmo quando muito argilosos, friáveis e de fácil preparo. Logo, um fator limitante para cultivo é a baixa fertilidade desses solos. Contudo, aplicações adequadas de corretivos e fertilizantes aliadas à época propícia de plantio de cultivares adaptadas levam a boas produções (DE SOUSA E LOBATO, 2020).

A suplementação de fósforo é realizada principalmente na forma de fertilizantes fosfatados solúveis, como o superfosfato simples (SSP) e superfosfato triplo (TSP). As rochas fosfáticas, definidas como minérios que possuem alguma fase cristalina rica em fósforo, são a principal fonte de matéria-prima para produção de fertilizantes fosfatados, razão pela qual estão sendo constantemente exploradas para suprir as altas demandas das indústrias de fertilizantes (LAPIDO-LOUREIRO E MELAMED, 2006).

Vale ressaltar, que o consumo mundial de P para agricultura entre o biênio 2016/2017 foi em torno de 46,9 Mt  $\text{P}_2\text{O}_5$  e houve previsão de aumento de 2% ao ano até 2020 (IFA, 2017). Para obtenção de fertilizantes fosfatados a partir de rochas fosfática, usualmente é empregado o processamento químico. No entanto, esse processo envolve alto consumo de energia, uso de ácidos inorgânicos fortes como o ácido sulfúrico e fosfórico, liberação de contaminantes gasosos, além da geração de subprodutos indesejáveis como o fosfogesso (CANOVAS et al., 2018; CONAMA, 2011). Estudos tem mostrado que para cada tonelada de  $\text{P}_2\text{O}_5$  são produzidas 4,5 toneladas de fosfogesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e este subproduto pode causar eutrofização de lagos e rios (CANOVAS et al., 2018; TAYIBI et al., 2009). Vale ainda mencionar que a geração de poluentes gasosos desse processo pode levar a um aumento da mortalidade e da morbidade na população local onde indústrias desse ramo estão instaladas (CONAMA, 2011). Portanto, é mandatário o emprego de rotas de produção de biofertilizantes fosfatados que não prejudiquem o meio ambiente.

Ademais, uma classe de novos produtos para a agricultura baseada no desenvolvimento de compósitos-fertilizantes para promover a liberação controlada de nutrientes vem se destacando recentemente (GIROTO et al., 2014; 2017). Entretanto, compósitos com a função de promover o aumento de solubilidade de fontes de nutrientes de baixa reatividade, como as rochas fosfáticas, ainda são pouco explorados. Existem trabalhos promovem o encapsulamento de microrganismos que promovem a solubilização de fosfato em materiais como alginato de cálcio para posterior adição destes materiais ao solo ou



mesmo a biorreatores, para a solubilização de rocha fosfática por cultivo submerso (JAIN et al., 2010; SCHOEBITZ et al., 2013; VASSILEV et al., 1995; 2017). Entretanto, na maioria das matrizes utilizadas para o encapsulamento de microrganismos não se obtém uma boa dispersão de material particulado, ou quase nenhum material pode ser dispersado conjuntamente com o encapsulamento devido às limitações dos tradicionais métodos de processamento. Assim, desenvolver um compósito a partir de um material compatível para promover boa dispersão de minerais de baixa solubilidade e simultaneamente encapsular microrganismos para promover a solubilização dessas fontes de nutrientes seria um conceito inovador de uma nova classe de fertilizantes (KLAIC, 2018).

### 3.2 Biossolubilização de rochas fosfáticas

Uma alternativa que vem sendo estudada e desenvolvida visando reduzir o impacto ambiental da produção de fertilizantes, bem como a diminuir os custos de processo, é a solubilização de rochas fosfáticas por rota biotecnológica. Tal alternativa consiste em aplicar um microrganismo para promover a solubilização da rocha, de modo que o produto resultante seja denominado biofertilizante fosfatado. Embora existam muitos microrganismos capazes de solubilizar fosfatos, destacam-se gêneros de bactérias *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Agrobacterium* e fungos *Aspergillus* e *Penicillium* (Krishnaraj e Dahale, 2014). Nesse tipo de bioprocessamento, o microrganismo atua como agente solubilizador de fosfato, tendo como função transformar o fósforo insolúvel presente nas rochas fosfáticas em suas formas solúveis.

O principal mecanismo de solubilização de fosfatos inorgânicos ocorre pela habilidade bioquímica que alguns microrganismos têm de produzir metabólitos de baixa massa molecular, como ácidos orgânicos. Assim, a solubilização de fosfato ocorre paralelamente à redução do pH do meio, uma vez que ambos os efeitos se dão em consequência da produção e secreção de ácidos orgânicos pelos microrganismos. Os grupos hidroxila e carboxila dos ácidos orgânicos podem sequestrar os cátions (principalmente o cálcio) ligados ao fosfato e, deste modo, converter o fosfato insolúvel em formas solúveis (KLAIC, 2018). Alguns ácidos orgânicos, tais como ácidos glucônico, oxálico e o ácido cítrico, têm sido reportados como bons agentes quelantes, razão pela qual podem atuar na solubilização de fontes de fosfato (KPOMBLEKOUA E TABATABAI, 1994). Vale ressaltar, que entre esses ácidos orgânicos, foi relatado que o ácido cítrico promove uma solubilização das rochas fosfáticas comparável àquela alcançada pelo ácido sulfúrico (LAZO et al., 2017; LIU E LAL, 2015; SCHNEIDER et al., 2010).

A solubilização pode ainda ser auxiliada por outros mecanismos biológicos, que, por sua vez, têm efeito apenas complementar ao da solubilização por ácidos orgânicos. Enzimas como fitases e fosfatases, que podem ser produzidas por alguns microrganismos, também podem catalisar a solubilização de fosfatos inorgânicos (VASSILEV et al., 2007). Além disso, fungos filamentosos podem aderir fortemente às partículas das rochas e penetrar suas hifas em direção aos poros do material, podendo aumentar a eficiência de solubilização, em comparação ao simples emprego de soluções acidificadas (LODI, 2020). Tais resultados permitem inferir que os fungos filamentosos são particularmente promissores para tais aplicações.

### 3.3 Cultivo em estado sólido

O cultivo em estado sólido (CES), também conhecido como fermentação em estado sólido (FES), pode ser definido como o crescimento de microrganismos sobre partículas sólidas úmidas, em situações nas quais o espaço entre as partículas contém uma fase gasosa contínua, que normalmente está saturada em água para manter um teor adequado deste elemento, vale ressaltar que a água está impregnada nas partículas ou forma um fino filme sobre elas, apresentando melhor aeração e menor risco de contaminação em relação a fermentação submersa. Embora não deva exceder a capacidade de retenção da matriz porosa, o conteúdo de água deve ser suficientemente alto para assegurar o desenvolvimento das atividades metabólicas dos microrganismos (MITCHELL et al., 2006).

Devido às atividades de água mais baixas encontradas nos sistemas de FES, os microrganismos que mais se adaptam a esse tipo de cultivo são os fungos filamentosos, para os quais a FES reproduz seu habitat natural, o que faz com que estes secretem naturalmente grandes quantidades de metabólitos para o meio extracelular, favorecendo a extração dos compostos produzidos, uma vez que os produtos se encontram em concentrações elevadas (UMSZA-GUEZ, 2009). Com isso, a FES é muito utilizada para *Aspergillus niger*, microrganismo empregado neste projeto, que é um fungo filamentoso reconhecidamente capaz de produzir ácido cítrico e, conseqüentemente, também de solubilizar fosfato a partir de rochas. Ademais, este processo pode ser aeróbio ou anaeróbio, visto que a palavra fermentação pode ser entendida como a quebra de compostos orgânicos por microrganismos na presença ou ausência de oxigênio (BRENJIAN et al., 2021).

É comum que a umidificação desses biomateriais seja com solução nutriente de pH corrigido para adequar às melhores condições de crescimento microbiano e suprir a falta de

algum componente (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 disso, 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).

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 % (SOCCOL, 1992).

Uma vantagem adicional da FES é a possibilidade de utilizar resíduos sólidos agroindustriais como fontes de carbono e de energia para o crescimento dos microrganismos, os quais são abundantes e de baixo ou nenhum valor comercial, o que torna o processo mais econômico, com uma redução de 25 a 50% nos custos do bioprocessamento (SATHYA et al., 2009), e ainda ambientalmente amigável, ao dar um destino adequado a rejeitos que poderiam ficar se acumulando nos pátios das agroindústrias (FARINAS, 2015).

Nesse sentido, o Brasil tem um forte potencial para o desenvolvimento de processos com FES, já que tem como base de sua economia a agricultura, clima predominantemente tropical, abundante incidência de raios solares, terras aráveis e água, resultando em uma geração enorme 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 e com a construção de uma economia circular (VANDENBERGHE et al., 2020).

Ademais, processos que envolvem FES são particularmente atraentes para aplicações industriais, oferecendo rendimentos de produção mais elevados (mais garantido em termos de produto por volume) (LEKANDA E PEREZ-CORREA, 2004). FES oferece menor consumo de energia, menor custo de operação e despesas para investimento, menos

processamento *downstream*, além de produzir menos efluentes do que a fermentação submersa (PANDEY, 2003; LEKANDA E PEREZ-CORREA, 2004). Apesar dessas vantagens, uma grande quantidade de calor é gerada durante FES, que é diretamente proporcional às atividades metabólicas do microrganismo. Às vezes, o acúmulo de calor pode ser tão alto, que ocorre a morte do fungo empregado no processo ou a desnaturação de produtos formados e acumulados ao longo do leito fermentativo. Além das atividades metabólicas do microrganismo, a falta de água livre e baixa condutividade de partículas sólidas, também podem levar a gradientes de calor na FES (PANDEY, 2003; HAMIDIESFAHANI et al., 2004).

Assim, pode-se dizer que o controle da umidade e da temperatura dos processos de FES em escala laboratorial é relativamente simples. Todavia, quando o objetivo é o aumento de escala, manter níveis adequados de umidade e temperatura pode ser uma tarefa difícil e em escala piloto e, principalmente, escala industrial (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 massa 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 de operação do biorreator. Conseqüentemente, os sistemas em FES são mais complexos do que a maioria dos sistemas com fermentação submersa.

### 3.4 *Aspergillus niger* e produção de ácido cítrico

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-propano ou 1,2,3-ácidotricarboxílico), intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), foi isolado no final do século XVIII a partir de suco de limão. Já próximo ao final do século XIX, ácido cítrico foi sintetizado a partir de glicerol e de dicloroacetona. Diversas outras rotas sintéticas utilizando diferentes matérias-primas foram utilizadas. No entanto, diante do aumento da importância comercial e industrial deste ácido, ocorreu gradualmente a substituição destes processos de extração ou síntese química por outros que utilizavam fungos (TORRADO et al., 2011).

Assim, foi descrita a produção de ácido cítrico como resultado do metabolismo de vários microrganismos, tais como *Penicillium glaucum*, *Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. nidulans*, *A. fonsecaeus*, *A. luchensis*, *A. phoenicus*, *A. wentii*, *A.saitoi*, *A. flavus*, *Absidia sp.*, *Acremonium sp.*, *Botrytis sp.*, *Eupenicillium sp.*, *Mucor piriformis*, *Penicillium janthinellum*, *P. restrictum*, *Talaromyces sp.*, *Trichoderma viride* e *Ustilina vulgar*. Porém,

foi já no século XX que se descobriu que algumas cepas de *Aspergillus niger* produziam grandes quantidades do bioproduto sob condições de pH entre 2,5 e 3,5, estabelecendo a base da produção industrial de ácido cítrico, que foi patenteada nos Estados Unidos (TORRADO et al., 2011).

