

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Thermoascus aurantiacus* EM CULTIVO
EM ESTADO SÓLIDO**

MÁRCIA BRANDÃO PALMA

**Tese para obtenção do grau de
Doutor em Engenharia Química**

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

**FLORIANÓPOLIS
2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

TESE DE DOUTORADO

**PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Thermoascus aurantiacus* EM CULTIVO
EM ESTADO SÓLIDO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

MÁRCIA BRANDÃO PALMA

FLORIANÓPOLIS, 2003

**PRODUÇÃO DE XILANASES POR *Thermoascus aurantiacus* EM CULTIVO
EM ESTADO SÓLIDO**

Por

Márcia Brandão Palma

Esta tese foi julgada para a obtenção do título de
Doutor em Engenharia Química
Área de Concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**
e aprovada em sua forma final pelo curso de Pós-Graduação

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Orientador

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Prof. Dr. David Alexander Mitchell

Profa. Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Profa. Dra. Marília Amorim Berbert de Molina

Florianópolis (SC), abril de 2003

*Ao meu pai, Romeu
À minha mãe, Maria Helena
Às minhas irmãs, Luciana e Mariza*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Agenor Furigo Junior, pela orientação, por todos os ensinamentos, pela agradável convivência e pela sincera amizade.

À minha grande amiga e formadora, Professora Adriane Maria Ferreira Milagres, pela incansável colaboração e disponibilidade, em todos os momentos durante a realização deste trabalho.

A Professora Marília Amorim Berbert de Molina, pelas enriquecedoras colaborações feitas a este trabalho e por sua amizade, que, superando distâncias, mostra o quanto é valiosa.

Aos Professores David Alexander Mitchell e Hugo Moreira Soares, pela disponibilidade em contribuir e estar presente na defesa deste trabalho.

Ao Professor Maurício Moura da Silveira, pela compreensão e por todas as valiosas sugestões feitas ao longo deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Engenharia Química da FURB, pelo incentivo e apoio.

À equipe da Divisão de Apoio e Desenvolvimento da Pesquisa e da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da FURB, pela compreensão e confiança.

Ao Grupo de Engenharia Biológica do Instituto Superior Técnico de Lisboa, Portugal, especialmente aos Professores Joaquim Cabral e Luis Fonseca e à Cecília Calado, pela oportunidade.

Aos bolsistas e monitores do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURB, Gilberto Fisher, Fernanda Seàra, Juliana Mariotto e Alexandre Klein, pela grande ajuda e amizade.

Ao Élio dos Santos, pela colaboração neste trabalho.

Aos amigos, sempre presentes, Rita, Gisele, Giovana, Karen, Rodrigo, Farah, Shirley e Kurt que souberam compreender e apoiar, mesmo nos momentos mais difíceis, o que foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

À Griseldes, um agradecimento muito especial, pela importância da sua amizade nesta jornada.

Aos meus pais, Romeu e Maria Helena, às minhas irmãs, Luciana e Mariza, aos meus cunhados, Valter e Junior e ao meu sobrinho João, minha inesgotável fonte de alegria, por serem, incondicionalmente, meus maiores incentivadores e amigos.

À Fundação Universidade Regional de Blumenau e à CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Realizou-se o cultivo em estado sólido de *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492, visando a produção de xilanases, avaliando-se, em um primeiro estudo, a suplementação do bagaço de mandioca, em diferentes níveis, com farelo de arroz. As proporções estudadas, entre os dois resíduos, respectivamente, foram 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 5:5 analisando-se, além da atividade de xilanases, as atividades das celulases carboximetilcelulase e avicelase e das proteases totais. A melhor composição obtida, para produção de xilanases, foi a que se utilizou 7 partes de bagaço de mandioca e 3 partes de farelo de arroz. Proporcionalmente à produção de xilanases, a indução de celulases foi muito pequena, assim como a formação de proteases, que, mesmo nos cultivos onde houve maior adição de fonte de nitrogênio, na forma de farelo de arroz, as atividades detectadas foram muito baixas. O pH manteve-se constante, durante os cultivos, mas o sistema não foi eficiente para manutenção da umidade dos meios. No entanto, no nível de umidade atingido neste sistema, este fato pareceu não afetar a produção de xilanases nos frascos. Na sequência, foram feitos estudos para adaptação dos reatores de coluna de Raimbault ao cultivo em elevadas temperaturas, visando a produção da enzima. Para isto, foram necessários avaliar diferentes volumes de água para o umidificador secundário e eliminar a condensação de líquido do topo das colunas. Foi verificado que, neste tipo de sistema fermentativo, deve-se iniciar os cultivos com valores menores de umidade inicial dos meios (55%), pois o sistema de umidificação dos reatores recupera a umidade, atingindo o valor necessário para desenvolvimento do microrganismo. O volume de água de 200 mL foi encontrado ser o ideal para estes cultivos, não acarretando umidificação excessiva, nem ressecamento dos meios. Com relação a influência da aeração sobre a formação da enzima, variou-se a vazão de entrada de ar, utilizando-se valores de 1 e 2 L/min. Além disto, diferentes materiais foram testados para promover a adequada distribuição do ar no meio sólido, evitando-se a formação de caminhos preferenciais. Constatou-se que um menor nível de aeração levou à maior produção de xilanases. Os diferentes distribuidores de ar utilizados não levaram a diferenças significativas, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$), na produção da enzima, o que levou a escolha do material de maior facilidade de operação, que foi o vidro picado. As análises feitas em três pontos diferentes da coluna, topo, meio e fundo, também não mostraram diferenças significativas ($P < 0,05$), em termos de produção de enzima. Os resultados obtidos, nas condições, então definidas

como adequadas para o cultivo do fungo termófilo, nos reatores de coluna, foram comparados com a produção em frascos onde verificou-se que as produtividades foram de 5,33 e 7,66 U/gms.h, respectivamente, mostrando que, possivelmente, algum parâmetro não controlado nos reatores pode estar influenciando o processo. Constatou-se que a melhor umidade para produção da enzima parece não ser a mesma para o crescimento do microrganismo. O cultivo nas colunas também não induziu elevadas atividades de celulasas e proteases. Alguns parâmetros cinéticos, relativos ao crescimento de *Thermoascus aurantiacus* e à produção de xilanases, em cultivo em estado sólido, foram determinados. A biomassa microbiana foi obtida pela medida do conteúdo de glicosamina que foi padronizada com dados de massa micelial seca proveniente de um cultivo submerso. A partir destes dados, e da atividade da enzima, determinou-se os valores das velocidades específicas de crescimento celular e de formação do produto, μ_{XMAX} (0,0061 h⁻¹) e μ_{PMAX} (45,07 U/g biomassa.h), respectivamente. Com os dados da biomassa e da velocidade de consumo de oxigênio (OUR) determinou-se os valores da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO₂), ao longo do tempo, além do fator de conversão oxigênio em célula, $Y_{X/O}$ =0,0189 g biomassa/mmol O₂ e do coeficiente de manutenção celular, m_o =0,00325 mmol O₂/g biomassa.h.

ABSTRACT

The solid state culture of *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 aiming the xylanases production was performed evaluating, in the first step, the supplementation, in different levels, of cassava bagasse with rice bran. The studied ratios, between two wastes, were respectively, 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 and 5:5 analyzing, not only the xylanases activity, but also the cellulases carboximetillulase and avicelase and the total proteases activity. The best composition obtained for xylanases production was 7 parts of cassava bagasse and 3 parts of rice bran. Proportionally to the xylanases production, the cellulases induction was very small, as well as the proteases production that even in the cultures where there was larger nitrogen source increase, like rice bran, the detected activities were very small. The pH of the culture medium remained constant during the cultivates but the system wasn't efficient for the conservation of the moisture of the mediums. However in the attained moisture for the system this fact appeared not to affect xylanases production on the flasks. In the sequence, studies for Raimbaut fixed-bed reactors adaptation for high temperatures cultivates, for xylanases production were performed. In order to do that, it was necessary to evaluate different capacities for the secondary humidifier and to remove the reactors' top liquid condensation. It was verified that, in the present kind of fermentation system, it is better to start the cultivates with the lower moisture level in the culture medium (55%) since the reactors' humidification system recover the moisture attaining the necessary level for the microorganism development and enzyme production. The water volume of 200 mL proved to be the ideal one for this cultivates as soon as neither did it cause excessive moisture nor did it dry the medium. Regarding to the aeration influence over the enzyme production, it was performed a variance in the air entrance rate, adopting the values of 1 and 2 L/min. Furthermore, different materials were tested for suitable air distribution in the solid medium avoiding the formation of preferential ways. It was verified that a lower aeration level conducted to a higher xylanases production. According to the Tukey ($P < 0,05$) test, the different air distributors used did not cause remarkable differences in the xylanases production, leading to the choice of the material that can be easily operated, pricked glass. The three different points analyzed in the reactor, top, medium and bottom, also did not show relevant differences ($P < 0,05$) in the enzyme production. The results obtained for enzyme production under the conditions defined as suitable for the thermophilic fungus culture in the packed bed reactors were compared with the flasks production where

it was verified that the productivity was 5,33 and 7,66 U/gms.h, respectively, showing that, possibly, a parameter that is not controlled in the reactors may be influencing the process. It was verified that the best moisture for the enzyme production appears not to be the same for the microorganism growth. The culture in the reactors, as the same as in the flasks, did not induce high cellulases and proteases activities. Some kinetics parameters related to *Thermoascus aurantiacus* growth and xylanases production in solid-state culture were determined. The microbial biomass was obtained through the amount of glucosamine that was padronized with data of dry mycelial mass deriving from a submerged culture. From the former results, and the activity of the enzyme, the values of specific growth rate and specific product formation rate μ_{XMAX} ($0,0061 \text{ h}^{-1}$) and μ_{PMAX} (45,07 U/gms.h), respectively, were determined. With biomass and oxygen uptake rate (OUR) results, a specific rate of oxygen uptake (QO_2) along the time was determined as well as the conversion factor oxygen in cell, $Y_{X/O}=0,0189 \text{ g cell/mmol O}_2$ and the cell maintenance coefficient, $m_O=0,00325 \text{ mmol O}_2/\text{g cell.h}$.

SUMÁRIO

	Página
NOMENCLATURA	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE QUADROS	viii
1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Xilanases	4
2.1.1 Composição química e degradação da hemicelulose	4
2.1.2 Produção de xilanases por microrganismos	5
2.1.3 Aplicações	13
2.2 Processos fermentativos para produção de enzimas	15
2.2.1 Fermentação em estado sólido (FES)	16
2.2.1.1 Definição e histórico	16
2.2.1.2 Aplicações da FES	19
2.2.1.3 Principais características	22
2.2.1.4 Fatores que afetam a FES	25
2.2.1.4.1 Microrganismo	25
2.2.1.4.1.1 Medida da biomassa em FES	27
2.2.1.4.2 Atividade de água e umidade	30
2.2.1.4.3 Aeração e transferência de oxigênio	35
2.2.1.4.4 Temperatura e transferência de calor	38
2.2.1.4.5 pH	40
2.2.1.4.6 Substrato	41
2.2.1.4.6.1 Bagaço de mandioca	43
2.2.1.5 Produção de xilanases por FES	47
2.2.1.5.1 Produção de xilanases por FES a partir de <i>Thermoascus aurantiacus</i>	50

2.3 Biorreatores para FES	52
2.3.1 Reatores de coluna utilizados em FES	54
3 – MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1 Microrganismo	58
3.2 Meios de cultura e manutenção do fungo	58
3.3 Obtenção da suspensão de esporos	58
3.4 Resíduos utilizados para os cultivos em estado sólido	59
3.4.1 Preparo dos meios para os cultivos em estado sólido	59
3.5 Condições de cultivo em estado sólido	59
3.5.1 Ensaio em frascos	59
3.5.2 Ensaio em reator de coluna	60
3.5.2.1 Sistema de reatores de coluna (Sistema de Raimbault)	60
3.5.2.2 Condições de cultivo nos reatores de coluna	64
3.5.2.3 Testes dos reatores de coluna de Raimbault para o cultivo em elevadas temperaturas	65
3.5.2.3.1 Umidade inicial dos meios	65
3.5.2.3.2 Volume de água nos umidificadores secundários	65
3.5.2.3.3 Vazão de ar	65
3.5.2.3.4 Distribuição do ar no interior das colunas	66
3.6 Tratamento das amostras	66
3.7 Determinações analíticas	68
3.7.1 Determinação da umidade	68
3.7.2 Determinação do pH	68
3.7.3 Extração das enzimas do meio	68
3.7.4 Determinação das atividades enzimáticas	68
3.7.4.1 Atividade de xilanases (EC 3.2.1.8)	68
3.7.4.2 Atividade de celulases	69
3.7.4.3 Atividade de proteases totais	70
3.7.5 Determinação das proteínas totais	70

3.7.6 Determinação do conteúdo de glicosamina	70
3.8 Determinação da velocidade de consumo de oxigênio	71
3.9 Determinação dos parâmetros cinéticos	74
3.9.1 Determinação das velocidades específicas	74
3.9.1.1 Correlação entre biomassa e conteúdo de glicosamina em cultivos líquidos	75
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1 Cultivo em frascos	78
4.2 Cultivo em reatores de coluna – 1ª Parte	94
4.3 Cultivo em reatores de coluna – 2ª Parte	108
4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos	120
5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES	142
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
ANEXOS	159

NOMENCLATURA

Aw	atividade de água
C1	exo β -1,4 glucanase ou avicelase
Cx	endo β -1,4 glucanase ou carboximetilcelulase
DNS	ácido 3,5 dinitrosalicílico
FES	fermentação em estado sólido
FSm	fermentação submersa
gms	grama de matéria seca
I	intervalo de (min)
k_{La}	coeficiente global de transferência de massa (h^{-1})
M	massa de substrato (g)
max	máximo
m_o	coeficiente de manutenção celular (mol O_2 /g célula.h)
M.OUR	velocidade de consumo de oxigênio em função da massa de bagaço fermentado (mmol O_2 /h)
n	número de moles
OUR	velocidade de consumo de oxigênio (mol O_2 /gms.h)
p	peso
$P_{O_{2i}}$	pressão parcial do oxigênio inicial (mmHg)
$P_{O_{2t}}$	pressão parcial do oxigênio, após o tempo de medida, em minutos (mmHg)
P_t	pressão parcial no ambiente (mmHg)
$P_{VH_{20}}$	pressão de vapor da água (mmHg)
QO ₂	velocidade específica de consumo de oxigênio (mol O_2 /g célula. h)

t	Tempo (s, min ou h)
T	Temperatura (k)
TCA	ácido tricloroacético
R	constante universal dos gases (mmHg.L/K.mol)
V	Volume (L)
X	concentração celular (mg/gms)
$Y_{P/X}$	fator de conversão de biomassa em produto (U/g biomassa)
$Y_{X/O}$	fator de conversão de oxigênio em célula (g célula/mol oxigênio)
μ_X	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_P	velocidade específica de formação de produto (U/g célula.h)
∇t	Intervalo de tempo no qual é realizada e medida de oxigênio (min)

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil ; Arab, L-arabinofuranose ; MeGIA, ácido 4-O-metil-glicurônico ; Xil, D-xilose	6
FIGURA 2 Processo de obtenção do amido ou fécula de mandioca.....	46
FIGURA 3 Reatores de Coluna denominados “Sistema de Raimbault”.....	57
FIGURA 4 Estufa utilizada para os cultivos em frascos.....	60
FIGURA 5 Colunas de vidro, encaixadas ao sistema de umidificação secundário.....	61
FIGURA 6 Distribuidor de ar e umidificador primário.....	62
FIGURA 7 Fluxômetros utilizados para controle da vazão de ar nas colunas.....	62
FIGURA 8 Disposição dos doze fluxômetros no sistema.....	63
FIGURA 9 Banho termostático, com circulação, para controle da temperatura.....	63
FIGURA 10 Esquema das colunas com diferentes materiais utilizados como “distribuidores do ar”.....	66
FIGURA 11 Esquema do tratamento das amostras.....	67
FIGURA 12 Equipamentos utilizados na determinação do consumo de oxigênio.....	71
FIGURA 13 Esquema do sistema para determinação da velocidade do consumo de oxigênio.....	72
 ARTIGO 1	
FIGURA 1 Atividades máximas de xilanases obtidas nos cultivos em frascos.....	84
FIGURA 2 Concentrações máximas de proteínas obtidas nos cultivos em frascos.....	85

FIGURA 3	Atividades específicas máximas de xilanases obtidas nos cultivos em frascos.....	85
FIGURA 4	Atividades máximas de proteases obtidas nos cultivos em frascos.....	88
FIGURA 5	Atividades máximas de celulasas obtidas nos cultivos em frascos.....	89
FIGURA 6	Variação da umidade com o tempo nos cultivos em frascos.....	89
FIGURA 7	Variação do pH com o tempo nos cultivos em frascos.....	90

ARTIGO 2

FIGURA 1	Esquema ilustrativo do Sistema de Raimbault	99
FIGURA 2	Esquema ilustrativo de montagem das colunas em função do material distribuidor de ar utilizado.....	102
FIGURA 3	Atividade de xilanases e variação da umidade nos três pontos de amostragem das colunas, onde se utilizou diferentes materiais distribuidores de ar.....	103
FIGURA 4	Variação da atividade de xilanases com o tempo nos cultivos em reatores de coluna em diferentes níveis de aeração.....	104
FIGURA 5	Variação da umidade com o tempo nos cultivos em reatores de coluna em diferentes níveis de aeração.....	104

ARTIGO 3

FIGURA 1	Sistema fermentativo para cultivo em meio sólido utilizando reatores de coluna.....	112
FIGURA 2	Comparação entre a produção de xilanases nos cultivos em reatores de coluna e frascos.....	114
FIGURA 3	Comparação entre a concentração de proteínas nos cultivos em reatores de coluna e frascos.....	115

FIGURA 4	Comparação entre a atividade específica de xilanases nos cultivos em reatores de coluna e frascos.....	115
FIGURA 5	Comparação entre a variação da umidade com o tempo nos cultivos em reatores de coluna e em frascos.....	116
FIGURA 6	Comparação entre a atividade de carboximetilcelulase – Cx e Avicelase – C1 nos cultivos em reatores de coluna e frascos.....	117
FIGURA 7	Comparação entre a atividade de protease nos cultivos em reatores de coluna e frascos.....	117
 ARTIGO 4		
FIGURA 1	Esquema do sistema para determinação da velocidade do consumo de oxigênio	125
FIGURA 2	Curva de calibração entre a biomassa de <i>Thermoascus aurantiacus</i> crescido em meio líquido, a base de extrato de farelo de arroz, e o conteúdo de glicosamina na biomassa.....	128
FIGURA 3	(A) Massa micelial formada ao longo do tempo e (B) valores de $\ln X$ ao longo do tempo nas quatro repetições dos cultivos em estado sólido (1.1, 1.2, 1.3, 1.4) conduzidos em reatores de coluna de Raimbault.....	128
FIGURA 4	Ilustração da modificação visual do meio de cultivo entre 24 e 240 horas, em função do crescimento celular.....	129
FIGURA 5	Atividade de xilanases produzida ao longo do tempo nas quatro repetições dos cultivos em estado sólido (1.1, 1.2, 1.3, 1.4) conduzidos em reatores de coluna de Raimbault..	131
FIGURA 6	Atividade de xilanases em função da biomassa formada	132
FIGURA 7	Correlação entre a velocidade de consumo de oxigênio (M.OUR) e a massa micelial formada, obtida pela medida do conteúdo de glicosamina.....	135
FIGURA 8	Velocidade específica de consumo de oxigênio.....	135

FIGURA 9 Velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) em função da velocidade específica de crescimento celular (μ_x).....

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Composição físico-química do bagaço de mandioca seco...	46
ARTIGO 1:	
TABELA 1 Produtividade de xilanases obtida nos diferentes experimentos.....	84
TABELA 2 Resultado das análises físico-químicas	86
ARTIGO 4:	
TABELA 1 Valores de μ_{xmax} e μ_{pmax} obtidos nas quatro repetições dos cultivos em estado sólido (1.1, 1.2, 1.3, 1.4) conduzidos em reatores de coluna de Raimbault.....	132
TABELA 2 Ajuste dos valores de consumo de oxigênio (y) com o tempo de medida, 30 minutos (x).....	134

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 Exemplos de aplicações da FES.....	20
QUADRO 2 Algumas características dos processos de FES e FSm.....	23
QUADRO 3 Alguns exemplos da utilização de biorreatores de coluna em FES.....	55
 ARTIGO 2:	
QUADRO 1 Identificação das colunas em função da variação da umidade do meio e do volume de água no umidificador secundário.....	101
QUADRO 2 Identificação das colunas de acordo com o material utilizado para distribuição do ar.....	102
 ARTIGO 4:	
QUADRO 1 Valores máximos de biomassa, determinados pelo conteúdo de glicosamina, em diferentes processos conduzidos em estado sólido.....	130

1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O desenvolvimento tecnológico atingiu, nas últimas décadas, dimensões incalculáveis e, dentro deste contexto, os processos biotecnológicos industriais merecem destaque especial. Tais processos apresentam significativa relevância social e econômica haja visto a possibilidade de utilização de recursos naturais renováveis, abundantes no Brasil, e o grande número de metabólitos, de interesse industrial, que podem ser gerados, a partir destes processos. É importante destacar que, como a poluição ambiental é uma consequência direta do desenvolvimento tecnológico, a implementação de tecnologias, fazendo uso de materiais renováveis, e adequadas, sob o ponto de vista energético e de preservação do meio ambiente, é uma necessidade que se faz presente em todos os segmentos industriais. Além disto, a variedade de metabólitos que podem ser obtidos, fazendo uso dos processos biotecnológicos industriais, em substituição aos processos químicos convencionais, com vantagens de operação e de aplicação, é um dos principais fatores que estimulam a realização do grande número de trabalhos de investigação científica, nesta área, bem como o investimento de diferentes setores econômicos na biotecnologia industrial.

Um dos principais exemplos de processo biotecnológico industrial, em amplo desenvolvimento, é a obtenção de enzimas. Aquelas produzidas comercialmente, pelas grandes indústrias da área, na maioria dos casos, são de origem microbiana devido, principalmente, à maior diversidade, possível de ser obtida pelos microrganismos, e às dificuldades, operacionais e econômicas, dos processos de extração de enzimas de tecidos animais e vegetais. Ressalta-se, ainda, que, a condução dos processos, para

obtenção das enzimas microbianas, pode ser controlada, de forma a se atender as necessidades do mercado. Especialmente no Brasil, devido as suas características climáticas, existe abundância de matéria-prima a ser utilizada nos cultivos microbianos para a produção de enzimas. Além disto, há uma grande variedade, e disponibilidade, de recursos naturais renováveis, que podem ser transformados, enzimaticamente, em produtos de maior valor agregado, e de interesse industrial.

As enzimas estão sendo cada vez mais aplicadas em diferentes setores industriais, destacando-se as indústrias de alimentos e bebidas, têxtil, papelreira e farmacêutica, devendo-se isto, principalmente, a algumas vantagens operacionais como especificidade de reação e alta eficiência de conversão, com pouca formação de metabólitos secundários. Destaca-se, ainda, que as reações enzimáticas, via de regra, acontecem em condições brandas de temperatura e pH, o que significa, para as indústrias, uma redução nos custos operacionais.

A indústria de papel e celulose, um dos setores produtivos com maior movimentação econômica a nível mundial, é uma das que vem investindo na busca de soluções para seus problemas, relativos a poluição ambiental, pelo uso da tecnologia enzimática. As xilanases são as enzimas mais estudadas para utilização no branqueamento de polpas de celulose. O emprego das enzimas do complexo xilanolítico, neste etapa do processo, leva a reduções significativas na utilização dos produtos organoclorados, que são altamente poluentes e conferem às indústrias de celulose a condição de serem uma das mais poluidoras, dentre todo o seguimento industrial. Diante deste fato, alguns países da Europa já impõem sérias restrições à utilização deste tipo de composto, haja visto sua ação prejudicial ao meio ambiente. O desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias para produção desta enzima, visando aumento de produtividade, aumento da escala de produção e redução dos custos de obtenção representa, portanto, uma alvo de investigação científica altamente relevante nos tempos atuais tendo em vista os impactos ambientais e econômicos gerados pela aplicação dos resultados obtidos por este tipo de trabalho.

A produção das xilanases, por processo biológico, pode acontecer por cultivos submersos sendo dada, no entanto, muita atenção, mais recentemente, à sua obtenção fazendo uso dos cultivos em estado sólido, que apresentam uma série de características favoráveis, quando comparados aos cultivos submersos. Destaque especial deve ser feita à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais e de exploração florestal, como fonte de nutrientes nestes processos, na sua forma natural, o que confere ao

microrganismo um ambiente favorável à produção dos metabólitos de interesse, como as xilanases, que, por esta razão, são produzidas com características bioquímicas mais adequadas à aplicação industrial. No entanto, os processos de cultivo em estado sólido apresentam algumas dificuldades tecnológicas, principalmente, no que diz respeito ao controle do crescimento microbiano, que precisam ser superadas ou, pelo menos, minimizadas, para que estes possam ser analisados cineticamente e levados, assim, a uma escala maior de produção.

Dentro deste contexto, portanto, o trabalho aqui apresentado teve como **objetivo geral** a obtenção de xilanases de *Thermoascus aurantiacus* por cultivo em estado sólido utilizando-se bagaço de mandioca.

Para que o objetivo principal fosse alcançado, os seguintes **objetivos específicos** foram cumpridos:

1. Cultivo em frascos para obtenção da melhor composição dos meios sólidos, a partir de resíduos agroindustriais, bagaço de mandioca e farelo de arroz, para a produção de xilanases livre de celulasas e proteases ;
2. Cultivo nos reatores de coluna de Rimbault para adaptação deste sistema ao cultivo de microrganismo termófilo;
3. Determinação das melhores condições de operação dos reatores de coluna de Rimbault em termos de nível de aeração, umidade inicial dos meios, para obtenção de xilanases;
4. Realização do estudo cinético do processo, pela utilização da medida do conteúdo de glicosamina do micélio, como metodologia indireta de determinação da biomassa microbiana, e pela determinação da velocidade de consumo de oxigênio do microrganismo.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Xilanases

2.1.1 Composição química e degradação da hemicelulose

As hemiceluloses compreendem um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados, que se ligam, firmemente entre si e à superfície das microfibrilas de celulose, cobrindo-as e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa. Quimicamente, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos, formados por vários resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros, e por seus ácidos urônicos. Estes açúcares estão ligados entre si, por ligações glicosídicas β -1,4, formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduo, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Elas são classificadas de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, xilanas, galactomananas, arabino-xilanas, arabinoglucurono-xilanas, arabino-4-metil-glucurono-xilana, 4-metil-glucurono-xilanas, galactosanas, galacto-arabino-glucurono-xilana, são diferentes denominações das hemiceluloses em função da estrutura química que as compõem (BIELY, 1985 ; DA SILVA *et alii*, 1997). As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, nas camadas primária e secundária, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina. Cerca de 40% dos polissacarídeos que constituem a parede celular dos vegetais refere-se à hemicelulose sendo, portanto, depois da celulose, o carboidrato mais abundante na natureza (WOODWARD, 1984 ; DA SILVA *et alii*, 1997).

A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses, e trata-se de um heteropolissacarídeo composto de ligações β -1,4 de resíduos de D-xilanopiranosil com ramificações arabinosil e/ou acetil, dependendo do vegetal em que se encontra. No caso de madeiras duras, tais como Eucalipto e bétula, nas quais a xilana corresponde de 20 a 35% do peso seco da biomassa, o grupo substituinte é o O-acetil-4-O-metilglucuranoxilana, e em madeiras moles, como Pinos e vários cereais e gramíneas, é o arabino-4-O-metilglucuranoxilana. Neste caso, a fração de xilana corresponde, em média, a 8% do peso seco da biomassa. Resíduos de ácido ferúlico e cumárico podem ainda apresentar-se esterificados aos substituintes do tipo L-arabinose (WONG et al., 1988 ; HALTRICH et al., 1996).

Tendo em vista que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros, formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa também necessita de enzimas específicas. A endo β -1,4 xilanase (EC 3.2.1.8) forma o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação da xilana. Trata-se de uma endo-enzima que degrada, aleatoriamente, a cadeia principal de xilana, liberando xilo-oligossacarídeos (HALTRICH et al., 1996 ; KULKARNI et al., 1999). A degradação completa desta cadeia principal ocorre por uma ação sinérgica de endo e exo-xilanases (β -xilosidases ou β -D-xilosídeo xilohidrolases), que hidrolisam os xilo-oligômeros de baixa massa molecular resultantes. De acordo com BIELY (1985), para a hidrólise completa dos heteroxilo-oligômeros, são necessárias, ainda, enzimas que hidrolisem os grupos substituintes como α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilesterase, conforme ilustrado na Figura 1. Assim, de acordo com o autor, as enzimas do complexo xilanolítico podem ser divididas em enzimas que degradam a cadeia principal (endo- β -1,4 xilanase e β -xilosidase) e enzimas que degradam as cadeias laterais (α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase e acetilesterase).

