

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE BIORREATOR DE
TAMBOR ROTATIVO EM ESCALA DE BANCADA

Tomás Augusto Polidoro

Caxias do Sul
2009

Tomás Augusto Polidoro

**DESENVOLVIMENTO DE BIORREATOR DE
TAMBOR ROTATIVO EM ESCALA DE BANCADA**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de
Mestre em Biotecnologia.**

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira.

Caxias do Sul

2009

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iv
NOMENCLATURA.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Processos fermentativos	3
2.1.1 Vantagens e desvantagens do cultivo em estado sólido	4
2.1.2 Aplicações do cultivo em estado sólido	5
2.2 Biorreatores	5
2.2.1 Biorreatores para cultivos em estado sólido.....	6
2.2.2 Dimensionamento de biorreatores para cultivo em estado sólido	11
2.3 Parâmetros operacionais do processo fermentativo em estado sólido.....	11
2.3.1 Temperatura.....	11
2.3.2 pH	12
2.3.3 Atividade de água / umidade	12
2.3.4 Aeração.....	13
2.3.5 Substrato	13
2.3.6 Mistura.....	14
2.3.7 Concentração celular	14
2.4 Cultivo de fungos filamentosos para a produção de enzimas pectinolíticas	14
2.4.1 Substâncias pécticas	14
2.4.2 Enzimas pectinolíticas	16
2.4.3 Aplicações industriais das enzimas pectinolíticas	17
2.4.4 Produção de pectinases por <i>Aspergillus niger</i>	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Projeto do sistema de biorreator de tambor rotativo.....	19
3.2 Cultivo de <i>Aspergillus niger</i>	20
3.2.1 Meios de cultivo	20
3.2.2 Condições experimentais dos cultivos.....	21
3.2.3 Amostragem	22

3.2.4 Demanda de oxigênio pelo cultivo	22
3.2.5 Métodos Analíticos.....	24
3.2.6 Cálculo dos fatores de conversão e produtividade do processo	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Biorreator de tambor rotativo	29
4.1.1 Construção do tambor rotativo e do sistema de agitação	29
4.1.2 Umidificação e aquecimento do fluxo gasoso.....	33
4.1.3 Estimativa indireta da concentração de biomassa	35
4.1.4 Dispersão do fluxo gasoso no interior do biorreator	36
4.1.5 Coleta de amostras.....	37
4.1.6 Monitoramento e controle da temperatura interna do biorreator.....	38
4.1.7 Verificação da homogeneidade do meio de cultivo.....	41
4.1.8 Montagem final do sistema de tambor rotativo	41
4.2 Cultivos de <i>Aspergillus niger</i> no sistema de tambor rotativo desenvolvido	42
4.2.1 Efeito da agitação sobre o cultivo de <i>Aspergillus niger</i>	42
4.2.2 Efeito da massa de substrato sobre o cultivo de <i>Aspergillus niger</i>	47
4.2.3 Efeito do controle da temperatura sobre o cultivo de <i>Aspergillus niger</i>	51
4.2.4 Comparação dos fatores de conversão e produtividade nos diferentes cultivos.....	55
ANEXO A - MODELO DE UTILIDADE DE DISPOSITIVO DE TAMBOR ROTATIVO n° MU8901075-2	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação dos biorreatores utilizados para cultivo em estado sólido..	6
Figura 2. Biorreatores com aeração superficial sem agitação.	7
Figura 3. Biorreatores com aeração forçada e sem agitação.	8
Figura 4. Biorreatores com aeração superficial e com agitação	9
Figura 5. Biorreatores com aeração forçada e com agitação.	10
Figura 6. Representação estrutural de um segmento de molécula de pectina	15
Figura 7. Representação esquemática do projeto inicial do biorreator de tambor rotativo.	19
Figura 8. Desenho da montagem do casco do biorreator de tambor rotativo.	30
Figura 9. Projeto e construção das tampas do biorreator de tambor rotativo.	30
Figura 10. Detalhes construtivos do sistema de agitação do biorreator de tambor rotativo.	32
Figura 11. Montagem do casco do biorreator de tambor rotativo sobre o sistema de agitação	32
Figura 12. Motor do sistema de agitação do biorreator de tambor rotativo.	33
Figura 13. Aparato utilizado para umidificação do ar injetado no biorreator de tambor rotativo.	34
Figura 14. Banho termostatizado utilizado para aquecimento do ar injetado no biorreator de tambor rotativo.	35
Figura 15. Sistema para remoção da umidade residual do fluxo gasoso.	36

Figura 16. Diferentes configurações de aeradores testadas.....	37
Figura 17. Equipamento para coleta de amostras de substrato do interior do biorreator de tambor rotativo durante cultivo de <i>Aspergillus niger</i>	38
Figura 18. Temperaturas medidas por termopares instalados no interior do meio de cultivo de <i>Aspergillus niger</i>	39
Figura 19. Desenho esquemático do sistema de controle de temperatura do biorreator de tambor rotativo	40
Figura 20. Sistema de aquecimento e refrigeração do biorreator de tambor rotativo	40
Figura 21. Esquema completo do sistema de tambor rotativo para cultivos sólido	42
Figura 22. Variação da concentração de biomassa estimada em função do tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 01, 02 e 07.....	43
Figura 23. Temperaturas medidas em função do tempo no interior do meio de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 01, 02 e 07.....	43
Figura 24. Aspecto do meio de cultivo utilizado para fermentação em estado sólido em biorreator de tambor rotativo.....	46
Figura 25. Variação da biomassa estimada em função do tempo para cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 02, 04 e 05.....	48
Figura 26. Temperaturas medidas em função do tempo no interior do meio de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 02, 04 e 05.....	48
Figura 27. Variação da concentração de biomassa estimada em função do tempo em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 02, 03 e 06.....	51

Figura 28. Temperaturas medidas em função do tempo no interior do meio de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições: 02, 03 e 06.....	52
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características das condições de cultivo testadas.....	22
Tabela 2. Variação da umidade no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 01, 02 e 07	44
Tabela 3. Variação da concentração de ART no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 01, 02 e 07.....	45
Tabela 4. Variação da atividade de endo-PG no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 01, 02 e 07.....	45
Tabela 5. Variação do teor de umidade no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 02, 04 e 05	49
Tabela 6. Variação da concentração de ART no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 02, 04 e 05.....	50
Tabela 7. Variação da atividade de endo-PG no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 02, 04 e 05.....	50
Tabela 8. Variação do teor de umidade no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 02, 03 e 06	53
Tabela 9. Variação da concentração de ART no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 02, 03 e 06.....	53
Tabela 10. Variação da atividade de endo-PG no cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em tambor rotativo nas condições 02, 03 e 06.....	53
Tabela 11. Fatores de conversão e produtividade nos cultivos de <i>A. niger</i> em biorreator de tambor rotativo	55

NOMENCLATURA

- Δt – intervalo de tempo entre duas medições
- A – redução da viscosidade
- a e b – coeficientes da curva de calibração
- ART – açúcares redutores totais
- D – diâmetro
- dil – diluição da preparação enzimática após a extração
- DNS – ácido dinitrosalicílico
- dX/dt – velocidade instantânea de crescimento
- endo-PG – endo-poligalacturonase
- f_c – fator de correção na extração
- FDA – Food and Drugs Administration
- FES – fermentação em estado sólido
- F_n – vazão de ar em base molar
- $F_{O_2,e}$ – vazão em base molar de oxigênio na entrada do biorreator
- $F_{O_2,s}$ – vazão em base molar de oxigênio na saída do biorreator
- F_V – vazão volumétrica de ar
- GRAS – *Generally Recognized as Safe*
- L – comprimento
- M – massa de meio seco no interior do biorreator
- m_o – coeficiente de manutenção celular para o oxigênio
- OUR – demanda de oxigênio pelo cultivo
- OUR_n – demanda de O_2 no final do intervalo de tempo considerado
- OUR_{n-1} – demanda de O_2 no início do intervalo de tempo considerado
- P – pressão total do sistema
- P_{endo} – atividade enzimática de endo-PG
- $p_{enzimas}$ – produtividade em endo-poligalacturonase
- P_f – máxima atividade enzimática alcançada
- pH – potencial hidrogeniônico
- P_i – atividade enzimática no início do processo
- R – constante dos gases
- S_f – concentração final de açúcares redutores totais
- S_i – concentração inicial de açúcares redutores totais

STR – *stirred tank reactor*

T – temperatura

t – tempo de obtenção da máxima atividade enzimática

$T_{enzimas}$ – atividade enzimática total do cultivo

UV – ultravioleta

v – volume da preparação enzimática utilizada na análise

V_a – viscosidade da amostra

$V_{a,i}$ – viscosidade da amostra inativada

X – concentração celular

X_f – máxima concentração celular alcançada

X_i – concentração celular inicial

X_n – concentração celular no final do intervalo de tempo considerado

X_{n-1} – concentração celular no início do intervalo de tempo considerado

Y_{GO} – fator de conversão de oxigênio em células

$y_{O_2,e}$ – fração de molar de oxigênio no ar

$y_{O_2,s}$ – fração de molar de oxigênio no gás na saída do biorreator

$Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato consumido em atividade enzimática de endopoligalacturonase

$Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato consumido em células

RESUMO

Neste trabalho, são descritos os detalhes da montagem de um sistema de cultivo microbiano em estado sólido, cujo elemento principal é um biorreator de tambor rotativo em escala de bancada, com casco em vidro refratário com aproximadamente 6,2 litros de volume. A montagem do equipamento exigiu estudos para a definição dos seguintes aspectos: geometria do reator; controle de frequência e período de agitação; umidificação, aquecimento e controle do fluxo do ar injetado no sistema; mistura do meio de cultivo; medição e controle da temperatura do meio; retirada de amostras.

O sistema desenvolvido foi avaliado, tendo como processo fermentativo modelo o cultivo de *Aspergillus niger* T0005/007-2, microrganismo produtor de enzimas pectinolíticas. Os testes foram feitos em um meio contendo farelo de trigo como suporte sólido, avaliando-se a influência de três parâmetros principais – agitação, massa de meio de cultivo e temperatura do meio – sobre o crescimento celular e a produção de endo-poligalacturonase (PG) por *A. niger*. Três formas de agitação do meio sólido foram comparadas: sem agitação; agitação a 1 rpm por 5 minutos a cada duas horas; agitação a 1 rpm por 1 hora e 55 minutos a cada duas horas. A segunda forma de agitação levou ao melhor crescimento celular, 81 mg.g⁻¹, e a atividade de endo-PG da ordem de 80 U.g⁻¹, semelhante ao estimado com o sistema estático. Com a terceira forma de agitação, aparentemente houve dano ao micélio fúngico e, com isso, resultados inferiores foram alcançados. A avaliação do efeito da massa de meio de cultivo sobre o processo foi feita com cargas crescentes de meio que resultaram na ocupação de 30, 45 e 60 % do volume útil do reator. Quanto ao crescimento celular, o melhor resultado foi alcançado com a menor carga de meio, enquanto que a carga intermediária resultou no mais alto título enzimático final, 107,2 U.g⁻¹. Nos experimentos sobre a influência da temperatura sobre o cultivo de *A. niger*, a maior atividade enzimática (80,6 U.g⁻¹) foi obtida numa condição de trabalho que permitiu que a temperatura do meio atingisse valores da ordem de 45°C. Com o meio mantido a 30°C, a atividade enzimática máxima foi substancialmente mais baixa, 46,4 U.g⁻¹.

Nos testes realizados com o processo modelo, não se verificou uma clara influência positiva da agitação sobre a produção de endo-PG. Entretanto, a partir dos experimentos com temperatura controlada, é possível sugerir que a formação de endo-PG é favorecida por uma condição de estresse para o microrganismo, no caso representado por temperaturas do meio acima de 40°C, visto que a temperatura ideal de crescimento de *A. niger* encontra-se na faixa de 28 a 34°C. Este resultado, que discorda do que é genericamente descrito na literatura

especializada sobre cultivos em estado sólido, é um exemplo da importância de dispor-se de um biorreator de tambor rotativo de pequena escala como equipamento básico para a realização de estudos fundamentais a respeito deste tipo de processo. Adicionalmente, o fato de o corpo do reator ser construído em vidro permite a visualização do espaço interno do tambor rotativo e observar o efeito da agitação sobre o meio de cultivo.

ABSTRACT

In this work, details on the assembling of a solid state cultivation system, whose main component is a bench scale rotating-drum bioreactor, are described. The bioreactor was built in refractory glass and has an approximate volume of 6.2 liters. To assemble the equipment, the following aspects have been studied: geometry of the bioreactor; control of frequency and period of agitation; moistening, warming and controlling of the inlet air flux; mixing of cultivation medium; determination and control of medium temperature; sample withdrawn.

The developed system was evaluated, being the cultivation of the pectinolytic enzyme-producing microorganism *Aspergillus niger* T0005/007-2 used as the model process. The fermentative tests were carried out in a medium containing wheat-straw as solid support and were used to evaluate the effects of three main parameters – agitation, mass of cultivation medium and medium temperature – on the cell growth and the production of endopolygalacturonase (endo-PG) by *A. niger*. For agitation of the solid medium, three modes were compared: no agitation; agitation of 1 rpm for 5 minutes each 2 hours; agitation for 1 hour and 55 minutes, each 2 hours. The second mode of agitation led to the best cell growth, 81 mg.g⁻¹, and to endo-PG activity of approximately 80 U.g⁻¹, similar to that obtained with the static system. With the third mode of agitation occurred, apparently, some damage to fungus mycelium and inferior results were achieved. The evaluation of the mass of cultivation medium on the process was done by loading the reactor with masses that result in the occupation of 30, 45 and 60% of the working volume of the bioreactor. With respect to the cell growth, the best result was attained with the smallest load of medium, whereas the intermediate load resulted in the highest endo-PG activity, 107.2 U.g⁻¹. In the experiments on the influence of the temperature on the cultivation of *A. niger*, the largest endo-PG activity (80.6 U.g⁻¹) was obtained in a process condition that allowed that the temperature reached values close to 45°C. When the medium temperature was controlled at 30°C, the endo-PG activity was substantially lower, 46.4 U.g⁻¹.

In the tests with the model process, no clearly positive influence of agitation on the production of endo-PG was observed. From the temperature-controlled experiments however, it is possible to suggest that endo-PG formation is favored by a stress condition for the microorganism, represented in this case by medium temperatures over 40°C, since the optimal temperatures for *A. niger* growth is found in the range of 28 to 34°C. This result disagrees from what is generically described in the specialized literature for the solid state cultivations, being this fact an example of the importance of having a small-scale rotating-drum bioreactor

as a basic equipment for fundamental studies on that type of fermentative process. Additionally, the fact of the reactor body being built on glass allows the inspection of the internal space of the rotating drum and to observe the effects of agitation on the cultivation medium.

1. INTRODUÇÃO

Processos fermentativos se caracterizam pela transformação de matérias-primas em produtos através de uma sequência de reações realizadas por células. Estes processos podem ocorrer em presença ou ausência de água livre no meio de cultura, sendo denominados como processo submerso ou processo em estado sólido, respectivamente.

Os processos fermentativos em estado sólido empregam normalmente resíduos agrícolas como fonte de energia e suporte para os microrganismos, agregando valor e levando à obtenção de produtos de interesse industrial. No Brasil, a enorme área territorial combinada com a diversidade de culturas vegetais, propicia grande geração de resíduos agroindustriais, aumentando as perspectivas de desenvolvimento de processos fermentativos em estado sólido. Dentre os produtos obtidos em cultivos microbianos em estado sólido, destacam-se as enzimas que são largamente empregadas na produção de alimentos e bebidas, além de biopesticidas, fertilizantes e fármacos, entre outros.

Uma das vantagens do emprego do processo em estado sólido em relação ao processo submerso é a ausência de água livre no meio de cultivo, aumentando a concentração de produtos e, em consequência, permitindo a utilização de menores quantidades de solvente para a extração dos produtos e gerando um menor volume de efluentes a ser tratado. Por outro lado, limitações associadas ao controle da temperatura do meio de cultivo, ao suprimento de oxigênio aos microrganismos e à remoção dos gases oriundos do processo incluem-se entre as suas desvantagens. No caso de elevação da temperatura, decorrente do calor produzido por reações metabólicas do microrganismo, pode ocorrer alteração da condição ótima de crescimento do microrganismo ou a desnaturação de produtos termossensíveis como, por exemplo, as enzimas.

Uma alternativa para minimizar os efeitos destes fatores limitantes é o uso de biorreatores de tambor rotativo, em que a agitação do meio de cultivo favorece a liberação do calor e a remoção de gases dos interstícios da massa sólida. Na condução de processos aeróbios em tambores rotativos, a agitação, aliada a uma corrente de ar que é introduzida no reator, permite uma oxigenação mais eficiente do meio. Entretanto, a agitação pode danificar o micélio de fungos filamentosos, enquanto o fluxo de ar, quando utilizado em vazões elevadas, pode resultar no ressecamento do meio de cultivo.

O conhecimento técnico a respeito de biorreatores para cultivo em estado sólido, quando comparado àqueles usados em processos submersos, é ainda incipiente, sendo os reatores utilizados em cultivos sólidos, na maioria dos casos, construídos para aplicação em

condições específicas. Os estudos sobre processos em estado sólido em escala de bancada, os são realizados em geral com biorreatores artesanais, sendo pouco explorado o uso de tambores rotativos construídos em material que permitam a visualização das alterações do meio durante o cultivo.

Dentro deste contexto, este estudo teve como objetivo geral projetar e construir um biorreator de tambor rotativo de escala de bancada a ser aplicado no desenvolvimento de diferentes processos em estado sólido.

Para a realização de ensaios fermentativos com o biorreator desenvolvido, foi escolhido, como modelo, o processo de produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger*. Estas enzimas são largamente utilizadas na indústria, especialmente na clarificação de vinhos e sucos de frutas, sendo, há vários anos, objeto de estudo no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- definir a geometria do biorreator de tambor rotativo em vidro refratário a ser construído a partir de dados da literatura especializada;
- desenvolver e testar o sistema de filtração, aquecimento, umidificação e distribuição do ar injetado no biorreator;
- avaliar o comportamento do biorreator com respeito à mistura do meio sólido;
- projetar o sistema de controle da temperatura no interior do tambor rotativo;
- testar o biorreator construído em cultivos de *Aspergillus niger* realizados com diferentes regimes de agitação, temperaturas e massa de meio de cultivo, tendo como parâmetros de avaliação o crescimento microbiano, o consumo de substrato e a produção enzimática de endo-poligalacturonase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Processos fermentativos

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a quantidade de água no meio de cultivo. Sendo denominados de processos em estado sólido ou fermentação em estado sólido (FES) – caracterizados pela ausência de água livre no meio – ou de processos submersos – em que há a presença de água livre no meio (Cannel & Moo-Young, 1980).

O processo submerso é a modalidade de processo fermentativo com o maior número de aplicações industriais. O modelo de biorreator que responde por 90% do total de biorreatores utilizados industrialmente, em fermentação submersa, é o reator com agitação mecânica, conhecido como STR (*stirred tank reactor*). O meio líquido permite a perfeita dissolução das fontes de energia e nutrientes, facilitando o contato do microrganismo a estes compostos, e favorece operações como a esterilização do meio de cultivo, o controle da temperatura e do pH durante o processo. No processo submerso, há também facilidade de aumento de escala e de modificações no regime de operação, podendo ser executado em regime descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo (Schmidell *et al.*, 2001).

A ocorrência da fermentação em estado sólido é, possivelmente, muito mais antiga que os registros da própria humanidade, sendo, por isso difícil de definir o início desta prática pelos seres humanos, havendo relatos do uso deste tipo de cultivo pelos chineses datando de 2.500 anos a.C. (Schmidell *et al.*, 2001).

Segundo Durand *et al.* (1988), a FES se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, sendo que o conteúdo líquido ligado à matriz deve estar em um nível de atividade de água que assegure o crescimento e o metabolismo das células, sem exceder a máxima capacidade de ligação da água com a própria matriz sólida.

Nos últimos anos, vem aumentando a produção bibliográfica acerca da fermentação em estado sólido, tratando, principalmente, da produção de enzimas, corantes, flavorizantes e gêneros alimentícios (Couto & Sanromán, 2006)

2.1.1 Vantagens e desvantagens do cultivo em estado sólido

Os processos fermentativos em estado sólido apresentam algumas características vantajosas e outras desvantajosas em comparação com os processos submersos. Algumas destas características, listadas por Cannel & Moo-Young (1980) e aprofundadas por Demain *et al.* (1999), são resumidas a seguir:

- a fermentação em estado sólido é relativamente resistente à contaminação bacteriana por conta da baixa atividade de água do substrato;
- os biorreatores são compactos e a carga de substrato é muito mais alta em função da baixa umidade, permitindo uma maior produtividade volumétrica;
- quando necessária a extração de produtos, a fermentação em estado sólido requer menor quantidade de solventes e, portanto, menor custo de recuperação;
- o tratamento dos resíduos é simplificado, pois eles podem ser secados e utilizados como ração animal ou fertilizante;
- em cultivos aeróbios, o fornecimento de oxigênio e manutenção da temperatura podem ser controlados pelo uso de aeração forçada, pois a grande área superficial do substrato sólido facilita a remoção do calor gerado e a transferência de massa de oxigênio e dióxido de carbono;
- no cultivo de fungos, os esporos utilizados para a inoculação permitem repetições mais confiáveis;
- há dificuldade na agitação do meio de cultivo, acarretando heterogeneidade na distribuição de massa celular, nutrientes, temperatura, pH e umidade, tornando muito complexo o controle do processo;
- a baixa condutividade térmica do substrato sólido dificulta a remoção do calor gerado pelo metabolismo celular;
- não é possível a determinação direta do pH e umidade do meio de cultivo, pois não existem sensores apropriados;
- a microflora é limitada pelos baixos índices de umidade, restringindo-se a fungos filamentosos e algumas bactérias;
- o conhecimento de engenharia de processo dos sistemas submersos é muito maior do que dos sistemas em estado sólido.