O *Aspergillus niger* continua sendo o principal microrganismo utilizado na produção industrial de ácido cítrico, que ocorre principalmente por cultivo aeróbio submerso (BARRINGTON E KIM, 2008). O gênero possui extrema relevância por sua patogenicidade, as micotoxinas produzidas (AFONSO, 2015). As micotoxinas são um grupo de metabólitos secundários que são formadas durante o crescimento do fungo filamentosos. Tais compostos podem estar presentes no fungo ou são excretados no meio, ou seja, nos alimentos, levando à sua contaminação, que do ponto de vista agrônomo, é caracterizado como patógeno oportunista (SORATO VARGA et al., 2004). Já em relação ao contato humano, há a possibilidade de contração de aspergilose que é uma doença infecciosa oportunista causada por meio da inalação de esporos por indivíduos com imunidade reduzida (MINISTÉRIO DA SAÚDE). Importante dizer que em 90% dos casos de ocorrência, o responsável é o fungo *Aspergillus fumigatus*, sendo o restante dividido entre os microrganismos *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* (MINISTÉRIO DA SAÚDE). Como sintomas há tosse com presença de catarro ou sangue, dificuldade ao respirar, dor no peito, perda de peso e febre alta, tendo como tratamento o emprego de antifúngicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE).

Os substratos mais utilizados industrialmente são beterraba e melão de cana-de-açúcar (ADHAM, 2002). Entretanto, sua alta demanda tem implicado no emprego de novos processos, mais econômicos e sustentáveis, como a utilização de resíduos e subprodutos agroindustriais em cultivo em estado sólido, dentre eles o bagaço de cana-de-açúcar, que oferece inúmeras vantagens em relação às técnicas convencionais, pois além de reduzir os custos de produção, impactos ambientais e não ser um produto alimentício, oferece extração mais eficiente do produto (KUMAR et al., 2003; DHILLON et al., 2013).

Atualmente, o ácido cítrico é o segundo metabólito microbiano mais produzido no mundo, perdendo apenas para o etanol, sendo estimado em mais de 1,7 milhões de toneladas/ano e valor de mercado ultrapassando 2 bilhões de dólares por ano (DHILLON et al., 2013). Suas propriedades o tornam um produto multifuncional: cerca de 70% de sua produção total é utilizada na indústria alimentícia como acidificante e no melhoramento do sabor de alimentos e bebidas, seguida pela indústria farmacêutica, que utiliza cerca de 12% do bioproduto na síntese de biopolímeros, e 18% são utilizados para outras aplicações como

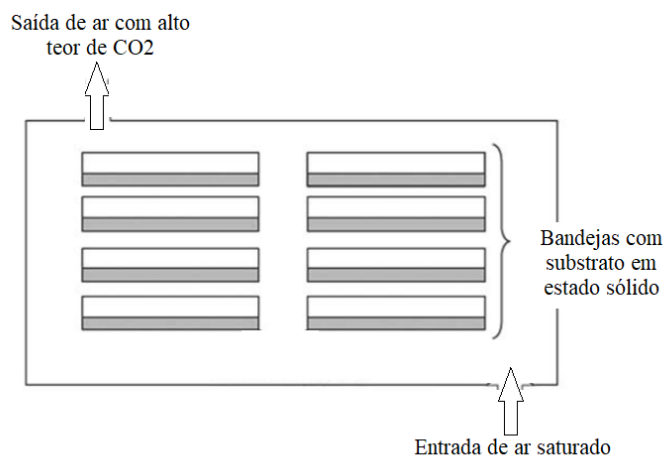
aditivos detergentes, cosméticos, produtos de higiene pessoal e na agricultura, para a biorremediação de metais pesados no solo (SOCCOL et al., 2006).

### 3.5 Biorreator de leito empacotado (BLE)

Apesar de seu excelente potencial de aplicação, a FES ainda não está plenamente estabelecida como alternativa industrial bem-sucedida, principalmente devido à falta de equipamentos industriais disponíveis e otimizados.

Em relação ao desafio de evitar acúmulo de calor, a mistura do conteúdo fermentativo pode melhorar significativamente a transferência de calor para a parede do reator. Entretanto, nem todos os fungos filamentosos, em especial o *Aspergillus niger*, e substratos sólidos toleram o atrito proveniente do movimento de mistura. Assim, o leito fermentativo deve ser mantido estático durante a fermentação para o sucesso do processo desejado. Nesse contexto, dois tipos de biorreatores que fornecem leitos estáticos estão disponíveis, são eles: biorreatores de bandeja e biorreatores de leito empacotado. Nos biorreatores de bandeja (Figura 3.1), nos quais o ar não é soprado através das bandejas, a remoção de calor é limitada às superfícies delas. Conseqüentemente, a altura total do leito se limita a alguns centímetros, assim, tais reatores são restritivos na quantidade de substrato que pode ser fermentado.

**Figura 3.1:** Esquema de um biorreator de bandeja.

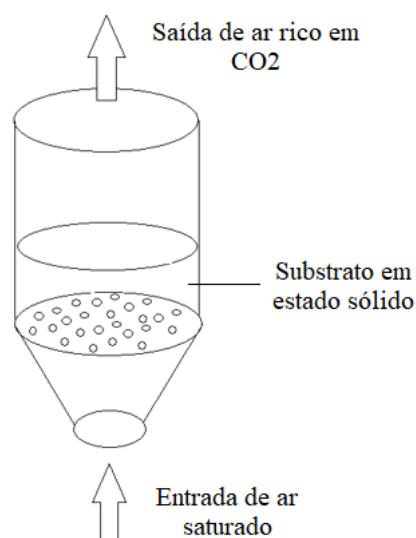


**Fonte:** Adaptado de Couto e Sanroman (2006).

Em biorreatores de leito empacotado (BLE) (Figura 3.2), os problemas citados anteriormente são parcialmente superados pela aeração forçada, ademais, nos BLE maiores alturas do leito fermentativo podem ser alcançadas. Todavia, esta classe de biorreatores

também está sujeita ao problema de superaquecimento do leito devido à remoção deficiente do calor metabólico gerado, o que pode inibir o crescimento do fungo e afetar o rendimento e a estabilidade do bioproduto de interesse. Segundo Ghyndial et. al (1994), durante os horários de pico de produção de calor, a temperatura pode subir 10 °C ou mais acima da temperatura ótima. Ainda segundo o experimento realizado por Ghildyal et.al. (1994), onde os estudos experimentais foram conduzidos em um biorreator de leito empacotado utilizando farelo de trigo como substrato e o fungo *Aspergillus niger* para a produção da enzima amiloglucosidase, resultados indicaram que os gradientes de temperatura causados por resistências de transferência de calor foram reduzidos consideravelmente com a existência de corrente de ar forçada e como consequência, houve aumentos correspondentes na atividade enzimática produzida.

**Figura 3.2:** Esquema de um biorreator de leito empacotado.



**Fonte:** Autora.

Mesmo com a dificuldade de controle da temperatura, biorreatores de leito empacotado são mais comumente aplicados na FES devido ao seu projeto simples, custo reduzido, baixas exigências de manutenção e menores chances de contaminação em relação ao biorreator de bandeja (SOCCOL et al., 2017).

Vale ressaltar, que um BLE típico consiste em uma coluna de seção transversal cilíndrica de parede dupla (encamisada), orientada verticalmente e com uma placa perfurada no fundo para suportar o leito de substrato, com ar sendo continuamente soprado através da

base e percolado através do leito. 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., 2016). 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, conseqüentemente houve a diminuição da produção de celulasas e inulinasas, respectivamente. Dessa maneira, gradientes axiais de temperatura são praticamente inevitáveis. Vale ressaltar, que o acúmulo de calor pode causar a desnaturação enzimática e prejudicar o crescimento microbiano e a produção de metabólitos (MITCHELL et al., 2010; FIGUEIROA-MONTERO et al., 2011). 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).

Entretanto, devido à possibilidade da presença da camisa no BLE e da aeração forçada por todo o leito, os problemas citados anteriormente, 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).

Por conta de não haver um método eficiente de remoção do calor metabólico gerado, biorreatores de leito fixo raramente são empregados para operações em larga escala. Entretanto há estudos que visam otimizar este parâmetro, com o desenvolvimento de biorreatores de leito fixo encamisados e compostos por secções fermentativas independentes (módulos fermentativos), como o empregado neste trabalho.



## **4 MATERIAIS E METODOLOGIA**

### **4.1 Microrganismo**

Foi empregado o fungo *Aspergillus niger C* (mesofílico), já utilizado por Klaic (2018), tendo proporcionado resultados muito promissores de solubilização de rocha fosfática em cultivos sólido e submerso. O fungo pertence à coleção do Laboratório de Agroenergia da Embrapa Instrumentação (São Carlos – SP), tendo sido as linhagens de *Aspergillus niger C* isoladas originalmente de resíduos de manteiga e cedidas pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro – RJ). Foi empregado nos cultivos a concentração  $10^7$  esporos/mL de esporos na suspensão.

### **4.2 Matriz sólida porosa**

Para composição da matriz sólida porosa, foram empregados bagaço de cana (BC) e farelo de Trigo (FT) na proporção de 3 partes de FT e 7 partes de BC (3:7 m/m). O farelo foi comprado no comércio local. O bagaço foi doado pela Usina Santa Cruz, do Grupo São Martinho, situada na cidade de Américo Brasiliense – SP. O bagaço e o farelo foram secos a 60 °C por 48 a 72 h (até peso constante) em estufa de convecção forçada, para evitar deterioração dos materiais durante o armazenamento e garantir o mesmo lote de material para todos os experimentos. O bagaço seco foi peneirado com auxílio de uma peneira de café com abertura de 6 mm, que reteve as fibras mais grossas empregadas nos experimentos. Os componentes da matriz sólida porosa foram autoclavados antes de todos os cultivos (121 °C, 1,1 atm, 20 min).

### **4.3 Solução nutriente**

A matriz sólida foi umidificada por adição de solução nutriente até 72 % de umidade em base úmida. Esse teor de umidade foi definido com base em testes preliminares, conduzidos para avaliação da capacidade de retenção de água pela matriz composta por bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 3:7 m/m. A solução nutriente foi adaptada do meio de Pikovskaya (1948), tendo a seguinte composição (m/v):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 %; NaCl, 0,2 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 %; KCl, 0,2 %;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,002 %; e  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 %. A solução nutriente foi autoclavada separadamente antes de todos os cultivos (121 °C, 1,1 atm, 20 min).

#### 4.4 Rocha fosfática

Foi empregada a rocha fosfática comercial Itafós, uma rocha ígnea proveniente da cidade de Arrais no Tocantins, que apresenta alta porosidade, além de ter uma maior e mais eficiente velocidade de dissolução, alta reatividade e ser facilmente solubilizado pelos diferentes ácidos existentes. Esta também foi cedida gentilmente pela EMBRAPA Instrumentação de São Carlos. O pó foi preparado por meio de moagem da amostra comercial por um período de 2h em um moinho orbital (Servitech CT 241 – 0,5 HP), que consiste em um vaso de porcelana (1000 mL) recheado com esferas de alumina. A concentração de rocha adicionada ao meio de cultivo como fonte de fósforo insolúvel correspondeu a 2,0 % (m/v) na solução nutriente. Tal concentração obteve os melhores resultados em testes prévios realizados previamente pelo grupo.