2.1.2 Produção de xilanases por microrganismos

A produção de xilanases, por microrganismos, estende-se à utilização, principalmente, de bactérias e fungos filamentosos, havendo poucos relatos acerca da utilização de leveduras. As xilanases apresentam características diferentes, como pH e

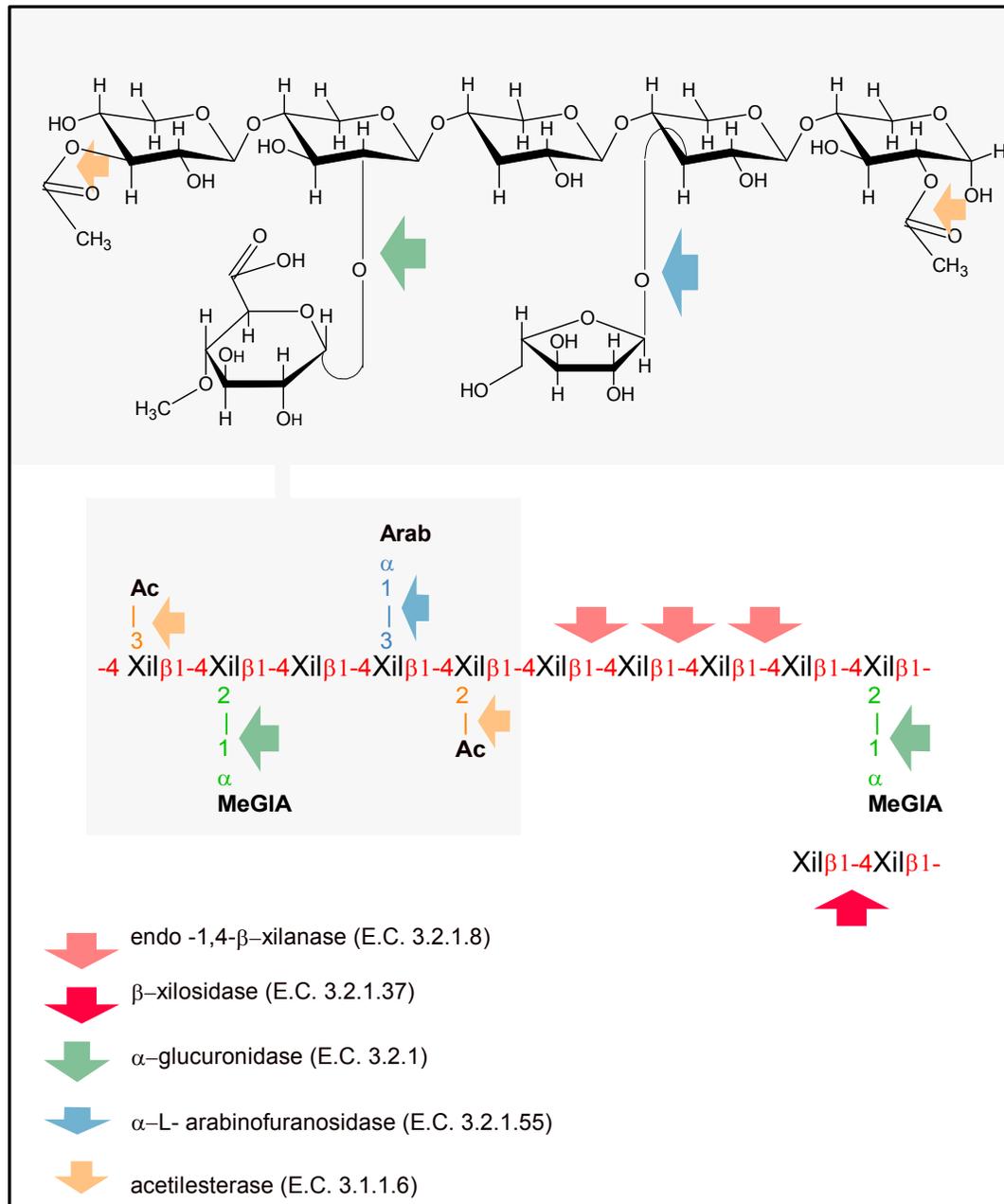


Figura 1 – Representação teórica da estrutura da xilana vegetal e pontos onde as enzimas atuam. Ac, grupo acetil ; Arab, L-arabinofuranose ; MeGIA, ácido 4-O-metilglucurônico ; Xil, D-xilose (Fonte: BIELY, 1985)

temperatura ótimos de atuação, e especificidade pelo substrato, dependendo do microrganismo produtor (HALTRICH et al., 1996). De uma forma geral, as xilanases de origem microbiana possuem uma composição protéica simples e massa molecular entre 8

e 145 kDa. A faixa ótima de temperatura para produção de endo-xilanases, por bactérias ou fungos, varia de 40 a 60 °C, sendo as bactérias mais conhecidas por produzirem xilanases termoestáveis (KULKARNI et al., 1999). Apesar dos fungos filamentosos serem microrganismos naturalmente mesófilos, há trabalhos indicando a produção de xilanases termoestáveis por algumas espécies incluindo *Thermoascus aurantiacus* e *Melanocarpus albomyces* utilizadas por KALOGERIS et al. (1998) e JAIN et al. (1998), respectivamente. De uma maneira geral, as xilanases, provenientes de diferentes microrganismos são estáveis na faixa de pH de 3 a 10, sendo, no entanto, a melhor produção enzimática obtida em pH entre pH 4 e 7.

A produção de xilanases por bactérias está limitada a poucas espécies como, por exemplo, *Bacillus* sp. (GESSESSE & MANO, 1999 ; DUARTE et al., 2000 ; NATH & RAO, 2001), *Streptomyces* sp. (RUIZ-ARRIBAS et al., 1995 ; BEG et al., 2000) e *Staphylococcus* sp. (GUPTA et al., 2001). Nestes trabalhos, objetiva-se, principalmente, a obtenção de xilanases termoestáveis ou alcalino-tolerantes.

Via de regra, os fungos sintetizam enzimas mais ativas em pH baixo que, sob o ponto de vista industrial, os fungos são particularmente interessantes, uma vez que podem produzir xilanases extracelulares. Os extratos enzimáticos, obtidos destas culturas, possuem, geralmente, maior atividade do que aqueles provenientes do cultivo de bactérias. Além disto, os fungos possuem a capacidade de produzir diferentes enzimas do complexo xilanolítico, o que permite hidrolisar, não somente a cadeia principal da xilana, mas também, as suas ramificações (HALTRICH et al., 1996 ; KULKARNI et al., 1999). No entanto, xilanases fúngicas estão normalmente associadas à produção de celulasas, o que não é desejável, dependendo do fim ao qual a enzima se destina (KULKARNI et al., 1999).

A produção de xilanases por fungos filamentosos está relatada para uma maior diversidade de espécies como *Aspergillus* sp. (GAWANDE & KAMAT, 1999 ; FERREIRA et al., 1999 ; GHANEM et al., 2000 ; SOUZA et al., 2001 ; LU et al., 2003), *Fusarium* sp. (CHEILAS et al., 2000 ; SAHA, 2002), *Melanocarpus* sp. (JAIN et al., 1998 ; NARANG et alii, 2001), *Penicillium* sp. (PALMA et al., 1996 ; DALSENTER, 2002), *Rhizopus* sp. (BAKIR et al., 2001), *Thermoascus* sp. (GOMES et al., 1994 ; SOUZA et al., 1999 ; KALOGERIS et al., 1998 ; KALOGERIS et al., 1999b ; KALOGERIS et al., 2001 ; KALOGERIS et al., 2003) e *Thermomyces* sp. (ALAM et al., 1994 ; DAMASO et al., 2000, SINGH et al., 2000 ; REDDY et al., 2000).

Um dos fatores básicos para uma eficiente produção de xilanases, por microrganismos, refere-se à adequada escolha do substrato e a otimização da composição do meio de cultivo, pois, a partir daí, pode-se definir as características da enzima, bem como controlar a formação de compostos indesejáveis, como a produção de celulases, quando a enzima produzida destina-se a indústria de celulose papel, por exemplo. Neste caso, o substrato não é somente a fonte de carbono e energia, mas fornece, também, os compostos indutores da produção enzimática para o microrganismo (KULKARNI et al., 1999).

A maioria das endo-xilanases produzidas por bactérias e fungos, parecem ser enzimas induzidas. Em geral, o mecanismo que regula a indução das xilanases é complexo e a resposta, em termos de produção enzimática, frente a um indutor, varia para cada microrganismo, pois um indutor que leva a máxima atividade em uma espécie pode ser o inibidor da atividade em outra (KULKARNI et al., 1999). BIELY (1995) propôs um mecanismo de indução de xilanase para a levedura *Cryptococcus albidus* no qual uma pequena quantidade de xilanase constitutiva, suficiente apenas para a indução do sistema, é produzida e excretada no meio, hidrolisando a xilana em compostos de peso molecular menor, capazes, então, de entrar na célula e induzir a produção de xilanase. Xilose e glicose, provenientes da ação da enzima sobre estes xilo-oligômeros, são repressores, funcionando como um controle sobre a produção. Segundo o autor, este sistema pode ser a explicação para a indução de xilanase em outros microrganismos. HALTRICH et al. (1996) descrevem, genericamente, a indução de xilanases produzidas por fungos por um mecanismo semelhante ao descrito anteriormente.

GOMES et al. (1994) relatam, em seu trabalho, alguns fatores que afetam a indução de xilanase de *Thermoascus aurantiacus* colocando que, dentre quatorze diferentes fontes de carbono testadas, os melhores indutores da enzima foram xilana “beechwood”, glucuronoxilana “birchwood” e metil β -D-xilopiranosídeo (MXP), sendo este último responsável pela maior atividade detectada, 2,5 mg/mL. Constatou-se a produção de pequenas quantidades de xilanase constitutiva em todos os cultivos, e a repressão da síntese por glicose, que foi irreversível, mesmo na presença de ciclo-adenosina 3,5-monofosfato (cAMP). No entanto, quando a concentração de glicose no meio foi reduzida ao nível detectado como não-repressor, 0,2 mg/mL, a repressão da síntese de xilanase foi totalmente revertida.

GESSESSE & MANO (1999) verificaram uma severa repressão da síntese de xilanase por *Bacillus* sp. quando o meio, constituído de farelo de trigo, foi acrescido de 5%

(p/p) de xilose e lactose, enquanto a adição de sacarose e glicose, na mesma proporção, não chegou a afetar a indução enzimática.

Recentemente, SOUZA et al. (2001) verificaram o efeito de vários açúcares facilmente metabolizáveis como glicose, xilose, frutose, maltose, celobiose e lactose, na indução de xilanase por *Aspergillus tamarii*. Os autores observaram que a adição de 1% destes açúcares nos meios de cultivo, constituídos à base de bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, causou uma severa repressão catabólica no sistema. No entanto, verificou-se que os cultivos conduzidos em meios à base de farelo de trigo foram resistentes à presença dos açúcares, não se detectando efeitos de repressão catabólica com a adição de, até, 10% de glicose.

A partir da descrição do mecanismo de indução das endo-xilanases, pode-se concluir que a utilização de xilana pura, ou de seus derivados de baixa massa molecular, é uma excelente opção para a produção destas enzimas, o que vem sendo feito, frequentemente, em pequena escala (HALTRICH et al., 1996). Entretanto, para a produção em escalas maiores, a utilização destes materiais, de elevado custo, torna o processo inviável, economicamente. Para solucionar esta questão, a utilização de resíduos agroindustriais e de exploração florestal como, por exemplo, bagaço de cana-de-açúcar (PALMA et al., 1996 ; SOUZA et al., 1999), sabugo de milho (DAMASO et al., 2000 ; BAKIR et al., 2001) e farelo de trigo (GOMES et al., 1994 ; RIDDER et al., 1999 ; BAKIR et al., 2001), dentre outros, tem sido a solução mais empregada.

Estes resíduos são fonte de xilana e xilo-oligômeros, podendo ser utilizados, na forma natural, como é o caso dos processos em estado sólido, ou após pré-tratamentos (químicos, físicos ou enzimáticos), que se fazem necessários para sua utilização nos cultivos submersos e, em alguns casos, também nos cultivos em estado sólido (KULKARNI et al., 1999).

No trabalho de GUPTA et al. (2001) observou-se que a utilização de resíduos, como farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho e cavaco de madeira, para fornecimento de carbono nos cultivos, levou a uma produção cinco vezes maior de xilanase por *Staphylococcus* sp., comparando-se com os resultados obtidos para os cultivos conduzidos a partir de xilose e xilana pura.

HALTRICH et al. (1996) descrevem, ainda, a possibilidade da utilização de indutores gratuitos, como β -metil-D-xilosídeo (BMX), um composto sintético não metabolizável, semelhante, quimicamente, a xilobiose, que leva a síntese de altos níveis

de xilanase. No entanto, os autores ressaltam que o uso destes indutores, em larga escala, é restrito, devido ao elevado custo dos mesmos.

A composição dos meios de cultivo para a produção de xilanases por diferentes microrganismos incluem, algumas vezes, além do substrato indutor, diversos sais minerais e alguns íons metálicos. No entanto, muito frequentemente, é necessário acrescentar, aos meios, uma fonte de nitrogênio. Geralmente, obtém-se bons resultados, em termos de produção de xilanase, fazendo uso de extrato de levedura e peptona na composição dos meios (HALTRICH et al., 1996). Entretanto, estes compostos podem ser substituídos, com sucesso, por materiais de custo muito mais baixo, conforme relatado por LU et al. (2003) que utilizaram farelo de soja e farelo de peixe na produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus*, em escala piloto.

Alguns trabalhos mostram que a produção de xilanase está relacionada a característica da fonte de nitrogênio, encontrando-se diferenças entre a utilização de fontes orgânicas ou inorgânicas.

GUTIERREZ-CORREA & TENDERDY(1998) mostraram, em seu trabalho, que a presença de uma fonte de nitrogênio orgânico no meio (farelo de soja) aumentou em sete vezes a produção de xilanases, em um cultivo misto utilizando *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis*, quando se comparou com o processo suplementado com nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio).

CHEILAS et al. (2000) obtiveram resultado semelhante na produção de arabinase, uma enzima do complexo xilanolítico, por *Fusarium oxysporum*, pois a utilização de uma fonte de nitrogênio orgânico foi mais favorável à produção da enzima, sendo o licor de maceração de milho, o composto que levou às mais altas atividades.

GOMES et al. (1994) avaliaram a influência da fonte de nitrogênio na produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus* e verificaram que a indução da enzima ocorreu somente na presença de uma fonte de nitrogênio orgânica no meio de indução. Os autores, sem especificar os compostos utilizados, relatam que a substituição do nitrogênio orgânico, pela mesma quantidade de nitrogênio inorgânico, reduziu a atividade de xilanase de 1008 nkatal/mL para 27 nkatal/ml, após 120 horas de cultivo.

No entanto, KALOGERIS et al. (1998) chegaram a resultados contrários, alcançando maiores atividades de xilanase de *Thermoascus aurantiacus* em meios contendo nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio), o que vai ao encontro dos resultados obtidos por GHANEM et al. (2000) que também obtiveram melhor produção de xilanase por, *Aspergillus terreus*, quando o meio foi suplementado com sulfato de amônio, que foi

avaliado dentre outras possibilidades de suplementação de nitrogênio inorgânico como cloreto de amônio, fosfato de amônio e nitrato de sódio e fontes orgânicas como peptona, extrato de levedura, licor de maceração de milho, farelo de soja e extrato de malte.

BAKIR et al. (2001) fizeram uso de farelo de soja, como fonte de nitrogênio, na produção de endo-xilanase por *Rhizopus oryzae* e observaram que, um aumento na concentração deste composto de 1 para 2%, no meio de cultivo, levou a um aumento de 26% na produção de xilanase. No entanto, os autores ressaltam que este valor é pequeno quando comparado com o efeito causado pelo aumento da concentração da fonte de carbono (sabugo de milho), de 1 para 3%, que levou ao acréscimo de 80% na produção de xilanase. Este fato foi atribuído, pelos autores, a um provável aumento da atividade proteolítica, estimulado pela presença de uma maior concentração de nitrogênio no meio. Testou-se ainda, neste trabalho, a combinação de 1% de farelo de soja com 1% de uma fonte de nitrogênio inorgânico (sulfato de amônio, nitrato de potássio e nitrato de sódio), obtendo-se os melhores resultados na combinação entre farelo de soja e sulfato de amônio, chegando-se a uma produção de, aproximadamente, seis vezes maior da enzima do que com a utilização dos outros sais testados.

O tipo e a concentração da fonte de nitrogênio utilizada no cultivo de *Thermoactinomyces thalophilus* afetaram, consideravelmente, a produção de xilanase e a formação de biomassa, conforme constatação de KOHLI et al. (2001). Os autores conduziram o trabalho avaliando diferentes fontes de nitrogênio como farelo de soja, peptona e triptona, em diferentes concentrações (0,1, 0,15, e 0,20%) frente a um controle feito com 0,25% de extrato de levedura. Observou-se que a utilização do farelo de soja levou a redução da atividade enzimática bem como da formação de biomassa. Nos experimentos conduzidos com peptona e triptona verificou-se que houve aumento de 11% na atividade de xilanase, quando se utilizou a concentração de 0,1%, o que, no entanto, não alterou a formação de biomassa. Quando a concentração destes compostos foi elevada para 0,20% observou-se, entretanto, redução na atividade de xilanase e aumento na biomassa total formada. Os autores atribuíram estes resultados, possivelmente, aos efeitos da repressão catabólica ou da mudança no balanço Carbono:Nitrogênio, que afeta, de uma forma geral, a produção enzimática.

É importante ressaltar que, além dos fatores até aqui descritos, a produção de xilanases, por fungos filamentosos, é influenciada, ainda, por variáveis como temperatura, pH, nível de oxigênio dissolvido e agitação dos meios (HALTRICH et al., 1996).

A existência de xilanases múltiplas, com diferentes especificidades, provenientes de um único microrganismo, está relatada em alguns trabalhos mas, de acordo com WONG et al. (1988), este fato não possui origem e papel biológico satisfatoriamente esclarecidos.

DA SILVA et al. (1994) verificaram a presença de três frações protéicas com atividade de xilanase, na purificação do extrato obtido do cultivo de *Humicola* sp., no qual observou-se que o pH e a temperatura ótimos para a atividade dos três tipos de xilanases esteve entre 5,0-5,6 e 75 °C, respectivamente. Encontrou-se, ainda, que a xilanase I tratava-se de uma endo-xilanase enquanto as xilanases II e III tinham características de exo-xilanases.

KANG et al. (1996) também verificaram a presença de duas xilanases no cultivo de *Cephalosporium* sp. tendo, ambas, melhor atividade em pH entre 7,5 e 8,0 e na temperatura de 50 °C. As duas enzimas purificadas foram estáveis na faixa de pH de 5,0 a 12 e o extrato não apresentou atividade de celulase.

SOUZA et al. (1998) encontraram duas xilanases na purificação do extrato do cultivo de *Aspergillus tamaritii* em meio líquido, a base de pó de sabugo de milho. Foi verificado, para as enzimas designadas de xilanase I e II, massa molecular de 12.500 e 28.000 Da e uma estimativa do conteúdo de carboidrato de 39 e 12,7%, respectivamente. Ambas apresentaram atividade referentes a endo-enzimas, uma vez que o produto da ação das xilanases I e II sobre xilana foi, principalmente, xilobiose e xilo-oligossacarídeos.

KALOGERIS et al. (1998) obtiveram, na purificação do extrato do cultivo de *Thermoascus aurantiacus*, a indicação da presença de duas xilanases que mostraram ser termoestáveis, porém ativas somente em xilana.

JAIN et al. (1998) trabalharam com a purificação dos extratos provenientes do cultivo de *Melanocarpus albomyces* e também relatam a presença de duas xilanases. No entanto, neste caso, estas foram eficientes na hidrólise de vários substratos de natureza lignocelulósica.

MILAGRES & SALES (2001) detectaram duas bandas com atividade de xilanase, e várias bandas com a mesma atividade, na purificação dos extratos proveniente do cultivo de *Wolfiporia cocos* e *Poria medula-panis*, respectivamente, ambos realizados em meio líquido, à base de farelo de trigo.

2.1.3 Aplicações

O interesse na produção de xilanases deve-se a sua grande potencialidade de aplicação industrial, em diferentes segmentos que, de acordo com BIELY (1995) divide-se em duas categorias sendo uma, livre de celulasas e a outra, com uso associado de outras polissacaridasas.

A aplicação das xilanases na indústria de alimentos, por exemplo, se dá por sua ação conjunta com outras enzimas. No processamento de sucos, frutas e vegetais, a ação combinada das xilanases, celulasas, pectinases e outras hemicelulasas apresenta um efeito sinérgico que é vantajoso sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade do produto final. A liquefação das polpas para a fabricação de sucos, por exemplo, após a extração, que pode ser realizada por maceração enzimática, é uma operação possível de ser efetuada, enzimaticamente, por uma combinação de xilanases, pectinases e celulasas (WONG et al., 1988 ; DA SILVA et al., 1997).

Xilanases também são utilizadas, em aplicação conjunta com outras polissacaridasas, nas vinícolas e cervejarias, para reduzir a concentração de β -glicanas, que aumentam a viscosidade dos mostos, prejudicando, conseqüentemente, a etapa da filtração e dificultando a clarificação dos vinhos. Além disto, a estabilidade coloidal da cerveja, no resfriamento, também sofre ação da presença das β -glicanas, uma vez que estas são insolúveis em certas concentrações de álcool, podendo ser precipitadas (WOODWARD, 1984 ; DA SILVA et al., 1997 ; KULKARNI et al., 1999).

Na indústria de panificação as xilanases vêm sendo usadas sobre as arabinoxilanas, que representam de 2 a 3% (p/p) da farinha de trigo. Estes compostos absorvem cerca de 1/3 da água adicionada à massa, impedindo o desenvolvimento do glúten, reduzindo, assim, o volume do pão e prejudicando a textura do mesmo. Assim, a aplicação de xilanases (arabinosidasas) à farinha leva à liberação da água retida nas arabinoxilanas, melhorando o manuseio da massa e permitindo a obtenção de um produto final com maior volume e melhor estrutura de miolo (KULKARNI et al., 1999). Descrevendo a aplicação das xilanases no processamento de massas, INGELBRECHT et al. (2000) verificaram que a utilização de endo-xilanases alterou, positivamente, as propriedades reológicas da massa de spaghetti, obtida a partir de farinha de trigo do tipo “durum”, também por sua ação na liberação de água na massa que leva a uma melhora, da sua consistência.

O aumento na digestibilidade de rações animais é um processo que pode ser obtido pela aplicação das xilanases, conjuntamente com outras hemicelulases, uma vez que a hemicelulose é uma fibra insolúvel, e a sua ingestão, na forma integral, possui pouco valor nutricional para os animais ruminantes (KULKARNI et al., 1999). Um recente trabalho realizado por NSEREKO et al. (2000) mostrou a eficiência de várias enzimas na hidrólise e degradação da fibra de alfafa, utilizada para alimentação animal, tendo sido verificado que endo- β -1,4 xilanase e acetilesterase foram as enzimas mais relevantes para o processo.

A aplicação de xilanases, diretamente sobre a estrutura da xilana, leva à remoção seletiva da hemicelulose e também à obtenção de produtos como xilose e xilo-oligômeros, que apresentam potencialidade de aplicação direta como padrões para cromatografia ou na indústria de alimentos, como espessantes, substituintes de gordura e aditivos anti-congelantes. Além disto, estes compostos podem, ainda, ser convertidos, química ou biologicamente, em combustíveis líquidos, solventes e edulcorantes de baixas calorias. Têm-se, ainda, relatos da aplicação de xilanases na extração de café, de amido, de flavorizantes, de pigmentos e de óleos (WOODWARD, 1984 ; WONG, et al., 1988 ; KULKARNI et al., 1999).

Sem dúvida alguma, a maior aplicação industrial da xilanase, livre de celulase, está relacionada às indústrias de celulose e papel. Nesta aplicação, as xilanases podem auxiliar, consideravelmente, na redução da poluição ambiental, causada pela utilização do cloro como agente químico branqueador das polpas, o que resulta na formação de compostos residuais denominados organo-clorados, que são extremamente nocivos ao meio ambiente. Em função dos efeitos biológicos diretos em ecossistemas aquáticos de efluentes de branqueamento à base de cloro, existem, hoje, especialmente na América do Norte e Europa Ocidental, sérias restrições ao uso dos compostos clorados nos processos de branqueamento (KULKARNI et al., 1999). A utilização da xilanase, no biobranqueamento das polpas, leva a diminuição do consumo de branqueadores químicos, sem comprometer, entretanto, o resultado final, em termos da alvura do papel (DA SILVA et al., 1997). Desta forma, a polpa pode atingir o grau de alvura necessário à fabricação do papel, com a utilização de, até, 30% menos de cloro. Esta técnica vem sendo utilizada, em escala industrial, na Finlândia, um dos maiores produtores mundiais de polpa kraft, desde 1991, junto com outros métodos de branqueamento que utilizam pouca ou, até mesmo, nenhuma concentração de cloro (WONG, et al., 1988 ; DA SILVA, et al., 1997 ; KULKARNI et al., 1999).

Diversos trabalhos relatam a eficiência da utilização de xilanase, obtida por diferentes microrganismos, no processo de biobranqueamento (MILAGRES, 1994 ; DA SILVA et al., 1994 ; GAWANDE & KAMAT, 1999 ; BEG et al., 2000 ; BIM et al., 2000 ; VALCHEVA et al., 2000). No entanto, deve-se ressaltar que, para maior eficiência desta aplicação específica das xilanases, deve-se trabalhar com extratos enzimáticos resistentes a alcalinidade e a alta temperatura, e totalmente livre de celulasas (KULKARNI et al., 1999).

Para todas as aplicações aqui relatadas já existem preparações enzimáticas comerciais, com diferentes características e propriedades, obtidas de microrganismos, que estão sendo produzidas por grandes empresas multinacionais (HALTRICH et al., 1996).

2.2 Processos fermentativos para produção de enzimas

Existem dois tipos de processos fermentativos que são utilizados para a produção de enzimas: fermentação submersa (FSm) e fermentação em estado sólido (FES). Os processos de fermentação submersa são amplamente conhecidos, estudados e aplicados e apresentam variáveis na forma de condução que os classifica em processos descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo e semicontínuo (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Atualmente, a grande maioria das enzimas utilizadas industrialmente são produzidas fazendo uso da FSm, geralmente utilizando-se microrganismos geneticamente modificados. No entanto, o custo da produção destas enzimas por FSm é alto e o processo torna-se, muitas vezes, economicamente inviável (PANDEY et al., 2000a).

A produção de enzimas, pelo cultivo em estado sólido é uma alternativa atraente, sob o ponto de vista econômico, como relatam os trabalhos de TENGERDY (1998), para produção de celulasas, e de CASTILHO et al. (2000b), para a produção de lipases. Em ambos os casos, nos quais foram utilizados resíduos agroindustriais como substrato, a obtenção das enzimas por FES, quando comparada com a FSm, apresentou significativa redução dos custos, o que foi atribuído, principalmente, ao baixo valor econômico do substrato utilizado.

De acordo com MADAMWAR & PATEL (1992) uma das maiores motivações para os estudos que visam a obtenção de enzimas por FES é que, neste caso, obtém-se uma

maior atividade enzimática por unidade de volume, o que favorece, consideravelmente, os processos de purificação, que representam um custo significativo na produção enzimática.

Além disto, dados atuais mostram que a produção de enzimas por FES leva a obtenção de níveis de atividade superiores aos obtidos pelo cultivo submerso, além de se obter enzimas com propriedades funcionais mais adequadas às aplicações industriais (NIGAM & SINGH, 1994 ; MITCHELL et al., 2000a). Estes fatos estão atestados nos trabalhos de KALOGERIS et al. (1998) e SOUZA et al. (1999), para a produção de xilanases, RAO et al. (1983), MENEZES & HENNIES (1994), GUTIERREZ-CORREA & TENDERDY (1998) e TSAO et al. (2000), para a produção de celulasas, REDDY et al. (2000), para a produção de pululanase, CASTILHO et al. (2000b) e PALMA et al. (2000), para a produção de lipases, NANDAKUMAR et al. (1999), para a produção de amilases, HOURS & SAKAI (1994), para a produção de protopectinases, FENICE et al. (2003), para a produção de lacase e Mn-peroxidase.

Muitas enzimas, produzidas por cultivo em estado sólido, têm apresentado propriedades diferentes daquelas que foram obtidas por FSm, como maior termoestabilidade e resistência ao pH. ZHENG & SHETT (2000), por exemplo, mostraram que a produção de pectinases por FES, a partir de resíduos das indústrias que processam frutas, levou a obtenção de enzimas com características de resistência a valores de pH ideais para aplicação industrial. Os autores ressaltam que, o pH naturalmente ácido dos substratos, levou a este resultado.