Demain *et al.* (1999) sugerem, ainda, que a decisão de escolha pela fermentação em estado sólido ou pela submersa, para a produção de enzimas extracelulares, deve basear-se, principalmente, no custo e na eficiência do processo.

2.1.2 Aplicações do cultivo em estado sólido

Processos fermentativos em estado sólido são utilizados pelo homem há muito tempo, como é o caso da fermentação do arroz por *Aspergillus oryzae* para iniciar o processamento do koji ou o cultivo de *Penicillium roquefortii* para a produção de queijos. Atualmente, na indústria de alimentos, a fermentação em estado sólido tem importante papel na produção de flavorizantes, que correspondem a 25% do consumo mundial de aditivos alimentares, enzimas e ácidos orgânicos como o ácido láctico e o ácido cítrico (Couto & Sanromán, 2006). Dentre as enzimas, podem-se destacar as lipases, aplicadas no tratamento de efluentes das indústrias de alimentos (Capra *et al.*, 2003) e as pectinases que degradam a pectina presente em células vegetais, largamente utilizadas para a clarificação de vinhos e sucos de frutas (Hansen, 2003).

A fermentação em estado sólido pode ser utilizada também para a biorremediação e biodegradação de resíduos perigosos e para a biotransformação de resíduos agroindustriais ou produção de biopesticidas (Pandey *et al.*, 2000).

2.2 Biorreatores

De acordo com Schmidell *et al.* (2001), aplica-se a denominação de biorreator, reator bioquímico ou reator biológico ao reator no qual ocorrem reações químicas catalisadas por células vivas (animais ou vegetais), microrganismos ou enzimas produzidas a partir de células vivas. Tais reações visam a transformação de substratos em produtos de maior valor agregado e são denominadas comumente de fermentações. São relatados dois grupos distintos de biorreatores, reatores enzimáticos (que permitem o bioprocessamento sem a presença de células vivas) e biorreatores (onde as reações ocorrem a partir de células vivas). Os biorreatores podem ser divididos em dois grandes grupos: os biorreatores de fase aquosa contínua, utilizados em processos submersos, e os biorreatores de fase não-aquosa, próprios para cultivo em estado sólido. Entre os primeiros, os principais tipos são o tanque agitado (STR), a coluna de bolhas, o reator de fluxo pistonado (*plug-flow*) e o *airlift*. Os biorreatores para processos em estado sólido são discutidos em detalhes nos itens seguintes.

2.2.1 Biorreatores para cultivos em estado sólido

Os biorreatores para cultivo em estado sólido ainda não alcançaram o grau de desenvolvimento obtido para os biorreatores utilizados para cultivo em fase aquosa. Dois fatores que contribuem para isso são a dificuldade de manutenção da uniformidade do substrato e o controle da temperatura no reator, visto que na maioria dos casos o substrato sólido não é um condutor de calor eficiente (Raghavarao *et al.*, 2003). Os dois principais parâmetros variáveis em biorreatores para fermentação em estado sólido são a agitação e a aeração. A agitação visa manter a homogeneidade do meio de cultivo e a aeração facilita o acesso do oxigênio ao microrganismo, além de poder ser utilizada como método de controle de temperatura e umidade do meio de cultivo. Na Figura 1 são esquematizados os principais modelos de biorreatores para cultivo em estado sólido, divididos em quatro grupos: com aeração superficial e sem agitação; com aeração forçada e sem agitação; com aeração superficial e agitação; com aeração forçada e agitação.

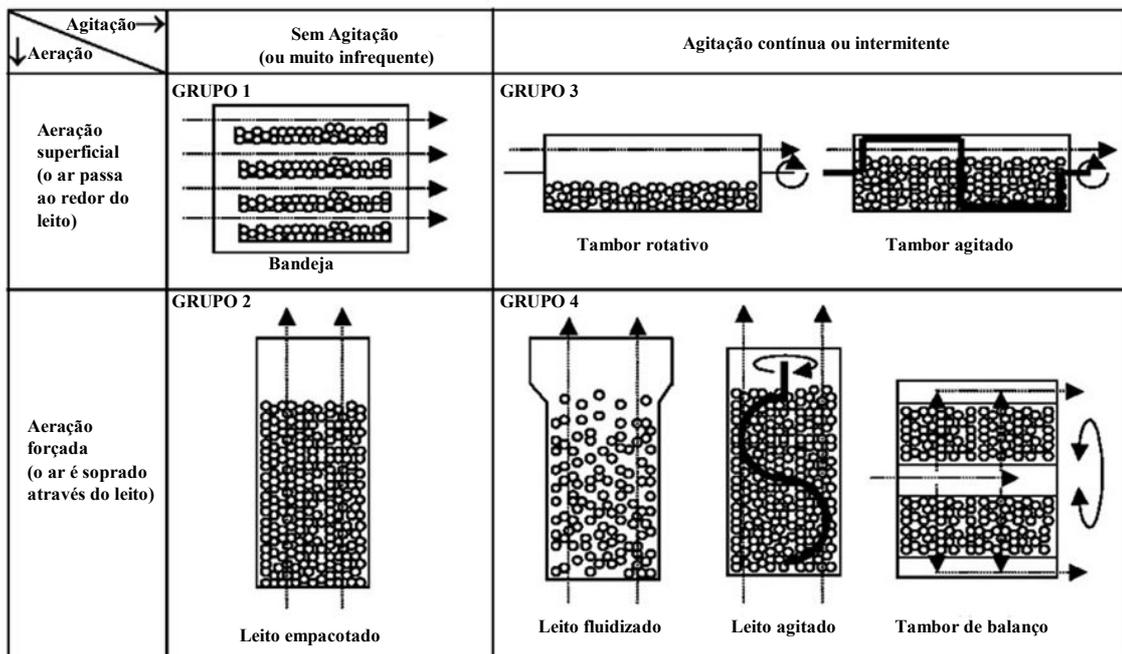


Figura 1. Classificação dos biorreatores utilizados para cultivo em estado sólido. As setas retas indicam o sentido do fluxo de ar (Mitchell *et al.*, 2006).

Como visto na Figura 1, Mitchell *et al.* (2006) dividiram os biorreatores para fermentação em estado sólido em quatro grandes grupos. As principais características de cada grupo, respectivamente, são detalhadas nas Figuras 2, 3, 4 e 5.

– **Biorreatores com aeração superficial e sem agitação**

Este grupo é composto basicamente por reatores de bandejas, que podem ser dispostos em salas climatizadas e ventiladas, estufas de bancada ou bandejas individuais. Podem ser utilizados também sacos plásticos hermeticamente fecháveis dispostos em estufas ou salas climatizadas, com substituição periódica da fase gasosa. As bandejas podem ser construídas em madeira, bambu, aço ou materiais poliméricos, tendo o fundo perfurado, ou não. Os reatores de bandeja com fundo perfurado possibilitam maior contato do substrato com a fase gasosa. O conceito de aeração superficial define a passagem do fluxo gasoso pela superfície do substrato sólido e não através dele, como é o caso da aeração forçada. A Figura 2 mostra desenhos esquemáticos de alguns modelos de biorreatores pertencentes a este grupo: câmara climatizada (Figura 2a); estufa (Figura 2b); bandeja individual (Figura 2c) e saco plástico (Figura 2d).

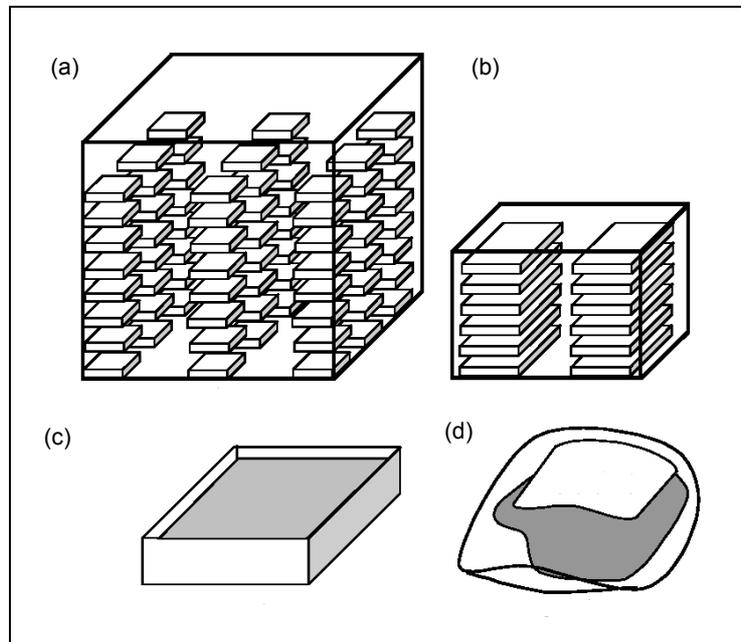


Figura 2. Biorreatores com aeração superficial sem agitação. a – câmara climatizada; b – estufa; c – bandeja individual; d – saco plástico. (Mitchell *et al.*, 2006).

– **Biorreatores com aeração forçada e sem agitação**

Este grupo compreende os reatores de leito empacotado, onde não há movimentação do meio de cultivo. Na Figura 3 são apresentadas quatro diferentes variações de biorreatores de leito empacotado: o leito empacotado clássico (Figura 3a), com formato tubular e fluxo ascendente de ar atravessando o meio de cultivo; o leito empacotado com tubo central perfurado ao longo do eixo central (Figura 3b), que tende a criar caminhos preferenciais do ar no eixo central do meio de cultivo ; o biorreator de leito empacotado com fluxo radial (Figura 3c), em que o ar é obrigado a atravessar o meio de cultivo da região central para fora e o biorreator de leito empacotado modelo *short-wide* (Figura 3d), que mescla bandeja com aeração forçada, tratando-se de uma bandeja com fundo perfurado e fluxo de ar que atravessa a camada de substrato.

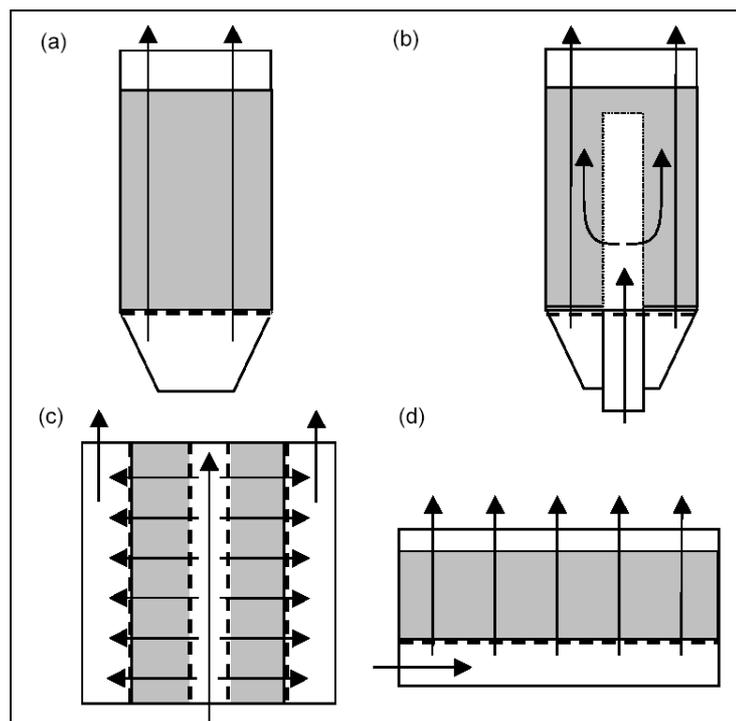


Figura 3. Biorreatores com aeração forçada e sem agitação. a – biorreator de leito empacotado; b – biorreator de leito empacotado com duto central; c – biorreator de leito empacotado com fluxo radial; d – biorreator *short-wide* (Mitchell *et al.*, 2006).

– **Biorreatores com aeração superficial e com agitação**

Este é o grupo dos biorreatores de tambor rotativo (Figura 4a) – onde a rotação do casco do biorreator permite a total exposição do meio de cultivo ao fluxo gasoso, responsável pela remoção do calor e dos gases gerados pelo metabolismo microbiano – e de tambor agitado (Figura 4b), modelo no qual o revolvimento do meio de cultivo é realizado por pás que giram no interior do tambor estático. O biorreator de tambor rotativo, modelo utilizado neste trabalho, pode ser dotado de chicanas que têm a função de melhorar a mistura do meio de cultivo. Variações destes modelos podem ter paredes duplas perfuradas ou inclinadas.

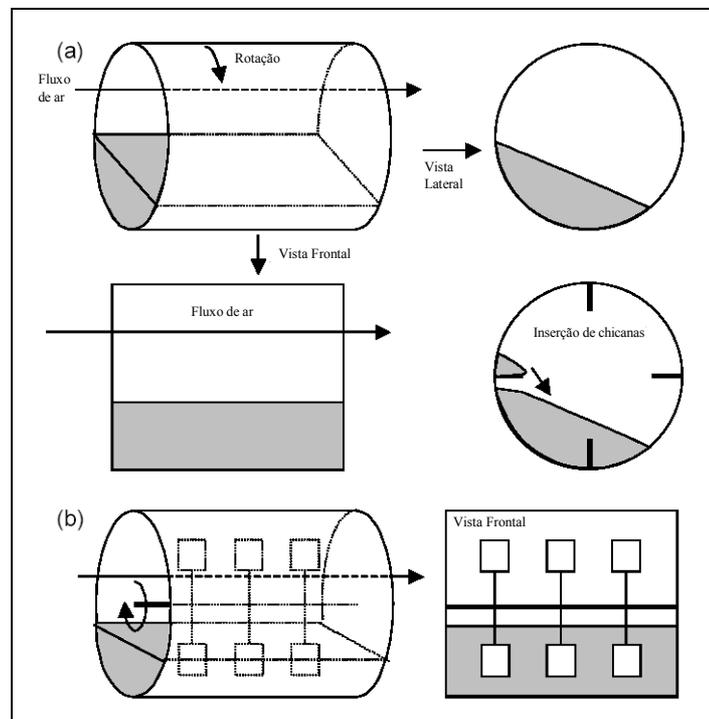


Figura 4. Biorreatores com aeração superficial e agitação. a – biorreator de tambor rotativo; b – biorreator de tambor agitado (Mitchell *et al.*, 2006).

Nagel *et al.* (2000) construíram um biorreator de tambor agitado, com volume útil de 35,3 L para estudar o controle da temperatura de cultivo de *Aspergillus oryzae* sobre grãos de trigo utilizando agitação contínua e refrigeração externa ao casco do biorreator. Os autores relatam redução do teor de umidade do meio de cultivo no decorrer da fermentação devido à evaporação da água do substrato para diminuir a temperatura do cultivo.

O uso de agitação intermitente em biorreator de tambor rotativo foi descrito por Reu *et al.* (1993), como forma de reduzir custos de processo e minimizar o cisalhamento do micélio. O sistema construído para estudar a influência da temperatura do cultivo de *Rhizopus oligosporus* utilizando soja como substrato foi eficiente no controle da temperatura em 34 e 36 °C. Nas mesmas condições, porém sem agitação, a temperatura medida foi de 45 °C; em outros ensaios sem agitação foi relatada eficiência de redução de temperatura por aeração superficial somente para vazões de ar superiores a 1,5 L.min⁻¹.Kg⁻¹.

– Biorreatores com aeração forçada e com agitação

É o grupo de reatores com maior variedade de parâmetros de controle do processo fermentativo: temperatura, teor de umidade e fluxo do ar injetado, intensidade de mistura (rpm), facilidade de adição de água e outros aditivos do processo. Na Figura 5, são mostradas quatro variações de modelos de biorreatores deste grupo: biorreator de coluna com agitação mecânica do leito e fluxo ascendente do ar (Figura 5a), que é uma evolução do sistema de leito empacotado; tambor agitado com parede inferior perfurada (Figura 5b), que propicia um melhor contato do ar com o meio de cultivo; biorreator de tambor rotativo com injeção de ar no interior do meio de cultivo (Figura 5c), que utiliza o mesmo princípio do tipo anterior; biorreator de leito fluidizado (Figura 5d), onde a agitação do meio de cultivo é realizada pelo fluxo de ar, economizando em sistemas de agitação mecânica, mas utilizando altas vazões de ar para manter o movimento.

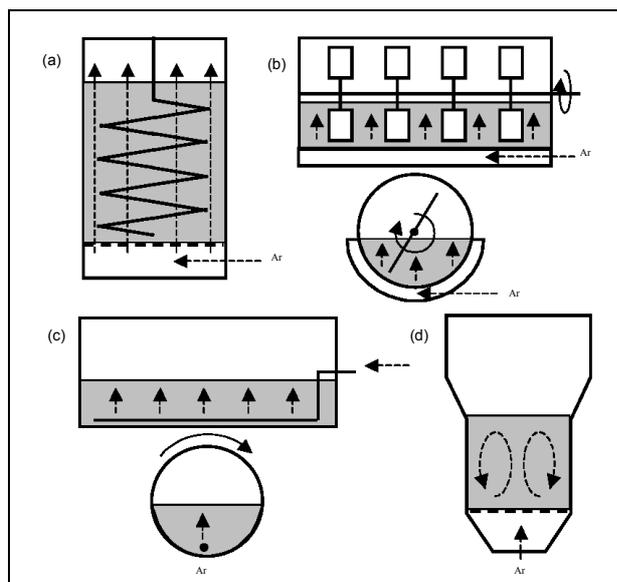


Figura 5. Biorreatores com aeração forçada e agitação. a – leito agitado; b – tambor agitado; c – tambor rotativo; d – leito fluidizado (Mitchell *et al.*, 2006).

2.2.2 Dimensionamento de biorreatores para cultivo em estado sólido

Por ser um processo ainda carente de estudos aprofundados, não existe um consenso com respeito às proporções geométricas de biorreatores para fermentação em estado sólido. A maior parte dos reatores industriais se baseia em protótipos empíricos e com dimensões apropriadas para o cultivo exclusivo de um único microrganismo (Doelle *et al.*, 1992).

A bibliografia consultada para reatores de tambor em escala de bancada descreve diversas relações entre diâmetro (D) e comprimento (L) do tambor utilizadas experimentalmente. Destas relações podem-se destacar os trabalhos de: Domínguez *et al.* (2001), D 150 mm e L = 307 mm; Hardin *et al.* (2002), D = 560 mm e L = 800 mm; Durand (2003), D = 560 mm e L = 900 mm; Kalogeris *et al.* (1999), D = 150 mm e L = 590 mm; Rutsatz (2006), D = 200 mm e L = 400 mm e Gasiorek (2008), D = 155 mm L = 268 mm.

2.3 Parâmetros operacionais do processo fermentativo em estado sólido

2.3.1 Temperatura

O controle da temperatura é um importante fator a ser considerado no projeto de biorreatores para fermentação em estado sólido (Doelle *et al.*, 1992). Nos estágios iniciais do metabolismo microbiano, as condições de temperatura e concentração de oxigênio são, em geral, homogêneas ao longo do leito. O progresso da fermentação acarreta compactações que dificultam a difusão do oxigênio e a remoção do calor gerado pelo crescimento, podendo ocasionar temperaturas superiores a 70 °C no interior do reator (Raghavarao *et al.*, 2003). Temperaturas diferentes das consideradas ideais ao crescimento do microrganismo acarretam inibição do crescimento e, eventualmente, destruição de produtos. Maiores gradientes de temperatura dependem diretamente da espessura da camada de substrato sólido. Este fator é um dos mais críticos no aumento de escala do processo (Scheper *et al.*, 2000).

Szewczyk & Myszka (1994) estudaram o efeito da temperatura sobre o crescimento de *A. niger* utilizando meio de cultivo a base de farelo de trigo e polpa de beterraba. Relataram o incremento no coeficiente de manutenção celular em temperaturas entre 25 e 34 °C e um decréscimo nestes valores para temperaturas entre 34 e 40 °C, indicando um efeito inibidor da temperatura sobre o crescimento de *A. niger* em meio sólido.

2.3.2 pH

O metabolismo microbiano é significativamente afetado pelo pH local. No caso da fermentação em estado sólido, existem gradientes de pH em cada partícula de substrato, impossibilitando o controle fino do pH. Em alguns casos, pode-se adicionar soluções-tampão ao substrato, porém tal prática depende também do modelo de biorreator utilizado (Doelle *et al.*, 1992; Scheper *et al.*, 2000).