#### 4.5 Cultivos em estado sólido

Com base em Klaic (2018), a temperatura ideal de solubilização de fosfato pelo fungo *A. niger C* é 30 °C. O tempo de cultivo foi de 72h, determinado pelos testes de cinética realizados previamente pelo grupo de pesquisa. Os ensaios fermentativos foram realizados em biorreator de leito empacotado contendo três módulos fermentativos. Para início dos cultivos, bagaço de cana e farelo de trigo secos foram pesados na proporção 3:7 m/m até totalizar 195 g por módulo. O material foi esterilizado por calor úmido (autoclave, 121 °C, 1,1 atm, 20 minutos) dentro de uma embalagem plástica, na qual posteriormente foi feita a inoculação da suspensão fúngica e transferência para o módulo do biorreator. Foram adicionados 31,53 mL de suspensão de esporos com concentração de  $10^7$  esporos por módulo, o que equivale a  $10^6$  esporos por grama de substrato sólido seco inicial. Em seguida, a umidade do meio sólido foi ajustada para 72 % (em base úmida) através da adição de solução nutriente (composição conforme item 4.3) com 2% (m/v) de rocha fosfática, com pH ajustado para 2,5, tendo essa solução também sido previamente esterilizada. Finalmente, o material foi homogeneizado manualmente, para boa distribuição da solução de umidificação e do inóculo.

Toda a manipulação foi realizada em ambiente estéril, proporcionado por câmara de fluxo laminar, esterilizada por radiação ultravioleta e álcool a 70%. Os módulos fermentativos foram incubados por 72 h. A Figura 4.1 mostra o aspecto do material dentro do módulo fermentativo ao final do cultivo. A coloração preta do sólido fermentado é indicativa da colonização do material pelo fungo *A. niger C*.

Ao final do tempo de cultivo, os metabólitos produzidos foram recuperados por meio de extração sólido-líquido. Ao conteúdo dos módulos fermentativos (contendo 195 g de substrato sólido seco inicial), foram adicionados 5 mL/g de água destilada. A mistura foi homogeneizada sob agitação manual por no mínimo 10 minutos. Em seguida, o líquido foi separado do sólido por filtração em papel de filtro e então centrifugado por 20 minutos a 12.000 rpm e 20 °C. O sobrenadante obtido foi utilizado como extrato bruto para as análises de proteínas solúveis, pH, acidez total e de fosfato solúvel, em triplicata analítica.

**Figura 4.1:** Material cultivado em módulo fermentativo em biorreator de leito empacotado.



**Fonte:** Acervo pessoal.

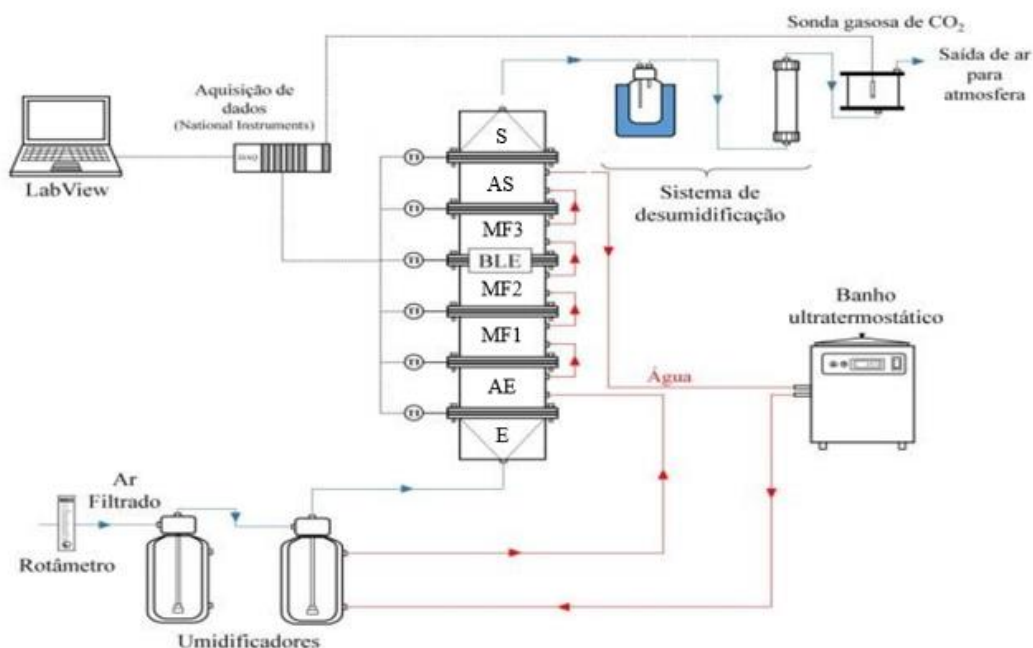
#### 4.6 Biorreator de leito empacotado

O aparato experimental utilizado nos experimentos está apresentado na Figura 4.2. Na base do equipamento há a entrada de ar saturado empregado na aeração dos módulos fermentativos. Importante dizer que, antes de sua entrada no equipamento, o ar foi comprimido e filtrado para retirada de impurezas grosseiras, passando, em seguida, por 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. Em relação a saída de ar carregado de CO<sub>2</sub> e água, há uma etapa de desumidificação composta por um trap, na 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 CO<sub>2</sub> por sonda.

**Figura 4.2:** Aparato experimental empregado nos cultivos em estado sólido em BLE, sendo E - módulo de entrada, AE - módulo acessório de entrada, MF1, MF2 e MF3 - módulos fermentativos, AS - módulo acessório de saída e S - módulo de saída.



**Fonte:** Adaptado de Rodrigues, N. A. (2021)

A configuração do biorreator é similar à empregada nos estudos de Zanelato (2011), Casciatori (2015), Perez et al. (2019) e Rodrigues (2021), como mostra a Figura 4.3, na qual os números de 1 a 3 representam os módulos que constituem o equipamento. A coluna é composta por módulos de formato cilíndrico em aço inoxidável, que possuem 10 cm de altura, 13 cm de diâmetro interno e 15 cm de diâmetro externo. Há um espaço anular externo que é preenchido com água a fim de manter a temperatura ideal de processo e evitar sobreaquecimento. Para circulação da água nas camisas foram utilizadas mangueiras que conectaram um módulo ao 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 côncavo para direcionar o escoamento. Entre um módulo e outro foi colocada um flange, de 1,3 cm de espessura,

juntamente com um anel de borracha, para garantir a vedação do equipamento e evitar contaminações.

**Figura 4.3:** Biorreator de leito empacotado modular: imagem real.



**Fonte:** Acervo pessoal.

A seção cônica de entrada, foi preenchida com 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 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.

Aos módulos fermentativos, foram acrescentados os substratos úmidos inoculados com esporos fúngicos. Vale ressaltar 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. No módulo acessório de saída, foi colocado bagaço grosso seco, 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.

É importante salientar que o empacotamento de todos os módulos foi realizado utilizando a técnica *loose packing* (LP) proposta por Casciadori 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 de ar 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 dos flanges na posição radial central de todos os módulos. Também foi realizado o monitoramento online da concentração de CO<sub>2</sub> com auxílio de uma sonda Analog Output Transmitter Indigo 201 da marca VAISALA, que 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).

## **4.7 Métodos Analíticos**

### **4.7.1 Proteínas solúveis**

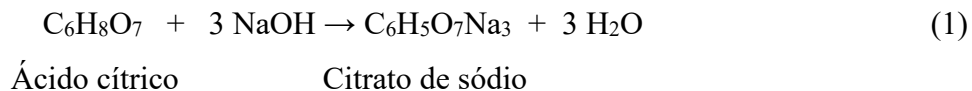
A concentração de proteínas solúveis no extrato líquido obtido a partir de cada módulo fermentativo foi determinada em triplicata analítica. Para tanto, foi empregado o método de Bradford (1976), que consiste em reagir 20 µL de amostra com 1 mL do reagente de Bradford em uma cubeta, com tempo de incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, após o que foi feita leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. O equipamento foi zerado com o branco, composto por 20 µL de água e 1 mL do reagente de Bradford, e uma curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas de uma solução de soro albumina bovina.

### **4.7.2 pH e acidez**

O pH dos extratos líquidos obtidos ao final dos cultivos foi medido com auxílio de um eletrodo de vidro, que conta com compensação de temperatura.

Para determinação da acidez titulável ou acidez total em ácidos orgânicos expressos em ácido cítrico, foram realizadas titulações. Em tal análise, 5 mL de extrato bruto foram diluídos em 45 mL de água destilada, e a mistura resultante foi adicionada de 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína (1% m/v) e titulada até a viragem com solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Neste caso, como o extrato foi diluído, foi possível visualizar o

ponto de viragem pela mudança de coloração do indicador. Para o cálculo da acidez expressa em ácido cítrico, tomou-se por base a relação estequiométrica (Equação 1) da reação que ocorre na titulação:



Com base nessa relação, por meio da Equação 2, calculou-se a acidez total da amostra:

$$\text{Acidez} \left( \text{em ácido cítrico, } \frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{\frac{1}{3} M_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}} \cdot MM_{\text{ácido cítrico}}}{V_{\text{amostra}}} \quad (2)$$

onde  $M_{\text{NaOH}}$  é a molaridade da solução de NaOH usada como titulante (mol/L);  $V_{\text{gasto NaOH}}$  é o volume de solução gasto na titulação (L), tomado como sendo a média da triplicata analítica;  $MM_{\text{ácido cítrico}}$  é a massa molar do ácido cítrico (igual a 192 g/mol) e  $V_{\text{amostra}}$  é o volume de amostra titulado (L). Efeitos de diluições, quando aplicáveis, foram considerados para o cálculo da acidez do extrato bruto inicial.

#### 4.7.3 Determinação de fosfato solúvel

Os extratos obtidos dos cultivos na presença de rocha fosfática foram também analisados em termos da concentração de fosfato solúvel. Para tanto, foi empregado o método colorimétrico adaptado de Murphy e Riley (1962). Uma alíquota de 5 mL da amostra de sobrenadante clarificado diluído 10 vezes reagiu com 2 mL de uma solução de ácido ascórbico (0,4 mol/L), 0,2 mL de solução de ácido cítrico (0,03 mol/L) e 2 mL de um reagente composto por 25 mL de uma solução de ácido sulfúrico (4,7 mol/L), 5,5 mL de solução de molibdato de amônio (0,08 mol/L) e 0,6 mL de solução de tartarato de antimônio e potássio (0,05 mol/L). Esta mistura reagiu a 50°C por 15 minutos, formando um complexo azul de fosfo-antimonial-molibdênio; em seguida, a mistura foi colocada em banho de gelo.

A concentração do complexo formado foi determinada indiretamente por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 880 nm. O branco foi feito a partir do mesmo procedimento, com água ultrapura tipo I substituindo o extrato bruto. A curva padrão de fosfato solúvel foi construída a partir de uma solução mãe de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , este seco em estufa a 105°C e esfriado em dessecador, a partir da qual foram preparadas diluições com concentrações entre 5 e 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

#### 4.8 Análise cinética do bioprocesso

Curvas cinéticas foram construídas para visualização da evolução do teor CO<sub>2</sub>, representado como uma medida indireta de crescimento do microrganismo. Às curvas cinéticas experimentais, foram ajustados modelos cinéticos de ordem zero, de primeira ordem e logístico (Tabela 4.1), para ajuste de parâmetros de crescimento (estimado indiretamente com base no teor de CO<sub>2</sub>).