HOURS & SAKAI (1994) e PANDEY (2003) relatam que ainda não existem métodos eficazes para a comparação entre níveis de produtividade obtidos em FES e FSm. Portanto, segundo estes trabalhos, a exata razão para o aumento dos níveis de atividade enzimática nos cultivos em meio sólido não é totalmente conhecida, mas o fato de que este cultivo aproxima-se muito do ambiente natural de crescimento dos microrganismos explica, em parte, as diferenças constatadas.

2.2.1 Fermentação em estado sólido (FES)

2.2.1.1 Definição e histórico

O cultivo de microrganismos em meio sólido pode ser definido de várias maneiras mas, de uma forma geral, pode-se afirmar que FES é o processo que envolve o crescimento de microrganismos, em partículas sólidas úmidas, na ausência de água no

estado líquido visível entre estas (MITCHELL et al., 2000a ; PANDEY, 2003). Outras definições mais detalhadas descrevem a FES como uma técnica de crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida) na qual o conteúdo de líquido contido na matriz sólida deve ser mantido em valores de atividade de água que assegure o conveniente crescimento e metabolismo celular, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz (DURAND et al., 1993 ; BRAMORSKI et al., 1998). A matriz sólida pode ser classificada em duas categorias: 1) as partículas são, ao mesmo tempo, suporte e substrato (materiais orgânicos e lignocelulósicos) ; 2) a matriz sólida é apenas um suporte e deve ser acrescida de nutrientes (DURAND, et al., 1993). Outra definição para FES a descreve como a técnica de crescimento de microrganismos em meio com ausência de água livre, ou seja, ausência de água não retida no substrato sólido, simulando processos biológicos que ocorrem na natureza como degradação da madeira, compostagem e crescimento de fungos em alimentos (LONSANE et al., 1991; RAMANA MURTHY et al., 1993).

Desde o início da história o homem tem feito uso de microrganismos para seu benefício, mesmo não compreendendo os fenômenos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nas transformações. Dentro deste contexto, os processos de FES, representam um importante papel, pois sabe-se que várias formas de alimentos, utilizando esse cultivo microbiano, fazem parte da dieta dos povos dos países Orientais, Asiáticos e Africanos, há muitos séculos (NIGAM & SINGH, 1994 ; DEL BIANCHI et al., 2001). A utilização dos princípios da FES para a produção de alimentos está relatada desde o ano 1000 a. C., na China, onde se tem notícia da produção de molho de soja. No ano 500 a.C., também os chineses, iniciaram a produção de “Chiang”, um alimento similar ao “miso”, que é obtido a partir da FES. É interessante observar que aspectos religiosos impulsionaram a prática da FES nos países orientais, uma vez que o budismo, introduzido na China no século 4 a.C. e no Japão no século 5 a.C., proíbe o uso da carne, incentivando, assim, a utilização de vegetais, destacando-se o arroz, a soja e o amendoim. Até o século 18, a preparação dos alimentos fermentados nos países orientais limitava-se a produções familiares, o que, no entanto, foi a base para grandes indústrias deste gênero, que existem hoje no Oriente (CANNEL & MOO-YOUNG, 1980 ; RAMANA MURTHY et al., 1983 ; NIGAM & SINGH, 1994). Dentre a variedade de alimentos e bebidas provenientes dos países Orientais tais como “chiang sufu”, “ontjom”, “tape ketan”, “sake”, dentre outros, os mais populares são o molho de soja, o “miso” e o “tempeh”, que, hoje, são produzidos, em larga escala, por indústrias de fermentação totalmente

automatizadas. O “koji” é um dos processos fermentativos mais executados na China, no Japão e no sudeste da Ásia, podendo ser considerada a técnica precursora da FES. Diversos materiais amiláceos podem ser usados na produção do “koji” mas, pela tradição da cultura japonesa, utiliza-se arroz cozido, inoculado com esporos de *Aspergillus oryzae* (CANNEL & MOO-YOUNG, 1980 ; NIGAM & SINGH, 1994 ; MITCHELL, et al., 2000a).

A introdução dos processos de FES, no Ocidente, aparece relatada em 1891, nos Estados Unidos, com um produto semelhante ao “koji”, no qual utilizou-se, no entanto, farelo de trigo para a sua preparação. Este produto recebeu o nome de “Taka-Koji”, em função do nome do pesquisador que o desenvolveu, Takamine. O processo foi levado à escala industrial, fazendo uso, para isto, de reatores de tambor rotativo e foi utilizado, em 1913, no Canadá, para substituição do malte na indústria de destilados (CANNEL & MOO-YOUNG, 1980). No entanto, a produção de queijos maturados com fungos como Roquefort, Camembert e Brie, nos países Ocidentais, faz uso da tecnologia da FES e é relatada, desde a antiguidade, assim como os processos de ensilagem e compostagem (NIGAM & SINGH, 1994 ; MITCHELL et al., 2000a). Sobre este fato CANNEL & MOO-YOUNG (1980) relatam a existência de três processos que fazem uso da FES dos quais se têm dados históricos e que, ainda hoje, são executados:: 1) produção de alimentos orientais fermentados; 2) produção de queijos maturados com fungos; 3) processos de compostagem.

A partir de 1940, os países ocidentais direcionaram seus esforços para o desenvolvimento e aprimoramento dos processos de FSm, dando pouca ou nenhuma importância à FES. Depois da 2ª Guerra Mundial, os processos de FSm tornaram-se muito conhecidos, impulsionados pelo sucesso na fabricação de penicilina, tornando-se modelos tecnológicos para a produção de qualquer composto por fermentação. Assim, o progresso no desenvolvimento da tecnologia de FSm levou a uma estagnação de FES nos países ocidentais. Alguns trabalhos isolados, fazendo uso da FES, foram feitos entre 1950 e 1960, objetivando a transformação de esteróides por culturas de fungos, e entre 1960 e 1970, para a produção de micotoxinas. No entanto, foi o enriquecimento protéico de rações animais a principal atividade que motivou a utilização da FES nos países Ocidentais após 1940, pois tratava-se de um processo que permitia a utilização de resíduos agroindustriais, agregando valor a um material de baixo custo e, em alguns casos, minimizando a poluição causada por estes resíduos (PANDEY, 2003). Este aspecto, característico da FES, é de interesse global e, devido a isto, há um contínuo

aumento do número de estudos relativos a este processo, que teve um grande avanço na última década.

2.2.1.2 Aplicações da FES

Embora a FES tenha sido desenvolvida para a manufatura de produtos tradicionais, como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação, atualmente, tem se estendido as indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos como enzimas, ácidos orgânicos, etanol, biogás, antibióticos, surfactantes, toxinas, agentes de bioremediação, cogumelos comestíveis, polissacarídeos microbianos, biopesticidas, enriquecimento protéico de alimentos fermentados, pré-digestão de rações animais, e variações dos tradicionais alimentos fermentados (MITCHELL et al., 2000a ; PANDEY et al., 2000a ; PANDEY, 2003). De uma forma geral, a aplicação comercial dos processos de FES podem ser divididos em dois tipos: 1) aplicações sócio-econômicas como compostagem de resíduos, ensilagem e aproveitamento de resíduos agroindustriais ; 2) aplicações lucrativas, economicamente, como produção de enzimas, ácidos orgânicos e alimentos fermentados (RAMANA MURTHY et al., 1993 ; MITCHELL, et al., 2000a).

Algumas aplicações da tecnologia da FES, para obtenção de insumos de valor industrial, já se encontram em níveis de grande escala como a produção de ácido cítrico, que está sendo feita, comercialmente, na Tailândia e na Indonésia, utilizando-se recursos naturais como substratos (LU et al., 1995). Recentemente, o Alltech's European Bioscience Center iniciou a produção, em larga escala, no México, da enzima fitase, também utilizando tecnologia baseada na FES (PANDEY et al. , 2000a),

Uma inovadora aplicação da FES foi estudada por NIGAM et al. (2000) e trata-se do uso deste tipo de cultivo como complementação do processo de descoloração dos efluentes da indústria têxtil. Neste trabalho, resíduos agroindustriais, como farelo de trigo e sabugo de milho, foram usados para adsorver corantes, usados na indústria têxtil. Após a adsorção, estes foram usados como substratos para FES, usando os fungos *Phanerochaete chrysosporium* e *Coriolus versicolor*. Os autores concluíram que a presença dos corantes não inibiu o crescimento e houve aumento do teor protéico dos resíduos em todos os cultivos, paralelo a descoloração do substrato. Este processo apresenta uma série de vantagens, pois a FES pode ser adequada aos grandes volumes

de efluentes gerados nas indústrias e a água resultante do tratamento pode ser reutilizada pela indústria, em processos específicos.

O Quadro 1 mostra alguns exemplos de recentes aplicações da FES, com os respectivos substratos e microrganismos utilizados.

Quadro 1 – Exemplos de aplicações da FES

Produto	Microrganismo	Substrato	Referência
Enzimas			
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	NANDAKUMAR et al., 1999
	<i>Rhizopus</i>	Bagaço de mandioca	SOCCOL et al., 1994
L-Asparaginase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Soja	ABDEL-FATTAH & OLAMA, 2002
β -Galactosidase		Farelo de trigo	MORAES, 1999
Endoglucanase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	JECU, 2000
Glicoamilase e xilanase	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i>	Bagaço de mandioca	DALSENTER, 2000
Poligalacturonase, celulase, xilanase e protease	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo e Casca de Manga	COURI et al., 2000
Lipase	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu e complementos	PALMA et al., 2000
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Farelo de trigo	ul-HAQ et al., 2002
Lacase e Mn-Peroxidase	<i>Panus tigrinus</i>	Sabugo de milho e resíduo da extração de óleo de oliva	FENICE et al., 2003
Pectinases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo	CASTILHO et al., 2000a

Quadro 1 – continuação

Produto	Microrganismo	Substrato	Referência
Poligalacturonase	<i>Lentinus edodes</i>	Bagaço de maçã e morango	ZHENG & SHETTY, 2000
Protease ácida	<i>Neosartorya fischeri</i>	Farelo de trigo	WU & HANG, 2000
Pululanase	<i>Clostridium thermosulfurogen</i>	Farelo de trigo	REDDY et al., 2000
Xilanase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Bagaço de cana de açúcar	SOUZA et al., 1999
Metabólitos secundários			
Aromas	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Borra de café	SOARES et al., 2000
	<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Bagaço de mandioca	BRAMORSKI et al., 1998
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bagaço de cana de açúcar	DOMINGUEZ et al., 2000
Ácido giberélico	<i>Gibberella fujikoroii</i>	Farelo de trigo	BANDELIER et al., 1997
	<i>Gibberella fujikoroii</i>	Amberlite	GELMI et al., 2000
Ácido orgânico			
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de mandioca e bagaço de cana de açúcar	VANDENBERGHE et al., 2000
Outros produtos			
Matéria-prima para polpas	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Farelo de trigo submetido a “steam-explosion”	CHEN et al., 2002
Quitosana	<i>Gongronella butleri</i>	Batata doce	NWE et al., 2002
Biomassa			
Esporos do fungo	<i>Verticillium lecanii</i>	Farelo de arroz	FENG et al., 2000

Quadro 1 – continuação

Produto	Microrganismo	Substrato	Referência
Processos			
Biodegradação da madeira	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	Cavacos de eucalipto (<i>Eucalyptus grandis</i>)	FERRAZ et al., 2003
	<i>Laetiporeus sulfureus</i> <i>Wolfiporia cocos</i> , <i>Poria medula-panis</i> , <i>Pycnoporus coccineus</i> , <i>Phlebia tremellosa</i> e <i>Trametes versicolor</i>	Cavacos de eucalipto (<i>Eucalyptus grandis</i>)	MACHUCA & FERRAZ, 2001
Delignificação	<i>Trichoderma spp.</i>	Resíduo do processamento de óleo de oliva	HADDADIN et al., 1999
Detoxificação	<i>Rhizopus</i> , <i>Phanerochaete</i> e <i>Aspergillus</i>	Borra de café	BRAND et al., 2000
Enriquecimento nutricional de ração animal	<i>Penicillium decumbens</i>	Palha de milho	YANG et al., 2001

2.2.1.3 Principais características

Caracterizar a FES, via de regra, leva a uma comparação com a FSm, para uma melhor compreensão do processo. Segundo MITCHEL et al. (2000a) a principal diferença entre FSm e FES diz respeito a quantidade de água livre presente no substrato. RAMANA MURTHY et al. (1993) descrevem que a diferença entre os dois bioprocessos refere-se a utilização, na FES, do substrato sólido úmido, o qual é insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, ao contrário da FSm, onde se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido. Já GERVAIS & MOLIN (2003) relatam que a principal diferença entre a FSm e FES está na capacidade de mistura dos sistemas. As FSm's são reações de mistura perfeita, onde, cada parte do reator contém, ao mesmo

tempo, a mesma quantidade de microrganismos, nutrientes e metabólitos. No entanto, nos cultivos em meio sólido, encontram-se sistemas com alta viscosidade, sendo que, para se chegar a uma homogeneidade, seria necessária uma excessiva agitação, o que levaria a ruptura celular. Assim, os autores concluem que os sistemas de cultivo em meio sólido caracterizam-se por serem meios heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de soluto.

Diversos autores, em suas revisões sobre FES, apresentam vantagens e desvantagens do processo em meio sólido. No entanto, é uma tarefa difícil generalizar vantagens relacionadas aos processos submersos, ou em estado sólido, sabendo-se que cada microrganismo pode melhor se adequar a um ou outro processo, bem como produzir complexos enzimáticos diferentes. Algumas diferenças entre os dois processos estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2: Algumas características dos processos de FES e FSm

<i>Fermentação em Estado Sólido (FES)</i>	<i>Fermentação Submersa (FSm)</i>
<ul style="list-style-type: none"> O meio de cultivo é simples, na maioria das vezes, natural. São usados, geralmente, resíduos agroindustriais. O único componente necessário a ser adicionado ao meio é água, embora, ocasionalmente, outros nutrientes como fonte de Nitrogênio ou minerais possam ser adicionados. 	<ul style="list-style-type: none"> Utiliza-se, normalmente, meios sintéticos, que são economicamente inviáveis quando se pensa no “scale-up” do processo.
<ul style="list-style-type: none"> Havendo necessidade de pré-tratamentos estes são simples mas podem modificar, negativamente, a estrutura do substrato. 	<ul style="list-style-type: none"> Utilizando-se meios complexos, os pré-tratamentos são indispensáveis para solubilizar os nutrientes.
<ul style="list-style-type: none"> O espaço ocupado pelo equipamento de fermentação é pequeno, considerando-se o rendimento do produto, e os meios sólidos de fermentação são concentrados, o que eleva a produtividade volumétrica. 	<ul style="list-style-type: none"> Os bioreatores ocupam grandes espaços e o substrato é muito diluído, levando a baixas produtividades volumétricas.

Quadro 2 - continuação

<i>Fermentação em Estado Sólido (FES)</i>	<i>Fermentação Submersa (FSm)</i>
<ul style="list-style-type: none"> Em muitos casos, não há necessidade de filtração pois o produto é concentrado no substrato e pode ser usado diretamente (ex: alimentos orientais). Havendo necessidade de extração do produto do substrato (ex: produção de enzimas) gasta-se muito menos solvente do que no processo submerso. No entanto, os extratos podem estar contaminados com componentes do substrato. 	<ul style="list-style-type: none"> Processos de “downstream” necessitam da remoção de grandes volumes de água, o que encarece, sobremaneira, o processo. No entanto, com meios e processos definidos, os protocolos de purificação podem ser simplificados.
<ul style="list-style-type: none"> Como a maioria das bactérias requerem altos níveis de atividade de água, a FES exclui, ou reduz sensivelmente, o problema da contaminação bacteriana. 	<ul style="list-style-type: none"> Trabalha-se com valores altos de atividade de água e isso propicia ambiente favorável para o crescimento de microrganismos contaminantes.
<ul style="list-style-type: none"> O resíduo remanescente possui um volume reduzido e não apresenta condições para o desenvolvimento de patógenos. 	<ul style="list-style-type: none"> Normalmente, grandes volumes de resíduos líquidos são gerados e estes ainda podem apresentar grande atividade biológica.
<ul style="list-style-type: none"> Utilizando-se altas concentrações de substrato pode-se obter altas concentrações de produtos. 	<ul style="list-style-type: none"> Altas concentrações de substratos podem causar problemas de natureza reológica e de repressão catabólica.

(AIDOO et al., 1982 ; LONSANE et al., 1991 ; NIGAM & SINGH, 1994 ; SMITS et al., 1998 ; MITCHELL et al., 2000a ; REDDY et al., 2000 ; ZHENG & SHETTY, 2000 ; GERVAIS & MOLIN, 2003).

O processo em estado sólido apresenta algumas limitações, que devem ser consideradas. Neste contexto, destaca-se que, em operações de grande escala, o calor gerado pelo metabolismo microbiano deve ser removido, o que torna-se mais difícil na FES, contrariamente a FSm, pois a grande quantidade de água presente no meio, facilita o controle da temperatura (LONSANE et al., 1991 ; RAMANA MURTHY et al., 1993). Além disto, a heterogeneidade da mistura na FES dificulta o controle do crescimento microbiano e de parâmetros como temperatura, pH, agitação, aeração e concentração de nutrientes e

produtos, o que torna muito complicado controlar e automatizar o processo (GERVAIS & MOLIN, 2003 ; PANDEY, 2003).

2.2.1.4 Fatores que afetam a FES

2.2.1.4.1 Microrganismo

O tipo de microrganismo que pode crescer e formar produtos, em FES's, é determinado, principalmente, pela atividade de água (A_w) do meio. De acordo com MITCHELL et al. (2000a) valores de a_w na ordem de 0,95 – 0,98 podem ser considerados típicos para os meios das FES's. Este nível de a_w é ideal para o crescimento de muitos fungos, especialmente os filamentosos, os quais, geralmente, possuem a condição ótima de crescimento em valores de A_w entre 0,96 e 0,98 no meio. Existem, ainda, situações em que fungos filamentosos suportam condições de a_w próximo a 0,90 para o seu crescimento. Como consequência, a maioria dos processos em meio sólido são conduzidos por fungos filamentosos, sendo mais comumente utilizados os Phicomycetos (*Mucor e Rhizopus*), Ascomycetos (*Aspergillus e Penicillium*) e Basidiomicetos (fungos da podridão branca) (PANDEY et al., 2000a).

NIGAM & SINGH (1994) enfatizam que os fungos filamentosos são os microrganismos de maior importância industrial usados em FES's, pois estes podem crescer naturalmente em frutas, grãos e resíduos agrícolas e florestais, sendo as condições de cultivo deste tipo de processo muito próximas as condições naturais de crescimento. Existem também outras características dos fungos filamentosos que os tornam mais atrativos para utilização na FES, como a facilidade de crescimento em meios com baixos valores de pH e a capacidade destes em produzir esporos, o que facilita o preparo do inóculo e a estocagem das células, na forma vegetativa, por longos períodos de tempo (MITCHELL et al., 2000a).

Bactérias e leveduras crescem em meios com a_w 's altos, na ordem de 0,99 e tem seu crescimento totalmente inibido em condições de a_w de 0,90. Por esta razão, existe um número menor de trabalhos, na literatura, enfocando a utilização destes microrganismos na condução de FES. Existem, entretanto, estudos recentes mostrando a utilização de leveduras para produção de etanol e para o enriquecimento protéico de substratos sólidos amiláceos (MITCHELL et al., 2000a). As bactérias são menos utilizadas

nos processo em estado sólido, mas PANDEY et al. (2000a) ressaltam que existem grandes potencialidades no seu uso para produção de enzimas, como inulinase, e produtos como o ácido glutâmico.

A reprodução dos fungos filamentosos pode acontecer pelos esporos, que são germinados, formando estruturas filamentosas chamadas hifas, cujo crescimento é limitado na sua porção terminal. É importante ressaltar que, um mesmo micélio, formado pelo conjunto das hifas, apresenta diferentes estágios fisiológicos, uma vez que as hifas próximas a extremidade, que apresentam crescimento, são mais jovens que as demais, localizadas no interior do micélio, onde não se detecta crescimento. Como as hifas de extremidade são proporcionalmente muito menores em relação a fração interna do micélio, pode-se dizer que a proporção de biomassa nova em relação à massa total diminui com o avanço da cultura (MOO-YOUNG et al., 1983). No entanto, dependendo do tipo de cultivo, o crescimento dos fungos filamentosos acontece de maneira diferenciada, sendo por fragmentação do micélio nas FSm's, e por crescimento radial nos cultivos em ágar.

Nas FES's o crescimento acontece pela extensão das pontas das hifas sobre a superfície sólida, sendo a direção e a velocidade do crescimento determinadas pela disponibilidade dos nutrientes, bem como pelas características do substrato (LONSANE et al., 1985). De acordo com NIGAM & SINGH (1994) as hifas crescem ao longo da superfície da partícula sólida úmida utilizando o filme líquido como fonte de umidade e nutrientes e os póros do substrato como espaço para o crescimento em busca de novos nutrientes.

BIESEBEKE et al. (2002) mostraram, em seu trabalho, uma representação do crescimento dos fungos filamentosos em FES, na qual são apresentadas dois tipos de hifas, assim denominadas: 1) hifas aéreas; 2) hifas penetrativas. As hifas aéreas aparecem sobre a interface ar-líquido e as hifas penetrativas estão em contato direto com o substrato. Segundo MITCHELL et al. (2000a), as hifas penetrativas podem desempenhar um importante papel na disponibilidade do substrato pois, na maioria das vezes, estes são polímeros insolúveis em água que precisam ser degradados em frações monoméricas, solúveis em água, para serem, então, consumidos pelos fungo. Portanto, esta degradação enzimática do substrato, pela fração penetrativa das hifas, é um fator determinante para o processo, pois, a partir daí, os fragmentos difundem-se até a superfície das partículas, sendo transformados, pela ação de outras enzimas, em compostos metabolizáveis.

As hifas aéreas parecem ser responsáveis pelo consumo do oxigênio, uma vez que esta fração do micélio não tem contato direto com o substrato, conforme atesta o estudo feito por BIESEBEKE et al. (2002), que compararam, sob os aspectos moleculares e fisiológicos, o crescimento de *Aspergillus oryzae* em FES e FSm. Além da descrição da função das partes das hifas, os autores constataram, ainda, que a formação de hifas aéreas ocorreu apenas no cultivo em estado sólido e que diferentes polióis foram acumulados no interior destas, durante o crescimento no estado sólido, possivelmente para efetuar o transporte de carbono.

A adesão dos fungos filamentosos às partículas do substrato, durante o crescimento nas FES's, segundo CORDOVA-LOPEZ et al. (1996), é uma importante propriedade deste microrganismos uma vez que favorece a absorção dos nutrientes. No entanto, esta forte ligação a uma matriz sólida implica na impossibilidade de separação entre o micélio e o substrato e, conseqüentemente, na determinação, de forma direta, da biomassa formada (LONSANE et al., 1985 ; MAIORANO et al., 1992 ; NIGAM & SINGH, 1994 ; MITCHELL et al., 2000a ; PANDEY et al., 2000a).

2.2.1.4.1.1 Medida da biomassa em FES

Como o conhecimento da quantidade de biomassa microbiana, bem como do perfil de seu aumento com o tempo, é fundamental em qualquer sistema fermentativo, seja em estudos de laboratório acerca do metabolismo e cinética microbiana, seja no monitoramento e controle de uma fermentação em nível industrial, existem vários métodos indiretos para dosagem de biomassa sendo utilizados nas FES's que se baseiam na medida de alguma atividade metabólica ou de algum componente específico da biomassa (LEKHA & LONSANE, 1994). No entanto, segundo OOIJKAAS et al. (1998) todos apresentam suas próprias limitações e, além disso, o conteúdo dos diferentes componentes celulares dos microrganismos, especialmente os fungos, pode mudar significativamente dependendo da espécie, condições de crescimento e idade da cultura. É importante ressaltar que, para representar o crescimento da biomassa, o indicador selecionado deve ser constante durante o crescimento do microrganismo e sob diferentes condições de cultivo (SCOTTI et al., 2001).

DEGRANDES et al. (1991) classificaram os métodos indiretos para determinação de biomassa na FES em:

- a) baseados nos constituintes celulares como glicosamina (SUGAMA & OKAZAKI, 1979 ; KALOGERIS et al., 1998 ; GELMI et al., 2000 ; NAGEL et al., 2000 ; PALMA et al., 2000 ; ROSENBLITT et al., 2000 ; SCOTTI et al., 2001 ; GELMI et al., 2002), ergosterol (OOIJKAAS et al., 1998 ; SANTOS, 2001), ácidos nucleicos (OOIJKAAS et al., 1998) e proteína (ORIOLO et al., 1988 ; CORDOVA-LOPEZ et al., 1996 , AGUILAR et al., 2001 ; FENICE et al., 2003) ;
- b) baseados na atividade biológica ; como ATP (SMITS et al., 1996) e consumo de oxigênio e/ou produção de CO₂ (SUGAMA & OKAZAKI, 1979 ; SATO et al., 1983 ; MAIORANO et al., 1992 ; SOCCOL, et al., 1994 ; SMITS et al., 1996 ; BERTOLIN, 1997 ; OOIJKAAS et al., 1998 ; DOMINGUEZ et al., 2000 ; NAGEL et al., 2000 ; OOSTRA et al., 2001 ; SANTOS, 2001).
- c) baseados no consumo de algum componente do meio (nutrientes) (LU et al., 1995 ; LU et al., 1998).

Recentemente, TEREbiznik & PILOsof (1999) e BORZANI (2000) propuseram modelos matemáticos que correlacionam a biomassa formada na FES com a taxa de variação de matéria seca no meio fermentado. Em ambos os trabalhos foram obtidos resultados satisfatórios, ressaltando a facilidade de operação da medida.

O método de dosagem do conteúdo de glicosamina tem por princípio a quantificação de um constituinte majoritário da parede celular dos fungos, a quitina, um polímero linear insolúvel, constituído por ligações α -1,4 de acetilglicosamina. O método de dosagem do monômero baseia-se na despolimerização da molécula de quitina, seguida pelo ensaio, por espectrofotometria, da quantidade de glicosamina liberada (RIDE & DRYSDALE, 1972 ; AIDOO et al., 1981 ; LEKHA & LONSANE, 1994).

Em seu trabalho experimental DEGRANGES et al. (1991) avaliaram o teor de biomassa pela análise da glicosamina como constituinte celular. A análise foi efetuada em duas etapas: hidrólise e extração. O principal problema, neste procedimento, segundo os autores, é a reprodutibilidade e a quantificação da glicosamina. Os dados mostraram que a glicosamina apresenta comportamento constante, mas a análise deste constituinte sofre influência do meio de cultivo. Assim, os autores afirmam que a glicosamina é um bom indicador do desenvolvimento da biomassa devendo ser usada, no entanto, para estudos que visem otimizar a concentração de nutrientes nos meios.

SCOTTI et al. (2001) estudaram a medida da glicosamina como método indireto para determinação do crescimento de *Cunninghamella elegans*, cultivada em FES, e concluíram que esta metodologia é adequada para a estimativa da biomassa fúngica. Os

autores constataram que o conteúdo de glicosamina manteve-se constante, independentemente da idade da cultura e das condições de cultivo, mas pareceu ser dependente da composição do meio de cultivo, em função da natureza da fonte de carbono.

Os trabalhos produzidos por GELMI et al. (2000) e GELMI et al. (2002) mostram a validade da dosagem de glicosamina como método indireto para a estimativa da biomassa microbiana de *Gibberella fujikoro*, na produção de ácido giberélico, por FES.

Mais recentemente, FENICE et al. (2003) utilizaram a medida de glicosamina para determinar a biomassa de *Panus tigrinus* no estudo comparativo da produção de lacase e Mn-peroxidase por FES e FSm e KALOGERIS et al. (1999b) e KALOGERIS et al. (2003) fizeram uso desta técnica para a determinação da biomassa de *Thermoascus aurantiacus* na produção de xilanases por FES.

O consumo de oxigênio, durante o metabolismo dos fungos aeróbios, está associado ao crescimento celular e tem sido utilizado para a estimativa de biomassa em FES. A medida do oxigênio é simples, rápida e pode ser feita diretamente no sistema fermentativo, utilizando-se um analisador de oxigênio paramagnético ou um cromatógrafo gasoso (DEGRANDES et al., 1991 ; LEKHA & LONSANE, 1994 ; TEREbiznik & PILOsoF, 1999). Entretanto, para a estimativa da biomassa, a partir destes dados, é necessário que se obtenha uma correlação matemática entre o consumo do oxigênio e a formação de biomassa. Alguns modelos foram propostos por SATO et al. (1983), SOCCOL et al. (1994) e GOUDAR & ELLIS (2001). Segundo TEREbiznik & PILOsoF (1990) métodos baseados na composição dos constituintes celulares dos fungos são utilizados para determinar a correlação nos modelos e, dentre estes, a medida de glicosamina é a mais utilizada. Os trabalhos de NAGEL et al. (2000) e ROSENBLITT et al. (2000) relatam dados positivos acerca desta associação na construção dos modelos. No estudo comparativo entre a determinação de biomassa de *Sporotrichum cellulophilum* pela medida de glicosamina e pela medida do consumo de oxigênio realizada por KIM et alii (1985) obteve-se uma boa correlação entre os dois parâmetros, o que confirma a adequação da associação destas duas metodologias indiretas de estimativa de biomassa em FES.