2.3.3 Atividade de água / umidade

A atividade de água é a razão entre a pressão de equilíbrio de vapor do substrato em relação à água pura em uma mesma temperatura. Trata-se da quantidade de água não ligada à disposição dos microrganismos. Cada microrganismo necessita de um valor mínimo de atividade de água para efetuar suas atividades metabólicas. Quantidades elevadas de água livre no substrato dificultam a difusão de gases e a dissipação de calor. O teor de umidade pode variar entre 18 e 85%, de acordo com o poder de absorção do substrato (Schmidell *et al.*, 2001)

Os teores de umidade utilizados em cada cultivo são determinados pelas propriedades do substrato utilizado e pela necessidade do microrganismo. Fontana *et al.* (2005) relatam 63% de umidade no cultivo de *A. niger* em farelo de trigo, Gasiorek (2008), 60% de umidade no cultivo de *A. niger* utilizando polpa de beterraba como substrato, Szewczyk & Myszka (1994), 60% de umidade no cultivo de *A. niger* em polpa de beterraba e farelo de trigo e Schutyser *et al.* (2003), 44% de umidade em cultivo de *A. oryzae* sobre grãos de trigo

As funções da atividade de água em sistemas biológicos são numerosas e os mecanismos de ação e interação das moléculas de água com estes não estão completamente compreendidos. Pode-se distinguir, entre essas funções, a atuação da água como solvente, provendo a célula com nutrientes dissolvidos e removendo metabólitos nocivos. Ao nível molecular, a água promove a estabilização estrutural de biopolímeros como proteínas, nucleotídeos e carboidratos. A atividade de água também auxilia na preservação da permeabilidade da membrana celular (Gervais & Molin, 2003).

2.3.4 Aeração

A injeção de ar esterilizado no biorreator contribui para o correto suprimento de oxigênio ao microrganismo, além de remover o calor e os gases oriundos do metabolismo celular (Doelle *et al.*, 1992).

Uma consequência negativa da aeração forçada é o ressecamento do leito de substrato até níveis de umidade inferiores aos mínimos requeridos pelo microrganismo. Uma forma de evitar que isto ocorra é a umidificação da corrente gasosa injetada no equipamento (Scheper *et al.*, 2000).

Gasiorek (2008) relata que a aeração favoreceu a produção de ácido cítrico por *A. niger* até certo ponto pois, quando em excesso, a aeração auxiliou no incremento da biomassa, reduzindo, entretanto, o rendimento em ácido cítrico em cerca de 20% .

2.3.5 Substrato

Nos cultivos em estado sólido, a principal função do substrato é servir de fonte de carbono e nutrientes, mas o substrato também propicia o suporte dos microrganismos. Segundo Mitchell *et al.* (2006), vários aspectos devem ser levados em consideração na seleção do substrato a ser utilizado nos cultivos em estado sólido:

- afinidade entre o microrganismo e a fonte de carbono;
- tamanho, formato e densidade das partículas constituintes – definirá a fixação do microrganismo ao substrato;
- densidade aparente do meio de cultivo – que irá determinar a facilidade de acesso do microrganismo à fase gasosa;
- atividade de água do sólido – favorece ou inibe o crescimento microbiano.

O substrato pode ser utilizado na forma natural ou sintética, mas, de forma geral, os materiais são provenientes de matérias-primas, produtos ou resíduos agroindustriais, em geral determinados pelo processo que se deseja realizar, pela facilidade de obtenção ou dos resultados que se deseja conseguir (Schmidell *et al.*, 2001).

2.3.6 Mistura

A agitação em processos em estado sólido tem a função de manter a homogeneidade do leito de substrato, facilitar a oxigenação e remover os gases e o calor gerados durante o cultivo. A agitação em excesso pode acarretar a destruição do micélio em fungos filamentosos, além de dificultar a esporulação dos microrganismos (Scheper *et al.*, 2000; Schmidell *et al.*, 2001).

Em processo em estado sólido, em princípio, o diferencial de sistemas agitados em comparação aos de leito estático é a maior exposição do substrato à fase gasosa, melhorando a aeração e facilitando a remoção de calor e gases gerados durante o crescimento microbiano (Raghavarao *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2006).

Segundo Gasiorek (2008), o efeito da agitação contínua não prejudicou o crescimento de *A. niger*, pois a agitação promove a formação de agregados de substrato que aumentam de tamanho no decorrer da fermentação, permitindo o desenvolvimento dos microrganismos no interior destes aglomerados.

Schutyser *et al.* (2003) relatam redução de aproximadamente 10% no consumo de oxigênio por *A. oryzae* cultivado em grãos de trigo após agitação do biorreator, redução atribuída à destruição do micélio.

2.3.7 Concentração celular

A determinação indireta da concentração celular em meios sólidos, pode ser realizada por diferentes técnicas. Diferentes autores relatam o uso de métodos indiretos para estimar o crescimento microbiano, como Maiorano (1990) e Fontana *et al.* (2005) que utilizaram balanço gasoso e Kalogeris *et al.* (1999) e Nagel *et al.* (2000) que estimaram a biomassa pelo conteúdo de glicosamina, que é um constituinte da parede celular fúngica.

2.4 Cultivo de fungos filamentosos para a produção de enzimas pectinolíticas

2.4.1 Substâncias pécticas

Segundo Pilnik & Rombouts (1981), substâncias pécticas são heteropolissacarídeos estruturais que ocorrem principalmente na parede celular de plantas superiores. Elas são constituídas por moléculas ácidas ou neutras (Willats *et al.*, 2001). As substâncias pécticas

ácidas se dividem em homogalacturonanas e ramnogalacturonanas. Basicamente, as primeiras são formadas por unidades de ácido galacturônico, enquanto que as segundas são constituídas por unidades de ácido galacturônico e ramnose (Ribereau-Gayon *et al.*, 2003). Whitaker (1984) dividiu as homogalacturonanas em dois grupos: as pectinas que possuem um mínimo de 75% dos grupos carboxila esterificados com radicais metoxila, e os ácidos poligalacturônicos que não apresentam esterificação das carboxilas.

Kertesz (1951) cita a subdivisão das substâncias pécticas preconizada pela American Chemical Society: inicialmente as substâncias pécticas estão presentes em frutas na forma de protopectinas, que são insolúveis em água antes do processo de amadurecimento e solúveis após a maturação; sob ação enzimática, formam-se pectinas, que é o material polimérico solúvel em água, no qual pelo menos 75% dos grupos carboxílicos das unidades de ácido galacturônico estão metoxilados; ácido pectínicos, ácidos poligalacturônicos coloidais que possuem um número significativo de grupos metil ester que, em adequadas condições, podem formar gel com açúcares e ácidos; e ácido péctico, que são substâncias pécticas compostas de ácido poligalacturônico coloidal, completamente isentas de grupos metoxila. A Figura 6 representa a estrutura química de um segmento de molécula de pectina.

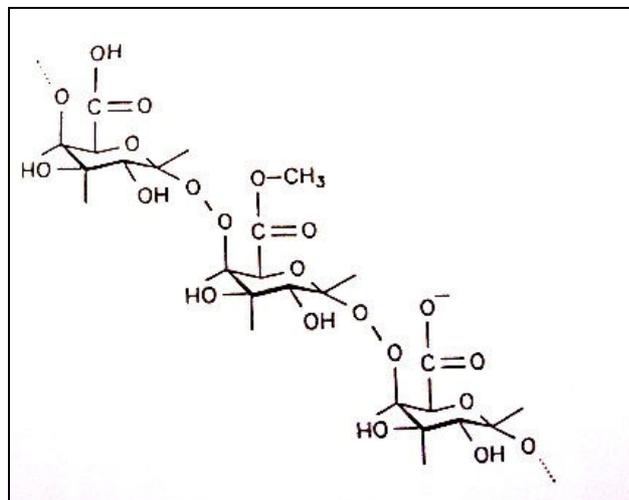


Figura 6. Representação estrutural de um segmento de molécula de pectina (Thakur *et al.*, 1997).

As substâncias pécticas são solúveis em água e insolúveis na maioria dos principais solventes orgânicos, com algumas exceções, como a formamida e glicerol, sob temperatura elevada. A facilidade de dissolução em água é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia, que está relacionado com ao peso molecular. A massa molecular é o principal responsável pela alta viscosidade de soluções aquosas de pectina com concentrações de até 2% em massa por volume. Outros fatores também favorecem o aumento de viscosidade,

como, por exemplo, o grau de esterificação, a concentração, o pH e a força iônica (Fogarty & Kelly, 1983).

2.4.2 Enzimas pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas podem ser produzidas por fungos filamentosos, bactérias, leveduras, nematóides, insetos e plantas (Pilnik & Rombouts, 1981). Essas enzimas pertencem a um grupo enzimático que atua sobre substâncias pécticas através de reações de hidrólise e de trans-eliminação, provocando a despolimerização das moléculas, e através de reações de desesterificação, hidrolisando a ligação éster entre os grupos carboxila e metil das pectinas (Kashyap *et al.*, 2001).

As enzimas pectinolíticas são classificadas pela sua ação despolimerizante ou desmetoxilante sobre as substâncias pécticas. As despolimerizantes atuam catalisando a quebra das ligações α -1,4 da cadeia principal, ao passo que a desmetoxilante desesterifica a pectina a ácido péctico por remoção dos resíduos metoxila (Pilnik & Rombouts, 1981; Kashyap *et al.* 2001).

As enzimas despolimerizantes, segundo Kashyap *et al.* (2001), foram classificadas de acordo com o modo pelo qual a ligação é rompida (hidrólise ou trans-eliminação), posição de ataque no substrato (endopectinases ou exopectinases); tipo de substrato hidrolisado (ácido péctico ou pectina). A seguir são apresentadas as subdivisões do grupo de enzimas despolimerizantes:

Poligalacturonases (PG)

- Endo-PG (E.C.3.2.1.15): hidrolisa aleatoriamente as ligações α -1,4 entre unidades de ácido poligalacturônico.

- Exo-PG 1 (E.C.3.2.1.67): hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico, a partir da extremidade não-redutora, liberando ácidos galacturônicos

- Exo-PG 2 (E.C.3.2.1.82): hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico, a partir do terminal não-redutor, liberando ácidos digalacturônicos.

Polimetilgalacturonases (PMG)

- Endo-PMG: hidrolisa a pectina aleatoriamente.

- Exo-PMG: hidrolisa a pectina sucessivamente.

Polimetilgalacturonato liases (PMGL)

- Endo-PMGL ou endo-pectina liase (E.C.4.2.2.10): rompe as ligações glicosídicas entre resíduos de ácidos galacturônicos por um mecanismo de trans-eliminação.

- Exo-PMGL ou exo-pectina liase: causa a quebra da pectina, sequencialmente, por transeliminação.

Poligalacturonato liases (PGL)

- Endo-PGL ou endo-pectato liase (E.C.4.2.2.2): rompe as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido péctico por trans-eliminação.

- Exo-PGL ou exo-pectato liase (E.C.4.2.2.9): rompe as ligações glicosídicas entre resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação, a partir de terminais não-redutores.

A pectinesterase (PE) (E.C.3.1.1.11) é a única enzima pectinolítica desmetoxilante, que catalisa a desesterificação dos grupos metoxila da pectina, a convertendo em ácido péctico e liberando metanol.

2.4.3 Aplicações industriais das enzimas pectinolíticas

A atividade industrial onde há a maior utilização de enzimas pectinolíticas é a indústria para a clarificação de sucos de frutas e vinhos, pois estas agem degradando as substâncias pécticas constituintes das frutas (Spagna *et al.* 1995; Alkorta *et al.* 1998). O tratamento de frutas com enzimas pectinolíticas auxilia o processo de extração, pois desagrega os tecidos, o que promove acréscimo no rendimento em suco e polpa; e diminui a viscosidade e turbidez dos sucos, incrementando o rendimento em substâncias que conferem aroma e cor aos sucos e promovendo sua clarificação (Blanco *et al.* 1999; Bastos *et al.* 2002;).

As enzimas pectinolíticas podem ser aplicadas ainda em uma gama de processos industriais associados ao tratamento e à degomagem de fibras vegetais, à cura de café, cacau e tabaco (Nair & Panda, 1997; Silva *et al.*, 2000; Kapoor *et al.*, 2001; Kashyap *et al.*, 2001; Sharma & Satyanarayana, 2006), à extração de óleos essenciais e pigmentos de materiais vegetais (Coelho *et al.* 1995; Hoondal *et al.*, 2002; Gummadi & Panda, 2003; Hadj-Taieb *et al.*, 2006) e à indústria têxtil e de papel (Reid & Ricard, 2000; Olsson *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2004; Jayani *et al.*, 2005; Sharma & Satyanarayana, 2006).

2.4.4 Produção de pectinases por *Aspergillus niger*

Aspergillus niger é o fungo mais utilizado industrialmente para a produção de enzimas pectinolíticas, pois possui capacidade de sintetizar poligalacturonases, polimetil galacturonase, pectinaliase e pectinesterase (Panda & Naidu, 2003). A grande vantagem do uso deste fungo está na sua classificação como GRAS (*generally recognized as safe*) pela “Food and Drugs Administration” (FDA), que é o órgão do governo dos EUA responsável pelo controle de alimentos e medicamentos, que permite o uso de metabólitos de *A. niger* na indústria de alimentos (Schuster *et al.*, 2002).

São relatadas distintas respostas fisiológicas para uma mesma linhagem de *A. niger* cultivada com diferentes técnicas de fermentação, sendo que a produção de pectinases em processo em estado sólido apresenta vantagens em relação ao processo submerso (Acuña-Arguelles *et al.*, 1995). Por outro lado, há a necessidade da seleção de linhagens adaptadas a cada tipo de processo de produção (Minjarres-Carranco *et al.*, 1997).

Maldonado & Saad (1998) estudaram a produção de pectinesterase e poliagalacturonases, duas enzimas do grupo das pectinases, por *A. niger* em cultivo submerso e sólido. Com pectina como fonte de carbono, a produção foi de quatro e seis vezes maior em sistema sólido em comparação com o submerso, respectivamente, com um menor tempo de processo.

Fontana *et al.* (2005) estudaram a influência do teor de pectina e glicose sobre o crescimento e produção de poligalacturonases por *A. niger* utilizando farelo de trigo como substrato, relatando a adição de 6% de pectina e 10 % de glicose como ideais para a produção de poligalacturonases por de *A. niger* em meio sólido.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Projeto do sistema de biorreator de tambor rotativo

O projeto e construção do biorreator de tambor rotativo, com capacidade de aproximadamente 1.000 g de meio de cultivo, foi baseado em relações dimensionais relatadas pela bibliografia (Reu *et al.*, 1993; Kalogeris *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*, 2001; Gasiorek 2008). Além do biorreator propriamente dito também foi projetado um sistema de aquecimento, umidificação e controle do fluxo de ar que alimenta o biorreator. Tal modelo de reator foi escolhido por possuir inúmeras possibilidades de variação nos parâmetros operacionais, como a frequência e o período de agitação e a vazão do fluxo gasoso, por exemplo.

O vidro refratário foi eleito como material para a construção pela possibilidade de realizar sua esterilização por calor úmido e visualização do interior. A Figura 7 representa um desenho esquemático da proposta inicial do sistema de biorreator de tambor rotativo, com seus principais componentes. O controle da temperatura interna do biorreator durante os cultivos seria realizado da seguinte maneira: o suprimento de calor garantido pela passagem do fluxo gasoso (Figura 7 – 1) umidificado (Figura 7 – 2) e aquecido (Figura 7 – 3) pelo interior do tambor (Figura 7 – 4) e a remoção do calor gerado pelo metabolismo pelo movimento de rotação do biorreator. Tanto a proposta inicial do sistema quanto a metodologia inicialmente definida para o controle da temperatura interna do aparato sofreram aperfeiçoamentos ao longo dos testes preliminares, visando otimizar o sistema.

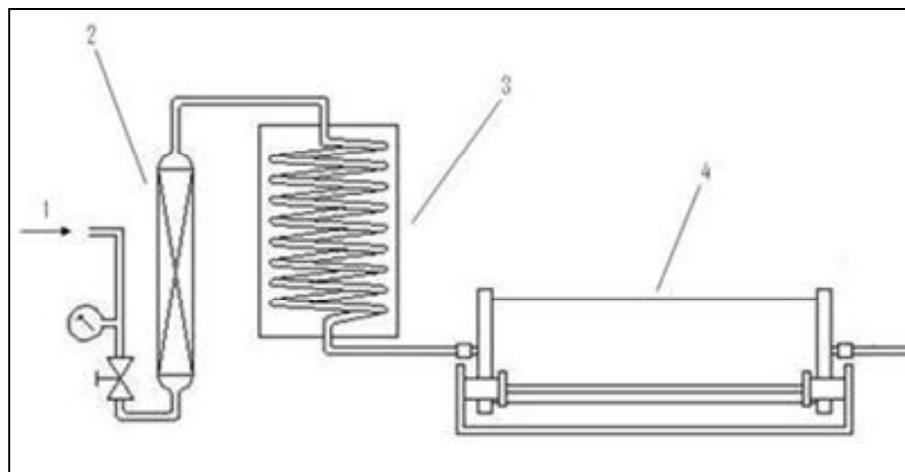


Figura 7. Representação esquemática do projeto inicial do biorreator de tambor rotativo. 1 – entrada do fluxo gasoso; 2 – coluna umidificadora do ar; 3 – serpentina para aquecimento; 4 – biorreator de tambor rotativo.

3.2 Cultivo de *Aspergillus niger*

Para verificar a aplicabilidade do sistema de fermentação de tambor rotativo projetado e construído de acordo com o item 3.1 foram realizados cultivos utilizando um fungo filamentosos em diversas condições operacionais. Foi escolhido *Aspergillus niger* por ser um fungo filamentosos com condições de cultivo semelhantes às já utilizadas pela equipe do Laboratório de Bioprocessos do Instituto de Biotecnologia da UCS (Fontana *et al.*, 2005)

Para todos os cultivos em biorreator de tambor rotativo foi utilizado o fungo *A. niger* T0005/007-2. Esta linhagem foi isolada do solo da região de Salta, Argentina, e cedida pelo Departamento de Engenharia de Alimentos da Fundação Universidade Federal de Rio Grande. A cultura foi mantida a 4°C em meio glicerinado (Maiorano, 1982).

3.2.1 Meios de cultivo

Para conservação e propagação do microrganismo, foi utilizado o agar glicerinado descrito por Maiorano (1982), com a seguinte composição (g.L⁻¹): glicose, 25,0; glicerina, 25,0; extrato de levedura, 5,0; agar-agar, 20,0. O pH do meio de cultivo, foi ajustado em 6,5 e em seguida esterilizado em autoclave a 1 atm por 20 min e então distribuídos em placas de Petri previamente esterilizadas em estufa a 170 °C por 3 h. As culturas foram propagadas a 30°C por 48 horas e mantidas a 4°C.

Para o preparo do inóculo a cultura foi propagada em placas de Petri contendo meio glicerinado à temperatura de 30 °C por 72 h. A concentração da suspensão de esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer (Linde, 2000)

O meio sólido utilizado nos ensaios foi baseado nos estudos de Fontana *et al.* (2005) e continha farelo de trigo como suporte, fonte de carbono e nutrientes possuindo a seguinte composição após inoculação (g): farelo de trigo, 35,6; pectina cítrica (CP Kelco, Brasil), 3,0; glicose, 9,4; solução de nutrientes, 29,6 mL; água (incluindo o volume da suspensão de conídios usada na inoculação), q.s.p 100 g. A solução de nutrientes tinha a seguinte composição (g.L⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 4,0; KH₂PO₄, 2,0; MgSO₄.7H₂O, 1,0; FeSO₄.7H₂O, 6,3x10⁻⁴; ZnSO₄ 6,2x10⁻⁴; MnSO₄, 1,0x10⁻⁵. O meio de cultivo foi esterilizado em autoclave a 1 atm por 20 min. Após resfriados, foram adicionados água destilada esterilizada e suspensão de esporos, correspondente a 1,00x10⁶ esporos por grama de meio úmido, para completar a massa desejada. A homogeneização inicial do meio de cultivo, antes da inoculação, foi realizada por revolvimento manual do leito em recipiente aberto no interior de câmara de

fluxo laminar esterilizada. O teor inicial de umidade, após o preparo do meio de cultivo, foi de aproximadamente 53% (m/m).