**Tabela 4.1.** Formas diferencial, integrada e linearizada dos modelos cinéticos\* a serem empregados na análise cinética do bioprocesso de solubilização biológica de fosfato por cultivo sólido.

Modelo	Forma Diferencial	Forma Integrada	Forma Linearizada
Ordem Zero	$\frac{dX}{dt} = k_0$	$X = k_0 \cdot t + X_0$	-
Primeira Ordem	$\frac{dX}{dt} = k_1 \cdot X$	$X = X_0 e^{k_1 t}$	$\ln(X) = k_1 \cdot t + \ln(X_0)$
Logístico	$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$	$X = \frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m}{X_0} - 1\right) e^{-\mu t}}$	-

\*X representa a variável resposta (proteínas, acidez ou fosfato solubilizado) no tempo t, X<sub>m</sub> seu valor máximo e X<sub>0</sub> seu valor inicial; k<sub>0</sub>, k<sub>1</sub> e μ<sub>m</sub> são as constantes de taxa dos modelos de ordem zero, de primeira ordem e logístico, respectivamente, ajustados aos dados cinéticos experimentais para as curvas de proteínas, acidez e fosfato solubilizado em função do tempo de cultivo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

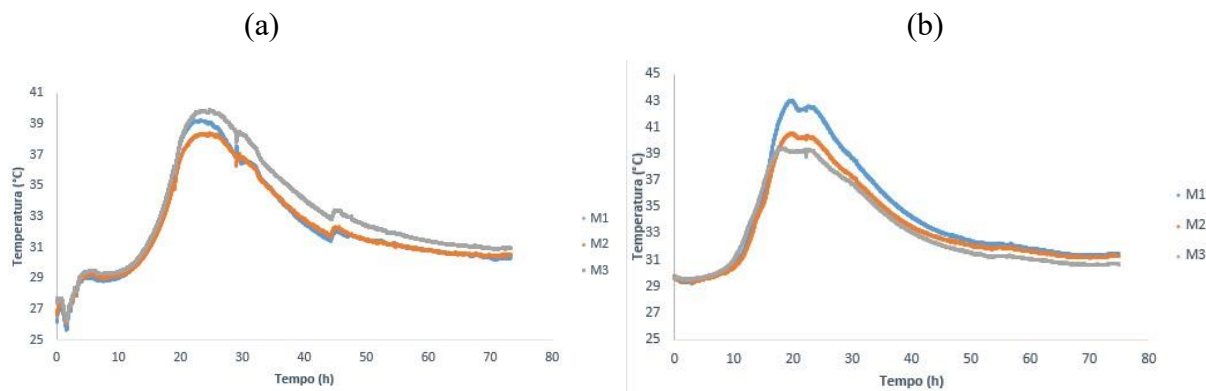
Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos em cada cultivo realizado em BLE, tanto em batelada quanto contínuo, além de uma comparação teste trabalho com trabalhos já publicados na literatura.

### 5.1 Cultivo em estado sólido em biorreator de leito empacotado: processo em batelada

As FES em batelada foram realizadas de forma que os módulos do biorreator eram adicionados juntos à coluna e extraídos ao mesmo tempo do sistema. A Figura 5.1 apresenta os perfis de temperatura destes cultivos.



**Figura 5.1:** Perfis de temperatura em duplicata (a e b) dos cultivos em estado sólido em batelada do microrganismo *A. niger* em BLE em matriz sólida composta por BC e FT na proporção de 3:7 (m/m), respectivamente, sendo M1, M2 e M3 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna.



**Fonte:** Acervo pessoal.

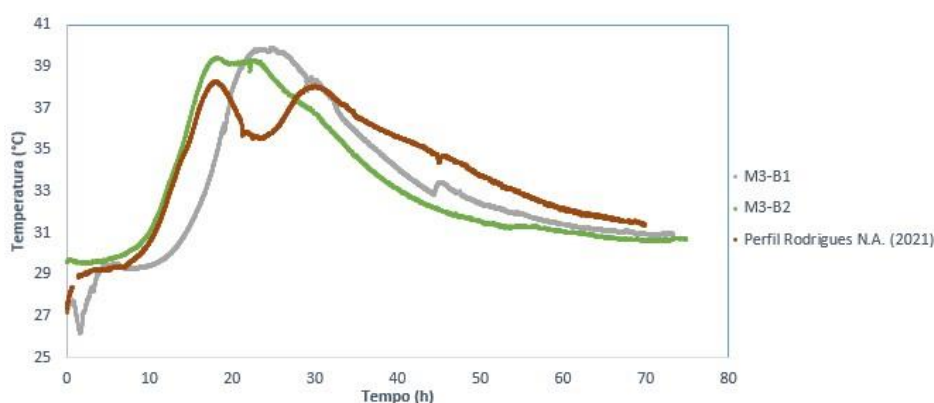
Esses ensaios foram realizados em um BLE com um comprimento da seção fermentativa de 33,4 cm (3 módulos fermentativos) empregando *A. niger* como inóculo. Na Figura 5.1 a, é possível observar um grande pico, por volta de 24h, seguido por uma queda e um pico menor no período de 30h, além disso, pode-se observar um leve aumento de temperatura no período de 48h. Já na duplicata (Figura 5.1 b) há um indício de um crescimento diáuxico mais expressivo, evidenciado pelos dois picos de temperatura, o primeiro em torno de 15 h e o segundo em torno de 25 h de cultivo, além de um leve aumento no período de 52h.

Tal comportamento foi reportado por Rodrigues (2021) e decorre, provavelmente, da composição do substrato, que contém uma fonte de carbono facilmente assimilável (farelo de trigo) e uma fonte complexa (bagaço de cana). Depois de consumir inicialmente farelo de trigo, o fungo tem de passar por uma segunda fase lag, até adaptar-se ao consumo da hemicelulose presente no bagaço de cana e uma terceira fase para acessar a celulose do substrato mais fibroso. Entretanto há uma diferença significativa entre os experimentos aqui comparados. Além da diferença do pH da solução, o bagaço utilizado por Rodrigues (2021) é denominado fermentativo, sendo mais fino, enquanto o bagaço utilizado neste projeto tinha uma partícula mais grossa. Assim, pode-se dizer que o comportamento diáuxico das curvas de temperatura não foi tão pronunciado possivelmente pela maior dificuldade para o fungo assimilar o carbono mais complexo contido nas fibras de bagaço grosso, tanto celulose

quanto hemicelulose. A comparação entre os perfis deste trabalho e de Rodrigues (2021) pode ser vista na Figura 5.2.

Em relação as duas duplicatas, como citado anteriormente, pode-se observar um comportamento diferente das curvas de temperatura. Apesar dos picos de temperatura terem atingido os mesmos valores em um intervalo de tempo semelhante, na primeira batelada não pode ser observado um comportamento diáuxico explícito. O que se observa é um grande pico por volta de 24h, com uma subsequente queda na temperatura e por volta de 30h há um leve aumento novamente. Essa diferença de comportamento entre as bateladas é difícil ser explicada já que ambos os experimentos foram preparados da mesma maneira e permaneceram nas mesmas condições, entretanto, o microrganismo pode ter enfrentado maiores dificuldades de metabolização do substrato na primeira batelada que pode ser relacionado com a pequena diferença entre os valores de pH, acidez total e concentração de proteínas solúveis presentes na Tabela 5.1, tendo a batelada 2 apresentado os melhores valores. Porém, apesar dessa diferença, ambas as replicatas foram semelhantes quanto à performance na produção de ácido cítrico e solubilização de fósforo, como será discutido mais adiante.

**Figura 5.2:** Comparação entre os perfis de temperatura em batelada no topo do biorreator e o perfil de Rodrigues (2021) na mesma altura, em ensaio de cultivo de *A. niger* na composição de bagaço de cana e farelo de trigo, na proporção de 3:7 (m/m), respectivamente, sendo M3 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna no ponto mais alto, nas duas bateladas realizadas.



**Fonte:** Acervo pessoal.

As médias das temperaturas máximas registradas nas duas bateladas foram 39 e 41 °C, sendo no primeiro cultivo a máxima temperatura registrada no primeiro módulo

fermentativo e na segunda batelada no último módulo fermentativo, ou seja, na zona mais alta do biorreator. Vale ressaltar que o pico de temperatura no biorreator é esperado que ocorra no último módulo, ou seja, mais longe da entrada de ar. Segundo o modelo de Fanaei e Vaziri (2009), com aeração no sentido ascendente, o biorreator é incapaz de dissipar totalmente o calor metabólico produzido pelo fungo, sendo assim, a energia se acumula ao longo do comprimento do leito, formando um gradiente de temperatura crescente com a altura da coluna, de forma que algumas limitações no crescimento poderiam ser ocasionadas durante a fermentação. Assim, foi atípico o fato de, no primeiro cultivo, a maior temperatura ter sido registrada no módulo mais perto da entrada.

A Tabela 5.1 apresenta as temperaturas médias e máximas para cada batelada, sendo B1 a primeira batelada e B2 a duplicata. Todavia, não houve valores significativos de desvio padrão entre as duas variáveis listadas na tabela em relação a cada posição do biorreator.

**Tabela 5.1:** Temperaturas médias e temperaturas máximas registradas nos cultivos em batelada de *A. niger* em BLE na composição BC:FT 3:7, sendo M1, M2 e M3 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna e B1 e B2 as duas bateladas realizadas.

		Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)
<b>M1 (11,3 cm)</b>	<b>B1</b>	32,27 ± 0,96 <sup>A</sup>	39,25 ± 1,89 <sup>A</sup>
	<b>B2</b>	34,19 ± 0,96 <sup>A</sup>	43,03 ± 1,89 <sup>A</sup>
<b>M2 (22,6 cm)</b>	<b>B1</b>	32,24 ± 0,63 <sup>A</sup>	38,4 ± 1,07 <sup>A</sup>
	<b>B2</b>	33,5 ± 0,63 <sup>A</sup>	40,55 ± 1,07 <sup>A</sup>
<b>M3 (33,9 cm)</b>	<b>B1</b>	33,07 ± 0,05 <sup>A</sup>	39,91 ± 0,24 <sup>A</sup>
	<b>B2</b>	33,16 ± 0,05 <sup>A</sup>	39,44 ± 0,24 <sup>A</sup>

\* Para cada variável resposta, médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (teste de Tukey com  $\alpha = 5\%$ ).

**Fonte:** Acervo pessoal.

Além das temperaturas máximas, é relevante analisar as médias das temperaturas durante todo o cultivo. A maior temperatura média também se deu na posição  $z = 11,3$  cm, com valor de 34,19 °C, o que contradiz com os dados da literatura e o comportamento lógico que deveria acontecer ao longo do comprimento do biorreator. Como dito anteriormente, as temperaturas na entrada do BLE deveriam ser mais baixas comparadas às do topo por conta

da proximidade da entrada de ar, assim como relatam Gowthaman et al. (1993), Mazzutti (2009), Zanelato (2011) e Perez et al. (2019). Todavia, cabe destacar que todas as temperaturas médias se apresentaram entre 32,27 e 34,19 °C, diferença menor que 2 °C, o que está dentro da faixa de variabilidade das medidas com termopares.