O consumo do oxigênio está relacionado ao crescimento celular e ao coeficiente de manutenção das células de acordo com a equação (1) abaixo, descrita por SATO et al. (1983):

$$\text{OUR} = \left(\frac{1}{Y_{x/o}}\right)\left(\frac{dX}{dt}\right) + m_o \cdot X \quad (1)$$

Onde:

OUR = velocidade de consumo de oxigênio (“oxygen uptake rate”)

$Y_{x/o}$ = coeficiente de conversão de oxigênio em biomassa

X = biomassa

t = tempo

m_o = coeficiente de consumo de oxigênio para manutenção celular

Para aplicação da Equação 1, na estimativa da biomassa formada em FES, os coeficientes $Y_{x/o}$ e m_o precisam ser constantes ao longo do crescimento, o que se torna uma limitação do método, uma vez que, muito frequentemente, este fato não é constatado, sendo determinado um valor para cada fase do crescimento celular (SATO et al., 1983). Ainda segundo os autores, alguns fatores que ocorrem durante a condução dos processos em meio sólido são responsáveis pela variação dos coeficientes, que são: a) distribuição não uniforme dos nutrientes e do consumo de diferentes fontes de carbono, nos diferentes estágios do crescimento; b) mudanças no ambiente (concentração de nutrientes, pH), as quais alteram os resultados do crescimento celular; c) mudanças fisiológicas no microrganismo.

2.2.1.4.2 Atividade de água e umidade

A atividade de água (A_w) e a umidade dos substratos sólidos são considerados parâmetros fundamentais para a transferência de massa (água e solutos) através das células microbianas (PANDEY et al., 2000a).

O nível de umidade adequado do substrato sólido é determinado pela natureza do material, pelo tipo de produto final desejado e pela necessidade do microrganismo (LONSANE et al., 1985). A umidificação dos substratos é, normalmente, feita colocando-se uma camada de líquido na superfície das partículas, em quantidade que não permita a formação de uma mistura fluida (NIGAM & SINGH, 1994). Portanto, a determinação da quantidade de líquido necessária para a manutenção da umidade do sistema é fundamental para o sucesso do processo pois, excesso de líquido no interior da matriz

sólida leva a redução da porosidade do leito diminuindo, assim, a difusão do oxigênio, além de propiciar um ambiente mais favorável à contaminação bacteriana e à formação de hifas aéreas. Por outro lado, baixos níveis de umidade no substrato podem prejudicar o crescimento microbiano, uma vez que a difusão dos solutos (nutrientes) e do gás (oxigênio) será comprometida, podendo levar a falta de nutrientes e ao acúmulo de metabólitos inibitórios do crescimento (LONSANE et al., 1985 ; GERVAIS & MOLIN, 2003).

Ao longo dos cultivos em meio sólido ocorre a evaporação da água devido ao calor gerado pelas atividades metabólicas do microrganismo. Sendo assim, a umidade inicial do substrato sólido, que varia de 30 a 80%, altera-se no curso do processo, devendo ser repostada, para a continuidade do mesmo. Pode-se, para isto, manter a umidade relativa do ambiente entre 90–97% ou, se as condições operacionais permitirem, adicionar ar umidificado ao longo do reator, bem como instalar umidificadores no sistema fermentativo. Havendo condições, poderá se adicionar água estéril ao sistema, em intervalos de tempo pré-estabelecidos (LONSANE et al., 1985).

Alguns trabalhos, utilizando a ferramenta do planejamento experimental, mostraram que, dentre os fatores avaliados, a umidade do substrato apresentou-se como variável de grande relevância para a produção enzimática, como é o caso do trabalho de WU & HANG (2000), para a produção de proteases ácidas por *Neosartorya fischeri*, em farelo de trigo, e de RIDDER et al. (1999) e de SOUZA et al. (1999) que estudaram a produção de xilanases por *Trichoderma longibrachiatum*, em farelo de trigo e *Thermoascus aurantiacus*, em bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente.

BISWAS et al. (1988) ressaltam que o controle da biosíntese de enzimas em cultivos no estado sólido parece estar relacionado, dentre outros fatores, com a umidade do substrato. Em função desta importância significativa da umidade dos substratos sólidos, estudos vêm sendo realizados para verificar o efeito e o valor ótimo da umidade inicial do substrato para o crescimento celular e a produção de metabólitos como celulase de *Pestalotiopsis versicolor* (RAO et al., 1983) e pectinases e ácido cítrico de *Aspergillus niger* (LU et al., 1995 ; CASTILHO et al., 2000a ; ROUKAS, 2000).

A influência do teor de umidade do substrato sobre a produção de esporos, por FES, também está relatada na literatura. FENG et al. (2000) observaram que, para a produção de esporos de *Verticillium lecani* em FES, a partir de arroz, tanto a utilização de meios com baixa umidade (100 g arroz cozido/10 mL de água), quanto a utilização de meios muito úmidos (100 g de arroz cozido/110 mL de água) levaram a uma produção

inferior de esporos quando comparada com a produção obtida no meio considerado com umidade ótima pelos autores (100 g de arroz cozido/50 ml de água), no qual foi obtida uma quantidade de esporos dez vezes maior.

A produção de xilanase por FES é também influenciada pelo nível de umidade do substrato sólido, de acordo com o relato de alguns autores. GESSESSE & MANO (1999) obtiveram, em seu trabalho, a maior atividade de xilanase (700 U/g) de *Bacillus* sp. quando foram utilizadas relações entre peso/volume de farelo de trigo e agente umidificador na ordem de 0,5 a 1,5. Observou-se que, o aumento no nível de umidade do meio (até a relação (p/v) farelo de trigo: agente umidificador de 4,5), levou à diminuição da produtividade enzimática, obtendo-se valores 50% inferiores ao máximo produzido. GAWANDE & KAMAT (1999) estudaram os efeitos do nível de umidade do meio bem como do tipo de agente umidificador, na produção de xilanase por espécies de *Aspergillus* em FES, e concluíram que, variando-se a relação peso/volume entre farelo de trigo e agente umidificador de 1:1 até 1:7, o melhor resultado de atividade enzimática foi obtido no cultivo em meio com a relação de farelo/umidade de 1:5, independentemente da espécie utilizada. Resultado semelhante foi obtido por BEG et al. (2000) que, utilizando a relação substrato:umidade de 1:3 e 1:2,5 para farelo de trigo e polpa kraft de eucalipto, respectivamente, para produção de xilanase por *Streptomyces* sp. QG-11-3, em cultivo em estado sólido, alcançaram o máximo rendimento, em termos de produção de xilanase. FERREIRA et al. (1999) avaliaram o efeito da umidade, com valores entre 6- e 100% (p/V), utilizando diferentes substratos, sobre a produção da xilanase por *Aspergillus tamarii*, e verificaram que os melhores resultados, em termos de atividade de xilanase, foram obtidos nos cultivos contendo 86%, 80% e 75% de umidade em meios constituídos por farelo de trigo, sabugo de milho e bagaço de cana de açúcar, respectivamente. BISWAS et al. (1988) verificaram, no entanto, que o melhor nível de umidade do meio, para a produção de xilanase por *Aspergillus ochraceus* em FES, a partir de farelo de trigo foi 55% (p/V), o mesmo encontrado por RIDDER et al. (1999) para a produção de xilanase por *Trichoderma longibrachiatum* no mesmo substrato.

Para cada espécie de microrganismo utilizado, existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular, que pode não coincidir com o melhor valor para a produção enzimática. Esta constatação foi feita por NARAHARA et al. (1982) que estudaram o efeito da umidade do substrato sobre a atividade de proteases e amilases produzidas por *Aspergillus oryzae*. Os autores observaram que as atividades específicas diminuíram nos cultivos realizados com o substrato mais úmido, condição que, no entanto,

foi favorável ao crescimento microbiano. Desta forma, sugerem que processos com resultados semelhantes, é possível aumentar a atividade enzimática, desde que a umidade seja controlada em níveis altos, na fase de crescimento, para favorecer o microrganismo, e, na fase estacionária, seja levada a um nível mais baixo, adequado para a produção enzimática. Esta constatação é reforçada pelo trabalho de KIM et al. (1985) que observaram que o crescimento celular e a produção de celulase por *Trichoderma reesei* foram melhores quando o substrato sólido foi umedecido com 60 e 47%, respectivamente. Neste mesmo trabalho, os dados referentes ao crescimento celular e a produção de celulase por *Sporotrichum cellulophilum* mostraram que os valores ótimos foram obtidos nos ensaios realizados com 70% e 49%, respectivamente. Os autores concluem que há um valor de umidade ótimo para a produção de enzimas em substratos sólidos o qual, não necessariamente coincide com o valor correspondente para a obtenção da máxima concentração celular. Assim, o controle da umidade do sistema pode aumentar as produtividades enzimáticas nas FES's. HAN et al. (1987) confirmam esta conclusão mostrando, em seu trabalho que, a mínima umidade necessária para o crescimento de *Aspergillus ficuum* não é a mesma para produção de fitase, no cultivo em estado sólido, a partir de grãos de cereais e sementes de legumes. Os autores obtiveram que, para a produção da enzima, a umidade necessária esteve entre 25 e 35%, enquanto para o crescimento microbiano os valores deveriam estar acima de 50%. Neste estudo, o nível da atividade de fitase foi sensivelmente reduzido quando o conteúdo de umidade do substrato excedeu os 40%, além de se observar que a faixa ótima de umidade para a produção da enzima (20 a 50%) foi muito mais estreita do que para o crescimento microbiano (maior que 50%). A explicação para estes resultados, segundo os autores, pode estar no fato de que, baixas umidades do substrato resultam em cultivos com extensa fase lag, havendo tempo suficiente para se alcançar valores máximos de produção enzimática.

O efeito da água nas FES's é melhor indicado pela atividade de água – A_w , que representa, efetivamente, a água disponível ao microrganismo (NARAHARA et al. , 1982 ; KIM et al., 1985 ; ORIOL et al. ,1988). Segundo RAMANA MURTHY et al. (1993) o valor de A_w fornece a quantidade de água não ligada ao substrato, disponível, portanto, ao microrganismo, no ambiente em que este se encontra. MITCHELL et al. (2000a) citam a definição de A_w dos substratos sólidos umedecidos como a relação entre a pressão de vapor da água sobre o substrato (fase gasosa), em um sistema fechado, e a pressão de vapor da água pura, à mesma temperatura. Seguindo esta definição, os autores colocam

que a A_w do substrato pode ser determinada dividindo-se a umidade relativa de equilíbrio por 100.

Os fatores que levam a diminuição da umidade do meio, ao longo dos cultivos em meio sólido, como evaporação da água e acúmulo de calor, levam, também, a redução do valor de A_w , que, além disto, pode ser reduzido em função da liberação de açúcares redutores, por reações enzimáticas, típicas do metabolismo celular (RAMANA MURTHY et al., 1983).

NARAHARA et al. (1982) mostraram que a velocidade de crescimento de *Aspergillus oryzae* no processo “koji” diminuiu com a diminuição da A_w , chegando a zero quando o valor de A_w do meio estava em 0,90.

ORIOLE et al. (1988) fizeram um estudo cinético do crescimento de *Aspergillus niger* em reator de coluna e observaram que, quando a A_w do meio diminui, o tempo para germinação dos esporos aumenta e a média da velocidade específica de crescimento celular diminui drasticamente.

HAN & NOUT (2000) avaliaram os efeitos da A_w sobre o crescimento de *Rhizopus microsporus* em meio sólido e concluíram que, dentre quatro valores de A_w testados, 0,995, 0,982, 0,97, e 0,96, o valor mais alto (0,995) foi o mais favorável. Ainda como resultado deste trabalho, os autores verificaram que não houve interação entre a composição gasosa do meio e a a_w do substrato nos resultados de crescimento celular obtidos, sendo as espécies testadas mais sensíveis às alterações na A_w do sistema. KIM et al. (1985) mostraram que, em A_w 's menores que 0,99, o crescimento celular de *Trichoderma reesei* foi reprimido, em todos os meios de cultivo testados, independentemente do depressor de A_w utilizado.

No entanto, GELMI et al. (2000), utilizando a medida da glicosamina para expressar o crescimento celular de *Gibberella fujikuroi* em suportes inertes, obtiveram que, valores de A_w mais moderados (0,992), foram mais favoráveis ao crescimento celular do que valores mais elevados (0,999).

Com relação a influência de A_w sobre a produção de enzimas, GrajeK e Gervais (1987), citados por GERVAIS & MOLIN (2003) constataram que, na produção de xilanase por *Trichoderma viride*, em cultivo em estado sólido, a atividade máxima foi obtida em A_w de 0,995, enquanto para a produção de outras enzimas, como β -glucosidase o melhor valor de A_w foi de 0,96 – 0,98. Avaliando também a influência de A_w na atividade de poligalacturonase, ou autores observaram que a atividade desta enzima sofreu forte inibição com a utilização de NaCl e sorbitol como depressores da atividade de água,

obtendo-se as mais elevadas atividades em meios acrescidos de glicerol, de forma a se obter A_w entre 0,99 e 1,0. Mais recentemente, LU et al. (2003) concluíram que a produção de xilanase por *Aspergillus sulphureus* por FES, em escala piloto, utilizando koji seco como meio, foi fortemente afetada pela atividade de água do meio. A melhor umidade do meio, para se atingir a produtividade enzimática máxima foi de 40-50%, o que, de acordo com os autores, corresponde a valores de a_w na faixa de 0,93 a 0,96.

2.2.1.4.3 Aeração e transferência de oxigênio

Nos processos fermentativos conduzidos em estado sólido, a interação dos fenômenos de transporte com as reações bioquímicas apresentam um efeito considerável nos resultados obtidos (GHILDYAL et al., 1994). Segundo HAN (1987) a aeração, na FES, é mais fácil que no processo submerso, desde que o projeto do reator seja apropriado para permitir livre acesso do O_2 atmosférico até o substrato. O autor especifica ainda que, como a solubilidade do oxigênio em água é muito baixa (0,0283%, a 25 °C), o suprimento de O_2 é o fator limitante no crescimento celular da FSm. Na FES, por sua vez, forma-se um filme de água sobre o substrato insolúvel, o que torna a difusão do O_2 , para água, mais rápida do que no processo submerso. Conseqüentemente, o nível de O_2 necessário para a FES é esperado ser menor do que na FSm. No entanto, de acordo com LONSANE et al. (1991), o problema com a difusão de O_2 , na FES, resume-se à transferência do gás entre as partículas

O microrganismo pode conseguir O_2 diretamente da atmosfera gasosa, o que, segundo RAMANA MURTHY et al. (1993), seria uma situação ideal para o crescimento. No entanto, qualquer que seja a forma de transporte de O_2 , observa-se que a velocidade de transferência na FES é maior que na FSm (LONSANE et al., 1991).

A aeração, além da função principal de fornecimento de oxigênio, remove calor, CO_2 e outros compostos voláteis. Segundo DURAND et al. (1988), na FES, a aeração é necessária devido, basicamente, a três fatores: 1) para manter as condições aeróbias, pois a pressão parcial do O_2 e do CO_2 no gás são fatores críticos para o crescimento celular e formação do produto ; 2) para regular a temperatura do substrato, pois, em baixas condições de umidade, há dificuldades para transferência de calor e controle de temperatura ; 3) para regular o conteúdo de água do substrato durante o processo, que influencia o crescimento celular e o metabolismo do cultivo sólido.

Alguns trabalhos mostram a importância do controle da aeração nas FES's, ressaltando a influência do nível de aeração em variáveis que interferem no crescimento celular e na concentração dos metabólitos formados.

SARGANTANIS et al. (1993) verificaram os efeitos de variáveis ambientais na FES, visando a produção de proteínas. As variáveis estudadas foram: nível de aeração, umidade e temperatura do ar injetado e o coeficiente de transferência de calor entre a parede do reator e o ar, na incubadora. Os autores observaram que o nível de aeração e o coeficiente de transferência de calor têm efeitos significativos sobre o processo, afetando a morfologia do microrganismo, não sendo, no entanto, facilmente controlados. Os resultados obtidos ainda mostraram que o nível de aeração provocou variação no perfil do conteúdo de água, afetando a produção de biomassa e o consumo do substrato. Como uma das maiores dificuldades da FES é a remoção do calor gerado, devido a baixa condutividade térmica da matéria fermentada, o método do resfriamento evaporativo, injetando-se ar parcialmente saturado a baixa temperatura, segundo os autores, é um dos mais promissores.

GHILDYAL et al. (1994) verificaram o efeito da vazão da aeração no perfil de temperatura e na atividade de amiloglucosidase, em um processo fermentativo em estado sólido, conduzido em reator de coluna, pelo fungo *Aspergillus niger*. Neste trabalho, os autores determinaram a atividade enzimática e a temperatura, em diferentes pontos do leito, sob diferentes velocidades de aeração (5, 10, 15, 20 e 25 L/min). Observou-se que o gradiente de temperatura, causado pela resistência à transferência de calor, foi reduzido com o aumento da aeração, da mesma forma que houve aumento da atividade enzimática, nos processos conduzidos com maior nível de aeração. No entanto, os autores ressaltam que, aumentando-se a velocidade de aeração, para controlar a temperatura do reator e, conseqüentemente, aumentar a atividade enzimática, tem-se uma outra limitação, a evaporação da água, que prejudica o processo.

DOMÍNGUEZ et al. (2001) verificaram a influência da aeração na produção das enzimas ligninolíticas mangamês peroxidase e lignina peroxidase, no cultivo em estado sólido, conduzido em reator de tambor rotatório, a partir de suportes inertes, pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Os autores observaram que, alterando o nível de aeração de 0,5 para 1,0 vvm, a produção das enzimas aumentou cerca de três vezes, levando à conclusão que este é um parâmetro fundamental para este tipo de processo.

SHOJAOSADATI & BABAEIPOUR (2002) constataram, no entanto, que, para a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em reator de coluna, utilizando bagaço de

maçã como substrato, uma menor aeração foi mais favorável ao processo. No referido trabalho, foram testados três níveis de aeração, 0,8, 1,4 e 2,0 L/min, e a maior produção de ácido cítrico ocorreu no processo conduzido com nível de aeração de 0,8 L/min, possivelmente, segundo os autores, devido à formação de canais preferenciais no leito do reator.

KALOGERIS et al. (2003) utilizaram um reator de tambor rotativo, com agitação intermitente, para verificar a influência, dentre outros fatores, da temperatura e da umidade e do nível de aeração no biorreator, sobre a produção de hemicelulases e o crescimento celular de *Thermoascus aurantiacus*. Constatou-se que, tanto a formação de biomassa quanto a produção das enzimas, foram favorecidas nas condições de operação em que se utilizou altos níveis de aeração.

As operações normais, mais comuns em reatores de coluna, usadas para FES envolvem condições de aeração estáticas, a partir do fundo da coluna. Isto leva a um aumento da temperatura axial, que pode chegar a 20 °C a mais do que a temperatura do ar de entrada (RAMANA MURTHY et al., 1993).

Alguns trabalhos, que descrevem formas alternativas de aeração dos biorreatores aplicados a FES, visando a diminuição dos gradientes de temperatura e os problemas causados pela ruptura do micélio, encontram-se descritos na literatura. ASHLEY et al. (1999) utilizaram um modelo matemático para a transferência de calor axial com o objetivo de explorar duas estratégias de prevenção do aumento indesejável da temperatura, que compreenderam o fluxo reverso do ar, periodicamente, e a mistura do leito, de tempos em tempo, ao longo de toda a fermentação. Neste trabalho, foram feitas simulações para o crescimento de *Aspergillus niger* em substrato amiláceo, assumindo-se, na utilização do modelo, que o leito da coluna era largo o bastante para que a transferência de calor radial fosse desprezada. Os resultados mostraram que as estratégias utilizadas, vazão do ar de 0,0236 m/s e rotação de 10 – 60 vezes por hora, levaram a uma menor temperatura no interior da coluna, quando se comparou o processo com uma operação normal. Segundo os autores esse resultado deve-se a uma melhor distribuição do resfriamento da coluna, devido a ação conjunta do fluxo reverso de ar e da mistura periódica.

TSAO et al. (2000) estudaram um nova estratégia de operação de um reator de coluna para obtenção de celulasas por espécie de *Trichoderma*. Os autores utilizaram uma técnica descrita como “pressure pulsation” na qual provoca-se uma entrada forçada de ar, de forma que a pressão do sistema aumente e, conseqüentemente, o ar entre no

sistema poroso. Em seguida, uma válvula, na saída do reator, é aberta, provocando uma queda de pressão abrupta. Desta forma, o ar é expelido provocando um pulso (agitação) do meio poroso. De acordo com os autores, este procedimento, aliado a extração repetida da enzima, levou a um aumento de cerca de quatro vezes na produção.

FUJIAN et al. (2002), por sua vez, verificaram a influência de mudanças na dinâmica da aeração na produção de celulasas por *Penicillium decumbens*, em biorreator utilizando uma metodologia baseada na pulsação periódica de ar pressurizado no ambiente da fermentação. Este estudo demonstrou que, mudanças periódicas na dinâmica da aeração permitiram a não agregação do substrato, acelerando, conseqüentemente, o crescimento celular e aumentando o nível da atividade enzimática, que foi obtida em um menor período de fermentação. Os autores atribuíram estes resultados, em parte, a redução das forças de cisalhamento, o que manteve o micélio intacto. Esta mesma metodologia foi utilizada por HONGZHANG et al. (2002) no cultivo em estado sólido de *Bacillus thuringiensis* em um bioreator industrial, com capacidade de 70 m³. Constatou-se que as mudanças na dinâmica de aeração do processo aumentaram a transferência de massa e calor, bem como a porosidade do substrato, levando a obtenção de unidade de virulência de *Bacillus thuringiensis* superiores a 18.000 U/mg.

2.2.1.4.4 Temperatura e transferência de calor

As características térmicas dos materiais orgânicos e a baixa umidade presente nos sistemas de FES levam a dificuldades especiais na transferência de calor destes sistemas. Embora a FES seja uma alternativa para a maioria dos processos convencionais de fermentação líquida, o controle de temperatura, em grande escala, nas fermentações em estado sólido, é um difícil problema a ser resolvido (HASAN et al., 1998).

No início da fermentação, tanto a temperatura como a concentração de oxigênio, são os mesmos em qualquer ponto do leito. No entanto, com o progresso da fermentação, o oxigênio se difunde, permitindo que as reações metabólicas aconteçam, fato que, por sua vez, libera calor, o qual não é facilmente dissipado devido a baixa condutividade térmica do substrato e a dificuldades na condução através do leito da fermentação. Sendo assim, são formados gradientes de temperatura, e de concentração de oxigênio, que podem se tornar excessivos, dependendo dos parâmetros de controle do sistema. Podem

ser formadas zonas de alta temperatura, e baixa concentração de oxigênio, que afetam, negativamente, a produtividade em termos de formação de biomassa e metabólitos desejáveis (SAUCEDO-CASTAÑEDA et al., 1990).

Altas temperaturas, decorrentes da atividade metabólica dos microrganismos, especialmente com a respiração, durante o crescimento, afetam a germinação dos esporos, o crescimento celular e a formação de produtos, ao passo que temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento dos microrganismos e a outras reações bioquímicas (HASAN et al., 1998).

Um dos pontos limitantes no controle da transferência de calor na FES, é que as técnicas e conceitos usados para esta finalidade nas fermentações submersas não são facilmente adaptados para as fermentações conduzidas em meio sólido (RAMANA MURTHY et al., 1993 ; GHILDYAL et al. 1994). De acordo com SARGANTANIS et al. (1993) para remoção do calor gerado durante a FES, o método do resfriamento evaporativo, injetando-se ar parcialmente saturado, à baixa temperatura é um dos mais promissores.

NAGEL et al. (2000) propõem a utilização da agitação no biorreator, para remoção do calor gerado. O processo, no qual os autores avaliaram a viabilidade de utilização desta metodologia, foi o cultivo em estado sólido de *Aspergillus oryzae* em sementes de trigo. Constatou-se que a agitação contínua no reator foi eficiente no controle da temperatura, além de manter a homogeneidade do sistema. As taxas de respiração encontradas foram comparáveis às obtidas em sistemas isotérmicos, não agitados. Neste caso, a agitação não causou danos ao micélio, tampouco às partículas do substrato sólido, diminuindo a necessidade do resfriamento evaporativo, que pode vir a causar ressecamento do substrato, o que iria dificultar os cultivos em larga escala.

Conclusões semelhantes foram obtidas por OOSTRA et al. (2000) que estudaram a produção de esporos de *Coniothyrium minutans* por FES, em larga escala, verificando a diferença na dissipação do calor gerado, fazendo uso de reatores agitados ou não. Combinando testes em laboratório e simulações matemáticas, os autores verificaram que a taxa de calor metabólico, estimada a partir do consumo de oxigênio pelo microrganismo, em cultivo em frascos, foi de, aproximadamente, 500 Watts/m³ de leito. Além disto, conduzindo os processos em reatores de coluna, sem agitação, verificou-se que o resfriamento do leito, por condução na parede do reator, foi insuficiente, devido a largura do mesmo, o que provocou a formação de gradientes radiais de temperatura. Esperava-se chegar a um controle da temperatura, fazendo uso da aeração forçada, mas observou-

se que, paralelo a redução da temperatura, houve ressecamento de cerca de 30% do substrato, chegando-se a valores de a_w insuficientes para o desenvolvimento do microrganismo. As simulações matemáticas, feitas no trabalho, mostraram, ainda, que seria possível o resfriamento do leite sem a necessidade de velocidade de agitação muito pronunciada. Para avaliar o efeito da agitação na estrutura do microrganismo, foram realizados cultivos com agitação, verificando-se que os esporos de *Coniothyrium minutans* não se romperam. Sendo assim, pôde-se concluir que, dentre as duas possibilidades avaliadas para a remoção do calor em sistemas de grande escala, os reatores agitados apresentaram superioridade frente ao sistema de resfriamento evaporativo.

Assim como nos cultivos submersos, a temperatura inicial dos cultivos no estado sólido influencia a formação de diferentes produtos, especialmente as enzimas, conforme encontra-se relatado no trabalho de JECU (2000) para a produção de endoglucanase, de ul-HAQ et al. (2002), para a produção de lipases e de BISWAS *et alli* (1988), GAWANDE & KAMAT (1999) e LU et al. (2003), para a produção de xilanases.

2.2.1.4.5 pH

Embora o pH seja um fator relevante para a otimização dos processos em estado sólido (PANDEY, 2003) o controle e monitoramento deste parâmetro, durante as FES's, não é fácil de ser realizado.

Alguns eletrodos têm sido utilizados para medidas do pH diretamente da superfície do substrato sólido, mas a medida na suspensão aquosa ou no extrato, preparado a partir da amostra sólida, é o procedimento mais comum (MITCHELL et al., 2000a). Entretanto, de acordo com MUDGETT (1986) a forma da água nos substratos sólidos constitui um obstáculo para a medida do pH. Na maioria dos casos mede-se o pH após colocar, em suspensão, uma parte da amostra sólida em 3 a 4 partes de água. Este método permite medir o pH global, todavia não é totalmente representativo dos valores de pH nos micro ambientes, localizados no filme aquoso, onde se passam, na realidade, as reações bioquímicas. Sendo assim, a determinação exata do pH, em substratos sólidos é feita, com precisão, somente no início e no final do processo fermentativo. MITCHELL et al. (2000a) ressaltam que, devido a este fato, é impossível realizar um controle fino do pH em FES.

No entanto, como muitos substratos utilizados nos cultivos em estado sólido, apresentam boa capacidade tamponante, há uma menor necessidade do controle desta variável. É importante, todavia, que se faça um ajuste inicial no substrato sólido, geralmente na faixa entre 4,5 e 5,9, adicionando soluções-tampão ao líquido que irão, além disso, conferir a umidade ótima do meio (LONSANE et al., 1985).

Alguns trabalhos na literatura mostram o efeito da variação do pH inicial do substrato na produção de enzimas como endoglucanase (JECU, 2000), pululanase (REDDY et al., 2000) e lipases (ul-HAQ et al., 2002) e metabólitos como ácido cítrico e ácido glucônico (ROUKAS, 2000), determinando-se, pelos resultados obtidos, o pH ótimo para a formação do produto de interesse.

DURAND et al. (1988) ressaltam que a escolha do tampão ideal é um fator vital para o processo pois, para o tamponamento em algumas faixas de pH, é necessária a utilização de soluções-tampão orgânicas, que podem ser consumidas pelos microrganismos. Este fato foi observado pelos autores no crescimento de *Trichoderma viride* em cultivo em estado sólido, conduzido em um reator com capacidade para 2 Kg de matéria seca (polpa de beterraba). Com o consumo da solução tampão, como fonte de nitrogênio orgânico, o pH diminuiu para valores inferiores a 3,0 e, para não interromper o processo, foi necessária a aspersão de solução de uréia, em diferentes concentrações, durante as agitações manuais que foram feitas no reator. Assim, o pH do meio foi mantido em 3,8, obtendo-se valores extremos de 3,55 e 4,20.