3.2.2 Condições experimentais dos cultivos

Foram estudadas sete condições de cultivo a fim de avaliar a funcionalidade do sistema com relação ao regime de agitação, controle da temperatura de cultivo e preenchimento do volume do tambor:

condição 01 – ausência de agitação do sistema; carga de 1.100 g de substrato úmido; temperatura do ambiente externo ao tambor de 30°C, nas primeiras 24 h de cultivo, e 25 °C, entre 24 e 96 h; aeração de 0,40 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30 °C; pressão interna de 270 mmHg;

condição 02 – agitação por 5 min, a cada 2 h, à frequência de 1 rpm; carga de 1.100 g de substrato úmido; temperatura do ambiente externo ao tambor de 30°C, nas primeiras 24 h de cultivo, e 25°C, entre 24 e 96 h; aeração de 0,40 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30°C; pressão interna de 270 mmHg;

condição 03 – agitação por 5 min, a cada 2 h, à frequência de 1 rpm; carga de 1.100 g de substrato úmido; temperatura do ambiente externo ao tambor de 30°C, nas primeiras 24 h de cultivo e aspersão de fluido refrigerante (água) na parede externa do tambor, à temperatura de 20°C, entre 24 e 96 h; aeração de 0,40 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30 °C; pressão interna de 270 mmHg;

condição 04 – agitação por 5 min, a cada 2 h, à frequência de 1 rpm; carga de 1.650 g de substrato úmido; temperatura do ambiente externo ao tambor de 30°C, nas primeiras 24 h de cultivo, e 25°C, entre 24 e 96 h; aeração de 0,60 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30 °C; pressão interna de 270 mmHg;

condição 05 – agitação por 5 min, a cada 2 horas, à frequência de 1 rpm; carga de 2.200 g de substrato úmido; temperatura do ambiente externo ao tambor de 30°C, nas primeiras 24 h de cultivo, e 25°C, entre 24 e 96 h; aeração de 0,80 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30°C; pressão interna de 270 mmHg;

condição 06 – agitação por 5 min, a cada 2 horas, à frequência de 1 rpm; carga de 1.100 g de substrato úmido; temperatura do ambiente externo ao tambor de 30°C, nas primeiras 24 h de cultivo, e 35°C, entre 24 e 96 h; aeração de 0,40 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30°C; pressão interna de 270 mmHg;

condição 07 – agitação por 5 min, a cada 2 horas, frequência de 1 rpm, nas primeiras 24 h de cultivo, e agitação durante 1h e 55 min, a cada 2 horas, a 1 rpm, entre 24 e 96 h; carga de 1.100 g de substrato úmido; temperatura do ambiente externo ao tambor de 30°C, nas primeiras 24 h de cultivo, e 25°C, entre 24 e 96 h; aeração de 0,80 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30°C; e pressão interna de 270 mmHg;

A Tabela 1 resume as principais diferenças entre cada condição de cultivo experimentada.

Tabela 1. Principais características das condições de cultivo testadas

Condição	Agitação	Temperatura externa	Massa de substrato
01	sem agitação	25 C°	1.100 g
02	5 min a cada 2 h	25 C°	1.100 g
03	5 min a cada 2 h	20 °C	1.100 g
04	5 min a cada 2 h	25 C°	1.650 g
05	5 min a cada 2 h	25 C°	2.200 g
06	5 min a cada 2 h	35 C°	1.100 g
07	1h 55 min a cada 2 h	25 C°	1.100 g

vazão de ar 30 °C - 0,36 L.Kg⁻¹.min⁻¹; frequência de agitação - 1 rpm; pressão interna do biorreator - 270 mm Hg; temperatura externa ao fermentador nas primeiras 24 h – 30 °C.

3.2.3 Amostragem

Amostras de meio de cultivo foram coletadas do biorreator, a cada 24 h, através de um orifício de 20 mm de diâmetro pela introdução de um tubo de vidro esterilizado. Todos os procedimentos de amostragem foram realizados assepticamente em câmara de fluxo laminar.

3.2.4 Demanda de oxigênio pelo cultivo

Para o cálculo da demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR), foi utilizado o método descrito por Schmidell *et al.* (2001). O fluxo de ar que entrou no sistema foi medido em L.h⁻¹, e convertido para mol.h⁻¹ através da Equação 1:

$$F_n = \frac{P.F_V}{R.T} \quad (1)$$

Onde:

F_n – vazão de ar em base molar (mol.h⁻¹);

P – pressão total do sistema (atm);
 F_V – vazão volumétrica de ar ($L \cdot h^{-1}$);
 R – constante dos gases ($0,082 \text{ atm} \cdot L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot K^{-1}$);
 T – temperatura (K).

A partir da fração de oxigênio no ar (y_{O_2} no ar = 0,209), foi calculada a vazão molar de O_2 na entrada do sistema com o auxílio da Equação 2:

$$F_{O_{2,e}} = F_n \cdot y_{O_{2,e}} \quad (2)$$

Onde:

$F_{O_{2,e}}$ – vazão em base molar de oxigênio na entrada do biorreator ($\text{mol} \cdot h^{-1}$);
 F_n – vazão de ar em base molar ($\text{mol} \cdot h^{-1}$);
 $y_{O_{2,e}}$ – fração de molar de oxigênio no ar.

Para o cultivo de *A. niger*, considerou-se que o quociente respiratório era igual a 1 e, assim, a vazão de ar na entrada do biorreator era igual à vazão de gás na sua saída. Como o suprimento de oxigênio no biorreator não foi limitado, admitiu-se também que todo o oxigênio consumido pelo microrganismo foi utilizado na via respiratória. Neste caso, o quociente respiratório foi igual a 1, ou seja, para cada 1 mol de O_2 consumido foi produzido 1 mol de CO_2 . Assim, para calcular a fração de O_2 na saída do biorreator, foi utilizada a Equação 3:

$$F_{O_{2,s}} = F_n \cdot y_{O_{2,s}} \quad (3)$$

Onde:

$F_{O_{2,s}}$ – vazão em base molar de oxigênio na saída do biorreator ($\text{mol} \cdot h^{-1}$);
 F_n – vazão de ar em base molar ($\text{mol} \cdot h^{-1}$);
 $y_{O_{2,s}}$ – fração de molar de oxigênio no gás na saída do biorreator.

A partir dos dados obtidos, calculou-se a demanda de oxigênio (OUR) pelo cultivo ao longo dos ensaios fermentativos, a partir da Equação 4:

$$OUR = \frac{F_{O_{2,e}} - F_{O_{2,s}}}{M} \cdot 1000 \quad (4)$$

Onde:

OUR – demanda de O_2 pelo cultivo ($\text{mmol} \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$);
 $F_{O_{2,e}}$ – vazão em base molar de oxigênio na entrada do biorreator ($\text{mol} \cdot h^{-1}$);
 $F_{O_{2,s}}$ – vazão em base molar de oxigênio na saída do biorreator ($\text{mol} \cdot h^{-1}$);

M – massa de meio seco no interior do biorreator (g).

3.2.5 Métodos Analíticos

3.2.5.1 Determinação indireta da concentração celular

A estimativa das concentrações celulares foi feita indiretamente a partir de dados obtidos por balanço de oxigênio, de acordo com o método proposto originalmente por Zabriskie & Humprey (1978) e adaptado para cultivos sólidos por Maiorano (1990). Esse método se baseia na correlação da concentração fúngica no meio sólido com a demanda de oxigênio pelo cultivo (OUR). Conforme Nagai (1979), OUR se relaciona com a velocidade instantânea de crescimento através da Equação 5:

$$OUR = \frac{1}{Y_{GO}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_o \cdot X \quad (5)$$

Onde:

OUR – demanda de O₂ pelo cultivo (mmol.g⁻¹.h⁻¹);

Y_{GO} – fator de conversão de oxigênio em células (g.mmol⁻¹);

dX/dt – velocidade instantânea de crescimento (g.g⁻¹.h⁻¹);

m_o – coeficiente de manutenção celular para o oxigênio (mmol.g⁻¹.h⁻¹);

X – concentração celular (g.g⁻¹).

A integração da Equação 5 pelo método dos trapézios resulta na Equação 6:

$$X_n = \frac{Y_{GO} \left(\frac{\Delta t}{2} \right) (OUR_n + OUR_{n-1}) + \left[1 - m_o \cdot Y_{GO} \left(\frac{\Delta t}{2} \right) \right] X_{n-1}}{1 + m_o \cdot Y_{GO} \left(\frac{\Delta t}{2} \right)} \quad (6)$$

Onde:

X_n – concentração celular no final do intervalo de tempo considerado (g.g⁻¹);

Y_{GO} – fator de conversão de oxigênio em células (g.mmol⁻¹);

Δt – intervalo de tempo entre duas medições (h);

OUR_n – demanda de O₂ no final do intervalo de tempo considerado (mmol.g⁻¹.h⁻¹);

OUR_{n-1} – demanda de O₂ no início do intervalo de tempo considerado (mmol.g⁻¹.h⁻¹);

m_0 – coeficiente de manutenção celular para o oxigênio ($\text{mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

X_{n-1} – concentração celular no início do intervalo de tempo considerado (g.g^{-1}).

Na estimativa do crescimento, cada ponto de análise de consumo foi utilizado, sendo que o primeiro valor da concentração celular foi considerado nulo. Na realização dos cálculos, foram utilizados os valores das constantes Y_{GO} ($0,0142 \text{ g.mmol}^{-1}$) e m_0 ($2,75 \text{ mmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) determinados por Fontana (2004) para *A. niger*.

3.2.5.2 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

A quantificação do teor de açúcares redutores totais foi realizada conforme método descrito por Malvessi (2000) e adaptado por Fontana (2004):

- em um tubo de ensaio, contendo uma alíquota de 0,7 g de massa úmida, foram adicionados 10 mL de solução de ácido sulfúrico 1,5M;
- o tubo contendo a amostra foi imerso em banho à temperatura de 100 °C durante 30 minutos, seguido de resfriamento em banho de gelo;
- o conteúdo do tubo de ensaio foi neutralizado com solução de hidróxido de sódio 4 M, tratado com agentes desproteinizantes (sulfato de cobre 300g.L^{-1} e ferrocianeto de potássio 150 g.L^{-1}), filtrado e o volume completado a 50 mL com água destilada.
- o filtrado foi diluído e analisado pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959), sendo as leituras de absorvância feitas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 545 nm;
- as concentrações de ART foram calculadas a partir de uma curva padrão com concentrações de glicose entre 0 e 1,0 g.L^{-1} .

3.2.5.3 Determinação do teor de umidade

Para este procedimento, 1 g de amostra de meio homogeneizado e macerado em graal foi submetido a secagem em estufa a 95°C até atingir peso constante, sendo então calculado o percentual de umidade presente na amostra (AOAC, 1998).

3.2.5.4 Determinação da atividade de endo-poligalacturonase

A determinação da atividade de endo-poligalacturonase foi realizada a partir da obtenção de extrato aquoso enzimático, de acordo com a seguinte metodologia: foram pesados 2,7 g de amostra, adicionados 15 mL de água pH 4,0 em frascos Erlenmeyer, submetidos a agitação recíproca de 200 rpm, por 30 min, a 30°C, em agitador de bancada Certomat.U (B. Braun Biotech), sendo em seguida o extrato enzimático bruto foi separado por filtração.

Após obtenção do extrato aquoso, foi adotado o seguinte procedimento para os ensaios enzimáticos (Maiorano, 1990):

- do extrato aquoso convenientemente diluído, foram retirados 3,2 mL sendo a estes adicionados 14,8 mL de solução de pectina cítrica 0,63% (m/v) em tampão acetato 0,05 M, pH 4,0;
- a mistura de reação foi colocada em banho a 30°C por 30 min;
- posteriormente, foi realizada a medida da viscosidade, a 60 rpm, em viscosímetro Brokfield modelo DV-II+ (EUA);
- para cada amostra foi feito um controle contendo extrato enzimático inativado em banho em ebulição por 30 min, e submetido ao mesmo tratamento;
- uma curva padrão foi construída avaliando-se diluições do extrato entre 2 e 100 vezes.

Com os valores da viscosidade das amostras, foi efetuado então o cálculo da redução de viscosidade conforme a Equação 7:

$$A = \frac{V_{a,i} - V_a}{V_{a,i}} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde:

A – redução da viscosidade (%);

$V_{a,i}$ – viscosidade da amostra inativada (cp);

V_a – viscosidade da amostra (cp).

Em seguida, foi construída uma curva correlacionando os valores de A com o logaritmo decimal do inverso das diferentes diluições. Uma unidade de endo-PG foi definida como a quantidade de enzima que reduz em 50% a viscosidade da solução de pectina cítrica,

nas condições de análise, sendo o número de unidades enzimáticas presentes em cada diluição calculados de forma proporcional.

Com estes dados, foi feita uma nova curva, correlacionando valores de “A” com o do logaritmo decimal do número de unidades presentes em 3,2 mL de extrato aquoso com diferentes diluições. Para o trecho linear desta curva, foram então calculados os coeficientes angular e linear da equação da reta. A atividade de endo-PG foi determinada pela Equação 8:

$$P_{endo} = \frac{10^{(A-a/b)} \cdot dil}{v} \cdot fc \quad (8)$$

P_{endo} – atividade enzimática de endo-PG ($U \cdot g^{-1}$);

a e b – coeficientes da curva de calibração;

dil – diluição da preparação enzimática após a extração;

fc – fator de correção na extração ($mL \cdot g^{-1}$);

v – volume da preparação enzimática utilizada na análise (mL).

3.2.6 Cálculo dos fatores de conversão e produtividade do processo

Os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e em produto ($Y_{P/S}$) foram calculados levando-se em consideração os valores iniciais e finais de biomassa e produto (enzima) sobre o valor de substrato consumido, utilizando as Equações 9 e 10, respectivamente.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (9)$$

Onde:

$Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato consumido em células ($g \cdot g^{-1}$);

X_f – máxima concentração celular alcançada ($g \cdot g^{-1}$);

X_i – concentração celular inicial ($g \cdot g^{-1}$);

S_i – concentração inicial de açúcares redutores totais ($g \cdot g^{-1}$);

S_f – concentração de açúcares redutores totais no tempo de máxima concentração celular ($g \cdot g^{-1}$);

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (10)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato consumido em atividade enzimática de endopoligalacturonase ($U \cdot g^{-1}$);

P_f – máxima atividade enzimática alcançada ($U \cdot g^{-1}$);

P_i – atividade enzimática no início do processo ($U \cdot g^{-1}$);

S_i – concentração inicial de açúcares redutores totais ($g \cdot g^{-1}$);

S_f – concentração de açúcares redutores totais no tempo de máxima atividade enzimática ($g \cdot g^{-1}$);

A produtividade do processo foi calculada utilizando os valores máximos de atividade enzimática e o tempo de processo no qual os mesmos foram estimados, com a Equação 11.

$$p_{enzimas} = \frac{P_f - P_i}{t} \quad (11)$$

Onde:

$p_{enzimas}$ – produtividade em endopoligalacturonase ($U \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$);

P_f – máxima atividade enzimática alcançada ($U \cdot g^{-1}$);

P_i – atividade enzimática no início do processo ($U \cdot g^{-1}$);

t – tempo de obtenção da máxima atividade enzimática (h).

Foi estimada a quantidade enzimática total de cada cultivo, relacionando a atividade enzimática, a umidade e a carga de cada cultivo, utilizando a Equação 12.

$$T_{enzimas} = P_f \cdot M \quad (12)$$

Onde:

$T_{enzimas}$ – quantidade enzimática total do cultivo (U);

P_f – máxima atividade enzimática alcançada ($U \cdot g^{-1}$);

M – massa de meio seco no interior do biorreator (g).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são primeiramente abordados aspectos referentes à construção do biorreator de tambor rotativo em escala de bancada, incluindo-se melhorias e adaptações feitas no projeto inicial e, ainda, uma análise preliminar do desempenho do protótipo em cultivos do fungo filamentosso *Aspergillus niger*. Na sequência, são apresentados e discutidos, os cultivos de *A. niger*, neste biorreator com relação a influência da agitação, da temperatura e da massa de meio sólido sobre o crescimento microbiano, o consumo de substrato e a formação da enzima endo-poligalacturonase (endo-PG).

4.1 Biorreator de tambor rotativo

4.1.1 Construção do tambor rotativo e do sistema de agitação

Vidro refratário foi o material escolhido para a construção do casco do biorreator por permitir a visualização do meio e as alterações morfológicas ocorridas ao longo de um processo fermentativo, sendo este um diferencial do sistema desenvolvido em relação a reatores do mesmo tipo descritos na literatura, construídos, em geral, de aço inoxidável (Reu *et al.*, 1993; Kalogeris *et al.*, 1999).

O fato de o casco do reator ser construído em vidro limitou as opções com respeito ao diâmetro externo, que foi definido, em 140 mm, limite máximo para a manipulação na oficina de vidros da UCS. O diâmetro de 140 mm se aproxima dos utilizados por Kalogeris *et al.* (1999), 150 mm, Domínguez *et al.* (2001) e Gasiorek (2008), 155 mm. Com respeito ao comprimento do tambor, foi definida a medida de 400 mm a fim de permitir o uso de, pelo menos 1.000 g de meio sólido por cultivo, considerando a ocupação de cerca de 30% da capacidade do tambor.

As tampas do biorreator foram construídas em poliamida, em função da facilidade de usinagem e resistência à temperatura de esterilização em autoclave (cerca de 120°C). O fechamento do casco do biorreator foi feito com o auxílio de quatro hastes de aço inoxidável e a vedação com anéis tipo *O-ring*. A Figura 8 representa o esquema de montagem do tambor (Figura 8 – 1), com as tampas, (Figura 8 – 2) as hastes (Figura 8 – 3), e algumas das principais dimensões em mm.

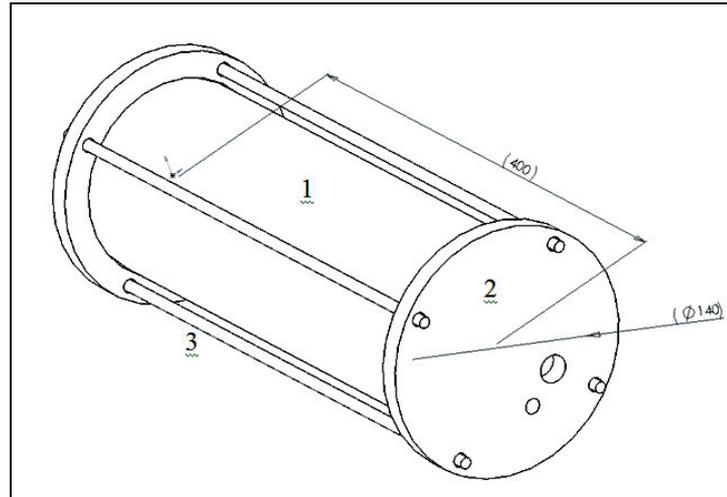


Figura 8. Desenho da montagem do casco do biorreator. 1 – tambor; 2 – tampas; 3 – hastes.

A Figura 9a apresenta o projeto da tampa de entrada de ar, com suas principais dimensões em mm. As duas tampas do biorreator possuem as mesmas dimensões principais e um orifício central que permite a fixação de duas válvulas do tipo “engate rápido” (Figura 9a–1). O que diferencia a tampa da entrada do fluxo gasoso da tampa da saída é a existência de dois orifícios, um para a passagem dos sensores de temperatura (Figura 9a–2) e outro para retirada de amostras do meio de cultivo (Figura 9a – 3). Uma fotografia da tampa de entrada, com o anel de vedação e a tampa de alumínio do orifício de amostragem pode ser visualizada na Figura 9b.

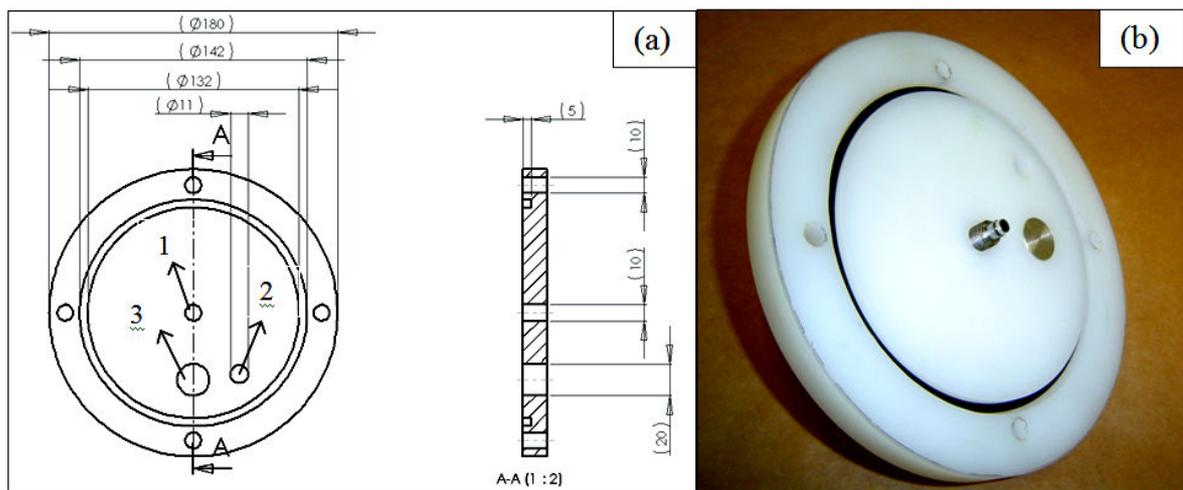


Figura 9. Projeto e construção das tampas do biorreator. a – Desenho da tampa de entrada de ar no biorreator, com representação do orifício para injeção de gás (1), passagem de sensores de temperatura (2) e retirada de amostras (3); b – fotografia da mesma tampa, com o anel de vedação, a válvula do tipo “engate rápido” e tampa de alumínio do orifício para retirada de amostras.

Para promover a agitação, o tambor foi apoiado sobre um suporte dotado de dois eixos providos de roletes que se encaixam nas bordas das tampas (Figura 10a). As chicanas internas do biorreator foram construídas em aço inoxidável e acompanham o movimento de rotação do casco. As chicanas têm a função de auxiliar no revolvimento do substrato sólido durante a agitação do sistema. O desenho que serviu de guia para a sua construção pode ser observado na Figura 10b.