A partir da Tabela 5.1, pode-se constatar que não houve uma diferença significativa ao nível de 5% de confiança entre as temperaturas médias, tanto entre as bateladas quanto entre os módulos fermentativos. Em relação à temperatura máxima atingida, 43,03 °C para a primeira batelada e 39,91 °C para a duplicata, nota-se uma diferença de pouco mais de 3 °C e um valor bem acima do considerado ideal, de 30°C para esse experimento. Como já discutido previamente, um leito composto majoritariamente por FT possui menor porosidade 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 bastante calor metabólico. Como exemplo, Ghildyal et al. (1994) cultivaram *A. niger* em FT em um BLE e relataram um aumento de temperatura de 15 °C. Estes valores muito elevados podem ter levado às fases estacionária e, conseqüentemente, de morte precoces. Se comparado com Rodrigues (2021), a temperatura máxima atingida foi de 38,6 °C no topo do biorreator e o decaimento da temperatura foi mais suave, o que pode ser relacionado com uma inativação mais gradual do microrganismo. Nas simulações de Mitchell et al. (2010), que também consideraram o fungo *A. niger*, cultivado apenas em FT em um BLE modular composto por 10 módulos de 10 cm de altura e 1 m de diâmetro, as predições por simulação 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 °C, o que foi corroborado neste experimento. Ademais, a pequena diferença das temperaturas entre as duas bateladas pode estar relacionada com a porosidade do leito, já que a matriz sólida foi alocada adotando-se o método LP e a homogeneização do meio foi feita manualmente.

Já sobre as variáveis analisadas após o cultivo, foram feitos os testes de concentração de proteínas solúveis, pH, acidez total e fosfato solúvel. As amostras apresentaram, em geral, resultados diferentes dos coletados na etapa de escala de laboratório, realizada em saquinhos de polipropileno anteriormente pelo grupo de pesquisa.

Os dados dessa etapa são apresentados na Tabela 5.2, onde já constam também os resultados da comparação de médias por teste de Tukey para cada variável resposta, ao nível de 5% de significância. Vale ressaltar que não há dados dos três módulos fermentativos de

ambas as bateladas, pois o material sólido de um módulo de cada cultivo foi congelado para outras análises que compuseram o projeto de iniciação científica.

**Tabela 5.2:** Comparação entre concentração de proteínas solúveis, acidez total, pH e concentração de fosfatos solúveis nos cultivos de *A. niger* em BLE e em embalagens de polipropileno, na composição BC:FT 3:7, sendo M1, M2 e M3 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna e B1 e B2 as duas bateladas realizadas.

		pH	Concentração de Proteínas Solúveis (g/L)	Acidez Total (g/L)	Concentração de Fosfatos Solúveis (g/L)
<b>M1 (11,3 cm)</b>	<b>B1</b>	-	-	-	-
	<b>B2</b>	5,94 <sup>A</sup>	0,274 <sup>B</sup>	0,96 <sup>A</sup>	0,05 <sup>B</sup>
<b>M2 (22,6 cm)</b>	<b>B1</b>	6,98 ± 0,62 <sup>A</sup>	0,368 ± 0,01 <sup>B</sup>	1,28 ± 0,16 <sup>A</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>B</sup>
	<b>B2</b>	5,73 ± 0,62 <sup>A</sup>	0,347 ± 0,01 <sup>B</sup>	1,6 ± 0,16 <sup>A</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>B</sup>
<b>M3 (33,9 cm)</b>	<b>B1</b>	5,97 <sup>A</sup>	0,394 <sup>B</sup>	1,28 <sup>A</sup>	0,04 <sup>B</sup>
	<b>B2</b>	-	-	-	-
<b>Embalagens de polipropileno</b>		6,98 ± 0,03 <sup>A</sup>	0,75 ± 0,06 <sup>A</sup>	1,69 ± 0,04 <sup>A</sup>	0,17 ± 0,07 <sup>A</sup>

\* Para cada variável resposta, médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (teste de Tukey com  $\alpha = 5\%$ ).

**Fonte:** Acervo pessoal.

As análises em relação a variável resposta pH do extrato indicaram que não houve diferença significativa (ao nível de 5% de significância) entre aqueles oriundos dos cultivos em embalagem de polipropileno e em biorreator de leito empacotado; entretanto, em relação aos valores absolutos, pode-se observar uma queda favorável. Para essa variável resposta, são desejáveis valores menores do que 7, indicando caráter ácido dos extratos enzimáticos. Isso foi obtido nos extratos brutos oriundos tanto dos testes em pequena escala quanto no processo de ampliação dos cultivos, ou seja, o aumento de escala não foi prejudicial em relação ao pH.

Quanto ao teor de acidez, este também não apresentou uma diferença significativa no aumento de escala. Importante dizer que na titulação do extrato bruto diluído com hidróxido de sódio (0,1 M), a reação entre ácido e base neutraliza todos os hidrogênios ácidos ( $H^+$ ) por ação dos grupos hidroxila da base ( $OH^-$ ), independentemente de qual seja o ácido

orgânico presente na solução. Por isso diz-se que os ácidos orgânicos foram quantificados como ácido cítrico, por este ácido ser metabolizado em maior quantidade pelo fungo *A. niger*.

Para a variável concentração de proteínas solúveis, houve diferença significativa entre as escalas analisadas. Tal diferença pode indicar indiretamente um prejuízo no crescimento do fungo nos cultivos em biorreator de leito empacotado, possivelmente pelo grande aumento de temperatura, chegando a 13 °C acima da temperatura ideal de crescimento, como pode ser observado na Figura 5.1. Outro ponto que corrobora tal hipótese, foi o fato de o centro do substrato de cada módulo fermentativo permanecer 'branco' ao final do tempo de fermentação, sendo que a característica do fungo filamentosos empregado é ter uma coloração escura que indica crescimento, como mostrado na Figura 4.1.

Ademais, os resultados da variável concentração de fosfatos solúveis referentes aos cultivos realizados em embalagem de polipropileno mostraram que ácidos orgânicos, quantificados como ácido cítrico neste trabalho, causam boa solubilização de fosfato. Entretanto, com o aumento de escala houve uma diminuição do valor de concentração, o que indica que a ampliação não foi favorável em relação a variável objetivo deste trabalho. Isso pode ser considerado como consequência do prejuízo no crescimento do microrganismo, ou seja, com uma morte adiantada o fungo não conseguiu se desenvolver de maneira adequada para uma boa produção de ácido cítrico e, por consequência, solubilização do fosfato presente na rocha comercial. Torna-se necessário, portanto, buscar alternativas de cultivo visando a diminuir o sobreaquecimento no leito, o que pode ser conseguindo na operação contínua, a ser testada nas etapas seguintes do projeto.

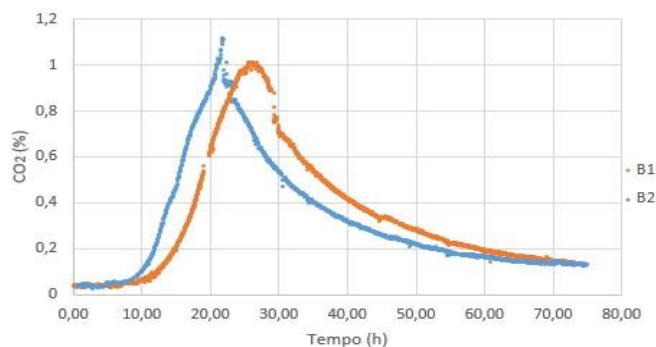
## **5.2 Análise respirométrica: processo em batelada**

Nos cultivos em biorreator de leito empacotado, também foi realizada a aquisição online da concentração de CO<sub>2</sub> do ar de saída do biorreator. Importante dizer que o CO<sub>2</sub> é gerado pela respiração celular do microrganismo, por isso tem-se este parâmetro como medida de crescimento do fungo.

A Figura 5.3 apresenta em duplicata os perfis de concentração de CO<sub>2</sub> na corrente gasosa de saída do BLE de acordo com o tempo de processo das bateladas. Observa-se que os perfis de concentração de CO<sub>2</sub> na corrente de saída apresentaram o mesmo comportamento dos perfis de temperatura, indicando que a elevação da temperatura nos

cultivos com *A. niger* foi, de fato, devido à geração de calor metabólico durante o crescimento celular.

**Figura 5.3:** Perfis da concentração de CO<sub>2</sub> em duplicata na corrente gasosa de saída do BLE, sendo B1 e B2 os dois cultivos em batelada realizados.



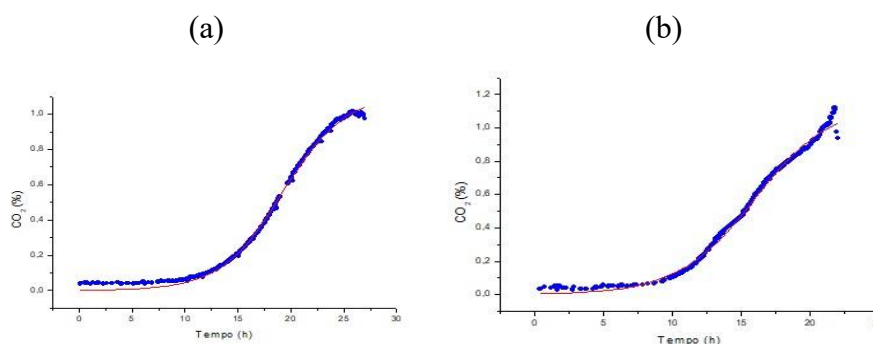
**Fonte:** Acervo pessoal.

De acordo com o esperado, as concentrações máximas de CO<sub>2</sub> registradas nos processos em batelada não apresentaram diferença significativa entre si, atingindo um valor máximo médio de 1,07 % (v/v). 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. Outro ponto importante é 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 CO<sub>2</sub>, também é possível determinar as velocidades da reação através do ajuste de um modelo de cinética aos dados de CO<sub>2</sub> acumulado com o tempo. Assim, o modelo logístico foi o que melhor ajustou ambas as curvas da duplicata (Figura 5.4), valendo ressaltar que o ajuste foi feito apenas nas fases lag e exponencial, já que o ajuste logístico não é capaz de acompanhar a fase de morte dos microrganismos.

A Tabela 5.3 apresenta os valores das velocidades de produção de CO<sub>2</sub> para cada duplicata, além dos valores obtidos anteriormente em embalagens de polipropileno.

**Figura 5.4:** Ajuste em duplicata do modelo logístico aos dados de CO<sub>2</sub> acumulado dos cultivos em batelada em BLE, sendo a figura (a) referente a primeira batelada e a figura (b) referente a duplicata.



**Fonte:** Acervo pessoal.

**Tabela 5.3:** Constantes específicas de taxa crescimento celular de acordo com o ajuste da equação da logística para os dados de CO<sub>2</sub> acumulado por tempo dos cultivos em batelada, sendo B1 e B2 os dois cultivos realizados.

	<b>M (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>B1</b>	0,344 ± 0,002	0,998
<b>B2</b>	0,357 ± 0,005	0,995
<b>bem. Polip. Proteínas Solúveis</b>	0,133 ± 0,046	0,94
<b>Emb. Polip. Fosfatos Solúveis</b>	0,328 ± 0,152	0,938
<b>Emb. Polip. Acidez</b>	0,098 ± 0,042	0,945
<b>Total</b>		

**Fonte:** Acervo pessoal

Observa-se que houve diferença significativa entre os valores de  $\mu$  para os cultivos em embalagens plásticas e na ampliação de escala, isso deve-se, possivelmente ao fato de que durante os experimentos em pequena escala, não foi possível monitorar o crescimento celular a partir da taxa de geração de CO<sub>2</sub>, sendo assim, optou-se por obter parâmetros indiretos ou parcialmente relacionados ao crescimento do microrganismo.