2.2.1.4.6 Substrato

A seleção do substrato adequado para FES depende de uma série de fatores que incluem o custo e a viabilidade de uso (PANDEY et al., 2000a).

Os trabalhos que buscam o melhor substrato para os processos em meio sólido levam, na maioria das vezes, aos resíduos agroindustriais. Alguns autores ressaltam que o uso deste tipo de material, como substrato principal dos cultivos em meio sólido, caracteriza-se como a principal vantagem deste processo, haja visto o custo destes materiais, uma vez que são sub-produtos das indústrias de alimentos e de exploração florestal, e não têm aplicação prática compatível com o volume gerado (CASTILHO et al., 2000b ; SOARES et al., 2000). O uso destes resíduos, segundo PANDEY et al. (2000a),

é, também, um importante auxílio na resolução de problemas de poluição ambiental, causados pelo grande volume deste material que é gerado pelas indústrias.

Os materiais utilizados como substrato nos cultivos em meio sólido incluem produtos como arroz, mandioca, soja, beterraba, batata e batata doce (COCHET et al., 1988 ; LU et al., 1995 ; FENG et al., 2000 ; NWE et al., 2002 ; ABDEL-FATTAH et al., 2002) e resíduos da exploração destes produtos como farelos e palha de trigo e arroz (FENG et al., 2000 ; JECU, 2000 ; CASTILHO et al., 2000a ; BIESEBEKE et al., 2002 ; CHEN et al., 2002), casca de soja, milho e arroz (HAN, 1987 ; MADAMWAR et al., 1989 ; YANG et al., 2001), bagaço de mandioca (VANDENBERGHE et al., 2000 ; PALMA et al., 2002) e de cana-de-açúcar (SOUZA et al., 1999), resíduos da indústria de processamento do café (BRAND et al., 2000 ; SOARES et al., 2000), resíduos das indústrias processadoras de frutas como maçã, figo, morango e manga (BRAMORSKI et al., 1998 ; COURI et al., 2000 ; ROUKAS, 2000 ; ZHENG & SHETTY, 2000 ; SHOJAOSADATI & BABAEIPOUR, 2002), resíduos das indústrias extratoras de óleo como torta de oliva, torta de soja, torta de amendoim, torta de canola e torta de babaçu (HADDADIN et al., 1999 ; PALMA et al., 2000 ; FENICE et al., 2003).

Nas FES's, o substrato sólido não apenas fornece os nutrientes para os microrganismos mas também serve de suporte para o crescimento destes (PANDEY, 2002). Aqueles materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento celular são considerados substratos ideais. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes encontram-se em concentrações abaixo da mínima, sendo necessária a suplementação do meio (NIGAM & SINGH, 1994 ; PANDEY et al., 2000a).

Algumas situações requerem, ainda, que os substratos, principalmente os de origem lignocelulósica, sejam submetidos a pré-tratamentos (químicos ou mecânicos) para serem mais facilmente acessados pelos microrganismos (MITCHELL et al., 2000a ; PANDEY et al., 2000a).

O uso de substratos inertes nos processos de FES também está relatado na literatura (MADAMWAR et al., 1989 ; CÓRDOVA-LÓPEZ et al., 1996 ; GELMI et al., 2000 ; COUTO et al., 2001 ; DOMÍNGUEZ et al., 2001 ; GELMI et al., 2002). Os substratos inertes podem ser materiais sintéticos, como amberlite ou poliuretano, ou podem ser materiais naturais, como bagaço de cana-de-açúcar, tendo função única de suporte para o crescimento celular. De acordo com PANDEY et al. (2000a), a utilização destes materiais, nas FES's, torna-se atraente nos estudos cinéticos uma vez que, fazendo uso

de outros substratos, nestes estudos, encontram-se alguns problemas devido a natureza heterogênea de alguns compostos.

Embora muitos fatores relacionados aos substratos para FES tenham importância para o crescimento microbiano e a formação do produto de interesse, o tamanho da partícula e o nível de umidade e/ou a atividade de água do meio são considerados os mais críticos (MITCHELL et al., 2000a ; PANDEY et al., 2000a ; PANDEY, 2003).

Via de regra, partículas pequenas possuem uma maior área superficial para a utilização, pelo microrganismo, sendo uma propriedade desejável para as FES's. No entanto, partículas muito pequenas podem resultar em aglutinação do substrato, o que, conseqüentemente, interfere na aeração do sistema, bem como na utilização do oxigênio pelos microrganismos. Por outro lado, a utilização de partículas de tamanho maior leva a um aumento do espaço interpartículas, melhorando os processos relacionados a transferência do oxigênio, mas limitando a área superficial das partículas, onde ocorrem os processos de transferência de massa (nutrientes e umidade), vitais para o microrganismo (PANDEY et al., 2000a).

ORIOLE et al. (1988) verificaram que o tamanho da partícula foi um fator crítico para o crescimento de *Aspergillus niger* em bagaço de cana-de-açúcar. Os autores constataram que o aumento na granulometria do substrato levou a uma diminuição da velocidade do crescimento celular. A causa deste fato foi atribuída, pelos autores, a dificuldade na difusão interpartículas dos nutrientes, uma vez que constatou-se, microscopicamente, que o crescimento celular ocorreu apenas na superfície das partículas.

RIDDER et al. (1999) e DALSENTER (2000) obtiveram resultados semelhantes em cultivos em meio sólido para produção de xilanase e glicoamilase, respectivamente.

O mesmo resultado está relatado no trabalho de DAMASO et al. (2000) que, comparando a utilização de dois tamanhos de partícula (4,5 e 6,0 mm) de sabugo de milho na produção de endo-xilanases por *Thermomyces lanuginosus*, obtiveram a máxima produção enzimática nos cultivos realizados com substrato de menor granulometria.

2.2.1.4.6.1 Bagaço de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), também conhecida como aipim e macaxeira, é originária da América do Sul e constitui um dos principais alimentos

energéticos para cerca de 500 milhões de pessoas, sobretudo nos países em desenvolvimento (EMBRAPA, 2003). Os últimos dados extraídos do Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA), do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, disponibilizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2003a) revelam que a produção de mandioca no Brasil, em 2002, esteve na ordem de 23 milhões de toneladas, dando ao país, a posição de segundo maior produtor mundial de raiz de mandioca, atrás apenas da Nigéria, que produziu cerca de 34 milhões de toneladas.

Dentro deste panorama, a Região Sul destaca-se com 23,3% da produção nacional. De acordo com dados da Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2001-2002, do Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina – Instituto CEPA/SC (CEPA, 2003) as duas maiores regiões produtoras de mandioca no estado são o sul catarinense e o Alto Vale do Itajaí. A produção de raiz de mandioca, no estado, segundo os mesmos dados, em 2001, foi de 708.950 toneladas, sendo a região de Blumenau e Rio do Sul, responsáveis pela produção de 50.791 toneladas e 110.160 toneladas, respectivamente. Os mais recentes dados do IBGE, segundo o Instituto CEPA/SC (CEPA, 2003), apontam, no entanto, para uma redução na safra de mandioca em Santa Catarina em 2002, atingindo-se uma produção de 600.000 toneladas.

A principal importância da mandioca, como matéria prima industrial, é a de ser fonte de amido e seus derivados. Do total beneficiado, o processamento de farinha utiliza cerca de 30% da produção de raízes, enquanto a produção de amido atinge cerca de 25% do total (EMBRAPA, 2003).

A farinha é a principal forma de utilização da mandioca no Brasil. As farinhas que passam por torrefação, tais como farinha seca, farinha d'água ou farinha do Pará, são, geralmente, utilizadas no consumo direto à mesa, enquanto que as farinhas provenientes de raízes secas, farinha de raspa ou farinha de apara, têm fins mais diversificados como farinha alimentícia panificável, destinando-se também para massas, em mistura com a farinha de trigo, na composição de rações e de lama aquosa, para mineração do petróleo, na produção de álcool, adesivos e agentes ligantes e na indústria de fundições (EMBRAPA, 2003).

O amido ou fécula de mandioca, natural ou modificado, pode ser usado para diversos fins industriais como espessante, ligante ou estabilizante em diferentes segmentos da indústria de alimentos, nos processos de engomagem e acabamento, nas

indústrias têxteis, e para dar corpo e acabamento em vários produtos originários da indústria papelreira (ABAM, 2003 ; EMBRAPA, 2003).

Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2003b), o mercado mundial de amido de mandioca, liderado pela Tailândia, é de 980 milhões de toneladas e, embora a produção, no Brasil, alcance 750 mil toneladas, a exportação deste material ainda é pequena, chegando a valores próximos a 50 mil toneladas. Dentre as diversas aplicações do amido de mandioca, acima mencionadas, um destaque especial deve ser feito para o seu uso na indústria de celulose e papel, que está reduzindo os custos do setor em, até, 15%, com a substituição do amido de milho. O amido de mandioca está presente em mais de 90% dos papéis de impressão e o setor consome, atualmente, cerca de 90 mil toneladas, por ano, tendo-se a expectativa de chegar ao consumo de, até, 250.000 toneladas, ou seja, 25% da produção brasileira, até 2006. Os volumes de exportação do amido de mandioca atingidos em 2001, 50.000 toneladas, destinaram-se, principalmente, para Europa, América Latina, Estados Unidos e África do Sul (PANORAMA BRASIL, 2003).

De acordo com CEREDA (1994) o processamento da mandioca causa sérios problemas ambientais devido a geração de quantidades significativas de resíduos, que podem ser sólidos ou líquidos. Alguns dos resíduos sólidos são a casca marrom, entrecasca, descarte, crueira, fibra, bagaço e varredura. Os resíduos líquidos são constituídos pela manipueira e pela água de lavagem das raízes.

O bagaço, também conhecido por massa ou farelo, é composto pelo material fibroso da raiz, contendo parte do amido que não foi possível extrair no processamento (40–70%), sendo produzido na etapa de separação da fécula (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003). A Figura 2 mostra um esquema ilustrativo do processamento das raízes de mandioca para extração do amido.

Segundo SOCCOL & VANDENBERGHE (2003), o processamento de 250–300 toneladas de raízes frescas de mandioca resulta na geração de cerca de 280 toneladas de bagaço com 85% de umidade. Ainda, segundo os autores, a composição do bagaço de mandioca revela a ausência de cianida e um baixo conteúdo de nitrogênio (2,3%). No entanto, devido ao seu baixo teor de cinzas (1,44%), este resíduo oferece vantagens para aplicação biotecnológica, frente a outros, como farelo de arroz e farelo de trigo, que contém, respectivamente, 7,5 e 11% de teor de cinzas. A composição físico-química do bagaço de mandioca encontra-se descrita na Tabela 1.

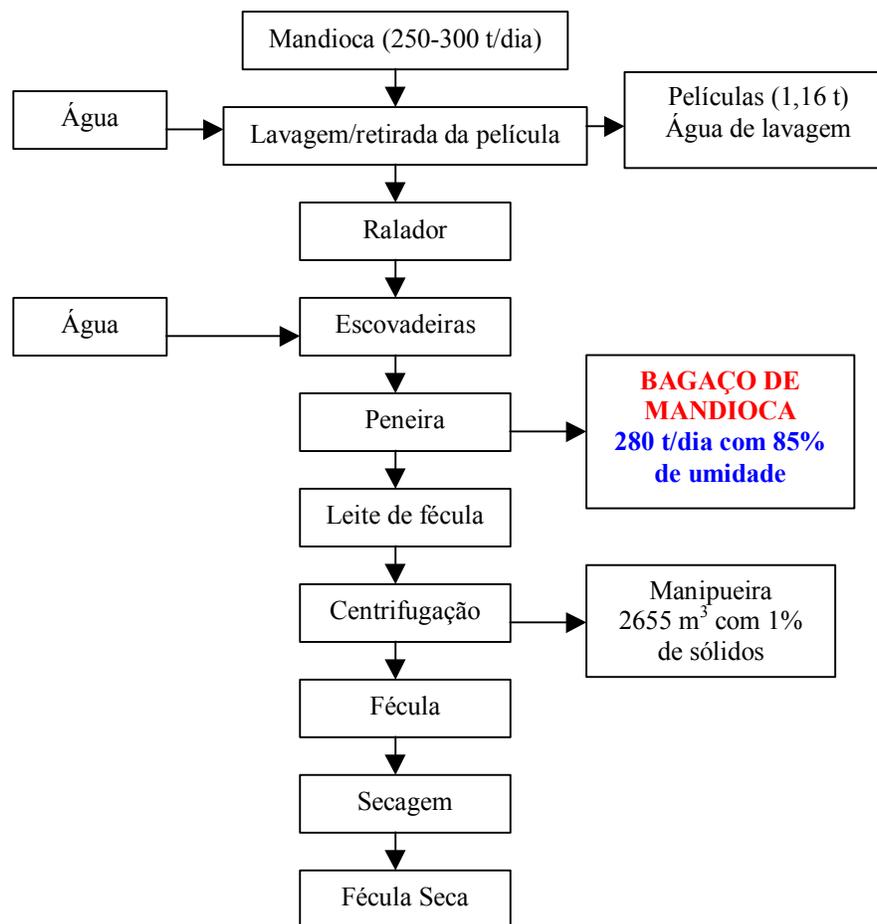


Figura 2 – Processo de obtenção do amido ou fécula de mandioca (Fonte: PANDEY et al., 2000b)

Tabela 1: Composição físico-química do bagaço de mandioca seco

Composição	CEREDA (1994)	BRAMORSKI et al. (1998)
Umidade (%)	9,52	13,91
Cinzas (g/100 g m.s.)	0,66	3,07
Lipídeos (g/100 g m.s.)	0,83	0,14
Proteínas (g/100 g m.s.)	0,32	1,56
Fibras (g/100 g m.s.)	14,88	42,04
Amido (g/100 g m.s.)	63,85	51,27

De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca (ABAM, 2003), existem muitas possibilidades de transformar os subprodutos e os resíduos da extração de amido em produtos nobres e de alto valor agregado. No Brasil, a utilização destes subprodutos é ainda irrisória. No entanto, no futuro, as empresas mais competitivas serão aquelas que valorizarem melhor estes subprodutos e resíduos, baixando custo na produção e aumentando a lucratividade e competitividade.

As aplicações biotecnológicas do bagaço de mandioca, particularmente em cultivos em meio sólido, incluem produção de etanol (JALEEL et al., 1988), amilases (SOCCOL et al., 1994), xilanases (DALSENER, 2000, PALMA et al., 2002), ácido cítrico (KOLICHESKI, 1995; VANDENBERGHE et al., 2000) e aromas (BRAMORSKI et al., 1998).

2.2.1.5 Produção de xilanases por FES

A produção de xilanases por FES vem sendo investigada visando avaliar, o efeito de diversos fatores sobre a produção enzimática, bem como buscar estratégias para a otimização da produção. A escolha do melhor substrato indutor de xilanase, o efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção da enzima, os efeitos da aw e umidade do meio, pH e temperatura do cultivo e a influência da aeração nos sistemas são as principais variáveis que influenciam na produção de xilanase por FES e que encontram-se descritas em muitos trabalhos (HALTRICH et al., 1996).

BISWAS et al. (1988) avaliaram a produção de xilanase e β -xilosidase por *Aspergillus ochraceus* no cultivo em meio sólido, a partir de resíduos lignocelulósicos (farelo de trigo, bagaço de cana de açúcar), verificando a eficiência da utilização destes, na forma natural ou submetidos a pré-tratamentos, como indutores da produção de xilanases. Pela avaliação feita pelos autores, os materiais testados foram considerados substitutos adequados à utilização de xilana pura.

A avaliação da produção de xilanases em FES a partir de diferentes resíduos, também foi feita por FERREIRA et al. (1999) utilizando *Aspergillus tamarii*. Foram observadas, neste trabalho, atividades de xilanase e β -xilosidase em todos os cultivos, independentemente do resíduo sólido utilizado (farelo de trigo, sabugo de milho e bagaço de cana de açúcar). Constatou-se, entretanto, que a produção de xilanase, nos cultivos

feitos em meios compostos por farelo de trigo, foi acompanhada da produção de proteases.

GAWANDE & KAMAT (1999), dentre a utilização de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo, palha de arroz e casca de soja, como substratos sólidos para produção de xilanase por *Aspergillus* sp, verificaram que o cultivo em farelo de trigo levou às mais elevadas atividades de xilanase. Os extratos provenientes deste cultivo foram avaliados, positivamente, na hidrólise de diferentes materiais de origem lignocelulósica, sendo possível a remoção seletiva da hemicelulose.

Outros resíduos agroindustriais como talo de trigo, bagaço de algodão, casca de avelã e serragem foram avaliados na produção de xilanase, em cultivo em meio sólido, por *Rhizopus oryzae*. Entretanto, a produção da enzima, nestes resíduos, segundo BAKIR et al. (2001), não foi superior ao encontrado no meio composto por farelo de trigo. A influência da Aw e da temperatura na síntese de xilanase por *Aspergillus sulphureus*, em um cultivo em estado sólido, em escala piloto, a partir de koji seco, foi recentemente avaliada por LU et al. (2003) mostrando que a produção da enzima foi fortemente influenciada pelas variáveis avaliadas. Atividade superior a 1000 U/g de koji seco foi alcançada quando a umidade e a temperatura foram adequadamente controladas, sendo esta atividade reduzida para 650 U/g, quando o processo foi conduzido sem controle.

A utilização de culturas mistas de microrganismos também é possível para produção de xilanase por FES. O trabalho de GUTIERREZ-CORREA & TENDERDY (1998), utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato, mostra bons resultados, em termos de atividade de xilanase (2600 – 2800 U/g de matéria seca), em um cultivo misto de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis*. Observou-se, ainda, neste trabalho, que a utilização de farelo de soja nos meios, como suplemento em termos de fonte de nitrogênio, favoreceu a produção de xilanase.

As melhores condições para a produção de xilanase por *Aspergillus terreus* em cultivo em estado sólido, a partir de farelo de trigo, foram definidas por GHANEM et al. (2000) utilizando o planejamento experimental Plackett-Burman. Os autores observaram que a melhor produção da enzima ocorreu em pH 7,0 e temperatura de 50 °C, nos frascos contendo 10 g de farelo de trigo, com umidade de 75%.

A otimização da produção de xilanase em FES, utilizando a metodologia da superfície de resposta, foi utilizada por NARANG et al. (2001) para o cultivo de *Melanocarpus albomyces* em farelo de trigo. Neste trabalho foram definidos os melhores níveis de algumas variáveis que afetam a produção de xilanase como umidade, tamanho

da partícula, idade do inóculo, tempo de cultivo, concentração e tipo da fonte de nitrogênio e de surfactante. Foi obtida boa correlação do modelo matemático, pois a máxima atividade de xilanase, com as condições otimizadas, foi de 7760 U/g de substrato seco, tendo o modelo previsto uma atividade de 7890 U/g.

RIDDER et al. (1999), também fazendo uso da metodologia de superfície de resposta para otimização do cultivo de *Trichoderma longibrachiatum* em farelo de trigo, avaliaram os efeitos da aeração, da umidade e da quantidade de substrato na produção de xilanase em reatores de bandeja e obtiveram atividades de 738 U/g e 556 U/g, quando foram utilizadas velocidade de aeração de 2,9 L/min/kg de farelo e umidade de 55%, respectivamente. A quantidade de substrato nas bandejas, segundo os autores, não teve efeito significativo sobre a produção de xilanase.

Tendo em vista os atrativos que a termoestabilidade oferece nas aplicações industriais de xilanases, vários trabalhos estão sendo feitos visando a produção de xilanases termoestáveis por bactérias como *Streptomyces* sp. (BEG et al., 2000) e diferentes espécies de fungos tais como *Thermomyces lanuginosus* (DAMASO et al., 2000 ; SINGH et al., 2000), *Thermoactinomyces thalophilus* (KOHLI et al., 2001) e *Thermoascus aurantiacus* (GOMES et al., 1994 ; SOUZA et al., 1999 ; KALOGERIS et al., 1998 ; KALOGERIS et al., 1999b ; KALOGERIS et al., 2003).

É importante ressaltar que alguns processos, em escala industrial, estão sendo realizados por várias empresas, visando a produção de xilanase por microrganismos, para diferentes aplicações industriais. HALTRICH et al. (1996) relatam, em sua revisão sobre a produção de xilanases por fungos, a produção industrial de xilanases fúngicas por quinze empresas, especificando a espécie utilizada, o tipo de cultivo, a atividade obtida e o modo de ensaio para obtenção da atividade, e as aplicações recomendáveis. Destas empresas, três, sendo duas de origem japonesa e uma alemã, utilizam o cultivo em estado sólido para a produção de xilanases. A “Amano Pharmaceutical Co. Ltda.”, de Nagaoya, no Japão, utiliza uma cepa de *Aspergillus niger* para a obtenção de xilanase recomendada para uso nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e de ração animal. A também japonesa “Seikagaku Corporation”, situada em Tokio, produz xilanase, em escala comercial, para ser empregada em estudos acerca da estrutura de carboidratos, utilizando cepa de *Trichoderma* sp. A empresa de origem alemã, “Stern-Enzym GmbH & Co. KG”, localizada em Ahrensburg, faz uso de *Trichoderma reesei* para obtenção de xilanase, por cultivo em estado sólido, e recomenda sua utilização nas indústrias de panificação, de ração animal e para hidrólise de resíduos vegetais.

2.2.1.5.1 Produção de xilanases por FES a partir de *Thermoascus aurantiacus*

Thermoascus aurantiacus, fungo pertencente ao grupo dos termófilos, é um ascomiceto, isolado, pela primeira vez, em 1907, por Hugo Míehe, a partir de pilhas de feno auto aquecidas, armazenadas em depósitos. A presença deste fungo foi constatada em diversos meios como plantas de tabaco, solo, cavacos de madeira, vagem de cacau, esterco de aves, efluentes, dentre outros (MACHUCA, 1991).

Estudos referentes a uma cepa brasileira, isolada de cavacos de eucalipto, foram feitos por AUER (1986), que encontrou, na referida cepa, características não usualmente verificadas nesta espécie, como, por exemplo, a capacidade de produção de fenol-oxidases. De acordo com o autor, a produção de enzimas altamente termoestáveis como xilanase, arabinofuranosidase, β -glucosidase, endoglucanase, exocelulase e amilase já foi detectada em diferentes cultivos de *Thermoascus aurantiacus*.

A produção de xilanase por este fungo está relatada no trabalho de ALAM et al. (1994) que avaliaram a utilização de bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, farelo de arroz, palha de arroz, serragem, polpa de papel sulfite e resíduo de juta como substratos para o cultivo em estado sólido. Dentre estes, a utilização do farelo de trigo levou a obtenção da mais elevada atividade de xilanase, 705,7 U/g, após sete dias de cultivo, tendo sido obtida, paralelamente, atividade de pectinase e celulase. A melhor umidade do meio para a produção de xilanase foi encontrada ser de 50% e a suplementação com 0,1% de Tween 80 mostrou-se eficiente para o processo. A caracterização da xilanase produzida nestas condições revelou que a enzima foi mais ativa à 70 °C e pH 5,0 e estável na faixa de pH de 5,0 a 11,0. Foi observado, ainda, que a xilanase de *Thermoascus aurantiacus* foi resistente a longos períodos de estocagem, havendo pouca redução da atividade, após incubação do extrato por um mês a 4 °C, e retenção de 90% da atividade após dez dias de incubação a 55 °C.

KALOGERIS et al. (1998) verificaram o aumento na atividade de xilanase em cultivo em estado sólido de *Thermoascus aurantiacus*, a partir de farelo de trigo, otimizando variáveis do processo como fonte de carbono e nitrogênio, tipo de inóculo, umidade do meio e tamanho da partícula. Os autores constataram que, sob estas condições otimizadas, o fungo produziu 6.193 U/g de substrato após sete dias de cultivo a 50 °C. A purificação dos extratos enzimáticos foi realizada, sendo encontradas duas xilanases (I e II) apresentando pl de 6,8 e 5,5, respectivamente. Ambas as enzimas tiveram atividade ótima em pH 4,0 - 4,5 e temperatura de 70 – 75 °C. Após incubação dos

extratos purificados a 85 °C, foram retidas 58% de atividade da xilanase I e 35% da xilanase II. Incubações feitas a 25 °C por 24 horas, em condições de pH de 3,0 a 10,0 revelaram que quase a totalidade da atividade da xilanase I foi retida entre pH 4,0 e 5,0, enquanto, para xilanase II, o mesmo aconteceu, porém entre pH 8,0 e 9,0. As duas enzimas apresentaram termoestabilidade a 80 °C, exibindo meia vida de 88 e 41 minutos, respectivamente.

Dando sequência a este trabalho KALOGERIS et al. (1999a) investigaram as propriedades bioquímicas e catalíticas da xilanase II, purificada no trabalho anteriormente citado, e obtiveram que esta apresenta uma massa molecular de 33.000 Da. Os resultados referentes à sua ação em diferentes polissacarídeos sugerem que esta endo-xilanase pertence a família 10. Esta classificação, segundo os autores, é conferida às endo-xilanases microbianas, baseando-se na sequência de aminoácidos que as compõem bem como na hidrofobicidade da enzima, podendo esta ser classificada como pertencente a família 10 ou a família 11. Endo-xilanases da família 10 exibem propriedades catalíticas mais versáteis sendo capazes de quebrar as ligações glicosídicas da cadeia principal da xilana em pontos próximos às ramificações de ácido metil-glucurônico, ácido acético e α -L-arabinofuranosídeo.

Continuando, ainda, este trabalho, a descrição das propriedades catalíticas e bioquímicas da xilanase I foram descritas por KALOGERIS et al. (2001). Esta endo-xilanase apresentou massa molecular de 33.000 Da e teve ação sobre O-acetil-4-O-metil-glucuronoxilana, liberando grandes quantidades de fragmentos acetilados e não acetilados. A enzima foi capaz de hidrolisar arabinoxilana à arabinose, xilose e xilobiose, o que, somado aos outros resultados obtidos no trabalho, sugere que a xilanase I de *Thermoascus aurantiacus*, similarmente à xilanase II, tem propriedades catalíticas que a classifica como pertencente à família 10.

SOUZA et al. (1999) verificaram a influência de fatores como umidade do meio, tempo de cultivo, concentração de inóculo e quantidade de substrato no cultivo em meio sólido, a partir de bagaço de cana de açúcar, para a produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus*. Para isto, os autores utilizaram a metodologia de superfície de resposta, encontrando que a umidade do meio e a quantidade de substrato no reator foram os fatores de maior influência sobre a produção de xilanase. Nas condições otimizadas para a produção da enzima, ou seja, 55% de umidade no meio e 17 g de bagaço de cana-de-açúcar nos frascos, obteve-se 2.700 U/g de massa seca inicial,

enquanto o valor previsto pelo modelo foi de 2.400 U/g, mostrando eficiência na correlação dos dados.

Mais recentemente, KALOGERIS et al. (2003) conduziram a produção de xilanase e outras hemicelulases, e também de celulases, em um reator projetado para o cultivo em meio sólido de fungos termofílicos. O processo foi conduzido com *Thermoascus aurantiacus* inoculado em meio constituído por farelo de trigo. Após avaliação e determinação das condições ótimas para o cultivo e operação do reator, incluindo umidade do meio, temperatura do cultivo e velocidade de aeração, foram obtidas 4.490 U de xilanase/g de farelo de trigo seco, sendo verificado, ainda, que há associação entre a produção da enzima e o crescimento microbiano.

2.3 Biorreatores para FES

Os biorreatores, nos processos fermentativos, devem criar um ambiente adequado para o crescimento e a atividade dos microrganismos. Para isto, o biorreator deve ser projetado de forma a impedir a entrada de substâncias estranhas ao ambiente, bem como permitir o estreito contato entre o meio e o microrganismo, ao longo de todo o cultivo. De uma maneira geral, um biorreator ideal deve ter as seguintes características: a) ser construído com material atóxico, sendo capaz de suportar altas pressões, para o caso das esterilizações; b) possuir um sistema de agitação e/ou aeração, bem como permitir a retirada periódica de amostra, sem comprometer o processo; c) possuir um mecanismo de resfriamento, de forma a controlar a temperatura do ambiente de reação; d) ser capaz de operar em condições assépticas (THIEMANN, 2001).

Os reatores, a serem utilizados nos cultivos em estado sólido, devem ser projetados levando-se em consideração, não apenas os aspectos gerais de operação, mas também as particularidades inerentes a este tipo de processo. A variedade de materiais que podem ser utilizados como suportes ao crescimento, e suas características como composição, tamanho, resistência mecânica, porosidade e capacidade de retenção de água, somados ao fato da baixa umidade do substrato, que confere problemas de transferência de calor ao sistema, devem ser levados em consideração no projeto e nas estratégias de controle de um reator que vai operar em um cultivo em estado sólido. A morfologia do fungo, no que diz respeito a presença de hifas septadas ou não (o que confere maior ou menor resistência mecânica à eventual agitação do meio), e a

necessidade, ou não, da esterilidade no processo são outros fatores que influenciam o projeto dos biorreatores para FES (DURAND, 2003).