Duas polias dentadas de diferentes diâmetros unidas por uma correia (Figura 10c) são responsáveis pela transmissão de torque de um motor de corrente contínua de 12 V que, alimentado por uma fonte com tensão variável (Figura 10d), possibilita o ajuste da rotação em valores entre 0,5 e 4 rpm. Nos primeiros ensaios preliminares, foi observado efeito negativo da agitação contínua a 4 rpm sobre o crescimento microbiano, que aliado ao incrementando do teor de umidade do substrato, conduz à compactação do meio de cultivo e, conseqüente aumento da aderência do farelo de trigo às paredes e chicanas do equipamento. O uso de agitação intermitente, proporcionada pela inserção de um *timer* na fonte de alimentação, permitindo ligar e desligar a agitação do biorreator até 12 vezes a cada dia, 7 dias por semana. Nagel *et al.* (2000) observaram que a rotação do tambor rotativo deveria ser variável para facilitar o controle da temperatura em diferentes fases do processo fermentativo. Adicionalmente, a agitação intermitente, além de reduzir danos à estrutura celular do microrganismo, diminui o gasto energético do sistema (Reu *et al.*, 1993; Kalogeris *et al.*, 2003).

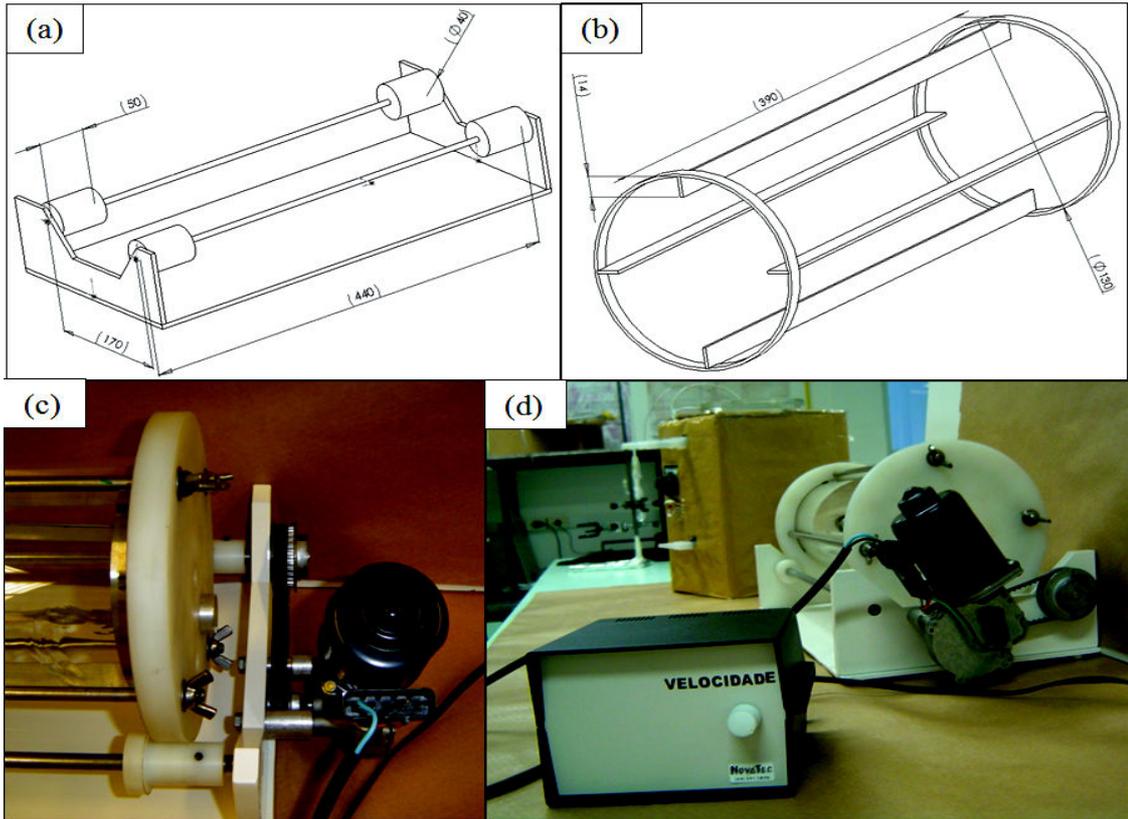


Figura 10. Detalhes construtivos do sistema de agitação do biorreator de tambor rotativo. a – Desenho do suporte do casco do biorreator de tambor rotativo com roletas para agitação do biorreator; b – desenho das chicanas internas do biorreator com suas principais dimensões, em mm; c – motor de corrente contínua e polias de transmissão; d – fonte de alimentação, com voltagem variável.

A Figura 11 é uma fotografia do tambor rotativo montado com as tampas, chicanas e hastes de fixação sobre o sistema de agitação, com o motor de corrente contínua, as polias transmissoras de movimento e roletas.



Figura 11. Montagem do casco do biorreator de tambor rotativo sobre o sistema de agitação.

Em ensaios preliminares verificou-se um aumento na temperatura externa do motor do sistema de agitação do biorreator que poderia reduzir-lhe a vida útil se operado continuamente por mais de duas horas, por isso foi instalado um *cooler* para refrigeração da carcaça do motor, como pode ser visualizado na Figura 12



Figura 12. Motor do sistema de agitação do biorreator de tambor rotativo. (1) *cooler*.

4.1.2 Umidificação e aquecimento do fluxo gasoso

Para a umidificação do ar foi construída uma coluna em vidro, de 55 mm de diâmetro e 500 mm de comprimento, recheada com anéis de Raschig, com 10 mm de diâmetro por 15 mm de comprimento. A Figura 13a ilustra a coluna e o recheio da mesma está destacado na Figura 13b.

A passagem de ar pelo substrato de fermentação em estado sólido é essencial para garantir o suprimento de oxigênio ao microrganismo e remover gases e calor gerados durante o crescimento microbiano (Ashley *et al.*, 1999). O ar deve ser saturado em umidade para evitar perda de água do meio de cultivo por evaporação e estar na temperatura de crescimento adequada ao microrganismo, para prevenir gradientes térmicos dentro do biorreator ou variações de temperatura durante os cultivos (Fujian *et al.*, 2002).



Figura 13. Aparato utilizado para umidificação do ar injetado no biorreator. a – Coluna umidificadora; b – anéis de Raschig.

Após a umidificação, o ar deve ser aquecido até a temperatura de cultivo para então ser injetado no biorreator. Inicialmente, o projeto previa a manutenção da temperatura do ar através de um banho termostatzado com temperatura constante, mas os resultados dos ensaios preliminares indicaram oscilações na temperatura de entrada do ar. A solução encontrada foi a inserção do sensor do termostato na entrada do biorreator. Na entrada do banho, o fluxo divide-se em dois, ascendendo por duas serpentinas de dezessete espirais com raio médio de 65 mm cada, unindo-se em saída única. O tubo de vidro possui um diâmetro interno de 6 mm. O banho de aquecimento do ar umidificado que entra no biorreator está representado na Figura 14, onde pode-se ver também o termostato digital (Figura 14 – 1) que controla a temperatura do banho onde estão imersas as serpentinas e a conexão em forma de “T” (Figura 14 – 2), onde está instalado o termopar que permite a medição da temperatura do ar.



Figura 14. Banho termostático utilizado para aquecimento do ar injetado no biorreator. (1) termostato que regula a temperatura do banho; (2) conexão em “T” para inserção do termopar.

4.1.3 Estimativa indireta da concentração de biomassa

Neste trabalho a determinação da biomassa foi baseada no consumo de oxigênio pela população microbiana no biorreator.

Para a medida do consumo de oxigênio presente na fase gasosa do reator, foi testada inicialmente a interrupção do fluxo de ar e recirculação da fase gasosa presente no interior do tambor rotativo com uma bomba peristáltica, de forma semelhante à utilizada por Maiorano (1990) e Fontana (2004). Observou-se que a vazão máxima da bomba peristáltica utilizada foi insuficiente para homogeneizar o conteúdo gasoso do circuito. Desta forma, a medida da fração de oxigênio de todos os cultivos foi realizada sem interrupção da aeração, como descrito a seguir.

Após atravessar o biorreator, o ar passa por um *trap* que remove o excesso de água incorporada ao gás e em seguida por uma coluna recheada de sílica para a absorção da umidade residual. No topo desta coluna foi acoplado o eletrodo do oxímetro, que quantifica a fração molar de O_2 da corrente gasosa. Este valor foi utilizado para a estimativa indireta da concentração microbiana ao longo do cultivo. A Figura 15 ilustra a coluna de sílica (Figura 15 – 1) com o eletrodo do oxímetro na sua parte superior (Figura 15 – 2).

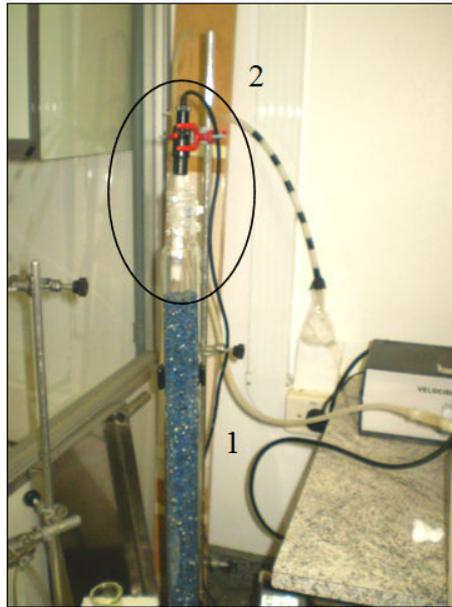


Figura 15. Sistema para remoção da umidade residual do fluxo gasoso. (1) Coluna recheada (2) eletrodo de oxigênio.

4.1.4 Dispersão do fluxo gasoso no interior do biorreator

A forma de dispersão do gás no interior do tambor rotativo é importante para prevenir gradientes de concentrações durante o cultivo e também para permitir maior homogeneidade e auxiliar na remoção de calor. Por isso foram testados, em cultivos preliminares de *A. niger*, sem agitação, três diferentes tipos de difusores de ar.

O primeiro difusor testado era composto por um único ponto de injeção (Figura 16a) localizado no centro da tampa do biorreator. Após 96 horas de cultivo de *A. niger* era visível uma faixa central na superfície do meio de cultivo com coloração diferente do restante, denunciando uma imperfeita distribuição do ar pelo tambor.

O segundo difusor tinha formato de “T”; com perfurações que forçavam a saída do ar em direção perpendicular ao eixo central do biorreator (Figura 16b). Esses orifícios estavam localizados no sentido radial do tambor, de modo a injetar o ar em direção contrária ao substrato quando não há agitação. Este sistema foi utilizado nos ensaios, construído com tubos de 10 mm de diâmetro e 50 mm de comprimento;

Um terceiro tipo de difusor era constituído por um tubo perfurado localizado no centro do casco do biorreator (Figura 16c). Este dispositivo foi descartado, por apresentar um excesso de condensação de água ao longo do tubo.

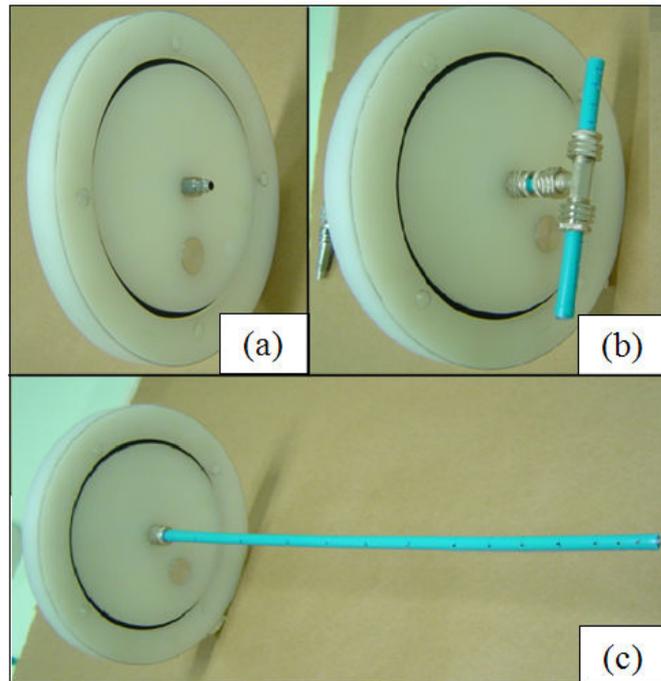


Figura 16. Diferentes configurações de aeradores testadas. a – único ponto de injeção; b – difusor em “T”; c – tubo perfurado central.

4.1.5 Coleta de amostras

Em biorreatores com o casco metálico, a retirada de amostras é normalmente realizada através de janelas de inspeção instaladas na lateral do equipamento (Reu *et al.*, 1993; Kalogeris *et al.*, 1999). No reator descrito neste trabalho, a retirada de amostras foi realizada a partir de um orifício localizado em uma das tampas do biorreator, como no equipamento descrito por Domínguez *et al.*. (2001). O equipamento utilizado para coleta de amostras, composto por um tubo de vidro de 20 mm de diâmetro externo, 16 mm de diâmetro interno e 200 mm de comprimento e um êmbolo de alumínio, foi considerado eficiente para a retirada de pequenas quantidades de substrato do interior do biorreator. Em cada coleta, a massa de substrato úmido retirada do biorreator foi de aproximadamente 15 g. O êmbolo com ponta cônica, encaixado no interior do tubo de vidro permitia retirar amostras a qualquer distância da tampa do biorreator. Na Figura 17, são apresentados os desenhos do tubo (Figura 17 – 1) e do êmbolo (Figura 17 – 2), com suas dimensões em mm.

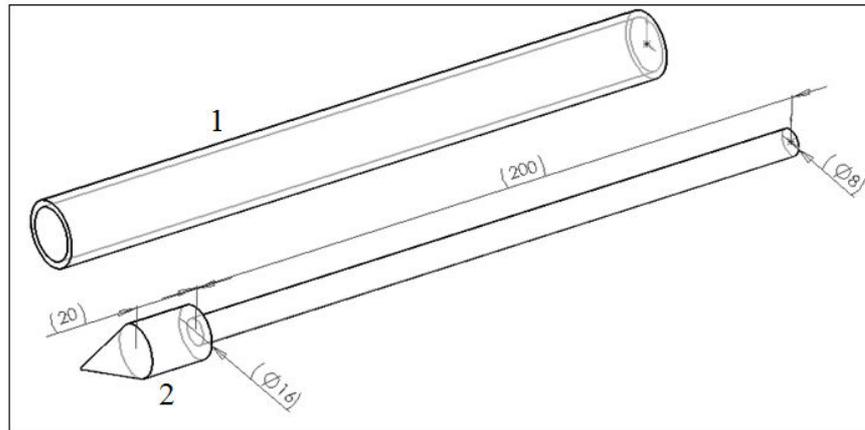


Figura 17. Equipamento para coleta de amostras de substrato do interior do biorreator durante cultivo de *Aspergillus niger*. (1) Tubo de vidro; (2) hasta com êmbolo de alumínio.

4.1.6 Monitoramento e controle da temperatura interna do biorreator

Nos ensaios fermentativos preliminares para o ajuste do sistema de acompanhamento da temperatura interna do tambor, as medidas de temperatura foram realizadas em cultivos com o biorreator estático, com termopares do tipo PT 100 com 4 mm de diâmetro e 15 mm de comprimento, conectados a um termostato digital marca INOVA modelo INV 9606. A determinação da temperatura da porção gasosa no biorreator foi feita por apenas um sensor, havendo a necessidade de estabelecer o número e a posição dos termopares para monitorar a temperatura no interior do meio de cultivo.

Para definir o melhor ponto de fixação do termopar para o monitoramento da temperatura do meio cultivo, foi realizado um ensaio com 1.100 g de substrato sólido, temperatura externa de 25 °C, fluxo de 0,40 L.min⁻¹ de ar umidificado, a 30°C, e pressão interna de 270 mmHg. Neste ensaio, foram instalados termopares em três diferentes posições no meio sólido: T1, fixado na chicana a 5 cm da tampa de injeção de ar; T2, fixado a meia distância entre as duas tampas; T3, fixado a 5 cm da tampa de saída do ar. Na Figura 18, é mostrada a representação gráfica da evolução dos perfis de temperatura lidos pelos três termopares nesta condição.

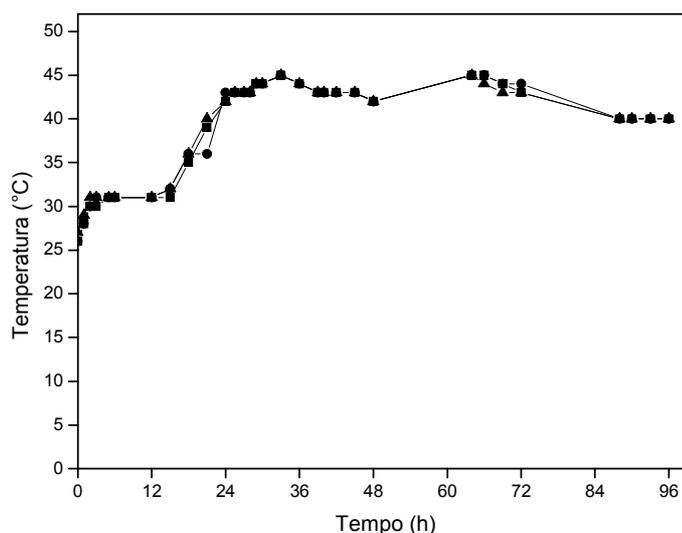


Figura 18. Temperaturas medidas por termopares (T1, T2 e T3) instalados no interior do meio de cultivo de *A. niger* com 1.100 g de substrato sólido, temperatura externa de 25 °C, fluxo de 0,40 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30 °C e pressão interna de 270 mmHg para T1 – fixado na chicana inferior a 5 cm da tampa de injeção de ar (■), T2– fixado na chicana inferior a meia distância entre as duas tampas (●) e T3 – fixado na chicana inferior a 5 cm da tampa de saída de ar (▲).

A variação da temperatura do meio de cultivo ao longo do eixo central do biorreator foi semelhante nas três posições testadas, indicando a instalação de apenas um sensor no interior do meio de cultivo, que foi fixado a meia distância das duas tampas do tambor.

Nos ensaios fermentativos preliminares, foi observado que a variação da temperatura do ambiente no qual se encontrava o biorreator afetava significativamente a temperatura do meio de cultivo, demonstrando que este controle não poderia ser realizado unicamente pelo fluxo de ar que atravessava o sistema e tornando evidente a necessidade de um sistema mais eficiente para este fim. Visto, como já relatado, que o casco do reator foi construído com um tubo de vidro com o maior diâmetro manipulável na vidraria da UCS, a construção de uma camisa externa de refrigeração para o controle da temperatura, recurso normalmente utilizado em biorreatores de tambor agitado (Nagel *et al.*, 2000; Rutsatz, 2006), tornou-se inviável. Deste modo, para o controle da temperatura interna do tambor rotativo, foi montado um sistema de aquecimento e arrefecimento da sua superfície externa, que consistia de uma câmara termostatizada com circulação de ar aquecido e o arrefecimento pela aplicação de uma lâmina de fluido refrigerante (água) através de dispersores posicionados na parte superior do casco de vidro. Maiores detalhes acerca deste sistema constam no Anexo A. A Figura 19 representa de forma simplificada o modo de funcionamento do sistema, com os seguintes

componentes: termostato (1); termopar (2); resistência para aquecimento do ar (3); reservatório e bomba do fluido refrigerante (4); dispersores do fluido refrigerante (5); recirculação do fluido refrigerante (6).

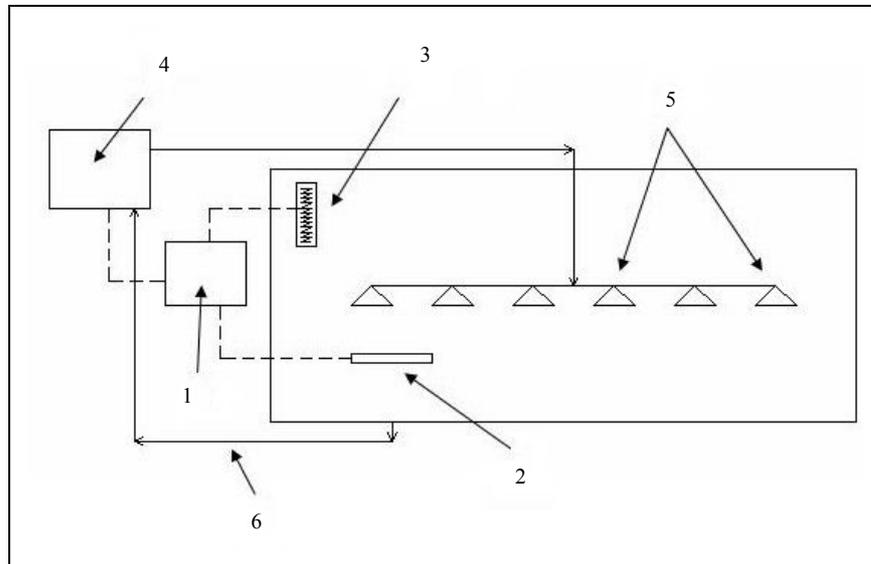


Figura 19. Desenho esquemático do sistema de controle de temperatura. (1) termostato; (2) termopar; (3) resistência para aquecimento do ar; (4) reservatório e bomba do fluido refrigerante; (5) dispersores do fluido refrigerante; (6) recirculação do fluido refrigerante.