O valor de  $\mu$  correspondente a variável fosfatos solúveis foi o que mais se aproximou aos valores obtidos dos cultivos em BLE. Além disso, espera-se que parâmetros oriundos



de análises a partir da variável proteínas solúveis sejam mais adequadas, já que esse é um parâmetro indireto de crescimento do microrganismo e os demais parâmetros são relacionados parcialmente com o crescimento do fungo empregado nos cultivos. No entanto, cabe considerar que a análise respirométrica é uma medida da atividade biológica da cultura, enquanto o teor de proteínas solúveis sofre interferência de células inviáveis presentes no meio e de outros metabólitos proteicos, como enzimas liberadas durante o cultivo.

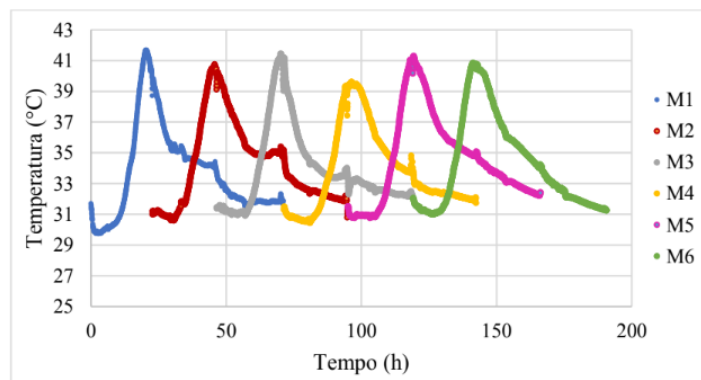
Ademais, é especialmente interessante que a análise respirométrica apresente uma boa estimativa da biomassa em cultivos em estado sólido em BLEs, já que nestes não é possível realizar amostragem. Os altos valores de coeficientes de correlação indicam bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

### **5.3 Cultivo em estado sólido em biorreator de leito empacotado: processo contínuo**

A operação contínua do BLE consistiu na adição de um módulo a cada 24h e remoção após 72h de cultivo, aplicando-se a metodologia de Rodrigues (2021) e, considerando estudos cinéticos do cultivo do microrganismo *Aspergillus niger* C em pequena escala. Assim, no decurso de um total de 192h, 6 módulos fermentativos passaram pela coluna do BLE contínuo, cada um deles permanecendo 24h em uma dada posição, após o que sofriam uma elevação no sentido axial, totalizando 72h de residência de cada módulo na coluna. Além disso, foi empregada a concentração de  $10^7$  esporos/mL na suspensão em cada módulo fermentativo. Para composição da matriz sólida porosa, também foram empregados bagaço de cana e farelo de trigo (3:7 m/m), totalizando 195g de substrato sólido por módulo, com 2% m/m de rocha fosfática comercial brasileira, sendo estes umidificados até 72% em base úmida por adição de solução nutriente e pH ajustado em 2,5. A Figura 5.5 apresenta os perfis de temperatura obtidos ao longo do experimento empregando o cultivo contínuo em estado sólido em biorreator de leito empacotado. Vale ressaltar, que a altura máxima do leito não ultrapassou a de 3 módulos fermentativos, o que equivale a 33,4 cm.

A média de temperatura máxima registrada no cultivo contínuo foi de 41°C, valor muito semelhante ao obtido nos cultivos em batelada, sendo de 39 e 41 °C. É possível observar na Figura 5.5 que cada pico equivale ao valor máximo de temperatura atingido em cada módulo fermentativo, os quais sempre foram atingidos por volta de 23h a partir do momento em que o módulo foi adicionado à coluna do BLE, o que também pôde ser observado nos cultivos em batelada.

**Figura 5.5:** Perfis de temperatura dos cultivos contínuos em estado sólido do microrganismo *A. niger* em BLE na composição de bagaço de cana e farelo de trigo na proporção 3:7 (m/m), respectivamente, sendo M1, M2, M3, M4, M5 e M6 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna.



**Fonte:** Acervo pessoal.

Uma diferença observada foi que nos cultivos em batelada, notou-se um comportamento diáuxico nos perfis de temperatura, sendo vistos dois picos, fato este não observado no cultivo contínuo. Ademais, cada módulo fermentativo foi adicionado à base do sistema pelo fato de terem sido observados, nos cultivos em batelada, valores cerca de 10°C acima da temperatura ideal no topo do BLE. Com essa manobra, pretendia-se que durante o pico de metabolização e crescimento do microrganismo, o módulo estivesse mais próximo da base e, conseqüentemente, mais próximo da entrada de ar a 30°C.

Entretanto, novamente, temperaturas bem acima da ideal foram atingidas em todos os módulos, mesmo com a estratégia de movimentação dos módulos, com aeração também sentido ascendente. Isso denota que o biorreator é incapaz de dissipar totalmente o calor metabólico produzido pelo fungo, de forma que a energia se acumula no interior do leito e a temperatura aumenta, com conseqüente limitações no crescimento. Na operação contínua, diferentemente da batelada, a temperatura não é crescente ao longo da coluna devido ao fato de as camadas estarem em diferentes fases de fermentação e geração de calor. De tal modo que a advecção de energia pelo ar tem efeito diferente sobre o perfil de temperatura no sistema.

A Tabela 5.4 apresenta as temperaturas médias e máximas para cada módulo fermentativo no cultivo contínuo. Observa-se que não houve diferença significativa entre as temperaturas médias nos 6 módulos que passaram pelos três níveis de altura do biorreator durante os cultivos, indicando boa homogeneidade térmica ao longo da coluna,

diferentemente do que ocorre na operação em batelada, em que geralmente se observa, tanto experimentalmente quanto com base no modelo de Fanaei e Vaziri (2009), para transferência de calor na FES em leitos empacotados, que a temperatura aumenta em direção ao topo da coluna, quando empregada aeração ascendente.

**Tabela 5.4:** Temperaturas médias e temperaturas máximas registradas no cultivo contínuo de *A. niger* em BLE na composição 3:7 (m/m) de bagaço de cana e farelo de trigo, respectivamente, sendo M1, M2, M3, M4, M5 e M6 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna.

	Temperatura Média (°C)	Temperatura Máxima (°C)
<b>M1</b>	33,45±2,97 <sup>A</sup>	41,69
<b>M2</b>	34,23±2,76 <sup>A</sup>	40,76
<b>M3</b>	33,89±2,58 <sup>A</sup>	41,46
<b>M4</b>	33,82±2,66 <sup>A</sup>	39,63
<b>M5</b>	34,60±2,90 <sup>A</sup>	41,31
<b>M6</b>	34,27±2,98 <sup>A</sup>	40,86

\*Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (teste de Tukey com  $\alpha = 5\%$ ).

**Fonte:** Arquivo pessoal.

Em relação à média de temperaturas máximas atingidas de 40,95°C, nota-se um valor bem acima do considerado ideal pelo projeto e por Klaic (2018), de 30°C. Em comparação com o experimento em batelada, os valores referentes às médias de temperatura obtidas ao longo do experimento concordam, já que para os cultivos realizados em batelada obteve-se 32,53°C e 33,62°C como temperaturas médias do primeiro ensaio em duplicata. Com relação às máximas temperaturas registradas, foram atingidos 43,03 °C na primeira batelada e 39,91 °C na duplicata. Como já discutido anteriormente, um leito composto majoritariamente por FT possui menor porosidade e, portanto, está mais sujeito ao sobreaquecimento pronunciado. Estes valores muito elevados, além do fato de o centro do substrato no módulo fermentativo também não apresentar as características de crescimento do fungo *A. niger*, comprovam o fato da fase estacionária ter sido antecipada e, conseqüentemente, ter levado o fungo à morte precoce.

As amostras analisadas de cada módulo apresentaram, em geral, resultados diferentes dos coletados após os cultivos em batelada para concentração de proteínas solúveis, pH e acidez total referente às titulações (com fenolftaleína) do extrato bruto diluído. Os dados dessa etapa são apresentados na Tabela 5.5, onde já constam também os resultados da comparação de médias por teste de Tukey para cada variável resposta, ao nível de 5% de significância.

As análises em relação à variável resposta pH do extrato indicaram que houve diferença significativa (ao nível de 5% de significância) entre os cultivos em embalagem de polipropileno e em biorreator de leito empacotado, assim como entre os módulos de um mesmo cultivo no BLE. Entretanto, para essa variável resposta, são desejáveis valores menores do que 7, indicando caráter ácido dos extratos enzimáticos. Isso foi obtido nos extratos brutos oriundos tanto dos testes em pequena escala quanto no processo de ampliação dos cultivos, ou seja, o aumento de escala ou a diferença entre os processos batelada e contínuo, não foram prejudiciais em relação ao desejado para a variável pH.

Quanto ao teor de acidez, observa-se uma diferença significativa entre os extratos. Entretanto, não se observa uma tendência entre os resultados, de forma que tanto os cultivos em pequena escala quanto com aumento dela; compartilham diferentes letras, mas observa-se uma ligeira superioridade na acidez dos extratos oriundos dos cultivos em batelada.

Para a variável concentração de proteínas solúveis, houve diferença significativa entre as escalas analisadas. Os resultados térmicos do processo contínuo, já demonstrados na Tabela 4.4 e na Figura 4.5, não corroboram com essa hipótese, já que o leito apresentou aumento de temperatura semelhante. Por outro lado, há que se considerar que, no cultivo contínuo, a distribuição mais otimizada do oxigênio pode ser um fator que afeta o crescimento celular e, por conseguinte, a produção de proteínas. Como o módulo novo é adicionado na base do leito, onde há contato com o ar de entrada, mais rico em oxigênio, a oferta desse gás é a mais alta possível justamente no estágio de crescimento do fungo em que há maior efetividade respiratória (fase exponencial, primeiras 24h de cultivo), o que pode ter favorecido a produção de biomassa celular, refletida no teor de proteínas na FES.

**Tabela 5.5:** Comparação entre concentração de proteínas solúveis, acidez total, pH e concentração de fosfatos solúveis nos cultivos de *A. niger* em BLE. Por módulo (M), com numeração crescente da base para o topo, e em modos de operação C: contínuo ou B: batelada, e em embalagem de polipropileno, sendo M1, M2, M3, M4, M5 e M6 os módulos fermentativos adicionados à estrutura da coluna durante o cultivo contínuo, M1, M2 e M3 os módulos fermentativos adicionados à coluna durante os cultivos B1 e B2 em batelada.

		pH	Acidez Total (g/L)	Concentração de Proteínas Solúveis (g/L)	Concentração de Fósforo Solúvel (g/L)
M1	C	6,32 <sup>C</sup>	1,34 <sup>B</sup>	0,68 <sup>BC</sup>	0,03 <sup>A</sup>
M2	C	6,50 <sup>A</sup>	1,06 <sup>C</sup>	0,67 <sup>BC</sup>	0,03 <sup>A</sup>
M3	C	6,53 <sup>A</sup>	0,99 <sup>C</sup>	0,93 <sup>A</sup>	0,03 <sup>A</sup>
M4	C	5,76 <sup>E</sup>	1,76 <sup>A</sup>	0,50 <sup>D</sup>	0,03 <sup>A</sup>
M5	C	6,14 <sup>D</sup>	1,41 <sup>B</sup>	0,60 <sup>C</sup>	0,01 <sup>C</sup>
M6	C	6,38 <sup>B</sup>	1,13 <sup>C</sup>	0,81 <sup>B</sup>	0,02 <sup>B</sup>
M1 (11,3 cm)	B1	-	-	-	-
	B2	5,94 <sup>A</sup>	0,96 <sup>A</sup>	0,274 <sup>A</sup>	0,05 <sup>B</sup>
M2 (22,6 cm)	B1	6,98 ± 0,62 <sup>A</sup>	1,28 ± 0,16 <sup>A</sup>	0,368 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>B</sup>
	B2	5,73 ± 0,62 <sup>A</sup>	1,60 ± 0,16 <sup>A</sup>	0,347 ± 0,01 <sup>B</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>B</sup>
M3 (33,9 cm)	B1	5,97 <sup>A</sup>	1,28 <sup>A</sup>	0,394 <sup>B</sup>	0,04 <sup>B</sup>
	B2	-	-	-	-
Embalagens de polipropileno		6,98 ± 0,03 <sup>A</sup>	1,69 ± 0,04 <sup>A</sup>	0,750 ± 0,006 <sup>A</sup>	0,17 ± 0,07 <sup>A</sup>

\*Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (teste de Tukey com  $\alpha = 5\%$ ).