DURAND et al. (1993) enfatizam que muitos problemas referentes a condução do processo em estado sólido podem ser minimizados, ou até mesmo, solucionados, pela escolha correta do reator. Estes autores classificam os reatores utilizados nos cultivos em estado sólido em: a) reatores sem agitação ; b) reatores com agitação ocasional ; c) reatores com agitação contínua ou rotação. Neste caso, para cada tipo, pode-se, ou não, trabalhar com aeração forçada. DURAND (2003) faz uma simples classificação destes biorreatores separando-os em: a) reatores em escala de laboratório, que permitem a utilização de poucas gramas ou, até mesmo, poucos kilos de matéria sólida seca ; b) reatores em escala piloto ou escala industrial, nos quais podem ser utilizados muitos kilos e, até, toneladas de material. Para o primeiro caso, segundo o autor, existe uma grande diversidade de configurações, mais ou menos sofisticadas, sendo mais comumente utilizados os reatores de bandeja, de leito fixo ou de coluna e de tambor rotativo, e suas variáveis, o que é confirmado nos trabalhos de PANDEY (1991) e RAMANA MURTHY et al. (1993).

Os reatores de bandeja são caracterizados por serem sistemas simples, nos quais o substrato é disposto sobre bandejas, de madeira ou aço inoxidável, normalmente perfuradas, para facilitar a convecção do ar. Podem, ainda, ser utilizadas bolsas plásticas microporosas para o acondicionamento do substrato a ser consumido. Neste tipo de biorreator não há aeração forçada nem agitação mecânica, o que implica no uso de finas camadas de sólidos para evitar o aquecimento metabólico do meio e manter as condições aeróbias (RAMANA MURTHY et al., 1993).

Os reatores de tambor são aqueles que se utilizam de agitação no processo. São, tradicionalmente, construídos na forma de tambor, podendo, ou não, conter chicanas em seu interior. Existem também os reatores de tambor estáticos, em que outros sistemas de agitação asseguram a mistura do meio sólido, como um vaso cilíndrico horizontal com uma rosca sem fim interna. A agitação, neste tipo de reator, pode ser contínua ou esporádica, podendo levar a problemas de cisalhamento e danificação da estrutura do micélio. (PANDEY, 1991 ; RAMANA MURTHY et al., 1993). Alguns exemplos de utilização deste tipo de reator encontram-se relatados nos trabalhos de DOMÍNGUEZ et al. (2001), para produção de enzimas ligninolíticas por *Phanerochaete chrysosporium*, de KALOGERIS et al. (1999b) e de KALOGERIS et al. (2003), para a produção de celulasas e hemicelulasas por *Thermoascus aurantiacus*.

Para aplicações, em nível industrial, dos cultivos em meio sólido, um número menor de configurações de reator encontra-se disponível, uma vez que, as dificuldades, normalmente encontradas para se operar um biorreator em FES, em pequena escala, alcançam grandes proporções, o que dificulta o controle, em escala maior. Dentre estas destacam-se: a) a remoção do calor gerado, em quantidades críticas de substrato sólido, o que restringe as estratégias de controle, pois pode haver compactação do meio sólido ou formação de canais preferencias, prejudicando, consideravelmente, a transferência de calor e massa ; b) a dificuldade na conciliação das propriedades do microrganismo, como resistência a destruição mecânica, necessidade de oxigênio e faixa ótima de temperatura para crescimento, pois, quando o fungo não é septado, há menor resistência a ruptura mecânica, o que restringe a opção para remoção do calor por agitação, o que também auxiliaria na melhor distribuição do oxigênio no meio ; c) as difíceis operações de inoculação e esterilização do substrato sólido em grandes quantidades, aliada a natureza deste material e a eventual necessidade de pré-tratamento do mesmo ; d) os custos de operação do processo, que dependem da economia do local de execução do processo ; e) dificuldades no manuseio do reator nas operações de enchimento, esvaziamento e limpeza (DURAND, 2003).

MITCHELL et al. (2002b), comparando a operação dos biorreatores em grande escala em FSm e FES, ressaltam que, apesar das metodologias para ampliação de escala nas FSm's estarem bem desenvolvidas, estas não podem ser aplicadas diretamente aos processo em estado sólido devido, principalmente, as diferenças na estrutura física dos sistemas, uma vez que, segundo os autores, a remoção de calor é o fator de maior consideração no projeto de um reator para operar em grande porte na FES, enquanto, para FSm aeróbicas, o fornecimento de oxigênio, normalmente, é o fator crítico de operação.

2.3.1 reatores de coluna utilizados em FES

Os reatores de coluna, dentre aqueles com aplicação em processos em meio sólido, são os mais estudados em escala laboratorial. A utilização dos reatores de coluna minimiza os problemas com os gradientes de temperatura, em função da convecção causada pelo ar que entra diretamente no reator. Além disso, o CO₂, liberado durante as reações metabólicas, pode ser eliminado, permitindo sua substituição pelo ar. O controle

da temperatura é feito pela colocação do reator em um banho termostatizado ou utilizando colunas encamisadas com circulação de líquido refrigerante (DURAND, 2003). Entretanto, a redução na porosidade do leito, com o progresso da fermentação, é um problema a ser contornado neste tipo de reator (RAMANA MURTHY et al., 1993 ; GHILDYAL et al., 1994 ; LU et al., 1998). GHILDYAL et al. (1994) ainda ressaltam que os reatores de coluna estão associados a baixa contaminação bacteriana pois são sistemas fechados, contrariamente aos reatores de bandeja. Além disso, o mesmo reator pode ser utilizado tanto para a fermentação, quanto para extração do produto final.

O Quadro 3 mostra alguns trabalhos encontrados na literatura, que descrevem a utilização dos biorreatores de coluna para diferentes processos em estado sólido.

Quadro 3 – Alguns exemplos da utilização de biorreatores de coluna em FES

Processo	Microrganismo	Referência
Produção de glicoamilase	<i>Aspergillus niger</i>	PANDEY & RADHAKRISHMAN (1992)
Estudo da influência dos gradientes gasoso e de temperatura na produção de glicoamilase	<i>Aspergillus niger</i>	GOWTHAMAN et al. (1993a)
Estudo dos efeitos do gradiente gasoso na atividade de glicoamilase	<i>Aspergillus niger</i>	GOWTHAMAN et al. (1993b)
Efeito do tamanho da partícula e do preenchimento do reator no crescimento do microrganismo	<i>Rhizopus oligosporus</i>	GUMBIRA-S'AID et al. (1993)
Determinação do k_La	<i>Aspergillus niger</i>	GOWTHAMAN et al. (1995)
Produção de ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	KOLICHESKI (1995)
Produção de glicoamilase	<i>Aspergillus niger</i>	PANDEY et al. (1996)

Quadro 3 - continuação

Processo	Microrganismo	Referência
Descrição de modelo matemático para transferência de calor e massa	<i>Aspergillus niger</i>	COSTA et al. (1998)
Produção de ácido cítrico em múltiplos reatores	<i>Aspergillus niger</i>	LU et al. (1998)
Estratégias para otimizar a transferência de calor	<i>Aspergillus niger</i>	ASHLEY et al. (1999)
Produção de xilanase	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	SOUZA (1998) ; SANTOS (2001)
Produção de β -galactosidase	<i>Scopulariopsis</i> sp.	MORAES (1999)
Produção de ácido cítrico em múltiplos reatores	<i>Aspergillus niger</i>	SHOJAOSADATI & BABAEIPOUR (2002)

Os reatores de coluna, conhecidos como “Sistema de Raimbault”, foram desenvolvidos para um processo de enriquecimento protéico de substrato sólido, na França, entre 1975 e 1980, sendo patenteado em 1976 (Raimbault & Germon, 1976, citados por DURAND, 2003). Este sistema é composto por pequenas colunas de 4 cm de diâmetro e 20 cm de altura, que são preenchidas com o meio sólido, previamente inoculado, e imersas em um banho com temperatura controlada. Cada coluna recebe ar saturado com água, do fundo para o topo da mesma (DE ARAUJO et al., 1997). De acordo com DURAND (2003), este sistema oferece a possibilidade de aerar o cultivo, permitindo, assim, analisar o metabolismo de respiração dos microrganismos, conectando-se, para isto, analisadores de gases às colunas. Ainda segundo o autor, este tipo de reator é convenientemente utilizado para estudos de avaliação e otimização da composição de meios, e para medidas de O₂ consumido e CO₂ produzidos. Além disto, devido ao uso de poucas gramas de meio sólido, e pela geometria das colunas, a temperatura do leito de fermentação consegue ser mantida com facilidade, pois a remoção do calor, pela parede da coluna, parece ser eficiente. A desvantagem deste tipo de reator diz respeito a impossibilidade de retirada de amostra diretamente da coluna, ao longo do cultivo, sendo necessária a amostragem destrutiva, retirando-se uma coluna, em cada intervalo determinado. Concluindo as suas considerações a respeito do Sistema de

Raimbault, o autor ressalta, ainda, que, devido as vantagens do baixo custo, da possibilidade de se efetuar a aeração forçada e da relativa facilidade de uso, este equipamento constitui um primeiro passo nos estudos relativos a FES. A Figura 3 ilustra o equipamento, que já foi utilizado nos trabalhos de KOLICHESKI (1995) e MORAES (1999), para a produção de ácido cítrico e β -glicosidase, respectivamente.

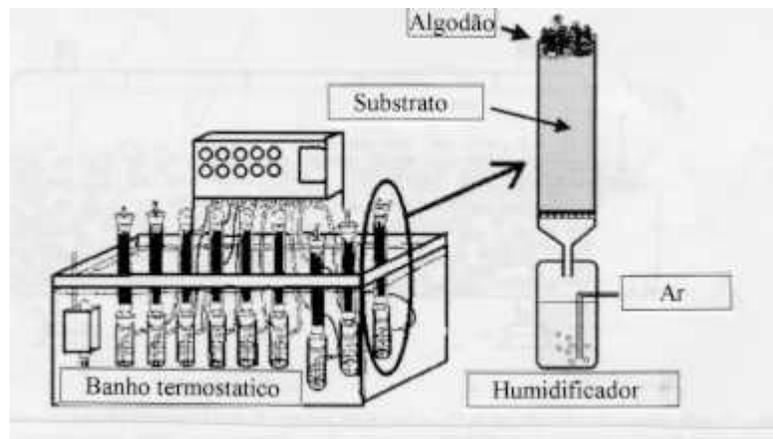


Figura 3 – Reatores de coluna denominados “Sistema de Raimbault” (Fonte: DURAND, 2003)

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Utilizou-se cepa pura de *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492, pertencente a classe dos ascomicetos, isolado de pilhas de cavacos de *Eucalyptus* sp., na indústria Champion Papel e Celulose Ltda, em Mogi Guaçu (AUER, 1986), que foi gentilmente cedida pelo Departamento de Biotecnologia da FAENQUIL, Lorena, SP.

3.2 Meios de cultura e manutenção do fungo

O meio de cultivo, para manutenção da cepa e obtenção de esporos de *Thermoascus aurantiacus*, foi composto por 2% (p/V) de ágar extrato de malte e 2% (p/V) de ágar-ágar, autoclavado por 15 minutos a 121 °C.

Para manutenção do microrganismo foi feito repique do fungo em tubos de ensaio contendo o meio de cultivo, que, posteriormente, foi incubado em estufa à 45 °C por 7 dias.

3.3 Obtenção da suspensão de esporos

Os esporos foram colhidos, assepticamente, em água estéril, dos tubos de ensaio contendo a cultura estoque, raspando-se a superfície do meio com alça de platina. Esta

suspensão foi filtrada, em gase estéril, e uma alíquota foi utilizada para contagem do número de esporos em Câmara de Neubauer. Os meios de fermentação foram inoculados, com a suspensão de esporos, de forma a se obter uma concentração padrão de 10^4 esporos/grama de substrato.

3.4 Resíduos utilizados para os cultivos em estado sólido

Os resíduos sólidos utilizados foram:

- Bagaço de mandioca, proveniente da Empresa Hercílio de Féculas Ltda. (Ibirama, SC), peneirado até a granulometria de 0,8 mm ;
- Farelo de arroz, proveniente da Indústria Roza Cereais Beneficiamento de Arroz (Massaranduba, SC).

3.4.1 Preparo dos meios para os cultivos em estado sólido

O meio de cultivo utilizado nas fermentações foi constituído pelos dois resíduos sólidos, bagaço de mandioca e farelo de arroz, sendo o primeiro, a fonte de carbono e o segundo, a fonte de nitrogênio orgânico. A fim de se avaliar a melhor combinação dos resíduos nos meios de cultivo, foram feitos, inicialmente, cultivos em frascos, onde efetuou-se a variação da quantidade de bagaço de mandioca e farelo de arroz nas seguintes proporções: 10:0 ; 9:1 ; 8:2 ; 7:3 ; 6:4 e 5:5. Em todas as composições avaliadas, foi acrescentado, ainda, 1% (p/p) de extrato de levedura com o objetivo de diminuir o tempo da fase lag. A composição do meio, que levou à obtenção das maiores atividades de xilanase nos frascos, foi utilizada nas fermentações conduzidas nos reatores de coluna.

3.5 Condições de cultivo em estado sólido

3.5.1 Ensaio em frascos

Os ensaios foram realizados em frascos de polipropileno (tipo bécher) de 600 mL contendo 10 g do meio sólido, com diferentes composições dos resíduos, conforme

descrito no ítem 3.4.1. Os frascos contendo os meios foram esterilizados a 121°C por 30 minutos. Após inoculação, com a suspensão de esporos, a umidade do meio de cultivo foi corrigida para 70%, com adição de água destilada estéril.

Os frascos foram cobertos com 6 camadas de gaze de algodão estéril, e incubados em estufa a 45 °C que foi revestida, internamente, com plástico e umidificada por 24 horas, antes do início do cultivo, a fim de minimizar a perda de umidade do meio, devido a elevada temperatura de cultivo. A estufa (QUIMIS, modelo 316.24) foi mantida com injeção de ar umidificado à vazão de 10 L/min. O cultivo foi conduzido em condições estáticas, por 240 horas, sendo retirado um frasco, a cada 24 horas, para análises de umidade, pH, proteínas totais e atividades de xilanases, celulases e proteases (Figura 4).



Figura 4 - Estufa utilizada para os cultivos em frascos

3.5.2 Ensaio em reator de coluna

3.5.2.1 Sistema de reatores de coluna (Sistema de Raimbault)

As colunas foram construídas de vidro, com volume útil de, aproximadamente, 80 mL (o que corresponde a cerca de 20 g de meio sólido utilizado neste trabalho). Sua base foi encaixada em um umidificador secundário, e o topo foi fechado, por uma rolha de

poliuretano autoclavável, perfurado por um tudo de vidro com 1,0 mm de diâmetro interno, conforme descrito por MORAES (1999) e ilustrado na Figura 5.



Figura 5 – Coluna de vidro, encaixada ao sistema de umidificação secundário

O procedimento para o fornecimento de ar para as colunas foi realizado conforme a descrição abaixo:

- Um distribuidor de ar e umidificador primário, construído a partir de um frasco Erlenmeyer de 1 L com 12 saídas de ar no topo, recebeu ar comprimido, através de um tudo de vidro com extremidade revestida por material poroso, onde foram borbulhados 500 mL de água destilada. Este sistema está ilustrado na Figura 6 ;
- O ar, previamente úmido, foi, então, distribuído pelas colunas, com entrada pelo fundo, passando, antes, por um umidificador secundário, constituído por um Erlenmeyer de 250 mL, contendo água na mesma temperatura do cultivo. A passagem do ar para as colunas, a partir deste umidificador secundário, aconteceu, também, por um tudo de vidro com extremidade em vidro sinterizado.
- O controle da vazão de entrada da aeração, em cada coluna, foi feita pela instalação de fluxômetros AGA, com faixa de leitura de 1 a 15 L/min, em cada saída de ar, do

umidificador primário. Estes foram posicionados sobre uma haste de metal, para que fossem mantidos na posição vertical. Os fluxômetros foram ajustados na vazão desejada e, a medida que uma coluna foi retirada do banho, o fluxômetro respectivo foi fechado.

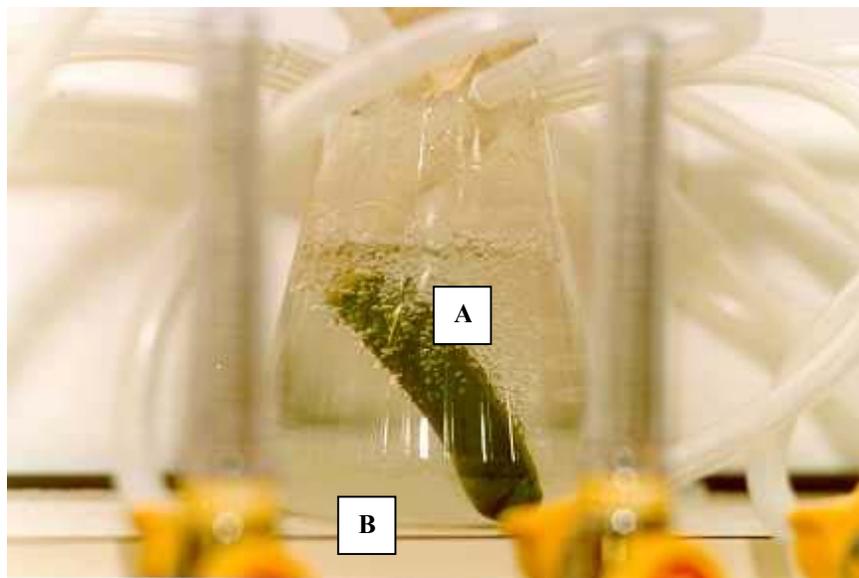


Figura 6 – Distribuidor de ar (A) e umidificador primário (B)

Nas Figura 7 e 8 estão ilustrados o sistema de controle de vazão do ar, pelo uso dos fluxômetros.



Figura 7 – Fluxômetros utilizados para controle da vazão de entrada de ar nas colunas

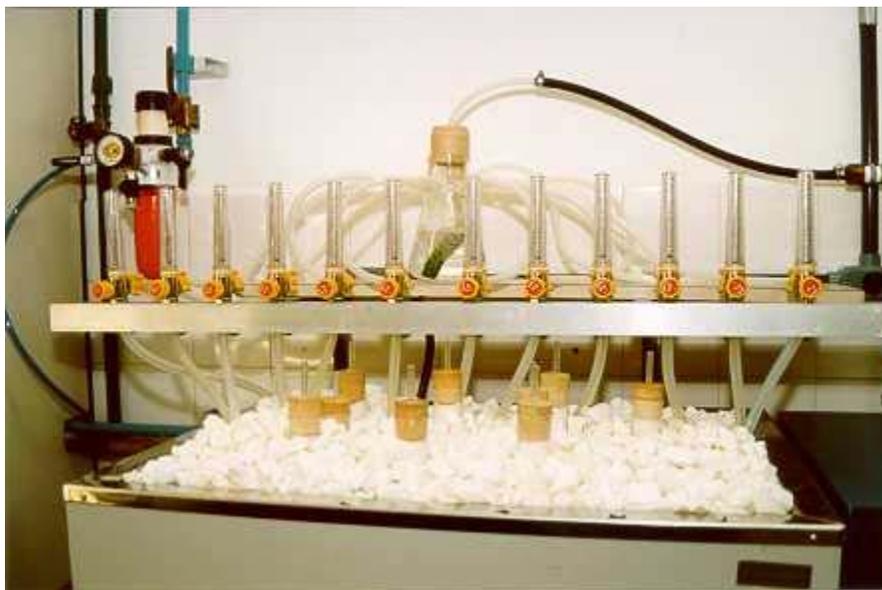


Figura 8 – Disposição dos fluxômetros no sistema

Para controlar a temperatura no interior das doze colunas, que faziam parte do sistema, as mesmas, juntamente com os umidificadores secundários, foram colocadas em um banho termostático, com circulação de água, construído especialmente para este fim pela empresa MARCONI Ltda., nas dimensões específicas para o processo, conforme ilustrado na Figura 9.



Figura 9 - Banho termostático, com circulação, para controle da temperatura

Para o isolamento de todo o ambiente de fermentação, foram colocados flocos de isopor, na superfície do banho.

Como o topo das colunas estava em contato com a temperatura ambiente, mais baixa que os 45 °C utilizados no cultivo, observou-se intensa condensação na parte superior das colunas, o que, invariavelmente, acarretava em umidificação excessiva dos meios, levando a contaminação. Para contornar este problema, a parte superior das colunas foi inteiramente revestida com material isolante, utilizado na construção civil, de nome comercial POLIPEX, evitando-se, assim, que o condensado retornasse ao meio. Na medida do possível, a temperatura ambiente foi mantida a mais próxima possível da temperatura dos cultivos.

3.5.2.2 Condições de cultivo nos reatores de coluna

O meio utilizado para os cultivos nos reatores de coluna foi aquele que apresentou os melhores resultados, em termos de produção de xilanases, nos cultivos em frascos, ou seja, a proporção 7:3 entre bagaço de mandioca e farelo de arroz, acrescidos de 1% (p/p) de extrato de levedura, sendo as colunas preenchidas com 20 g do meio sólido.

Os meios foram, inicialmente, autoclavados, por 30 minutos a 121 °C, em béqueres de polipropileno, fechados com papel “kraft”. Em seguida, estes foram inoculados, na concentração padrão de 10^4 esporos/g de meio sólido, e a umidade foi corrigida para 70 %, com adição de água destilada estéril. Após esta etapa, o conteúdo dos frascos foi transferido, assepticamente, para as colunas, previamente preenchidas, no funo das mesmas, com algodão, material distribuidor de ar e papel de filtro, e esterilizadas por 30 minutos a 121 °C. Seguindo o preenchimento das colunas com o meio sólido inoculado, foram colocados, na parte superior destas, papel de filtro e algodão, sendo, então, fechadas e levadas ao banho termostático.

Os cultivos foram conduzidos por 240 horas sendo uma coluna retirada a cada 24 horas para análises de umidade, pH, glicosamina, proteínas totais, consumo de oxigênio e atividades de xilanases, celulasas e proteases.

3.5.2.3 Testes dos reatores de coluna de Raimbault para o cultivo em elevadas temperaturas

Para que fossem definidas as melhores condições de operação dos reatores de coluna de Raimbault, em termos de produção de xilanases, por um microrganismo termófilo, alguns estudos foram realizados, como descrito abaixo.

3.5.2.3.1 Umidade inicial dos meios

Como o ar estava sendo umidificado duas vezes, avaliou-se a possibilidade de utilização de níveis de umidade dos meios mais baixos do que o utilizado nos cultivos em frascos, visando reduzir a possibilidade de contaminação dos cultivos, por excesso de água nos meios. Além da umidade inicial dos meios de 70%, foi testado o nível de 55% , que foi corrigido, acrescentando-se água estéril aos meios, após inoculação.

3.5.2.3.2 Volume de água nos umidificadores secundários

Para evitar o excesso de água nos meios sólidos, bem como o ressecamento do leite, foi feito um estudo para adequação do volume de água a ser colocado nos umidificadores secundários. Para isto, foram testados os valores de 150, 200 e 250 mL de água destilada no erlenmeyer de 250 mL, encaixado no fundo das colunas, utilizado como umidificador secundário.

3.5.2.3.3 Vazão de entrada de ar nas colunas

A determinação da melhor vazão de ar a ser empregada no sistema fermentativo foi feita, avaliando-se os valores de 1,0 e 2,0 L/min, controlados pelos fluxômetros instalados em cada uma das saídas de ar do umidificador primário.

3.5.2.3.4 Distribuição do ar no interior das colunas

A fim de se trabalhar na melhor condição de distribuição do ar, e evitar a formação dos caminhos preferenciais, ao longo do meio sólido, avaliou-se a possibilidade de utilização de diferentes materiais, chamados de “distribuidores do ar”, no fundo das colunas. Foram testados, cones de vidro, algodão, material poroso (pedra pomes), vidro picado e cones de vidro misturado ao meio sólido, conforme ilustrado no esquema da Figura 10. Para estes testes a quantidade de meio sólido, já umidificado e inoculado, colocado nas colunas foi de 20 g. O algodão colocado na parte superior das colunas ocupava o espaço de 3 cm, a partir do meio sólido e a partir do fundo das colunas, o conjunto de algodão e “distribuidor de ar” ocupava o espaço de 6 cm.

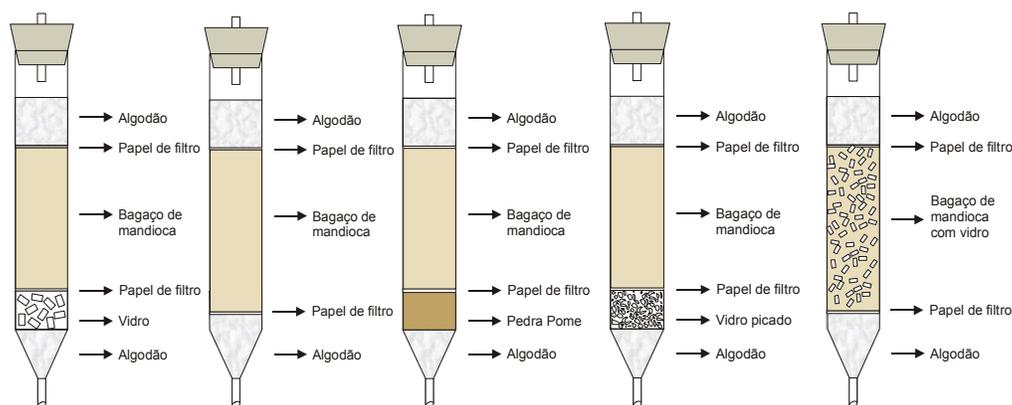


Figura 10 - Esquema das colunas com diferentes materiais utilizados como “distribuidores do ar”.

3.6 Tratamento das amostras

O meio fermentado, proveniente dos frascos ou das colunas, foi homogeneizado e, deste material, foi retirado 1 g para determinação de umidade e pH. O restante da amostra foi transferido para um prato plástico que, com o objetivo de parar a fermentação, foi levado para uma estufa com circulação de ar forçada (FANEM, modelo 320/8), a 35 °C por 4 horas. Após esta secagem, em condições brandas, o meio fermentado seco foi novamente homogeneizado em almofariz, com ajuda de um pistilo. Assim, a amostra

pôde ser estocada em freezer até o momento da extração para as determinações analíticas de proteínas totais, glicosamina e das atividades enzimáticas.

A Figura 11 mostra a sequência do tratamento das amostras.

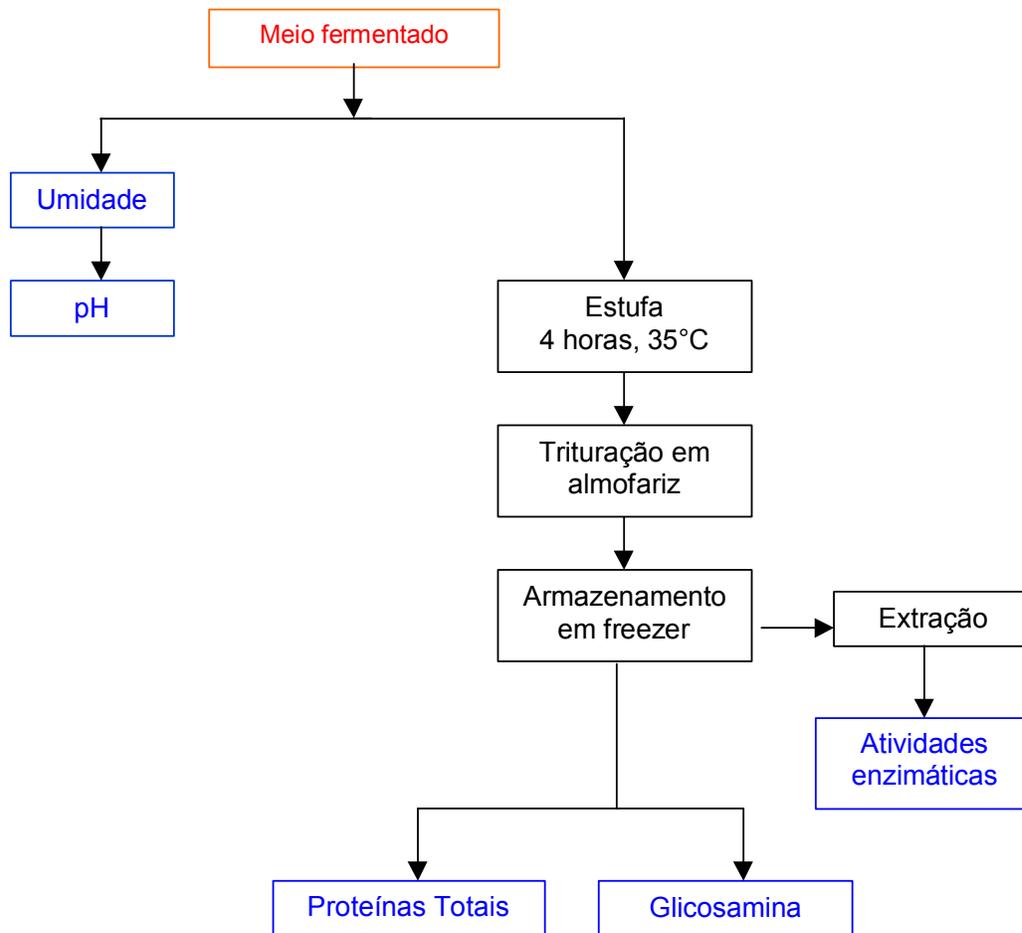


Figura 11 - Esquema do tratamento das amostras

3.7 Determinações analíticas

3.7.1 Determinação da Umidade

A umidade inicial do meio foi determinada colocando-se 1,0 g de amostra, em estufa a 35 °C, determinando-se, gravimetricamente, a água liberada após 24 horas.