Alguns componentes do sistema de manutenção da temperatura interna do biorreator aparecem na Figura 20, como a câmara termostaticada para aquecimento do ar por recirculação de ar quente (Figura 20a) e o dispersor do fluido refrigerante (Figura 20b).

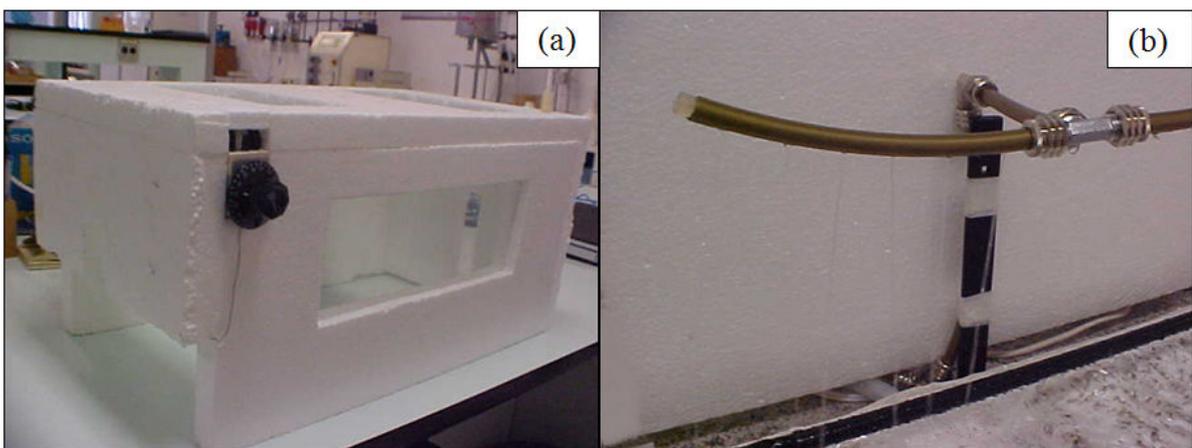


Figura 20. Sistema de aquecimento e refrigeração do biorreator de tambor rotativo. a – câmara termostaticada, com sistema de aquecimento por circulação de ar aquecido; b – dispersor de fluido refrigerante.

4.1.7 Verificação da homogeneidade do meio de cultivo

A eficácia do sistema de mistura do biorreator foi verificada com a retirada de amostras parciais e totais de cultivos de *A. niger*, realizados nas condições 02 (agitação por 5 min, a cada 2 h, à frequência de 1 rpm; carga de 1.100 g de substrato úmido; temperatura do ambiente externo ao tambor de 30°C, nas primeiras 24 h de cultivo, e 25°C, entre 24 e 96 h; aeração de 0,40 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30°C; pressão interna de 270 mmHg) e 03 (agitação por 5 min, a cada 2 h, à frequência de 1 rpm; carga de 1.100 g de substrato úmido; temperatura do ambiente externo ao tambor de 30°C, nas primeiras 24 h de cultivo e aspersão de água na parede externa do tambor, à temperatura de 20°C, entre 24 e 96 h; aeração de 0,40 L.min⁻¹ de ar umidificado a 30 °C; pressão interna de 270 mmHg).

As amostras parciais foram extraídas com o sistema de amostragem e as amostras totais são resultado da maceração do conteúdo total do biorreator ao final de 96 h de processo. As atividades de endo-PG das amostras retiradas com o sistema de amostragem foram de 80,6 e 46,4 U.g⁻¹, para as condições de cultivo 02 e 03, respectivamente. Quando comparadas com os valores de atividade estimados a partir da homogeneização da massa total de substrato ao final da fermentação, que foram de 79,2 U.g⁻¹ e 44,2 U.g⁻¹, para as condições de cultivo 02 e 03, respectivamente, pode-se admitir que o sistema de amostragem permite uma aproximação do valor médio dos parâmetros do cultivo e também que a eficiência do regime de agitação proporciona homogeneidade ao meio.

4.1.8 Montagem final do sistema de tambor rotativo

A Figura 21 ilustra a montagem final do sistema de tambor rotativo utilizado nos cultivos de *A. niger* em estado sólido. As setas indicam o sentido do fluxo gasoso (Figura 21–1) que, inicialmente, passa por uma válvula (Figura 21–2) e, em seguida, por um filtro de algodão hidrófobo para esterilização do ar. Um manômetro (Figura 21–3) impede a oscilação da pressão na linha de ar comprimido e um fluxímetro do tipo rotâmetro (Figura 21–5), calibrado por dispositivo de coluna de bolhas, regula a vazão de ar que é injetado no biorreator. Na Figura 21–6, pode-se ver a coluna recheada com anéis de Raschig para umidificação do ar e, na sequência (Figura 21 – 7) o banho termostático para aquecimento do ar, controlado por um termostato (Figura 21 – 9) cujo sensor está inserido na entrada do biorreator (Figura 21 – 8).

O biorreator de tambor rotativo (Figura 21–10) possui um motor de corrente contínua (Figura 21–14) com velocidade de rotação variável. Um segundo fluxímetro, ligado em série com o *trap* para remoção do excesso de umidade, permite o ajuste da pressão interna do biorreator, que é constantemente monitorada por um manômetro de mercúrio. A coluna de vidro recheada com sílica (Figura 21–11) remove a umidade residual da corrente gasosa, cujo teor de oxigênio é quantificado pelo oxímetro (Figura 21–13).

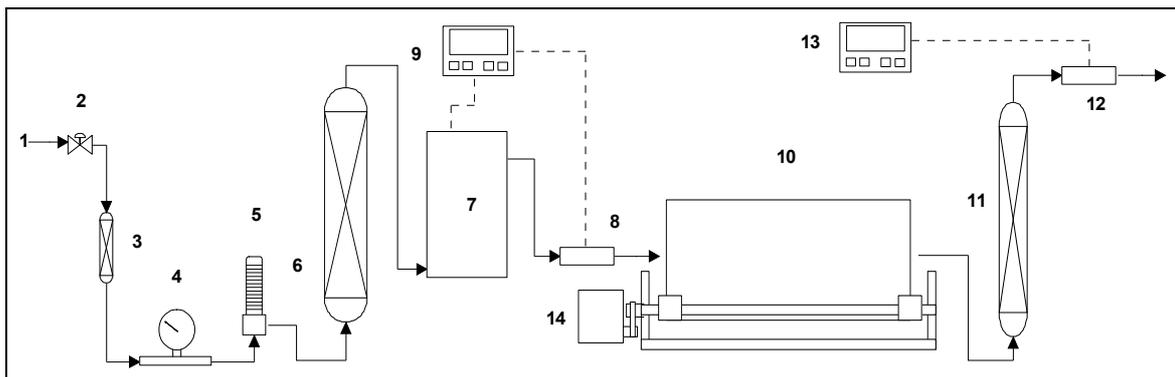


Figura 21. Esquema completo do sistema de tambor rotativo para cultivos sólido. (1) linha de ar comprimido; (2) válvula; (3) filtro; (4) manômetro; (5) fluxímetro; (6) coluna de umidificação do ar; (7) aquecimento do ar; (8) sensor de temperatura; (9) termostato; (10) biorreator de tambor rotativo; (11) coluna recheada com sílica para remoção de umidade; (12) sensor de fração de oxigênio; (13) oxímetro; (14) motor de corrente contínua com velocidade variável.

4.2 Cultivos de *Aspergillus niger* no sistema de tambor rotativo desenvolvido

4.2.1 Efeito da agitação sobre o cultivo de *Aspergillus niger*

Para avaliar o efeito da agitação sobre o cultivo de *A. niger* no sistema de tambor rotativo construído, foram comparadas três condições: 01 – sem agitação; 02 – agitação por 5 minutos a cada 2 horas; 07 – agitação contínua por 1 hora e 55 minutos, a cada 2 horas.

Na Figura 22, são apresentados os perfis cinéticos de crescimento de *A. niger* dos cultivos e na Figura 23 os valores de temperatura do meio de cultivo medidas nas três condições.

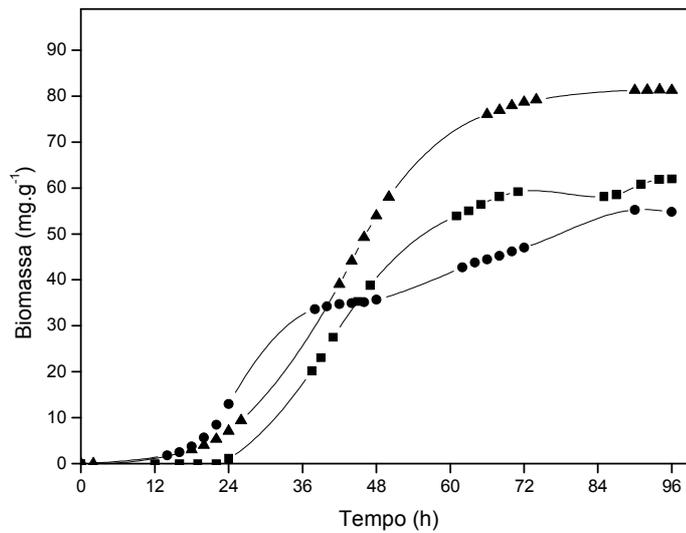


Figura 22. Variação da concentração de biomassa estimada em função do tempo em cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo nas condições: 01 – sem agitação (■); 02 – agitação por 5 minutos a cada 2 horas (▲); 07 – agitação contínua por 1 hora e 55 minutos a cada 2 horas (●).

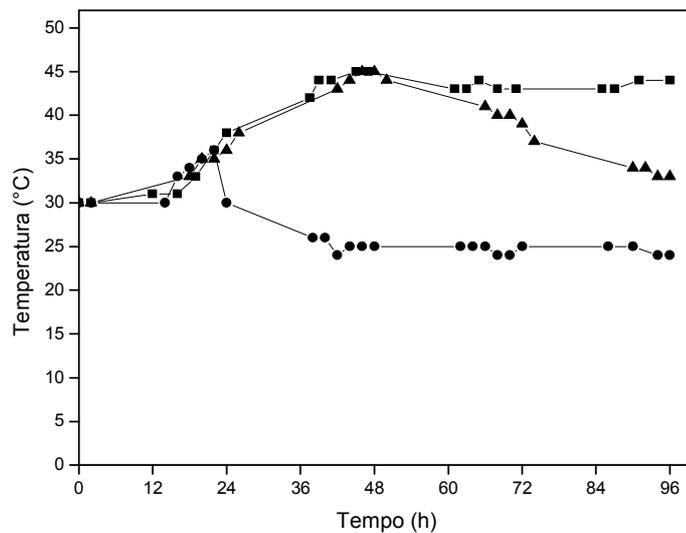


Figura 23. Temperaturas medidas em função do tempo no interior do meio de cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo nas condições: 01 – sem agitação (■); 02 – agitação por 5 minutos a cada 2 horas (▲); 07 – agitação contínua por 1 hora e 55 minutos, a cada 2 horas (●).

As maiores concentrações celulares finais foram estimadas na condição de cultivo 02, com agitação por 5 minutos a cada duas horas, em torno de 81 mg.g^{-1} . Na condição de cultivo 01 (ausência de agitação) foi observado o menor crescimento microbiano (62 mg.g^{-1}) ocasionado, provavelmente, pela dificuldade de transporte de oxigênio ao interior do meio de cultivo. Na condição 07 (agitação contínua), o crescimento estimado foi inferior em relação às

3 condições testadas, cerca de 55 mg.g^{-1} , devendo-se tal comportamento, possivelmente, à ruptura do micélio fúngico provocada pela agitação constante.

O pico de temperatura do meio de cultivo na condição de cultivo 02 foi de 45°C , em 48 h de cultivo, no período de fase exponencial de crescimento (Figuras 22 e 23), seguido de um gradual decréscimo da temperatura. Na condição de cultivo 01, a alta temperatura se manteve mesmo após redução da atividade microbiana, provavelmente devido à ausência de agitação do sistema, o que dificultou a remoção do calor no interior do meio de cultivo. Como descrito por Mitchell *et al.* (2006), os maiores valores de temperatura medidos no interior do meio de cultivo, da ordem de 45°C , coincidem com a fase exponencial de crescimento do microrganismo. Na condição de cultivo 07, em que foi utilizada a agitação contínua, foi observada elevação da temperatura enquanto a temperatura externa ao reator foi mantida em 25°C pela câmara termostaticada. Após as 24 horas iniciais, a temperatura medida foi semelhante à externa (25°C), constatando-se que os sistemas de agitação e de aeração proporcionaram a remoção calor. Esta aparente eficiência do controle de temperatura deve ser, em grande parte, creditada ao menor crescimento na condição 07 que levou a uma menor geração de calor.

Os resultados da variação do teor de umidade, concentração de ART e atividade de endo-PG são apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2. Variação da umidade no cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo

Tempo (h)	Umidade (%)		
	01	02	07
0	52	52	52
24	nd*	54	54
48	nd*	59	58
72	nd*	61	56
96	46	67	56

*n.d. = não determinado.

Condições: 01 – sem agitação; 02 – agitação por 5 minutos a cada 2 horas; 07 – agitação contínua por 1 hora e 55 minutos a cada 2 horas.

Tabela 3. Variação da concentração de ART no cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo.

Tempo (h)	Açúcares redutores totais (g.g ⁻¹)		
	01	02	07
0	0,61	0,62	0,62
24	nd*	0,53	0,59
48	nd*	0,49	0,51
72	nd*	0,35	0,50
96	0,33	0,21	0,50

*n.d. = não determinado.

Condições: 01 – sem agitação; 02 – agitação por 5 minutos a cada 2 horas; 07 – agitação contínua por 1 hora e 55 minutos a cada 2 horas.

Tabela 4. Variação da atividade de endo-PG no cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo.

Tempo (h)	Endo-PG (U.g ⁻¹)		
	01	02	07
0	0	0	0
24	nd*	6,1	4,3
48	nd*	36,8	13,5
72	nd*	47,8	14,6
96	79,2	80,6	16,3

*n.d. = não determinado.

Condições: 01 – sem agitação; 02 – agitação por 5 minutos a cada 2 horas; 07 – agitação contínua por 1 hora e 55 minutos a cada 2 horas.

Para a condição de cultivo 01, não foi possível a retirada de amostras diárias, devido à impossibilidade de obtenção de amostras homogêneas. Esta condição foi a única em que o teor de umidade do meio de cultivo diminuiu no decorrer do processo, de 53% de umidade inicial para 46%, em 96 horas de cultivo, fenômeno também observado por Nagel *et al.*(2000). Na ausência de agitação, a remoção do calor se dá pela evaporação da água do substrato sólido, enquanto que nos sistemas agitados o calor é liberado dos interstícios por convecção, mantendo e até incorporando umidade do fluxo gasoso (Mitchell *et al.*, 2006). Para as condições 02 e 07, os teores de umidade medidos apresentaram acréscimo no decorrer do cultivo, sendo de 67 e 56%, respectivamente, após 96 horas (Tabela 2).

O maior consumo de substrato medido foi na condição 02 (0,41 g.g⁻¹ em 96 horas de cultivo) e o menor na condição 07 (0,12 g.g⁻¹), acompanhando os respectivos resultados em termos de crescimento celular (Tabela 3 e Figura 22).

No que diz respeito à atividade de endo-PG, valores semelhantes de atividade enzimática foram calculados para as condições 01 e 02 – 79,2 U.g⁻¹ e 80,6 U.g⁻¹, respectivamente – não se observando, no caso, qualquer influência da agitação. Pode-se dizer que a condição 01 se assemelha a um cultivo em bandeja, como o descrito por Fontana *et al.* (2005), cujo custo de montagem e operação é evidentemente mais baixo que o de um sistema de tambor rotativo. Na condição 07, a atividade enzimática medida foi de apenas 16,3 U.g⁻¹, esta baixa atividade podendo ser explicada pelo baixo crescimento celular e consequente reduzido consumo de substrato.

A Figura 24 ilustra o aspecto do meio de cultivo no início (Figura 24a) e ao final de 96 horas de cultivo estático (Figura 24b) e agitado (Figura 24c). No final do cultivo estático, foi observada a formação de um bloco único, com plena colonização no interior e intensa esporulação nas áreas de maior contato com o fluxo gasoso. Nos cultivos agitados, em todas as condições testadas, foi observada a formação de grumos de meio de cultivo, de tamanhos variados, com as mesmas características de esporulação externa e colonização no interior do grumo, semelhante à condição de cultivo 01, conforme detalhado na Figura 24d.

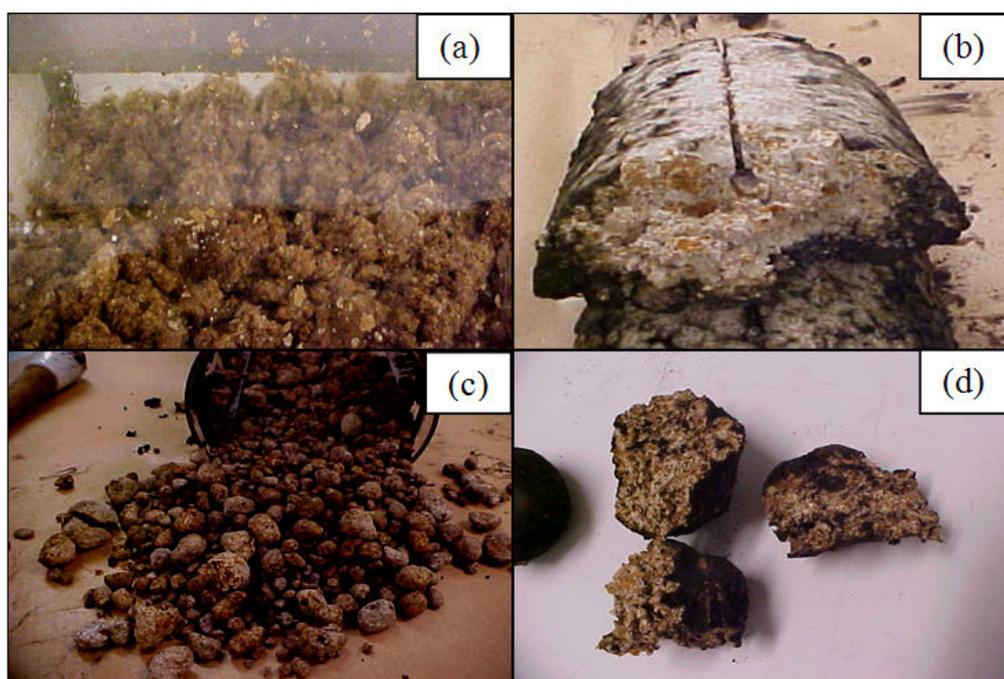


Figura 24. Aspecto do meio de cultivo utilizado para fermentação em estado sólido em biorreator de tambor rotativo no período inicial (a) e ao final de 96 horas de cultivo para as condições 01 – sem agitação (b), 02 – agitação por 5 minutos a cada 2 horas (c) e detalhe da composição dos grumos nos sistemas agitados (d).

4.2.2 Efeito da massa de substrato sobre o cultivo de *Aspergillus niger*

Na comparação entre reatores estáticos e agitados para processo em estado sólido, devem ser levados em consideração vários fatores, como, por exemplo, a operacionalidade de cada sistema em função da escala de produção. No entanto, reduzindo-se a questão apenas à obtenção de endo-PG, conforme descrito para as condições 01 e 02, não se observou vantagem no uso do tambor rotativo frente ao sistema estático, que funcionou como um reator de bandeja. Um sistema de bandejas, por outro lado, apresenta como limitação a deficiente transferência de calor e massa quando maiores espessuras do leito de meio de cultivo são utilizadas (Fontana, 2004). Neste caso, o uso do sistema agitado poderia ser vantajoso, prevendo-se a possibilidade de produzir-se uma maior quantidade de produto por área ocupada pelo reator.

Para avaliar o efeito da fração do volume do reator ocupada com meio sólido sobre o cultivo de *A. niger*, foram comparadas três condições de preenchimento do tambor rotativo: condição 02 – 1.100 g de substrato úmido, correspondendo a 30% de ocupação do volume interno do tambor, semelhante ao utilizado por Schutyser *et al.* (2003) e por Gasiorek (2008); condição 04 – 1.650 g de substrato úmido, correspondendo a 45% de ocupação do volume interno do tambor; condição 05 – 2.200 g de substrato úmido, correspondendo a 60% de ocupação do volume interno do tambor.

Na Figura 25, são apresentados os perfis cinéticos de crescimento de *A. niger* e na Figura 26 os valores da temperatura do meio de cultivo para as três condições comparadas.