**Fonte:** Acervo pessoal.

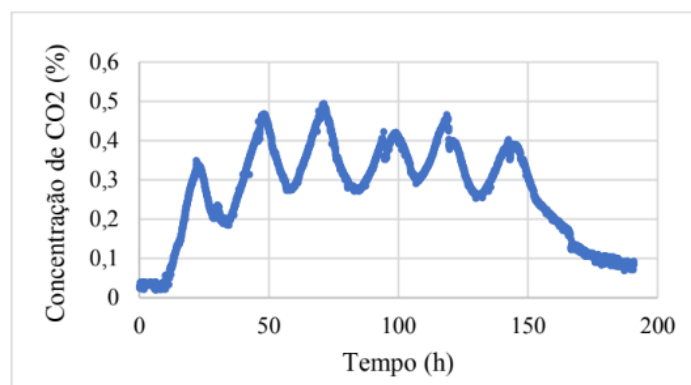
Por fim, os resultados da variável concentração de fosfato solúvel referentes aos cultivos realizados em embalagem de polipropileno mostraram que ácidos orgânicos, quantificados como ácido cítrico neste trabalho, causam boa solubilização de fosfato. Entretanto, com o aumento de escala houve uma diminuição do valor de concentração desse elemento, o que indica que a ampliação não foi favorável em relação à variável objetivo deste trabalho. Isso pode ser considerado como consequência do prejuízo na produção de ácido cítrico pelo microrganismo e, por consequência, houve uma baixa solubilização do

fósforo presente na rocha comercial. Vale ressaltar, que com o processo contínuo era esperado um controle maior da variável temperatura, entretanto isso não foi alcançado e o prejuízo à variável fósforo solúvel permaneceu.

#### 5.4 Análise respirométrica: processo contínuo

A aquisição online da concentração de CO<sub>2</sub> do ar de saída do biorreator também foi realizada nos cultivos contínuos em biorreator de leito empacotado. A Figura 5.6 apresenta o perfil de concentração de CO<sub>2</sub> na corrente gasosa de saída do BLE de acordo com o tempo de processo do cultivo contínuo. Observa-se que o perfil de concentração de CO<sub>2</sub> na corrente de saída apresenta o mesmo comportamento do perfil de temperatura, indicando que a elevação da temperatura nos cultivos com *A. niger* foi, de fato, devido à geração de calor metabólico também no cultivo contínuo.

**Figura 5.6:** Perfil de concentração de CO<sub>2</sub> na corrente gasosa de saída do BLE durante o cultivo contínuo.



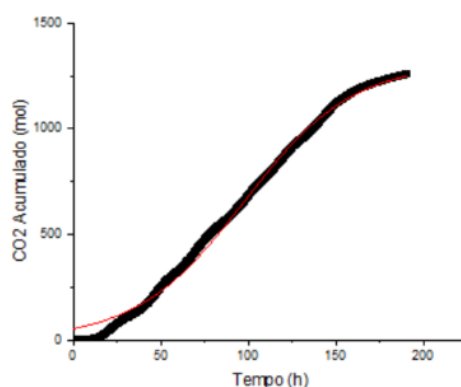
**Fonte:** Acervo pessoal.

De acordo com o esperado, as concentrações máximas de CO<sub>2</sub> registradas no processo contínuo, foram menores do que em batelada, atingindo os valores máximos de 0,5% e 1,07% (v/v), respectivamente. Isso pode ser explicado pelo fato de que durante o cultivo 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; já durante o cultivo contínuo, os módulos fermentativos se apresentam em diferentes fases de 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 taxa total de produção de CO<sub>2</sub> no processo contínuo são menores do que as observadas no pico de crescimento dos processos em batelada.

A partir dos dados de CO<sub>2</sub>, também é possível determinar a velocidade específica de crescimento, através do ajuste de um modelo de cinética aos dados de CO<sub>2</sub> acumulado com o tempo. Assim, o modelo logístico, foi o que melhor ajustou a curva também do processo contínuo, como representado pela Figura 5.7.

**Figura 5.7:** Ajuste do modelo logístico aos dados de CO<sub>2</sub> acumulado do cultivo contínuo em BLE.



**Fonte:** Acervo pessoal.

A Tabela 5.6 apresenta os valores das velocidades de produção de CO<sub>2</sub> para cada processo, além dos valores obtidos anteriormente em embalagens de polipropileno.

**Tabela 5.6:** Constantes específicas de taxa de produção de CO<sub>2</sub> de acordo com o ajuste da equação da logística para os dados de CO<sub>2</sub> acumulado por tempo dos cultivos em batelada (B1 e B2) e contínuo (C).

<b>BLE</b>	<b><math>\mu</math> CO<sub>2</sub> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>C</b>	0,031	0,995
<b>B1</b>	0,344 ± 0,002	0,995
<b>B2</b>	0,357 ± 0,005	0,940

**Fonte:** Acervo pessoal.

Observa-se que houve diferença significativa entre os valores de  $\mu$  para os cultivos em batelada, no modo contínuo e em embalagens plásticas. Seria interessante que parâmetros oriundos de análises a partir da variável proteínas solúveis fossem mais adequadas, já que

esse é um parâmetro indireto de crescimento do microrganismo e os demais parâmetros são relacionados parcialmente com o crescimento do fungo empregado nos cultivos. No entanto, cabe considerar que a análise respirométrica é uma medida da atividade biológica da cultura, enquanto o teor de proteínas solúveis sofre interferência de células inviáveis presentes no meio e de outros metabólitos proteicos, como enzimas liberadas durante o cultivo. Ademais, é especialmente interessante que a análise respirométrica apresente uma boa estimativa da biomassa em cultivos em estado sólido em BLEs, já que nestes não é possível realizar amostragem.

Em relação à taxa de produção de CO<sub>2</sub> no modo de operação contínuo ser menor do que as velocidades obtidas para os processos em batelada, é devido aos módulos fermentativos se apresentarem em diferentes estágios de fermentação no processo contínuo, conforme já discutido. Por fim, os altos valores de coeficientes de correlação indicam bom ajuste do modelo logístico aos dados experimentais, como já esperado com base na literatura.

## 5.5 COMPARAÇÕES COM A LITERATURA

A Tabela 5.7 traz alguns dados da literatura para comparação dos resultados de produção de ácido cítrico por *A. niger*, em cultivos em estado sólido com diferentes substratos. Importante dizer, que foram selecionados trabalhos que empregaram o mesmo microrganismo, para que o parâmetro de comparação pudesse ser a produção de ácido cítrico, como consequência da boa adaptabilidade do *Aspergillus niger* ao meio e ao método de fermentação.

Pode-se observar que os resultados obtidos pelos experimentos realizados para este trabalho foram inferiores, se considerados, para comparação, os resultados de acidez total por titulação do extrato bruto. Há uma grande diferença entre os resultados, independentemente do tipo de substrato, equipamento e escala empregados. Importante salientar que há grande dificuldade em comparar os resultados experimentais pelo fato de ainda não haver estudos do emprego de diferentes substratos e microrganismos em um mesmo equipamento. Uma vez que este processo ainda é recente e não padronizado.

Sendo assim, o bioprocessamento em estado sólido é promissor, mas precisa ser otimizado. Como grande destaque, tem-se a dificuldade de troca térmica, que mesmo sendo empregado um biorreator composto por módulos encamisados, houve uma grande elevação da temperatura durante a fermentação. Ademais, há a dificuldade de manipulação do equipamento durante, principalmente, o processo contínuo, podendo acarretar uma



contaminação do meio e perda de produção. Outro ponto é a dificuldade do processo de extração, já que é necessário a adição de um meio líquido com posterior etapa de maceração para extração do produto desejado.

**Tabela 5.7:** Comparação entre dados da literatura e dados obtidos para este trabalho em relação ao microrganismo empregado, ao tipo de fermentação, ao equipamento, ao tipo de substrato utilizado e produção de ácido cítrico por *A. niger*.

Microrganismo	Tipo de Fermentação	Substrato	Tipo de Reator	Concentração Média de Ácido Cítrico	Referência
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 567		Bagaço de Maçã	Biorreator de Tambor Rotativo	0,02 g/g de bagaço de maçã	DHILLON et al. (2013)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2001		Bagaço de Maçã	Erlenmeyer 500 mL	0,06 g/g bagaço de maçã	DHILLON et al. (2012)
<i>Aspergillus niger</i> LPB BC		Casca de Cacau	Erlenmeyer 125 mL	0,1 g/g polpa cítrica	OLIVEIRA et al. (2022)
<i>Aspergillus niger</i> LPB 21		Bagaço de Cana	Reator de Bandeja	0,27 g/g bagaço de cana	PRADO et al. (2009)
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3	Estado Sólido	Resíduo de Laranja e Cevada	Béquer 250 mL	0,07 g/g resíduo	SANTOS (2008)
<i>Aspergillus niger</i> LP BC		Polpa Cítrica	BLE	0,48 g/g polpa	RODRIGUES (2006)
<i>Aspergillus niger</i> C		Bagaço de Cana e Farelo de Trigo	Embalagem de Polipropileno	0,009 g/g resíduo seco	Este Trabalho
			BLE	0,006 g/g resíduo seco - Batelada 0,006 g/g resíduo seco - Cultivo Contínuo	

**Fonte:** Acervo pessoal.

Por fim, como indicação para futuros trabalhos, tem-se como ponto principal, aprimorar o *design* do biorreator para que haja um controle de temperatura do meio mais eficiente.

## 6 CONCLUSÕES

Considerando que processos que empregam FES são muito promissores economicamente, energeticamente e apresentam como opção ao setor industrial uma via mais sustentável de produção, neste trabalho buscou-se definir condições que contribuíssem para a ampliação de escala do processo de biossolubilização de rocha fosfática comercial brasileira. Entretanto, através dos resultados obtidos, pode-se concluir que a ampliação dos processos de FES em BLEs não foram conduzidos com eficiente controle térmico, mesmo quando combinados fatores como uso de matriz sólida porosa, diâmetro estreito do biorreator, camisa de resfriamento, poucos módulos fermentativos e modo contínuo de fermentação. Tal comportamento pode-se possivelmente atribuir ao emprego de um microrganismo mesofílico. Como consequência da elevação da temperatura, que atingiu valores bem superiores ao considerado ideal, as taxas de desenvolvimento do fungo foram prejudicadas, desencadeando menores produções de ácido cítrico e solubilização da rocha fosfática comercial, tanto no modo contínuo como em batelada, comparadas aos valores obtidos previamente nos cultivos em pequena escala em embalagens plásticas.