3.7.2 Determinação do pH

Para a determinação do pH do meio foi utilizada a amostra (1g/10 mL) proveniente da secagem para determinação da umidade, que foi suspensa em 10 mL de água destilada. O pH foi lido em pHmetro digital (DIGIMED, modelo DM 20), após 10 minutos de repouso, com agitação intermitente, da amostra.

3.7.3 Extração das enzimas do meio

A extração das enzimas do meio fermentado foi feita pela incubação de 1 g de amostra com 15 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0, na temperatura de 30 °C, velocidade de agitação de 200 rpm, por 30 minutos. A amostra foi centrifugada em Centrífuga HEMOS modelo 5836, a 4000 g por 10 minutos e, em seguida, foi filtrada a vácuo utilizando-se conjunto de filtração Millipore e papel de filtro Wathman N° 1.

3.7.4. Determinação das atividades enzimáticas

3.7.4.1 Atividade de xilanases (EC 3.2.1.8)

A atividade de xilanases foi determinada pela quantidade de açúcares redutores liberados a partir de xilana “birchwood” (Sigma), conforme descrito por BAILEY et al. (1992). Os açúcares redutores foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

A solução de xilana foi preparada a partir de 1 g de xilana (“birchwood” - Sigma) diluída com 80 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. Em seguida, a solução foi

fervida, com agitação ocasional, e o volume acertado para 100 mL, com o mesmo tampão.

A solução de xilana 1% foi previamente aquecida, colocando-se 0,9 mL da solução em tubos que foram incubados em banho termostatizado, à 50 °C por 5 minutos. Em seguida, acrescentou-se 100 µL das amostras contendo a enzima, incubando-se a mistura por 5 minutos. Desta, retirou-se 0,5 mL, que foram adicionados à 1 mL de DNS. Esta reação foi conduzida em banho de água fervente por 5 minutos, sendo paralisada com o esfriamento da solução em banho de gelo. Após diluição com 2 mL de água destilada, a absorbância das amostras foi lida em espectrofotômetro (METROLAB modelo 325 BD) a 540 nm, contra um branco reacional. A curva padrão foi feita a partir de xilose (Merck), nas concentrações entre 0,2 e 1,0 g/L.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores, expressos como xilose, por minuto, a 50°C. sendo a atividade enzimática expressa em U/g.

3.7.4.2 Atividade de celulases

As atividades de endo β -1,4 glucanase ou carboximetilcelulase (Cx) (EC 3.2.1.4) e exo β -1,4 glucanase ou avicelase (C1) (EC 3.2.1.74) foram determinadas segundo técnica descrita por TANAKA et al. (1981) que consiste em conduzir a hidrólise de uma solução de carboximetilcelulose 0,44% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 para a atividade da fração Cx e de uma suspensão a 1,1%, no mesmo tampão, de celulose microcristalina (Avicel) para a fração C1. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático à 1 mL dos substratos e procedendo a reação a 50 °C por 60 minutos. A paralisação da reação se deu pela imersão dos tubos em banho de gelo.

A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959). A curva padrão foi feita a partir de glicose (Merck), nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de glicose, por minuto, a 50 °C sendo a atividade enzimática expressa em U/g.

3.7.4.3 Atividade de proteases totais

A atividade das proteases totais foi avaliada utilizando-se azocaseína como padrão, conforme descrito por CHARNEY & TOMARELLI (1947).

Em tubos de centrifuga, foram adicionados 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de solução de azocaseína 0,5% (p/v), preparada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A mistura foi incubada por 40 minutos a 37 °C sendo adicionado, após este período, 0,5 mL de solução 10% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA), em banho de gelo, com objetivo de paralisar a reação. Os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. Retirou-se, então, 1 mL do sobrenadante e acrescentou-se 1 mL de hidróxido de potássio 5N. A absorbância das amostras foi lida a 428 nm, contra um branco preparado com a adição da amostra após a adição do TCA. Uma unidade de atividade proteásica (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença unitária entre o branco reacional e a amostra, por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática foi expressa em U/g.

3.7.5 Determinação das proteínas totais

Por se tratar de amostra proveniente de cultivo em estado sólido, foi necessário extrair as proteínas do meio, antes da quantificação das mesmas. Para isso, utilizou-se 0,1 g de amostra, 1 mL de NaOH 1 N e 1 mL de água destilada, que foram misturados e levados a um banho de água fervente por 5 minutos. Após, os tubos foram resfriados e centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm, sendo o sobrenadante utilizado para a dosagem das proteínas.

O teor de proteínas, determinado pelo método proposto por LOWRY et al. (1951), foi calculado pela equação de uma curva padrão feita com soluções de albumina bovina em concentrações entre 50 e 200 mg/L.

3.7.6 Determinação do conteúdo de glicosamina

Como forma indireta de quantificação do crescimento celular, foi utilizada a dosagem de glicosamina (AIDOO et al., 1981). Para isto, adicionou-se 5 mL de HCl 6N à

0,5 g de amostra, colocando-se a mistura em banho de água fervente por 2 horas. Em seguida, a amostra foi resfriada e filtrada a vácuo. Do sobrenadante, foram transferidos 1 mL para um balão de 25 mL, adicionando-se 1 gota de solução alcóolica de fenolftaleína 0,5% (p/v), sendo a neutralização efetuada com solução de NaOH 3 N, até que a coloração atingisse tonalidade rosa para depois, então, proceder-se a titulação reversa com KHSO₄ 1%, até que esta coloração desaparecesse. O volume do balão foi, então, completado com água destilada.

Após esta etapa inicial de extração, tomou-se 1 mL da solução acima e adicionou-se, à mesma, 1 mL de solução de acetil acetona em Na₂CO₃ 0,5 N, colocando a mistura em banho de água fervente por 20 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 6 mL de etanol e, em seguida, 1 mL de p-DAB (reagente de Erlich).

Os tubos foram incubados a 65 °C por 10 minutos e a absorbância foi lida a 530 nm contra um branco de água no lugar da amostra.

A curva padrão foi construída entre as concentrações de 0,01 a 0,2 g/L de glicosamina em água.

3.8 Determinação da velocidade de consumo de oxigênio

A velocidade de consumo de oxigênio foi obtida conforme relatado por MAIORANO et al. (1992), que descrevem uma adaptação do método proposto por SATO et al. (1983). Para esta determinação as amostras foram retiradas, dos cultivos nos reatores de coluna, a cada 24 horas para análise e introduzida no esquema ilustrado na Figura 12 e detalhado na Figura 13.



Figura 12 – Equipamentos utilizados na determinação do consumo de oxigênio

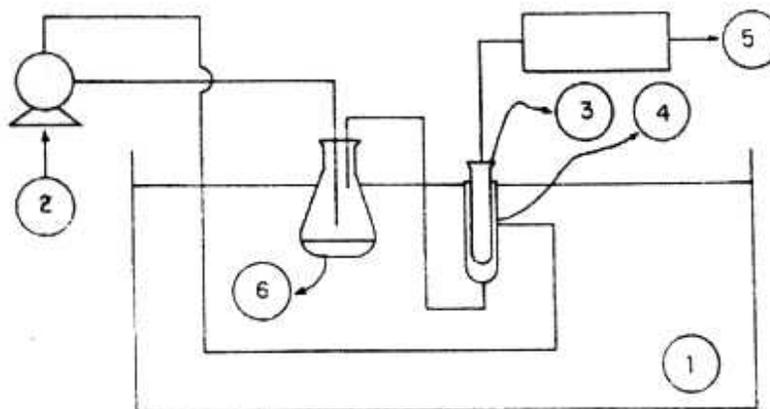


Figura 13 – Esquema do sistema para determinação da velocidade do consumo de oxigênio (Fonte: MAIORANO et al. (1992)).

Onde:

- 1 – Banho termostático ÉTICA modelo 316.3
- 2 – Bomba peristáltica MILAN modelo 202
- 3 – Eletrodo para medida de oxigênio marca DIGIMED
- 4 – Suporte para o eletrodo
- 5 – Analisador de oxigênio marca DIGIMED modelo DM4
- 6 – Erlenmeyer de 250 mL com a amostra

Para medida do consumo de oxigênio foram seguidos os seguintes procedimentos:

- a) o aparelho de medida de oxigênio, Oxímetro DIGIMED modelo DM 4, foi calibrado conforme o manual de operação ;
- b) O material fermentado, proveniente dos reatores de coluna foi transferido para um Erlenmeyer de 250 mL onde foi colocado o eletrodo de medida de oxigênio ;
- c) A bomba peristáltica foi acionada e o sistema operou em circuito fechado. Neste instante, o analisador de oxigênio foi ajustado para 100% e, com auxílio de um cronômetro, foram iniciadas as leituras, que foram feitas em intervalo de 1 minuto.

A velocidade de consumo de oxigênio, considerada constante em um determinado intervalo de tempo, foi calculada, com base na lei dos gases ideais, conforme o descrito por MAIORANO et al. (1992), pela equação 2:

$$OUR = \frac{(P_{O_{2i}} - P_{O_{2t}}).V}{M.R.T.\nabla t} \quad (2)$$

Onde:

OUR = velocidade de consumo de oxigênio (mmol O₂/gms.h)

$P_{O_{2i}}$ = pressão parcial do oxigênio inicial (mmHg)

$P_{O_{2t}}$ = pressão parcial do oxigênio, após o tempo de medida, em minutos (mmHg)

V = volume total de gás no sistema de medida (L)

M = massa seca de bagaço fermentado (gms)

R = constante universal dos gases = 62,36 (mmHg . L/K.mol)

T = temperatura da medida (K)

∇t = intervalo de tempo no qual é realizada a medida (min)

No entanto, algumas considerações devem ser feitas, a respeito da obtenção do valor de OUR:

- A medida expressa pelo medidor de oxigênio foi dada em porcentagem de oxigênio, havendo necessidade em transformá-la numa medida mássica (mmol ou mg de O₂).
- A $P_{O_{2i}}$ foi determinada por

$$P_{O_{2i}} = (P_t - P_{VH_{20}})0,21 \quad (3)$$

Onde:

P_t = pressão parcial na região de Blumenau = 760 mmHg

$P_{VH_{20}}$ = pressão de vapor da água na temperatura da medida (45 °C) = 72 mmHg

0,21 = fração de O₂ no ar

Após o cálculo, a $P_{O_{2i}}$ foi determinada como sendo = 144,48 mmHg ;

Este valor correspondeu a 100 % de O₂ .

- O valor de $P_{O_{2t}}$ foi o obtido nas medidas, em cada intervalo, em porcentagem de O₂ , corrigido para mmHg, pela correlação com 100% de O₂, atribuída a $P_{O_{2i}}$.

Assim, o O₂ consumido (mmol), em cada intervalo de medida (1 minuto), foi obtido pela equação 4, com os seguintes valores:

$$mmol O_2 = \frac{(144,48 - Pt)(mmHg).V(L)}{62,36(mmHg.L / K.mol).318K} \quad (4)$$

A partir, então, dos dados referentes ao consumo de O_2 (mmol), foram obtidos os valores de OUR, pela equação (2) que, neste trabalho, foram expressos em função da massa de bagaço fermentado, ou seja, M.OUR. Portanto, a velocidade de consumo de O_2 em função da massa de bagaço fermentado, M.OUR, foi obtida, para cada amostra retirada dos cultivos, pela regressão linear entre os valores O_2 consumido (mmol O_2) e tempo de medida (min), sendo M.OUR (mmol O_2 /h) o valor corresponde ao coeficiente angular obtido na regressão. A velocidade específica de respiração celular, QO_2 , expressa em mmol O_2 /g biomassa.h, foi obtida pela divisão do valor de M.OUR (mmol O_2 /h) pela massa celular (g biomassa), obtida pelo teor de glicosamina, correspondente ao intervalo de amostragem.

3.9 Determinação dos parâmetros cinéticos

3.9.1 Determinação das velocidades específicas

A determinação das velocidades específicas, definidas como:

- Velocidade específica de crescimento celular:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

(5)

- Velocidade específica de formação de produto (xilanases):

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

(6)

expressas em h^{-1} , foram obtidas pelo método de Le Duy & Zajic (LE DUY & ZAJIC, 1973), conforme descrito em HISS (2001). Os valores de massa celular (g célula) foram obtidos pelo método da glicosamina, conforme descrito no item 3.7.6.

3.9.1.1 Correlação entre biomassa e conteúdo de glicosamina em cultivos líquidos

Para a obtenção dos valores de massa celular, pelo método da glicosamina, foi necessário estabelecer uma correlação entre esta medida e uma forma direta de determinação do crescimento celular.

Para isto, foram feitos cultivos líquidos, em condições estáticas, a partir de diferentes composições de meio, onde foram determinados o peso seco do micélio formado e o teor de glicosamina desta biomassa seca.

Esta etapa foi feita utilizando-se três composições de meio de cultivo, preparados em água destilada.

1. 1% (p/V) de xilana "birchwood";
2. 1% (p/V) de PDA (potato dextrose agar – Merck) líquido ;
3. 1% (p/V) de extrato de farelo de arroz 20%.

Todos os meios foram acrescidos de 0,1% (p/v) de extrato de levedura e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Os cultivos foram conduzidos a 45 °C, em Erlenmeyers de 125 ml, contendo 25 mL de meio, que foram inoculados com suspensão de esporos na concentração de 10^4 esporos/mL. A duração dos cultivos foi de 10 dias e, a cada intervalo de 12 horas, um frasco foi retirado para amostragem.

Foram determinados, de cada frasco, o peso seco do micélio e o teor de glicosamina desta biomassa seca. A determinação do peso seco foi realizada por secagem do material obtido, após filtração a vácuo em papel de filtro previamente seco e pesado, em estufa, a 100 °C por 24 horas. O teor de glicosamina do micélio seco foi determinado conforme descrito no item 3.7.6. Os valores obtidos foram utilizados para determinação, por regressão linear, da relação entre massa seca do fungo e conteúdo de glicosamina, que foi utilizada, posteriormente, na determinação da massa celular obtida nos cultivos em estado sólido, conduzido nos reatores de coluna. Os resultados foram expressos em mg de glicosamina por g de biomassa seca, nos cultivos líquidos e em mg de glicosamina por g de meio sólido, nos cultivos em meio sólido.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a apresentação da revisão bibliográfica e da descrição da metodologia aplicada neste trabalho, estão mostrados e discutidos os resultados obtidos na condução dos processos em estado sólido, por meio dos cultivos em frascos e em reatores de coluna de Raimbault, para obtenção de endo β -1,4 xilanase. Estes resultados estão apresentados na forma de quatro artigos assim especificados:

- O primeiro artigo, refere-se aos resultados obtidos no cultivo em frascos no qual buscou-se a melhor combinação dos substratos sólidos, bagaço de mandioca e farelo de arroz, para a produção de endo β -1,4 xilanase. Além da avaliação da produção desta enzima, nas diferentes composições de meios estudadas, foram acompanhados, também nesta etapa, a produção de outras enzimas como celulasas e proteases totais e o conteúdo de proteínas no meio. Os dados apresentados neste artigo fizeram parte dos trabalhos apresentados no Simpósio Nacional de Fermentações – SINAFERM 2000, realizado em Teresópolis, RJ, no Congresso Nacional de Bioquímica - 2000, realizado em Póvoa de Varzim, Portugal e no Encontro Brasileiro sobre Tecnologia Enzimática – ENZITEC 2002, realizado em Brasília, DF ;
- O segundo artigo apresenta os resultados obtidos no cultivo em estado sólido conduzido nos reatores de coluna de Raimbault. Neste trabalho são mostrados os resultados referentes aos estudos preliminares realizados na condução do processo nestes reatores, visando obter a melhor forma de operação de um

cultivo conduzido em elevada temperatura, visando a obtenção da enzima de interesse, endo β -1,4 xilanase ;

- O terceiro artigo refere-se aos dados obtidos no cultivo em reatores de coluna de Raimbault, nas condições previamente estabelecidas como ideais para o processo. São apresentados os resultados em termos de produção de endo β -1,4 xilanase, celulasas, proteases e concentração de proteína, além da variação da umidade ao longo do tempo, comparando-se com o que foi obtido nas melhores condições dos cultivos realizados em frascos. Assim verifica-se, de forma mais clara, a influência de alguns fatores sobre a formação da enzima.

Parte dos resultados mostrados nos artigos 2 e 3 foram apresentados no Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ 2002, realizado em Natal, RN ;

- O quarto artigo aborda os aspectos referentes ao estudo cinético do processo, no qual avaliou-se a utilização da medida do conteúdo de glicosamina como método indireto para determinação da biomassa nos processos, necessitando, para isto, estabelecer uma correlação desta medida com uma forma de determinação direta de massa celular. Feito isto, os parâmetros cinéticos referentes ao crescimento celular e a produção da enzima endo β -1,4 xilanase foram determinados. Ainda neste artigo estão apresentados os resultados referentes a determinação dos parâmetros cinéticos do processo relativos ao consumo de oxigênio. Efetuou-se a medida da velocidade do consumo do oxigênio e, a partir destes dados, aliados aos dados referentes à cinética de crescimento do microrganismo, foram determinados importantes parâmetros do processo como fator de conversão de oxigênio em célula ($Y_{X/O}$) e coeficiente de manutenção celular, m_O .

4.1 Cultivo em frascos

ARTIGO 1:

“ ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE MEIO PARA A PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO CONDUZIDO EM FRASCOS”

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DE MEIO PARA A PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO CONDUZIDO EM FRASCOS

Márcia Brandão Palma¹ ; Agenor Furigo Junior²

- 1 – Departamento de Engenharia Química, Universidade Regional de Blumenau, CP 1507, Blumenau, SC, 89010-971, e-mail: palma@furb.br
- 2 – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, Florianópolis, SC, 88040-900, e-mail: agenor@enq.ufsc.br

RESUMO

Realizou-se o cultivo em estado sólido de *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492, visando a produção de xilanases, avaliando-se a suplementação do bagaço de mandioca, em diferentes níveis, com farelo de arroz. As proporções estudadas, entre os dois resíduos foram, respectivamente, 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 5:5. Os cultivos foram realizados em estufa, mantida a 45 °C, com injeção de ar umidificado, por 240 horas. A amostragem foi feita a cada 24 h sendo analisadas, além da atividade de xilanases, as atividades das celulases carboximetilcelulase e avicelase e das proteases totais. Avaliou-se, ainda, a concentração de proteínas totais bem como a variação da umidade e do pH dos meios. A melhor composição obtida, para a produção de xilanases foi a que se utilizou 7 partes de bagaço de mandioca e 3 partes de farelo de arroz. Proporcionalmente à produção de xilanases, a indução de celulases foi muito pequena, assim como a formação de proteases, que, mesmo nos cultivos onde houve maior adição de fonte de nitrogênio, na forma de farelo de arroz, as atividades detectadas foram muito baixas. O pH dos meios, 5,5, manteve-se constante durante os cultivos, mas o sistema não foi eficiente para manutenção da umidade dos meios. No entanto, este fato pareceu não afetar a produção de xilanases.

PALAVRAS CHAVE: xilanases, cultivo em estado sólido, bagaço de mandioca, *Thermoascus aurantiacus*

1 – INTRODUÇÃO

As xilanases (EC 3.2.1.8) formam o principal grupo de enzimas envolvidas na degradação aleatória da cadeia de xilana, que é o mais importante polissacarídeo componente das hemiceluloses, e trata-se de um heteropolímero composto de ligações β -1,4 de resíduos de D-xilanopirosil, arabinosil e/ou acetil, dependendo do vegetal em que se encontra (WONG et al., 1988 ; HALTRICH et al., 1996). O interesse na produção de xilanases deve-se a sua grande potencialidade de aplicação industrial, em diferentes segmentos, como as indústrias de alimentos e bebidas, onde estas são utilizadas em associação com outras polissacaridases, ou as indústrias de celulose e papel, onde devem ser livres de

celulases, para eficiência na sua utilização. Nesta, que é considerada a aplicação de maior relevância, as xilanases podem auxiliar, consideravelmente, na redução da poluição ambiental, ao substituir o cloro como agente branqueador das polpas, que resulta na formação de compostos residuais denominados organo-clorados, que são extremamente nocivos ao meio ambiente (BIELY, 1985 ; KULKARNI et al., 1999).

O cultivo em estado sólido pode ser definido como o processo onde o crescimento do microrganismo ocorre em meio na ausência de água não retida no substrato, simulando processos biológicos que ocorrem na natureza como degradação da madeira, compostagem e crescimento de fungos em alimentos (LONSANE et al., 1991). A produção de enzimas, via de regra, por esta forma de cultivo, é um processo atraente, sob o ponto de vista econômico, devido, principalmente, à possibilidade de obtenção de uma maior concentração enzimática por unidade de volume, o que facilita, consideravelmente, os processo de purificação, que representam um custo significativo na produção enzimática (MADAMWAR & PATEL, 1992 ; CASTILHO et al., 2000). Muitos trabalhos descrevem a produção de xilanases por cultivo em meio sólido buscando-se avaliar, a influência de alguns fatores sobre a produção da enzima como a escolha do melhor substrato indutor, o efeito da fonte de nitrogênio, da A_w e umidade do meio, do pH e temperatura do cultivo (RIDDER et al., 1999 ; SOUZA et al., 1999 ; GHANEM et al., 2000 ; NARANG et al., 2001 ; LU et al., 2003).

A utilização de resíduos agroindustriais, como substratos para os cultivos em meio sólido, caracteriza-se como uma das principais vantagens destes processos haja vista o custo irrelevante que o seu uso representa no processo, além de se minimizar os problemas de poluição ambiental, causados pelo grande volume destes materiais que é gerado pelas indústrias (PANDEY et al., 2000). O substrato sólido não apenas fornece os nutrientes para os microrganismos como também serve de suporte para o crescimento celular. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes encontram-se em concentrações abaixo da mínima, sendo necessária a suplementação do meio (NIGAM & SINGH, 1994 ; PANDEY, 2003). O bagaço de mandioca, utilizado como substrato sólido neste trabalho, é gerado na etapa de separação da fécula deste vegetal. O volume deste resíduo, gerado pelas fecularias, é alto, haja vista que o processamento de 250-300 t de raízes frescas de mandioca resulta na geração de cerca de 280 t de bagaço com 85% de umidade. Este é composto por material fibroso da raiz e parte do amido não extraído e contém baixo conteúdo de nitrogênio (cerca de 2,3%). No entanto, devido ao seu baixo teor de cinzas (1,44%) oferece vantagens para aplicação biotecnológica, frente a outros resíduos, como

farelo de trigo, que contém 11% de teor de cinzas (PANDEY et al., 2000 ; SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003).

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o bagaço de mandioca como matéria-prima na produção de xilanases, por cultivo em meio sólido, pelo fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus*, e o efeito de diferentes níveis de suplementação de farelo de arroz, como fonte de nitrogênio orgânico, na produção da enzima.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e inóculo

Thermoascus aurantiacus ATCC 204492 foi mantido em meio composto por 2% (p/V) de ágar extrato de malte e 2% (p/V) de ágar-ágar, e estocado a 4 °C. Os esporos foram obtidos após cultivo a 45 °C por 7 dias sendo o inóculo preparado colhendo-se, assepticamente, os esporos em água estéril, raspando-se a superfície do meio com alça de platina. A padronização do inóculo foi feita por contagem em Câmara de Neubauer sendo os meios de cultivo inoculados de forma a se obter uma concentração padrão de 10⁴ esporos/grama de substrato.

2.2 Meios e condições de cultivo

Os meios para os cultivos em estado sólido foram preparados a partir de diferentes combinações entre o resíduo utilizado como substrato sólido, bagaço de mandioca, e a fonte suplementar de nitrogênio orgânico, farelo de arroz. Foram avaliadas as composições 10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 entre bagaço de mandioca e farelo de arroz, respectivamente. Em todos os meios, acrescentou-se 1% (p/p) de extrato de levedura e a umidade inicial foi corrigida para 70%, com adição de água destilada estéril, após a inoculação.

Os cultivos foram conduzidos em frascos de polipropileno (tipo béquer), de 600 mL, contendo 10 g do meio de cultivo, que foram cobertos com seis camadas de gaze de algodão e incubados em estufa a 45 °C que foi revestida, internamente, com plástico e umidificada, por 24 horas, antes do início do cultivo, com injeção de ar úmido à vazão de 10 L/min. Os cultivos foram conduzidos em condições estáticas, por 240 horas, sendo retirado um frasco, a cada 24 horas, para análises. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

2.3 Extração das enzimas

A extração das enzimas do meio fermentado foi feita pela incubação de uma alíquota de 1 g de amostra, previamente seca a 35 °C por 24 horas, com 15 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0, na temperatura de 30 °C, velocidade de agitação de 200 rpm, por 30 minutos. Após, esta mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e filtrada a vácuo utilizando-se papel de filtro Wathman N° 1.

2.4 Procedimentos analíticos

2.4.1 Ensaio enzimáticos

A atividade de xilanasas foi determinada utilizando-se solução 1% (p/V) de xilana “birchwood” (Sigma), conforme procedimento descrito por BAILEY et al. (1992). Os açúcares redutores liberados da reação foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), utilizando-se solução de xilose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 μ mol de açúcares redutores por minuto.

A atividade das proteases totais foi avaliada utilizando-se azocaseína como padrão, conforme descrito por CHARNEY & TOMARELLI (1947). Uma unidade de atividade proteásica (U) foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença unitária entre o branco reacional e a amostra, por minuto, nas condições do ensaio.

As atividades de endo β -1,4 glucanase ou carboximetilcelulase (Cx) (EC 3.2.1.4) e exo β -1,4 glucanase ou avicelase (C1) (EC 3.2.1.74) foram determinadas segundo técnica descrita por TANAKA et al. (1981) que consiste em conduzir a hidrólise de uma solução de carboximetilcelulose 0,44% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 para a atividade da fração Cx e de uma suspensão a 1,1%, no mesmo tampão, de celulose microcristalina (Avicel) para C1. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático a 1 mL dos substratos e procedendo a reação a 50 °C por 60 minutos. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959) e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose, por minuto, a 50 °C.

Todas as atividades foram expressas em U/grama de matéria seca.

2.4.2 Determinação de proteínas

O conteúdo de proteínas das amostras, foi determinado pelo método proposto por LOWRY et al. (1951), após procedimento de extração realizado com 0,1 g de amostra, 1

mL de NaOH 1 N e 1 mL de água destilada, que foram misturados e levados a um banho de água fervente por 5 minutos. Após, os tubos foram resfriados e centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm, sendo o sobrenadante utilizado para análise. O teor de proteína foi calculado pela equação de uma curva padrão feita com soluções de albumina bovina.

2.4.3 Determinação de umidade e pH

A umidade das amostras foi determinada, gravimetricamente, após secagem a 35 °C por 24 horas. Estas amostras, resultantes da determinação da umidade, foram suspensas em 10 mL de água destilada e o pH foi lido após 10 minutos de repouso, com agitação intermitente.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de xilanases

A produção de xilanases foi avaliada nos cultivos realizados com diferentes composições de meio onde variou-se a suplementação de farelo de arroz sobre o bagaço de mandioca, utilizado como substrato principal dos processos.

A Figura 1 ilustra as atividades máximas de xilanases, obtidas nos diferentes experimentos, na qual pode-se observar que, no ensaio 4, em que foi utilizada a composição 7:3 entre bagaço de mandioca e farelo de arroz, levou a obtenção da mais alta atividade. É importante considerar que a obtenção da máxima atividade ocorreu, em todos os cultivos, após 144 horas, com exceção do experimento 6, em que foram utilizadas partes iguais de bagaço de mandioca e farelo arroz. Os valores de produtividade, em termos de atividade de xilanases por unidade de tempo, obtidos nos experimentos, estão descritos na Tabela 1.

O cultivo 6 apresentou muitos problemas na sua condução, uma vez que a composição aí testada não permitiu total absorção da água utilizada para umidificação do meio. Desta forma, houve muita dificuldade em se controlar as contaminações, fato que, aliado a obtenção da mais baixa produtividade enzimática, leva a não recomendação de utilização desta composição.