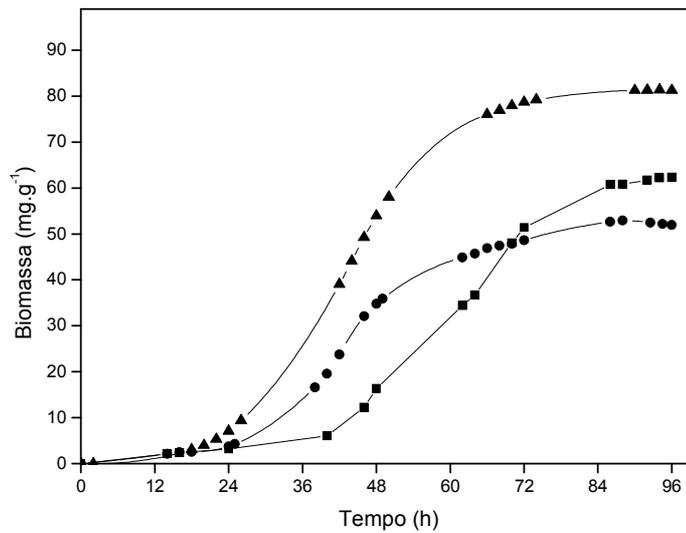


Figura 25. Variação da biomassa estimada em função do tempo para cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo nas condições: 02 – 1.100 g de substrato úmido, correspondendo a 30% de ocupação do volume interno do tambor (▲); 04 – 1.650 g de substrato úmido, correspondendo a 45% de ocupação do volume interno do tambor (■); 05 – 2.200 g de substrato úmido, correspondendo a 60% de ocupação do volume interno do tambor (●).

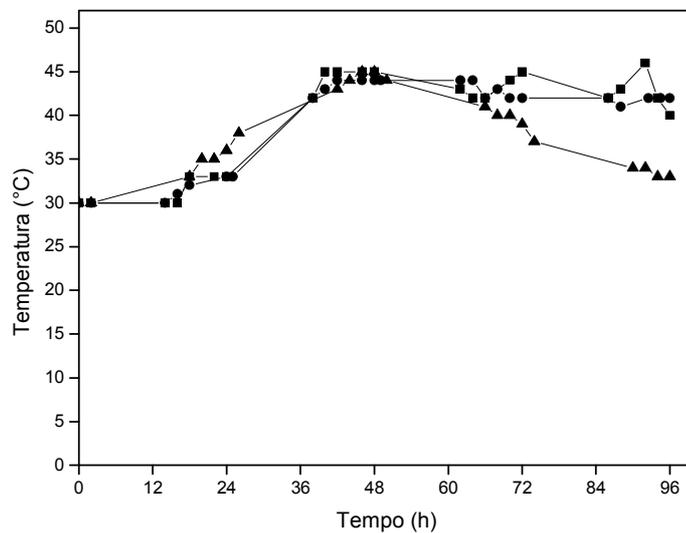


Figura 26. Temperaturas medidas em função do tempo no interior do meio de cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo nas condições: 02 – 1.100 g de substrato úmido, correspondendo a 30% de ocupação do volume interno do tambor (▲); 04 – 1.650 g de substrato úmido, correspondendo a 45% de ocupação do volume interno do tambor (■); 05 – 2.200 g de substrato úmido, correspondendo a 60% de ocupação do volume interno do tambor (●).

As maiores concentrações celulares foram estimadas na condição de cultivo 02, com ocupação de 30% do volume do reator, com valores máximos em torno de 81 mg.g⁻¹. Na condição de cultivo 04 (45% de ocupação), a fase *lag* foi maior, alongando-se além de 36 horas de cultivo, atingindo, em 96 horas, a concentração máxima de 62,4 mg.g⁻¹, contra 53 mg.g⁻¹ da condição 05. O menor crescimento na condição de cultivo 05 deve-se, provavelmente, à formação de um único bloco de meio no interior do tambor, em razão da impossibilidade de promover uma boa agitação do meio nesta condição, o que dificultou o acesso do oxigênio ao interior do meio de cultivo (Figura 25).

O pico de temperatura do meio de cultivo foi semelhante para as três condições testadas, em torno de 44°C. As temperaturas mantiveram este patamar até o final do processo para as condições com maior carga no tambor (04 e 05) e foi observada redução da temperatura do meio de cultivo na condição 02 após 60 horas. A menor ocupação do reator proporcionou, como esperado, maior eficiência na remoção do calor gerado durante o crescimento microbiano.

Os resultados da variação do teor de umidade, concentração de ART e atividade de endo-PG são apresentados nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

Tabela 5. Variação do teor de umidade no cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo.

Tempo (h)	Umidade (%)		
	02	04	05
0	52	52	52
24	54	54	55
48	59	56	55
72	61	56	56
96	67	64	58

Condições: 02 – 1.100 g de substrato úmido, correspondendo a 30% de ocupação do volume interno do tambor; 04 – 1.650 g de substrato úmido, correspondendo a 45% de ocupação do volume interno do tambor; 05 – 2.200 g de substrato úmido, correspondendo a 60% de ocupação do volume interno do tambor.

Tabela 6. Variação da concentração de ART no cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo.

Tempo (h)	Açúcares redutores totais (g.g ⁻¹)		
	02	04	05
0	0,62	0,64	0,63
24	0,53	0,65	0,61
48	0,49	0,63	0,58
72	0,35	0,43	0,36
96	0,21	0,34	0,15

Condições: 02 – 1.100g de substrato úmido, correspondendo a 30% de ocupação do volume interno do tambor; 04 – 1.650g de substrato úmido, correspondendo a 45% de ocupação do volume interno do tambor; 05 – 2.200g de substrato úmido, correspondendo a 60% de ocupação do volume interno do tambor.

Tabela 7. Variação da atividade de endo-PG no cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo.

Tempo (h)	Endo-PG (U.g ⁻¹)		
	02	04	05
0	0,0	0,0	0,0
24	6,1	3,3	2,7
48	36,8	26,3	26,0
72	47,8	50,0	48,7
96	80,6	107,2	60,1

Condições: 02 – 1.100g de substrato úmido, correspondendo a 30% de ocupação do volume interno do tambor; 04 – 1.650g de substrato úmido, correspondendo a 45% de ocupação do volume interno do tambor; 05 – 2.200g de substrato úmido, correspondendo a 60% de ocupação do volume interno do tambor.

Nas condições avaliadas, ocorreu aumento do teor de umidade do meio de cultivo ao longo do processo, indicando a existência de um acúmulo de água no interior do fermentador, sendo o maior teor de umidade final verificado na condição 02, da ordem de 67%, e o menor, de 58%, na condição 05. Incremento no teor de umidade também foi observado por Fontana *et al.* (2005) no cultivo de *A. niger* em bandeja.

A maior redução do teor de ART da condição 05 (0,48 g.g⁻¹) não foi acompanhada de alto crescimento microbiano (53 mg.g⁻¹) tampouco de altos títulos enzimáticos (60,1 U.g⁻¹). O maior título enzimático final, de 107,2 U.g⁻¹ foi obtido na condição 04, superando as 80,6 U.g⁻¹ da condição 02, embora com menor crescimento e com temperaturas próximas aos 40°C até 96 h de cultivo.

Os cultivos realizados nas condições 02 e 04 mostraram respostas diferentes para o crescimento microbiano e para a atividade em endo-PG, sugerindo que, para a produção eficiente do complexo enzimático, há a necessidade de que o microrganismo seja submetido a um ambiente menos favorável à reprodução celular.

4.2.3 Efeito do controle da temperatura sobre o cultivo de *Aspergillus niger*

A combinação de aeração com agitação e controle de temperatura interna do biorreator de tambor rotativo permitiu estabilizar a temperatura no interior do substrato durante os cultivos realizados neste trabalho. O controle da temperatura é frequentemente referido como um dos mais críticos nos processos em estado sólido (Reu *et al.*, 1993; Ashley *et al.*, 1999; Nagel *et al.*, 2000; Raghavarao, 2003; Mitchell *et al.*, 2006)

Para avaliar o efeito da temperatura sobre o cultivo de *A. niger* em tambor rotativo, foram comparadas três condições: condição 02 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 25°C até 96 h; condição 03 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e refrigeração com filme d'água a 20°C até 96 h; condição 06 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 35°C até 96 h.

Na Figura 26, são apresentados os perfis cinéticos de crescimento de *A. niger* e na Figura 28 os perfis de variação da temperatura do meio de cultivo para as três condições comparadas.

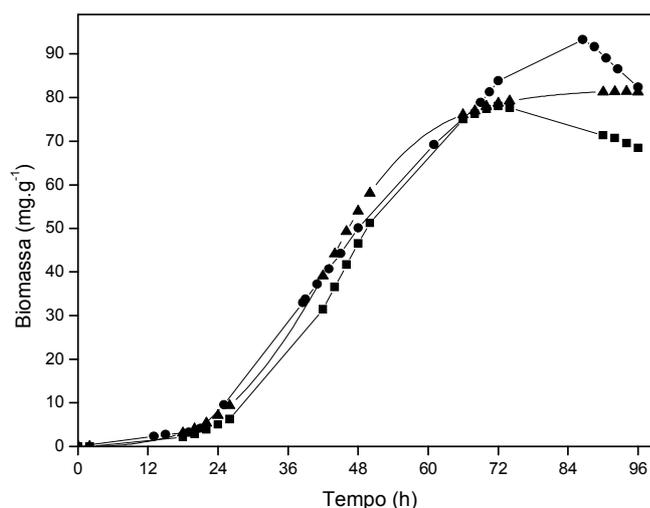


Figura 27. Variação da concentração de biomassa estimada em função do tempo em cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo nas condições: 02 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 25°C até 96 h (▲); 03 – temperatura externa de 30 °C nas primeira 24 h de cultivo e refrigeração com filme d'água a 20°C até 96 h (■); 06 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 35°C até 96 h (●).

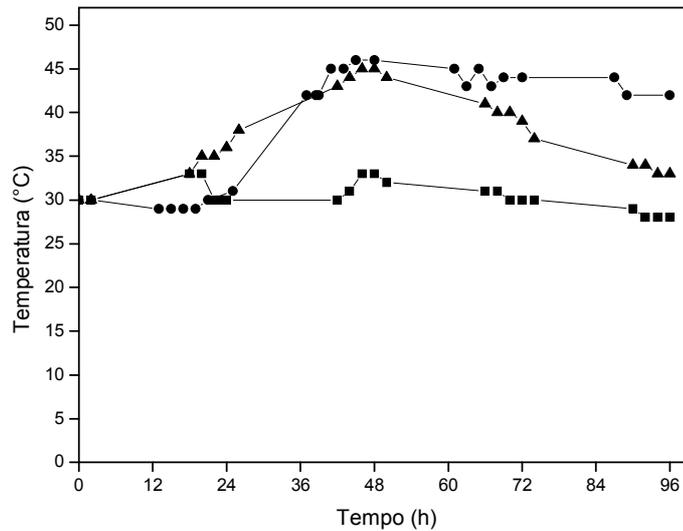


Figura 28. Temperaturas medidas em função do tempo no interior do meio de cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo nas condições: 02 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 25°C até 96 h (▲); 03 – temperatura externa de 30 °C nas primeiras 24 h de cultivo e refrigeração com filme d’água a 20°C até 96 h (■); 06 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 35°C até 96 h (●).

O perfil de crescimento foi semelhante para as três condições testadas, até 72 horas de cultivo, atingindo valores de concentração celular da ordem de $80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Apenas na condição 01 (temperatura externa de 25 °C) observou-se a manutenção deste patamar de biomassa, observando-se incremento na condição 06 (temperatura externa de 35 °C) e redução na condição 03 (aplicação de filme d’água externo ao tambor).

O comportamento dos perfis de temperatura com o tempo foi condizente ao estímulo externo aplicado pelo mecanismo de aquecimento e refrigeração, atingindo o pico de 45 °C para as duas condições não refrigeradas (02 e 06) e se mantendo em 30°C, após 24 horas de cultivo, na condição 03, sob refrigeração. A manutenção da temperatura acima de 40°C, entre a fase exponencial de crescimento e o final do cultivo da condição 06, proporcionou a continuidade do crescimento microbiano, diferentemente do observado na condição 03, com redução na concentração celular após a fase exponencial de crescimento.

Os resultados da variação do teor de umidade, concentração de ART e atividade de endo-PG são apresentados nas Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente.

Tabela 8. Variação do teor de umidade no cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo.

Tempo (h)	Umidade (%)		
	02	03	06
0	52	52	52
24	54	54	55
48	59	58	56
72	61	61	60
96	67	65	68

Condições: 02 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 25°C até 96 h; 03 – temperatura externa de 30 °C nas primeiras 24 h de cultivo e refrigeração com filme d'água a 20°C até 96 h; 06 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 35°C até 96 h.

Tabela 9. Variação da concentração de ART no cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo.

Tempo (h)	Açúcares redutores totais (g.g ⁻¹)		
	02	03	06
0	0,62	0,61	0,61
24	0,53	0,54	0,57
48	0,49	0,51	0,47
72	0,35	0,33	0,32
96	0,21	0,25	0,27

Condições: 02 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 25°C até 96 h; 03 – temperatura externa de 30 °C nas primeiras 24 h de cultivo e refrigeração com filme d'água a 20°C até 96 h; 06 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 35°C até 96 h.

Tabela 10. Variação da atividade de endo-PG no cultivo de *Aspergillus niger* em tambor rotativo.

Tempo (h)	Endo-PG (U.g ⁻¹)		
	02	03	06
0	0,0	0,0	0,0
24	6,1	3,2	2,8
48	36,8	22,2	27,1
72	47,8	28,9	46,8
96	80,6	46,4	61,2

Condições: 02 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 25°C até 96 h; 03 – temperatura externa de 30 °C nas primeiras 24 h de cultivo e refrigeração com filme d'água a 20°C até 96 h; 06 – temperatura externa de 30°C nas primeiras 24 h de cultivo e 35°C até 96 h.

Novamente, foi observado aumento do teor de umidade nas condições analisadas, sendo maior a variação entre 72 e 96 horas de cultivo nas condições de temperatura mais alta, indicando que não houve remoção de umidade do meio por evaporação, como descrito anteriormente para a condição 01.

O consumo de substrato foi semelhante nas três condições. Entretanto, a condição de cultivo 02 apresentou maior consumo de ART ($0,41 \text{ g.g}^{-1}$), enquanto a condição 06 levou ao menor consumo ($0,34 \text{ g.g}^{-1}$) entre os cultivos comparados.

Quanto à produção de endo-PG, na condição de cultivo 03, com temperatura controlada em cerca de 30°C , foram obtidos os piores resultados. Os dados obtidos mostram, novamente, a ocorrência de redução da produção de endo-PG em temperatura favorável ao crescimento de *A. niger*. Os resultados sugerem a necessidade de uma condição de estresse para o microrganismo, nesse caso representada pela elevação da temperatura do meio, para incrementar a produção da enzima.

Já na condição de cultivo 06, a atividade enzimática em 72 h de cultivo foi praticamente a mesma determinada para a condição 02, sendo menor (cerca de 75%), entretanto, ao final do processo. Comparando-se os perfis de temperatura das condições 02 e 06 (Figura 27), percebe-se o incremento deste parâmetro de forma semelhante nos dois cultivos, até 48 h, ocorrendo, após este período, decréscimo no meio de cultivo da condição 02 e a manutenção acima de 40°C até o final do ensaio na condição 06. Neste caso, é possível que, na condição 06, tenha ocorrido uma parcial inativação da enzima, provocada pela temperatura, como relatado por Santos *et al.*(2004).

4.2.4 Comparação dos fatores de conversão e produtividade nos diferentes cultivos

Neste item, são apresentados e discutidos os resultados alcançados após 96 horas dos diferentes cultivos, em termos dos fatores de conversão de substrato em células e produto e da produtividade, representados na Tabela 11.

Tabela 11. Fatores de conversão e produtividade nos cultivos de *A. niger* em biorreator de tambor rotativo

Condição	$Y_{X/S}$ [g.g ⁻¹]	$Y_{P/S}$ [U.g ⁻¹]	p [U.g ⁻¹ .h ⁻¹]
01	0,221	234,0	0,677
02	0,291	196,5	0,839
03	0,289	113,2	0,483
04	0,208	357,2	1,120
05	0,180	125,3	0,627
06	0,310	180,0	0,638
07	0,457	147,9	0,169

Fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), em gramas de células por grama de substrato, e endopoligalacturonase ($Y_{P/S}$), em unidades por grama de substrato, e produtividade (p), em unidades por grama de células por hora, dos cultivos de *A. niger* em biorreator de tambor rotativo calculados em 96 horas de cultivo para as condições de cultivo: 01 – 30 % de ocupação do tambor, sem agitação e temperatura externa de 25°C após 24 h de cultivo; 02 – 30 % de ocupação do tambor, com agitação por 5 minutos a cada duas horas a 1 rpm e temperatura externa de 25°C após 24 h de cultivo; 03 – 30 % de ocupação do tambor, com agitação por 5 minutos a cada duas horas a 1 rpm e temperatura externa de 20°C, refrigerado com filme lâmina d'água após 24 h de cultivo; 04 – 45 % de ocupação do tambor, com agitação por 5 minutos a cada duas horas a 1 rpm e temperatura externa de 25°C após 24 h de cultivo; 05 – 60 % de ocupação do tambor, com agitação por 5 minutos a cada duas horas a 1 rpm e temperatura externa de 25°C após 24 h de cultivo; 06 – 30 % de ocupação do tambor, com agitação por 5 minutos a cada duas horas a 1 rpm e temperatura externa de 35°C após 24 h de cultivo; 07 – 30 % de ocupação do tambor, com agitação por 1 hora e 55 minutos a cada duas horas a 1 rpm e temperatura externa de 25°C após 24 h de cultivo.

Observou-se uma variação entre 0,180 e 0,310 g de células por grama de substrato consumido, com valor médio de 0,250 g.g⁻¹, para os valores do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) calculados para as condições de cultivo 01 a 06. O valor de 0,457 g.g⁻¹ calculado para a condição 07 deve-se ao baixo consumo de substrato nesta condição.

Na condição de cultivo 04, foi estimado o maior valor para o fator de conversão de substrato em produtos ($Y_{P/S}$), fato explicado pelo alto título enzimático medido nesta condição. Por consequência, esta condição teve a maior produtividade estimada entre as condições testadas, pois o tempo de cultivo foi o mesmo para todos os ensaios.

Combinando o teor de umidade, a atividade enzimática e a carga de substrato úmido de cada cultivo, foi possível estimar a atividade enzimática total de cada cultivo. A menor

atividade enzimática total estimada foi para a condição 07 de 8×10^3 unidades. Valores intermediários, da ordem de 18×10^3 , 22×10^3 e 29×10^3 U foram estimados para as condições de cultivo 03, 06 e 02, respectivamente e as maiores atividades enzimáticas totais em endopoligalacturonase foram estimados para as condições 01, 05 e 04, com valores de 47×10^3 , 56×10^3 U e 64×10^3 U, respectivamente.

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos durante a realização deste trabalho, desde as etapas de projeto e prototipagem do biorreator de tambor rotativo até a realização de cultivos de *A. niger* no sistema construído, comprova a versatilidade operacional do biorreator. O sistema desenvolvido apresenta vantagens como:

- visualização das alterações ocorridas no meio e mudanças morfológicas do cultivo;
- possibilidade de variação da frequência e do período de agitação,
- possibilidade de controle da vazão e da temperatura do fluxo de ar úmido introduzido no sistema,
- possibilidade de controle e monitoramento da temperatura do interior do tambor rotativo,
- possibilidade de utilização de diferentes massas de substrato com conseqüente variação na ocupação do volume útil do equipamento,
- estimativa indireta da biomassa microbiana.

Nos ensaios fermentativos realizados com *A. niger*, como processo modelo, foram observados resultados que, aparentemente, discordam de afirmações recorrentemente encontradas na bibliografia especializada com respeito ao controle da temperatura durante cultivos em estado sólido. Acrescente-se que a possibilidade de observação direta do interior do tambor rotativo permite avaliar, claramente, o efeito do regime de agitação sobre as alterações na aparência do meio de cultivo. Estes exemplos evidenciam a importância de dispor-se de um biorreator de tambor rotativo em escala de bancada, que permita definir as melhores condições de cultivo, para a escala piloto.

Em seu estágio atual de desenvolvimento, o protótipo já permite a realização de estudos para a obtenção de outros produtos fúngicos ou bacterianos. Paralelamente, entretanto, devem ser implementadas melhorias no sistema, incluindo, entre outras, o aperfeiçoamento do monitoramento e do controle da temperatura, com a utilização de sensores sem fio, e o uso de controle computadorizado para o acionamento da refrigeração e do aquecimento. O controle digital poderá, também, ampliar as alternativas de controle de frequência e período de agitação.

Melhorias no casco do reator também devem ser consideradas, como a instalação de uma emenda de poliamida que permita a instalação de uma janela de inspeção lateral que facilite a retirada de amostras e a fixação de sensores de temperatura.

6. BIBLIOGRAFIA

- Acuña - Arguelles, M. E.; Gutiérrez -Rojas, M.; Viniegra-González, G.; Favela-Torres, E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid – state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 808-814.
- Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. J.; Serra, J.L. (1998). Industrial applications of enzymes: a review. **Process. Biochem.** 33: 21-28.
- Ashley, V. M.; Mitchell, D. A.; Howes, T. (1999). Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochem. Eng. J.** 3: 141-150.
- Bastos, M. S. R.; Gurgel, T. E. P.; Sousa Filho, M. S. M.; Lima, I. F. B.; Souza, A. C. R.; Silva, J. B. (2002). Efeito da aplicação de enzimas pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Rev. Bras. Frutic.** 24: 240-242.
- Blanco, P.; Sieiro, C.; Villa, T.G. (1999). Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.** 175: 1-9.
- Cannel, E.; Moo-Young, M. (1980). Solid state fermentation systems. **Process. Biochem.** 15: 2-7.
- Capra, F.; Ribeiro, N. P.; Vargas, G. D. L. P.; Oliveira, D.; Freire, D. M. G.; Di Luccio, M. (2003) . Efeito da umidade, temperatura e suplementação do meio na produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES. **Anais.** CD-ROM. Florianópolis. 2003.
- Coelho, M.A.Z.; Medronho, R.A.; Leite, S.G.F.; Couri, S. (1995). Partial purification of a polygalacturonase produced by solid state cultures of *A. niger* 3T5B8. **J. Braz. Society Microbiol.** 26: 318-322.