O material obtido ao final das etapas de fermentação não seria adequado para aplicação em solo como biofertilizante fosfatado no intuito de substituir os fertilizantes utilizados hoje e que passaram por processos com grande aplicação de produtos químicos devido ao baixo rendimento em fosfato obtido, o que foi consequência da dificuldade do controle dos parâmetros operacionais na ampliação de escala, já que em pequena escala os resultados foram promissores.

Portanto, estratégias operacionais devem continuar sendo estudadas para que este tipo de processo possa obter um melhor controle térmico nos cultivos, além de ter o potencial de proporcionar uma via de produção mais sustentáveis para um produto tão empregado no setor agrônômico, que é a base alimentar global e possui uma parcela importante na economia do Brasil.

## 7 REFERÊNCIAS

ADHAM, N. Z. Attempts at improving citric acid fermentation by *Aspergillus niger* in beetmolasses medium. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 97-100, 2002.

AFONSO, S. O. M. *Aspergillus niger*: sua utilização na indústria farmacêutica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. **Dissertação (Mestrado)**. 2015.

BARRINGTON, S.; KIM, J. W. Response surface optimization of medium components for citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 368-377, 2008.

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.

BRENIAN, 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](https://www.mdpi.com/si/processes/fermentation_processes)>. Acesso em fevereiro de 2021.

CANOVAS, C. R.; MACIAS, F.; PEREZ-LOPEZ, R.; BASALLOTE, M. D.; MILLAN BECERRO, R. Valorization of wastes from the fertilizer industry: Current status and future trends. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 678-690, 2018.

CASCIATORI, F.P.; LAURENTINO, C. L.; LOPES, K. C. M.; DE SOUZA, A. G.; THOMÉO, J. C. Stagnant Effective Thermal Conductivity of Agro-Industrial Residues for Solid-State Fermentation. **International Journal of Food Properties**, 2013.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; TABOGA, S. R.; CASCIATORI, P. A.; THOMÉO, J. C. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 255, p. 214–224, 2014.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C.L.; ZANELATO, A. I.; THOMÉO, J. C. Hygroscopic properties of agro-industrial solid by-products applied in solid-state fermentation for cellulase production. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 114-123, 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.

CONAMA. Limites de emissão de poluentes atmosféricos gerados na produção de fertilizantes, ácido sulfúrico, ácido nítrico e ácido fosfórico. **Resolução CONAMA nº 436, de 22 de dezembro de 2011**. Publicada no DOU em 26 de dezembro de 2011.

COUTO, S. R.; SAROMAN,, M. A. Application os solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

DA COSTA, D. B. Adubação fosfatada de cana-de-açúcar: disponibilidade de fósforo e formas de aplicação. Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Tese (Doutorado)**. 2012.

DE SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. **Latossolos**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01\\_96\\_10112005101956 .html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia16/AG01/arvore/AG01_96_10112005101956.html)>. Acesso em: 25 Jun. 2023.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERMA, M. Screening of agro-industrial wastes for citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 through solid state fermentation. **Science of Food and Agriculture**, v. 03, i. 07, p. 1560-1567, 2013.

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.

FANAELI, M. A.; VAZIRI, B. M. Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 48, p. 446–451, 2009.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

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.

GIROTO, A. S.; DE CAMPOS, A.; PEREIRA, E. I.; CRUZ, C. C. T.; MARCONCINI, J. M.; RIBEIRO, C. Study of a nanocomposite starch-clay for slow-release of herbicides: evidence of synergistic effects between the biodegradable matrix and exfoliated clay on herbicide release control. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 23, p. 131, 2014.

GIROTO, A. S.; GUIMARAES, G. G. F.; FOSCHINI, M.; RIBEIRO, C. Role of slow-release nanocomposite fertilizers on nitrogen and phosphate availability in soil. **Scientific Reports**, v. 7, p.11, 2017.

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.

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. **Pruned in Great Britain**, vol. 11, p. 611-620, 1993.

HAMIDI-ESFAHANI, S.A.; SHOJAOSADATI, A. Rinzema, Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.*, v. 21, p. 265–272, 2004.

IFA. Short-term fertilizer Outlook 2017-2018. International Fertilizer Association, **IFA Strategic Forum**, Zurich (Switzerland), 2017.

**Intergovernmental Panel on Climate Change**, 2022.

KPOMBLEKOUA, K.; TABATABAI, M. A. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*, v. 158, p. 442-453, 1994.

KLAIC, R. Estratégias para obtenção de compósitos fertilizantes via solubilização biológica de minerais. 168f. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. **Tese (Doutorado)**. São Carlos, 2018.

KRISHNARAJ, P. U.; DAHALE, S. Mineral phosphate solubilization: concepts and prospects in sustainable agriculture. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 80, p. 389-405, 2014.

KUMAR, D.; JAIN, V. K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1731–1738, 2003.

JAIN, R.; SAXENA, J.; SHARMA, V. The evaluation of free and encapsulated *Aspergillus awamori* for phosphate solubilization in fermentation and soil–plant system. **Applied Soil Ecology**, v. 46, p. 90-94, 2010.

LAPIDO-LOUREIRO, F. E. V.; MELAMED, R. O fósforo na agricultura brasileira: uma abordagem mínero-metalúrgica. Centro de Tecnologia Mineral. 2006.

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.

LAZO, D. E.; DYER, L. G.; ALORRO, R. D. Silicate, phosphate and carbonate mineral dissolution behaviour in the presence of organic acids: A review. **Minerals Engineering**, v. 100, p. 115-123, 2017.

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

LIU, R.Q.; LAL, R. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. **Science of the Total Environment**, v. 514, p. 131-139, 2015.

LODI, L. A. Solubilização biológica de rocha potássica para aplicação como biofertilizante. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. **Dissertação (Mestrado)**. São Carlos, 2020.

LÓPEZ RÍOS, C.A.; MENESES, A.Z.; PENAGOS, S.N.H.; COLORADO, A.A.R.; PÉREZ, V.I.M. Producción de ácido cítrico com *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche. *Dyna*, v. 73, n. 150, p. 39-57, 2006.

MAGALHÃES, M.; CAVALCANTE, A.C.; ANDRADE, L.S.; WANDERLEY, C.R.P.; MARINHO, G.; PESSOA, Q.A.R. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* AN 400 a partir de resíduo agroindustrial. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 24, n. 1, 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, 2009.

MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F.B. Microrganismos e Disponibilidade de Fósforo (P) nos Solos: uma análise crítica. **Embrapa**, 2003.

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

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N.; DALSENTER, F.D.H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intra-particle phenomena in solid-state fermentation, **Biochem. Eng. J.** v.17, p.15–26, 2004.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals, design and operation.** Springer-Verlag: Berlin, 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.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31-36, 1962.

NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. Ensaio em ambiente controlado. In: **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo.**

OLIVEIRA, A. J.; GARRIDO, W. E.; ARAÚJO, J. D.; LOURENÇO, S. (Eds). 1ed. v. 3, p. 189-253. Brasília: Embrapa-SEA, 1991.

OLIVEIRA, P. Z.; VANDENBERGHE, RODRIGUES, C.; PEREIRA, G. V. M.; SOCCOL, C. R. Exploring cocoa pod husks as a potential substrate for citric acid production by solid-state fermentation using *Aspergillus niger* mutant strain. **Process Biochemistry**, v, 13, p. 107-112, 2022.



PAULILO, M. T. S.; VIANA, A. M.; RANDI, A. M. Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Santa Catarina. 2015.

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

PASTORE, N.S.; HASAN, S.N.; ZEMPULSKI, D.A. Produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engevista**, v. 13, n. 3, 2011.

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 solidstate cultivation in packed-bed bioreactors by changing bed porosity and airflow distribution. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1-12. 2020.

PIKVOSKAYA. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. **Microbiology**, v. 17, p. 362-370, 1948.

PRADO, F.C.; VANDENBERGHE, L.P.S.; WOICIECHOWSKI, J.A.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A; SOCCOL, C. R. Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 4, p. 547-555, 2005.

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

RODRIGUES, C. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando polpa cítrica. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná. **Dissertação (Mestrado)**. Curitiba, 2006.

RODRIGUES, N. A. Avaliação experimental de diferentes modos de operação de um biorreator de leito empacotado multicamadas para produção de celulases por cultivo em estado sólido. **Dissertação (Mestrado)**. Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021, 2011.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. *Árvore do Conhecimento: Cana-de-Açúcar. Correção e Adubação*. Disponível em: [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-deacucar/arvore/CONTAG01\\_6\\_711200516715.html](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-deacucar/arvore/CONTAG01_6_711200516715.html)>. Acesso em: 25 Jun. 2023.

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, J. A. F. Avaliação dos resíduos dos processamentos de suco de laranja e de cerveja para obtenção de ácido cítrico por fermentação em estado sólido. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. **Dissertação (Mestrado)**. Lorena, 2008.

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.

SCHOEBITZ, M.; CEBALLOS, C.; CIAMPI, L. Effect of immobilized phosphate solubilizing bacteria on wheat growth and phosphate uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 13(1), p. 1-10, 2013.

SCHNEIDER, K. D.; VAN STRAATEN, P.; DE ORDUNA, R. M.; GLASAUER, S.; TREVORS, J.; FALLOW, D.; SMITH, P. S. Comparing phosphorus mobilization strategies using *Aspergillus niger* for the mineral dissolution of three phosphate rocks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108 (1), p. 366-374, 2010.

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.; VANDENBERGHE, L.; RODRIGUES, C. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 141-149, 2006.

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.

SORATO, A. M. C. et al. Controle alternativo de *Aspergillus niger* em sementes de zarcilito com licor pirolenhoso de Timburi in vitro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 11, p.2, 2016.

SOUZA FILHO, D. A. Redução do potencial poluidor da manipueira e produção de ácido cítrico em reatores inoculados com fungo. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão Ambiental do Instituto Federal do Ceará. **Dissertação (Mestrado)**. Fortaleza, 2016.

TAYIBI, H.; CHOURA, M.; LOPEZ, F.A.; ALGUACIL, F.J.; LOPEZ-DELGADO, A. Eenvironmental impact and management of phosphogypsum. **Journal of Environmental Management**, v. 90(8), p. 2377-2386, 2009.

TORRADO, A. M.; CORTÉS, S.; SALGADO, J. M.; MAX, B.; RODRÍGUEZ, N.; BIBBINS, B. P.; CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 394409, 2011.

UMSZA-GUEZ, M. A., Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em escala de frascos e bioreator de leito fixo. São José do Rio Preto: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, **Tese de Doutorado**. 2009.

VANDENBERGHE, L. P.; PANDEY, A.; CARVALHO, J. C.; LETTI, L. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; KARP, S. G.; MARTÍNEZBURGOS, 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.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; BRAVO, V.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 332- 336, 2007.

VASSILEV, N.; BACA, M. T.; VASSILEVA, M.; FRANCO, L.; AZCON, R. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet waste médium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 546-549, 1995.

VASSILEV, N.; EICHLER-LOBERMANN, B.; FLOR-PEREGRIN, E.; MARTOS, V.; REYES, A.; VASSILEVA, M. Production of a potential liquid plant bio-stimulant by immobilized *Piriformospora indica* in repeated-batch fermentation process. **Amb Express**, v. 7, p. 7, 2017.

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.