- Couto, S. R.; Sanromán, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **J. Food Eng.** 76: 291-302.
- Da Silva, R.; Franco, C.M.L.; Gomes, E. (1997) Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Bol. SBCTA**, 31: 249-260.
- Demain, A. L.; Davies, J. E. Atlas, R. M.; Cohen, G.; Hershberger, C. L.; Hu, W. S.; Sherman, D. H.; Willson, R. C.; Wu, J. H. D. (1999). **Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2. ed. Washington: ASM Press, 830 p.
- Doelle, H. W.; Mitchell, D. A.; Rolz, C. E. (1992). **Solid substrate cultivation**. 1. ed. Londres: Elsevier, 474 p.
- Domínguez, A.; Rivela, I.; Couto, S. R.; Sanromán, M. A. (2001). Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on an inert support. **Process Biochem.** 37: 549-554.
- Durand, A.; De Le Broise, D.; Blachère, H. (1988). Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **J Biotechnol.** 8: 59-66.
- Durand, A. (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 113-125.
- Ernandes, S.; Oshiro, A.; Yamaoka, K. & Del-Bianchi, V.L. (2003). Estudo comparativo do crescimento celular e esporulação de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* em fontes comerciais e alternativas utilizadas em fermentação submersa. In: XIV Sinaferm - Simpósio Nacional de Fermentações. **CD ROM** Florianópolis – SC, 2003.
- Fogarty, W.M. & Kelly, C.T. Pectic Enzymes (1983). In: Fogarty, W.N. Microb. Enzymes and Biotech. Dublin, **Appl. Sci. Publishers**. 131-182.
- Fontana, R. C. (2004). Estudo da produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.

- Fontana, R. C. (2005) Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspoergillus niger* in solid-state cultivatio. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 32:371-377.
- Fujian, X.; Hongzhang, C.; Zuohu, L. (2002). Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. **Enzyme Microbial Technol.** 30: 45-48.
- Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M.; Kalantzi. (1997). Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 425-429.
- Gasiorek, E. (2008). Effect of operating conditions on biomass growth during citric acid production by solid-state fermentation. **Chemical Papers.** 62 (2): 141-146.
- Gervais, P.; Molin, P. (2003) The role of water in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 85-101.
- Gummadi, S.N. & Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochem.** 38: 987-996.
- Hadj-Taieb, N.; Ayadi, M.; Khlif, M.; Mrad, K.; Hassairi, I.; Gargouri A. (2006). Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. **Enzyme Microb. Technol.**39: 1072– 1076.
- Hansen, D.N. (2003). XXL–A nova geração de pectinases. Biotimes – **Revista Bioindustrial Novozymes.** 1: 04-05.
- Hardin, M. T.; Howes, T.; Mitchell, D. A. (2002). Mass transfer correlations for rotating drum bioreactors. **J Biotechnol.** 97: 89-101
- Hoondal, G.S.; Tewari, R.P.; Tewari, R.; Dahiya, N. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 409-418.

- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochem.** 40 (9): 2931-2944.
- Kalogeris, E.; Fountoukides, G.; Kekos, D.; Macris, B. J. (1999). Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. **Bioresource Technol.** 67: 313-315.
- Kalogeris, E.; Iniotaki, F.; Topakas, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B. J. (2003). Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technol.** 86: 207-213.
- Kapoor, M.; Beg, Q.K.; Bushan, B.; Sing, K.; Dadhich, K.S.; Hoondal, G.S. (2001). Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus sp.* MG-CP-2 135 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and Sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast Wbers. **Process Biochem.** 36: 803–807.
- Kashyap, D. R. ; Vohra, P. K. ; Chopra, S. ; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases In the commercial sector: a review. **Bioresource Technol.** 77: 215-227.
- Kaur, G.; Kumar, S.; Satyanarayana, T. (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technol.** 94(3): 239-243.
- Kertesz, I. (1951). **The pectic substances**. Interscience Publishing. New York. 628 p
- Maldonado, M. C. ; Strasser de Saad, A. M. (1998). Production of pectinesterase and Polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 20: 34-38.
- Marsh, A. J.; Stuart, D. M.; Mitchell, D. A.; Howes, T. (2000). Characterizing mixing in a rotating drum bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnol. Lett.** 22: 473-477.
- Minjarres-Carranco, A. ; Trejo-Aguilar, B. A. ; Aguilar, G. ; Viniegra-González, G. (1997). Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger*

Adapted either to solid- state fermentation or submerged fermentation **Enzyme Microb. Technol.** 21: 25-31.

Mitchell, D. A.; Krieger, N; Berovic, M. (2006). **Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation.** Berlin: Springer-Verlag. 447p.

Nagel, F. J. J. I; Tramper, J.; Bakker, M. S. N.; Rinzema, A. (2000). Temperatura control in a continuously mixed bioreactor for solid-satate fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 72: 219-230.

Naidu, G. S. N. & Panda, T. (2003) Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochem. Eng. J.** 16: 57-67.

Nair, S.R. & Panda, T. (1997). Statistical optimization of medium componentes from improved synthesis of pectinase by *Aspergillus niger*. **Bioprocess Eng.** 16: 169-173.

Olsson, L.; Christensen, T.M.I.E.; Hansen, K.P.; Palmqvist, E.A. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 612-619.

Paiza, M. V. and Foster, E. M. (1983) Determining the safety os enzymes used in food processing. **J. Food Protect.**, 46: 453-458.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochem.** 35: 1153-1169.

Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 81-84.

Pilnik, W. & Rombouts, F.M. (1981). Pectic enzymes. In: Birch, G. G.; Blakebrough, N.; Parker, K. J. Enzymes and food processing. **Appl. Science. London.** p.105-128.

Raghavarao, K. S. M. S.; Ranganathan, T. V.; Karanth, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 127-135.

- Reid, I. & Ricard, M. (2000). Pectinase in paper making, solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 115-123.
- Reu, J. C.; Zwietering, M. H.; Rombouts, F. M.; Nout, M. J. R. (1993). Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. **App. Microbiol. Biotechnol.** 40: 261-265.
- Riberéau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. (2003). Tratado de Enología. Tomo 2. Química del vino. **Estabilización y Tratamientos**. Buenos Aires: 1 ed. 57-107, 177-255.
- Rutsatz, M. D. (2006). Cultivo em estado sólido: modelagem e quantificação de biomassa em biorreator cilíndrico horizontal agitado. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
- Santos, M. M.; Rosa, A. S.; Dal'Boit, S; Mitchell, D. A.; Krieger, N. (2004). Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresource Technol.** 93: 261-268.
- Scheper, T. (2000). **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. 1. ed. Nova Iorque: Springer.
- Schmidell, W; Lima, V. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001). **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blucher Ltda. Vol. 2. 593 p.
- Schuster, E; Dunn-Coleman, N; Frisvad, JC; Van Dijck, PW. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Appl Microbiol Biotechnol.** 59: 426-435.
- Sharma, D.C. & Satyanarayana T. (2006). A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresource Technol.** 97(5): 727-733

- Silva, C.F; Schwann, R.F.; Dias, E.S.; Wheals, A.E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **Int. J. Food Microbiol.** 60(2-3): 251-260.
- Spagna, G.; PiVeri, P.G.; Gilioli, E. (1995). Immobilization of a pectinlyase from *Aspergillus niger* for application in food technology. **Enzyme Microb. Technol.** 17 (8): 729– 738.
- Thakur, B. R.; Singh, R. K.; Handa, A. K.. (1997). Chemistry and uses of pectin – a review. **Critical Rev. in Food Science and Nutr.** 37(1):47-73.
- Whitaker, J.R (1984). Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme Microb. Technol.** 6: 341-349.
- Willats, W. G. T.; McCartney, L.; Mackie, W.; Knox, P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biol.** 47: 9-27.

**ANEXO A - MODELO DE UTILIDADE DE DISPOSITIVO DE TAMBOR
ROTATIVO nº MU8901075-2**

Relatório Descritivo de Modelo de Utilidade

DISPOSITIVO DE TAMBOR ROTATIVO

Campo da Invenção

O presente pedido de patente de modelo de utilidade se refere a um dispositivo de tambor rotativo. Em especial, o dispositivo pode ser construído em escala de bancada e em vidro e pode ser utilizado para fermentação em estado sólido. Especificamente, a presente invenção pertence ao campo dos dispositivos e está direcionado a solucionar o problema da visualização dos elementos dentro de um tambor rotativo e da manutenção da temperatura interna de biorreatores de tambor rotativo com o uso de um sistema simplificado de aquecimento e arrefecimento.

Antecedentes da Invenção

Atualmente os fermentadores de bancada utilizados para fermentação em estado sólido são principalmente do tipo “tambor agitado”, construídos em aço inox. A configuração de tambor agitado permite a construção de uma camisa em torno do tambor, por onde circula o líquido de aquecimento e/ou arrefecimento, geralmente água. O meio de cultivo é revolvido no interior do fermentador por meio de pás, o que favorece a homogeneidade do meio, mas, em contrapartida, exige alto gasto energético, além de promover a ruptura do micélio, no caso de fungos filamentosos. Fermentadores de bancada devem permitir plena visualização das alterações reológicas e morfológicas do meio de cultivo decorrentes do crescimento microbiano, sendo indicado o vidro como material de construção de biorreatores de bancada. A utilização deste material dificulta a construção de fermentadores do tipo tambor rotativo encamisados, não havendo relatos da existência deste tipo de biorreator na literatura consultada.

No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

O documento WO 08/107518 revela um biorreator projetado para o processamento de sólidos e/ou massas de alta viscosidade, constituído por um tanque reator vertical. A invenção também relaciona um método para fabricação e uso do dito reator. O presente modelo de utilidade difere deste documento por ser

construído em vidro, permitindo a visualização das alterações reológicas e morfológicas do meio de cultivo decorrentes do crescimento microbiano, possuindo também um sensor de temperatura no interior do tambor rotativo que emite um sinal captado por um termostato, fatos não citados no referido documento.

O documento US 2008/0057576 revela um reator adequado para fermentação em estado sólido compreendendo um vibrador anexado ao exterior do reator para que sua configuração seja mais eficiente durante a transferência do conteúdo. O presente modelo de utilidade difere deste documento por possuir um tambor rotativo de vidro e também por possuir um sistema de aquecimento e arrefecimento automatizado, fatos não citados no referido documento.

O documento EP 1131404 revela um biorreator para cultivar micro-organismos em meio sólido com uma câmara selada. O biorreator é feito de aço inoxidável ou de policarbonato. O resfriamento e o aquecimento do mesmo é feito através de comunicação de canais por fluidos (vapor, ar, água ou um solvente orgânico). O presente modelo de utilidade difere deste documento por possuir um tambor rotativo de vidro e por possuir um sistema de aquecimento e arrefecimento automatizado, fatos não citados no referido documento.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos do presente modelo de utilidade, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

É um objeto do presente modelo de utilidade um dispositivo de tambor rotativo compreendendo: umidificador (2) encaixado ao aquecedor (3), por sua vez conectado ao tambor rotativo (4), o qual apresenta, na parte externa, o dispositivo de dispersão (9) e, na parte interna, o sensor de temperatura (5) conectado ao termostato (6) que está ligado à resistência elétrica (7) e à bomba d'água (8).

Estes e outros objetos serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 mostra desenho esquemático do sistema para fermentação em estado sólido, onde: (1) ar; (2) umidificador; (3) aquecedor; (4) tambor rotativo.

A Figura 2 mostra de forma simplificada o diagrama de controle do sistema de aquecimento e arrefecimento do biorreator de tambor rotativo, onde: (5) sensor de temperatura; (6) termostato; (7) resistência elétrica; (8) reservatório de água com bomba; (9) dispersores de água; (10) duto de retorno da água ao reservatório.

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar o modelo de utilidade, contudo sem limitar o escopo do mesmo.

Dispositivo de tambor rotativo em escala de bancada

O presente modelo de utilidade descreve o dispositivo de tambor rotativo compreendendo: umidificador (2) encaixado ao aquecedor (3), por sua vez conectado ao tambor rotativo (4), o qual apresenta, na parte externa, o dispositivo de dispersão (9) e, na parte interna, o sensor de temperatura sem fio (5) que se comunica remotamente com o termostato (6) que por sua vez está ligado à resistência elétrica (7) e à bomba d'água (8).

Em especial, o presente modelo de utilidade descreve um fermentador de bancada que permite a plena visualização das alterações reológicas e morfológicas do meio de cultivo decorrentes do crescimento microbiano, por ser construído em vidro. Este dispositivo adicionalmente compreende um sistema de aquecimento e arrefecimento, automatizando o biorreator de tambor rotativo.

Umidificador

O umidificador (2) do presente modelo de utilidade compreende uma coluna d'água através da qual o fluxo de ar (1) é borbulhado, com a função de saturar em umidade o ar (1) que será injetado no tambor rotativo.

Aquecedor

O aquecedor (3) do presente modelo de utilidade compreende uma serpentina imersa em banho termostático que irá aquecer o ar (1) que sai do umidificador (2) até a temperatura desejada.

Tambor rotativo

O tambor rotativo (4) do presente modelo de utilidade compreende um cilindro de vidro, preferencialmente provido de tampas hermeticamente fecháveis. Nesse tambor (4) ocorre o crescimento microbiano em meio de cultivo sólido que pode ser composto por resíduos agroindustriais como farelo de soja ou trigo, cascas de arroz, quirera de milho e bagaço de cana-de-açúcar entre outros. Podem ser utilizados ainda meios de cultivo à base de suportes inertes, tais como: vermiculita, poliestireno expandido ou cortiça. O meio de cultivo pode ser enriquecido com fontes de carbono como glicose, frutose, lactose e celulose, sais minerais e indutores enzimáticos. No tambor podem ser cultivadas culturas de fungos ou bactérias. O fermentador é apoiado horizontalmente sobre um suporte provido de roletes, que permite a rotação do tambor (4) em diferentes velocidades. A rotação tem a finalidade de dissipar o calor e o gás carbônico resultantes do metabolismo microbiano, além de facilitar a difusão do oxigênio que atravessa a parte central do fermentador. Outra função da rotação é evitar a compactação do meio de cultivo.

Sensor de temperatura

O sensor de temperatura (5) do presente modelo de utilidade mede a temperatura interna do tambor rotativo, que emite sinal para um termostato (6).

Termostato

O termostato (6) do presente modelo de utilidade mostra o acionamento de uma resistência elétrica (7) se a temperatura do meio de cultivo estiver abaixo da ideal, para que a temperatura da câmara se equilibre com a temperatura do fermentador.

Bomba d'água

A bomba d'água (8) do presente modelo de utilidade pode ser acionada se a temperatura ultrapassar o valor crítico de crescimento microbiano, proporcionando a distribuição da água na parte superior do tambor rotativo (4), através de um dispositivo de dispersão (9).

Conforme demonstrado na Figura 2, o dispositivo de tambor rotativo apresenta mostra o diagrama de controle do sistema de aquecimento e arrefecimento do biorreator de tambor rotativo, onde: (5) sensor de temperatura; (6) termostato; (7) resistência elétrica; (8) reservatório de água com bomba; (9) dispersores de água; (10) duto de retorno da água ao reservatório.

Reivindicações

DISPOSITIVO DE TAMBOR ROTATIVO

1. Dispositivo de tambor rotativo caracterizado por compreender: umidificador (2) encaixado ao aquecedor (3), por sua vez conectado ao tambor rotativo (4), o qual apresenta, na parte externa, o dispositivo de dispersão (9) e, na parte interna, o sensor de temperatura (5) conectado ao termostato (6) que está ligado à resistência elétrica (7) e à bomba d'água (8).

2. Dispositivo de tambor rotativo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se apresentar em escala de bancada.

3. Dispositivo de tambor rotativo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por mostrar a temperatura interna do tambor rotativo.

4. Dispositivo de tambor rotativo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender um sistema automatizado de aquecimento e arrefecimento.

5. Dispositivo de tambor rotativo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por dispensar a utilização de água para o aquecimento do tambor rotativo.

6. Dispositivo de tambor rotativo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por possibilitar a variação das velocidades de rotação.

7. Dispositivo de tambor rotativo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por permitir a visualização externa dos processos realizados no interior do tambor rotativo e a esterilização do equipamento.

Resumo

DISPOSITIVO DE TAMBOR ROTATIVO

O presente pedido de patente de modelo de utilidade se refere a um dispositivo de tambor rotativo. Em especial, o dispositivo pode ser construído em escala de bancada e em vidro e pode ser utilizado para fermentação em estado sólido. Especificamente, o presente modelo de utilidade pertence ao campo dos dispositivos e está direcionado a solucionar o problema da visualização dos elementos dentro de um tambor rotativo e da manutenção da temperatura interna de biorreatores de tambor rotativo com o uso de um sistema simplificado de aquecimento e arrefecimento.

FIGURAS

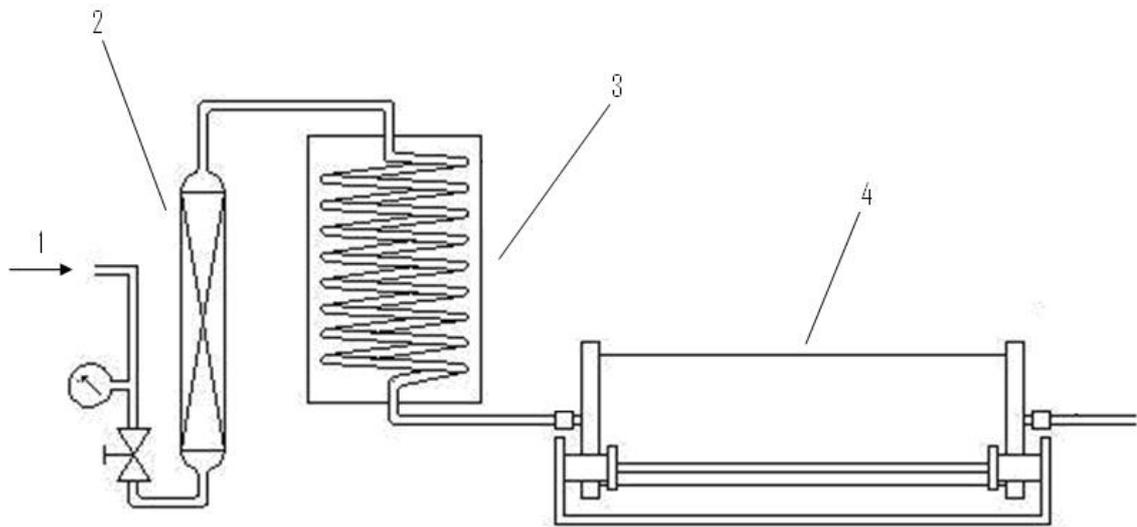


Figura 1

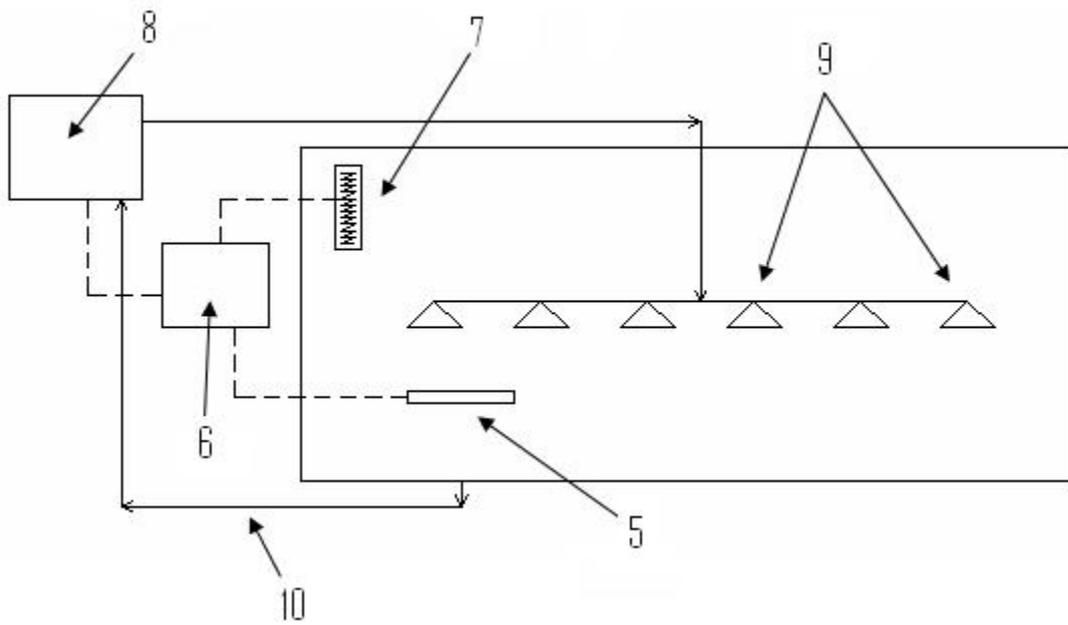


Figura 2