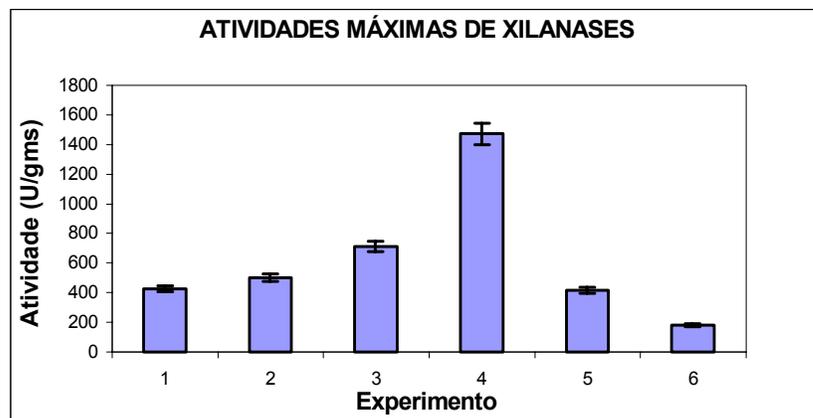


Figura 1: Atividades máximas de xilanasas obtidas nos cultivos em frascos. As barras de erro nos gráficos correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

Identificação dos experimentos (relação bagaço de mandioca:farelo de arroz): 1 (10:0), 2 (9:1), 3 (8:2), 4 (7:3), 5 (6:4), 6 (5:5).

Tabela 1 – Produtividade de xilanasas obtida nos diferentes experimentos

Experimento – Composição do meio (bagaço de mandioca/farelo de arroz)	Produtividade (U/gms.h)
1 – 10:0	2,95
2 – 9:1	2,60
3 – 8:2	3,30
4 – 7:3	7,66
5 – 6:4	2,47
6 – 5:5	1,50

O mais elevado valor de atividade de xilanase, encontrado no conjunto destes cultivos, 1.471 U/gms, é similar ao encontrado por SOUZA et al. (2001), 1.200 U/gms, no cultivo em meio sólido de *Aspergillus tamaris* e RIDDER et al. (2000) que obtiveram cerca de 1.000 U/g como valor máximo de atividade de xilanase de *Trichoderma longibrachiatum*. Ambos os trabalhos, no entanto, utilizaram farelo de trigo como substrato. Estes resultados, quando comparados aos descritos por ALAM et al. (1994), que avaliaram a produção de xilanase, também em farelo de trigo por *Thermoascus aurantiacus*, são superiores, uma vez que, os autores obtiveram uma produção máxima de 705,7 U/gms. Por outro lado SOUZA et al. (1999) e KALOGERIS et al. (1998), fazendo uso desta mesma espécie microbiana e de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, descrevem a produção de cerca de 2.000 e 6.000 U/gms de xilanase, respectivamente. É importante ressaltar que, a comparação de dados entre diferentes processos deve ser feita levando-

se em consideração que, nos cultivos em meio sólido, a obtenção de diferentes níveis de eficiência, em relação a formação do produto desejado, depende, dentre o conjunto de fatores que influenciam os cultivos em estado sólido, do substrato e da espécie microbiana utilizados, dentre outros (umidade, aeração, temperatura).

Os valores máximos de concentração de proteínas encontrados nos meios, em cada cultivo, estão ilustrados na Figura 2, podendo-se observar que o aumento desta concentração foi proporcional ao aumento da suplementação com farelo de arroz. A partir destes dados, obteve-se a atividade específica de xilanases, que está ilustrada na Figura 3.

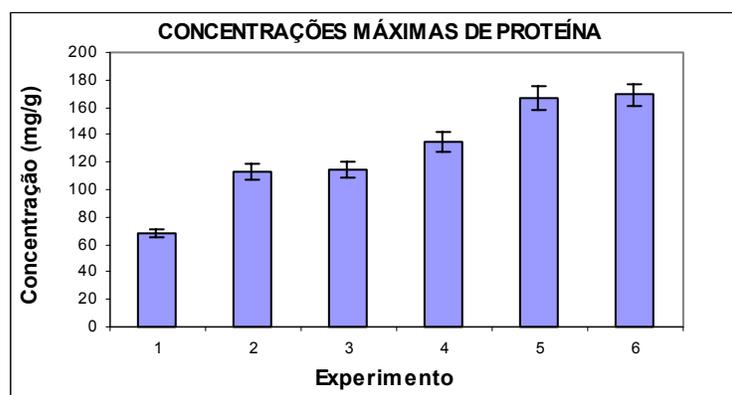


Figura 2 – Concentrações máximas de proteínas obtidas nos cultivos em frascos.

As barras de erro nos gráficos correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

Identificação dos experimentos (relação bagaço de mandioca:farelo de arroz): 1 (10:0), 2 (9:1), 3 (8:2), 4 (7:3), 5 (6:4), 6 (5:5).

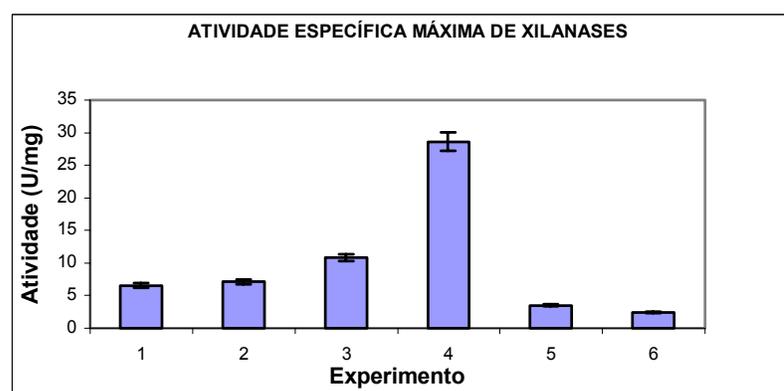


Figura 3 – Atividades específicas máximas de xilanases obtidas nos cultivos em frascos.

As barras de erro nos gráficos correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

Identificação dos experimentos (relação bagaço de mandioca:farelo de arroz): 1 (10:0), 2 (9:1), 3 (8:2), 4 (7:3), 5 (6:4), 6 (5:5).

Estes resultados deixam claro que a composição do meio 7:3 de bagaço de mandioca e farelo de arroz, utilizada no experimento 4, é a ideal para este processo, uma vez que levou a obtenção de atividade específica de xilanases de 28,6 U/mg de proteína, valor cerca de 4 vezes superior ao obtido no experimento 1 (6,56 U/mg proteína), que foi conduzido sem suplementação de farelo de arroz, mostrando que a presença de uma fonte de nitrogênio orgânico no meio, em uma proporção específica foi fundamental para a eficiência do processo. O bagaço de mandioca é um resíduo rico em fibras (cerca de 40%) e amido (cerca de 60%), mas apresenta deficiência na sua composição protéica, o que difere da composição do farelo de arroz, conforme pode ser observado na Tabela 2, onde são mostrados os resultados das análises físico-químicas realizadas nos dois compostos.

Tabela 2 – Resultado das análises físico-químicas de bagaço de mandioca e farelo de arroz

Análises realizadas*	Resultados	
	Bagaço de mandioca	Farelo de arroz
Amido (%p/p)	51,02	23,12
Cinzas (%p/p)	1,50	7,25
Glicídeos redutores em glicose (%p/p)	0,00	0,00
Lipídeos (%p/p)	0,22	21,46
Protídeos (%p/p)	1,67	14,52
pH	5,30	6,32
Umidade (%p/p)	4,97	8,99

*Análises realizadas no Instituto de Pesquisas Tecnológicas da FURB atestadas pelos laudos 51699/01 e 51700/01, respectivamente.

A presença de uma fonte de nitrogênio, na composição dos meios, para os cultivos em estado sólido, visando a produção de xilanase, parece afetar positivamente o processo. Alguns trabalhos mostram que a produção desta enzima está relacionada a característica da fonte de nitrogênio, encontrando-se, no entanto, diferenças entre a utilização de fontes orgânicas ou inorgânicas. Neste sentido, os trabalhos de GUTIERREZ-CORREA & TENGEDY (1998), conduzidos pelo cultivo misto de *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, e *Aspergillus phoenicis* e de CHEILAS et al. (2000), conduzido com *Fusarium oxysporum*, mostram o favorecimento da produção de xilanases na presença de uma fonte de nitrogênio orgânica, em comparação à utilização de fontes inorgânicas nos meios de cultivo. Quanto a produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus*, encontram-se

resultados contraditórios na literatura, pois GOMES et al. (1994) obtiveram que, o cultivo deste fungo em farelo de trigo, mostrou ser mais eficiente quando da utilização de fontes de nitrogênio orgânico no meio de indução. Os autores, sem especificar os compostos utilizados, relatam que a substituição do nitrogênio orgânico por igual quantidade de nitrogênio inorgânico, reduziu a atividade de xilanase de 1.008 para 27 nkatal/mL. Entretanto, KALOGERIS et al. (1998) obtiveram os melhores resultados em termos de produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus*, também utilizando farelo de trigo, quando os meios foram suplementados com sulfato de amônio, o que coincide com o obtido por GHANEM et al. (2000) para a produção de xilanase por *Aspergillus terreus*.

Além do tipo da fonte de nitrogênio, a concentração dos compostos nitrogenados utilizados para suplementação dos meios pode influenciar a produção de xilanase. Conforme os resultados obtidos neste trabalho, concentrações de farelo de arroz abaixo de 30%(p/p) foram insuficientes para a máxima produção da enzima. No entanto, a utilização de frações superiores a este valor, 40 e 50% (p/p), levou a obtenção de baixas atividades específicas de xilanases. Este fato pode estar relacionado à mudança no balanço Carbono:Nitrogênio, que afeta, de uma forma geral, a produção enzimática (KOHLI et al., 2001). Outra possibilidade para a justificativa destes resultados seria a indução de proteases, em função da alta concentração de proteínas utilizadas nos meios de fermentação. Na tentativa de elucidar esta questão, a formação destas enzimas foi monitorada ao longo do processo sendo os resultados expressos em termos de atividade máxima obtida (Figura 4). Pode-se constatar que a máxima atividade alcançada foi de 1 U/gms, o que ocorreu nos cultivos em que foram utilizadas as maiores concentrações de farelo de arroz, mostrando que as baixas atividades de xilanases, obtidas nestes cultivos, não se devem à presença de proteases. Esta questão também foi avaliada por FERREIRA et al. (1999) que verificaram, no entanto, que a produção de xilanases por *Aspergillus tamarii* foi acompanhada pela produção de proteases, em função do substrato utilizado nos cultivos sólidos, encontrando-se atividade proteásica nos ensaios conduzidos em farelo de trigo, que, segundo os autores, contém alto teor de proteína, o que não se repetiu, entretanto, quando se fez uso de sabugo de milho e bagaço de cana-de-açúcar.

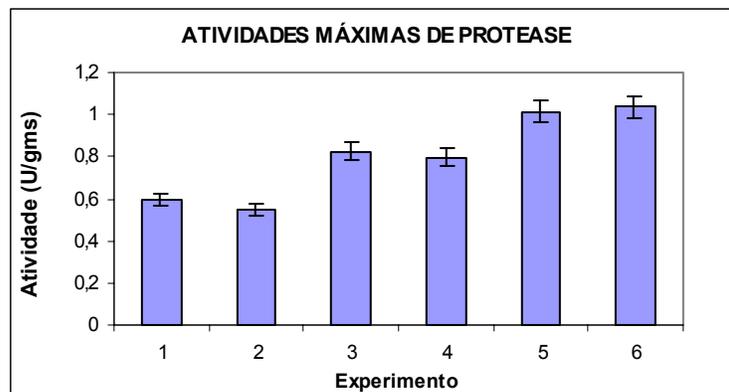


Figura 4 – Atividades máximas de proteases obtidas nos cultivos em frascos.

As barras de erro nos gráficos correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

Identificação dos experimentos (relação bagaço de mandioca:farelo de arroz): 1 (10:0), 2 (9:1), 3 (8:2), 4 (7:3), 5 (6:4), 6 (5:5).

3.2 Produção de celulases

Como o objetivo deste trabalho é a produção de xilanases, cuja principal aplicação industrial está na indústria de celulose e papel, a verificação da produção de celulases se fez necessária uma vez que a ausência destas enzimas, nos extratos enzimáticos, é condição essencial para o uso eficiente das xilanases nestas indústrias. Conforme ilustrado na Figura 5, não houve expressão de elevadas atividades de CX e C1, chegando-se a produção máxima de 22 e 20 U/gms de CX e C1, respectivamente, no experimento 1, no qual o bagaço de mandioca foi utilizado sem suplementação. Resultados semelhantes, em termos de baixa produção de celulases quando comparadas com as atividades de xilanases, de *Thermoascus aurantiacus* foram obtidos por KALOGERIS et al. (1999) (3.094 U xilanase/g, 905 U CX/g e 2,9 U C1/g) e KALOGERIS et al. (2003) (4.490 U xilanase/g, 1.709 U CX/g e 4 U C1/g).

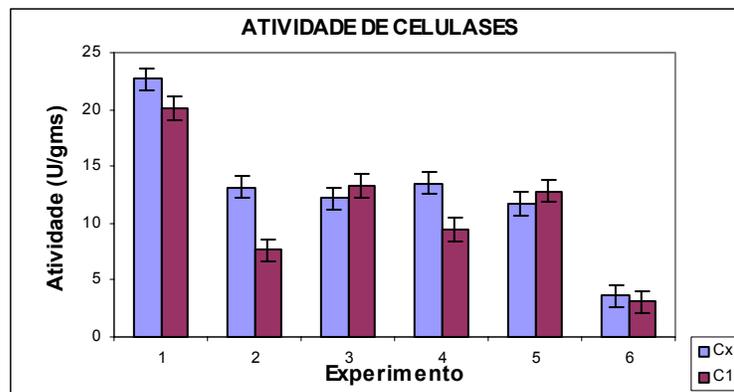


Figura 5 - Atividades máximas de celulases obtidas nos cultivos em frascos

As barras de erro nos gráficos correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

Identificação dos experimentos (relação bagaço de mandioca:farelo de arroz): 1 (10:0), 2 (9:1), 3 (8:2), 4 (7:3), 5 (6:4), 6 (5:5).

3.3 Variação da umidade e pH

Os perfis de variação da umidade em função do tempo dos cultivos estão mostrados na Figura 6, onde pode-se observar que, após 120 horas, em todos os experimentos, houve redução da umidade dos meios, mostrando que, os cuidados tomados, revestimento

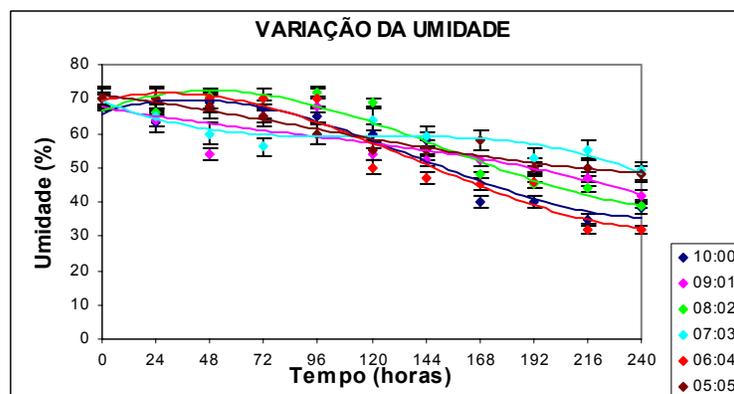


Figura 6 – Variação da umidade com o tempo nos cultivos em frascos.

As barras de erro nos gráficos correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

interno da estufa com plástico e injeção de ar umidificado ao longo dos cultivos, não foram suficientes para a manutenção da umidade, em função da utilização de temperatura elevada, 45 °C, e do longo período de cultivo, 10 dias. No entanto, as mais elevadas atividades enzimáticas foram obtidas nestas condições de redução da umidade dos meios, o que está relacionado com o relato de HAN et al. (1987) que colocam que o valor

ótimo de umidade do meio, para o crescimento celular, pode não coincidir com o melhor valor para a produção enzimática, em cultivos em estado sólido. Esta constatação também foi feita por NARAHARA et al. (1982) para a produção de amilases por *Aspergillus oryzae*. Da mesma forma, KIM et al. (1985) fizeram esta constatação para a produção de proteases por *Aspergillus oryzae* ressaltando que o crescimento celular foi favorecido em condições de 60% de umidade enquanto um teor de 47% é mais favorável à produção da enzima. Em relação a produção de celulasas por *Sporotrichum cellulophilum*, os autores verificaram que 70% foi o valor ótimo de umidade para o crescimento celular, enquanto, a mais elevada produção da enzima ocorreu em condições de 49% de umidade. Assim, confirmada esta teoria, é possível promover o aumento da atividade enzimática, desde que a umidade seja controlada em níveis altos, na fase inicial do processo, para favorecer o crescimento celular, e, seja reduzida, na fase estacionária, para adequar as condições à produção enzimática.

A Figura 7 ilustra a variação do pH ao longo dos cultivos, nos diferentes experimentos realizados, mostrando não ter havido variações bruscas, devido, possivelmente, a boa capacidade tamponante do substrato sólido conforme relatado por LONSANE et al. (19850, para os cultivos sólidos, de modo geral.

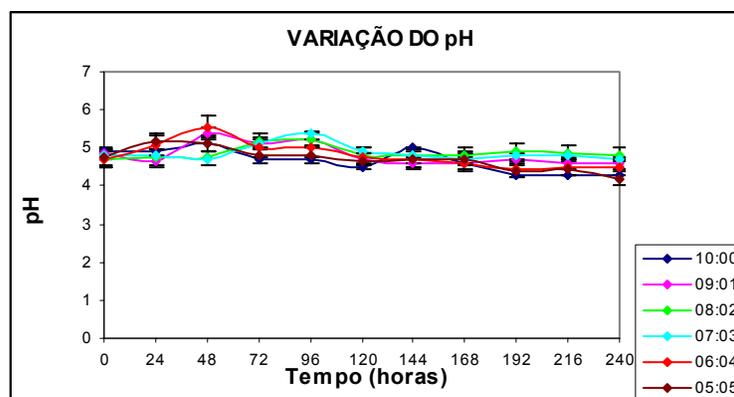


Figura 7 – Variação do pH com o tempo nos cultivos em frascos. As barras de erro nos gráficos correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

4 – CONCLUSÕES

Thermoascus aurantiacus ATCC 204492 produziu níveis de atividade de xilanases comparáveis a outros dados de literatura em processos conduzidos com diferentes espécies de fungos, quando o meio de cultivo, constituído por bagaço de mandioca, foi

suplementado com 30% de fonte de nitrogênio orgânica, na forma de farelo de arroz. A produção da enzima mostrou, entretanto, ser influenciada pela concentração deste suplemento nos meios.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAN, M. ; GOMES, I. ; MOHIUDDIN, G. ; HOQ, M.M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces laniginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, **16**: 298 – 302, 1994.

BAILEY, M.J. ; BIELY, P. ; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, **23**(3): 257 – 271, 1992.

BIELY, P. Microbial Xylanolytic Systems. **Trends in Biotechnology**, **3**: 286–295, 1985.

CASTILHO L.R. ; POLATO, C.M.S. ; BARUQUE, E.A ; SANT'ANNA JR., G.L. ; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, **4**: 239 – 247, 2000.

CHARNEY, J. ; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological Chemistry**, **171**: 501-505, 1947.

CHEILAS, T. ; STOUPIIS, T. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KATAPODIS, P. ; MAMMA, D. ; HATZINIKOLAOU, D.G. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Hemicellulolytic activity of *Fusarium oxysporum* grown on sugar beet pulp. Production of extracellular arabinase. **Process Biochemistry**, **35**: 557 – 561, 2000.

FERREIRA, G. ; BOER, C.G. ; PERALTA, R.M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaris* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, **173**: 335 – 339, 1999.

GHANEM, N.B. ; YUSEF, H.H. ; MAHROUSE, H.K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. **Bioresource Technology**, **73**: 113 – 121, 2000.

GUTIERREZ-CORREA, M. ; TENDERDY, R.P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, **20**(1): 45 – 47, 1998.

HALTRICH, D. ; NIDETZKY, B. ; KULBE, K.D. ; STEINER, W. ; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, **58**: 137 – 161, 1996.

HAN, Y.W. ; GALLAGHER, D.J. ; WILFRED, A. G. Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. **Journal of Industrial Microbiology**, **2**: 195 – 200, 1987.

KALOGERIS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, **60**: 155 – 163, 1998.

KALOGERIS, E. ; FOUNTOUKIDES, G. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. **Bioresource Technology**, **67**: 313 – 315, 1999.

KALOGERIS, E. ; INIOTAKI, F. ; TOPAKAS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, **86**: 207 – 213, 2003.

KIM, J.H. ; HOSOBUCHI, M. ; KISHIMOTO, M. ; SEKI, T. ; YOSHIDA, T. ; TAGUCHI, H. Cellulase Production by a Solid State Culture System. **Biotechnology and Bioengineering**, **7**: 1445 – 1450, 1985

KOHLI, U. ; NIGAM, P. ; SINGH, D. ; CHAUDHARY, K. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. **Enzyme and Microbial Technology**, **28**: 606 – 610, 2001.

KULKARNI, N. ; SHENDYE, A. ; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**, **23**: 411 – 456, 1999.

LONSANE, B.K. ; GHILDYAL, N.P. ; BUDIATMAN, S. ; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, **7**: 258 – 265, 1985.

LONSANE, B.K. ; SAUCEDO-CASTANEDA, G. ; RAIMBAULT, M. ; ROUSSOS, S. ; VINIEGRA-GONZALES, G. ; GHILDYAL, N.P. ; RAMAKRISHNA, M. ; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up Strategies for Solid State Fermentation Systems: a review. **Process Biochemistry**, **26**: 1 – 15, 1991.

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

MADAMWAR, D. ; PATEL, S. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **8**: 183 – 186, 1992.

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

NARAHARA, H. ; KOYAMA, Y. ; YOSHIDA, T. ; PICHANGKURA, S. ; UEDA, R. ; TAGUCHI, H. Growth and Enzyme Production in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**, **60(4)**: 311 – 319, 1982.

NARANG, S. ; SAHAI, V. ; BISARIA, V.S. Optimization of xylanase production by *Melanocarpus albomyces* IIS68 in solid state fermentation using response surface methodology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **91(4)**: 425 – 7, 2001.

NIGAN, P. ; SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, **6**: 405 – 423, 1994.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, **13(2-3)**: 81 – 84, 2003.

PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. ; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, **35**: 1153 – 1169, 2000.

RIDDER, E.R. ; NOKES, S.E. ; KNUTSON, B.L. Optimization of Solid-State fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. **American Society of Agricultural Engineers**, **42(6)**: 1785 – 1790, 1999.

SOCCOL, C.R. ; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, **13**: 205 – 218, 2003.

SOUZA, D.F. ; SOUZA, C. G. M. ; PERALTA, R.M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamaritii* in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, **36**: 835 – 838, 2001.

SOUZA, M.C.O. ; ROBERTO, I.C. ; MILAGRES, A.M.F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Applied Microbiology Biotechnology**, **52**: 768 – 772, 1999.

TANAKA, T. ; TANIGUCHI, M.A ; MATSUMO, R. ; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupeenicillium javanicum*. **Journal Fermentation Technology**, **59(3)**: 177-183, 1981.

WONG, K.K.Y. ; TAN, L.U.L. ; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4 Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological Reviews**, **52(3)**: 305 – 317, 1988.

4.2 Cultivo em reatores de coluna – 1ª PARTE

ARTIGO 2:

**“ ADAPTAÇÃO DOS REATORES DE COLUNA DE RAIMBAULT AO CULTIVO EM
MEIO SÓLIDO DO FUNGO TERMÓFILO *Thermoascus aurantiacus* PARA
PRODUÇÃO DE XILANASES”**

ADAPTAÇÃO DOS REATORES DE COLUNA DE RAIMBAULT AO CULTIVO EM MEIO SÓLIDO DO FUNGO TERMÓFILO *Thermoascus aurantiacus* PARA PRODUÇÃO DE XILANASES

Márcia Brandão Palma¹ ; Agenor Furigo Junior²

- 1 – Departamento de Engenharia Química, Universidade Regional de Blumenau, CP 1507, Blumenau, SC, 89010-971, e-mail: palma@furb.br
- 2 – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, Florianópolis, SC, 88040-900, e-mail: agenor@enq.ufsc.br

RESUMO:

Este artigo descreve os estudos que foram feitos para adaptação dos reatores de coluna de Raimbault ao cultivo do fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus* visando a produção de xilanases. A maior dificuldade, neste caso, foi a adequação do sistema de reatores de coluna às condições de alta temperatura dos cultivos. Para isto, foi necessário avaliar diferentes proporções de volume para o umidificador secundário e eliminar a condensação de líquido do topo das colunas. Com relação a influência da aeração sobre a formação da enzima, variou-se vazão de entrada de ar, utilizando-se valores de 1 e 2 L/min. Além disto, diferentes materiais foram testados para promover a adequada distribuição do ar no meio sólido, evitando-se a formação de caminhos preferenciais. Foi verificado que, neste tipo de sistema fermentativo, deve-se iniciar os cultivos com valores menores de umidade nos meios (55%), pois o sistema de umidificação dos reatores recupera esta umidade, atingindo o valor necessário para o desenvolvimento do microrganismo. A proporção de 200 mL de água no umidificador secundário foi encontrado ser o ideal para estes cultivos, não acarretando umidificação excessiva nem ressecamento dos meios. Constatou-se, ainda que, um menor nível de aeração levou à maior produção de xilanases. Os diferentes distribuidores de ar utilizados não levaram a diferença significativa, pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$), na produção de xilanases, o que levou a escolha do material de maior facilidade de operação, que foi o vidro picado. As análises feitas em três pontos diferentes da coluna, Topo, Meio e Fundo, também não mostraram diferenças significativas ($P < 0,05$), em termos de produção de enzima.

PALAVRAS CHAVE: xilanases, cultivo em estado sólido, *Thermoascus aurantiacus*, reatores de coluna, sistema de Raimbault.

1 – INTRODUÇÃO

O cultivo de microrganismos em meio sólido ocorre pelo crescimento celular em partículas sólidas úmidas, na ausência de água livre, visível entre estas (MITCHELL et al., 2000 ; PANDEY, 2003). Têm-se relatos da utilização deste tipo de cultivo desde a antiguidade, principalmente na produção de alimentos orientais e queijos maturados com fungos bem como nos processos de compostagem (CANNEL & MOO-YOUNG, 1980). Embora os cultivos em meio sólido tenham sido desenvolvidos para manufatura de produtos

tradicionais como alimentos e bebidas fermentadas, sua aplicação, atualmente, tem se estendido às indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se a produção de enzimas e ácidos orgânicos (MITCHELL et al., 2000). A produção de xilanases, por cultivo em estado sólido, é um dos processos que se destacam haja vista, principalmente, a relevância das aplicações industriais desta enzima, especialmente nas indústrias de celulose e papel. Entretanto, para maior eficiência nestas aplicações, algumas características das xilanases devem ser buscadas na sua produção, destacando-se a ausência de celulases nos extratos enzimáticos e a termoestabilidade da enzima (HALTRICH et al., 1996).

Muitos problemas referentes à condução do processo em estado sólido podem ser minimizados, ou até mesmo solucionados, pela escolha correta do biorreator, incluindo seu projeto e forma de operação. Estes devem ser projetados levando-se em consideração, não apenas os aspectos gerais de operação, mas também as particularidades inerentes a cada processo (DURAND et al., 1993 ; COUTO et al., 2001). Dentre os fatores a serem controlados num cultivo em estado sólido conduzido em reatores, a aeração e à transferência de oxigênio merecem destaque. Via de regra, a aeração, nos cultivos em estado sólido, é mais fácil que nos processos submersos, desde que o projeto do reator seja apropriado para permitir livre acesso do O₂ atmosférico até o meio sólido (HAN, 1987). A aeração, nos processos em meio sólido, além da função principal de fornecimento de O₂, remove calor e pode causar perda de umidade dos meios, se a velocidade de fornecimento não for adequadamente controlada. Muitos trabalhos, neste sentido, mostram a influência deste parâmetro sobre a produção de compostos como ácido cítrico e enzimas como amiloglicosidase, xilanase e enzimas ligninolíticas (GHILDYAL et al., 1994 ; DOMÍNGUEZ et al., 2001 ; SHOJAOSADATI BABAEIPOUR, 2002 ; KALOGERIS et al., 2003).

Os reatores de coluna, conhecidos como Sistema de Raimbault, foram desenvolvidos para um processo de enriquecimento protéico de substrato sólido, na França, entre 1975 e 1980, sendo patenteado em 1976. Neste sistema é possível se efetuar a aeração diretamente nos meios sólidos além de se ter eficiência na remoção do calor gerado no processo, pela parede das colunas. Além disto, apresenta baixo custo de montagem e facilidade de operação (DE ARAUJO et al., 1997 ; DURAND, 2003). Este sistema foi recentemente utilizado para a produção de ácido cítrico e de β -galactosidase por espécies de *Aspergillus niger* e *Scopulariopsis* sp., respectivamente (KOLICHESKI, 1995; MORAES, 1999).

Neste trabalho, o objetivo principal foi adequar as condições de operação dos reatores de coluna de Raimbault para um cultivo em meio sólido, em elevada temperatura, utilizando o fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus*, para a produção de xilanases. Cabe ressaltar que, como a utilização de microrganismos termófilos neste tipo de sistema de reatores de colunas não se encontra relatada na literatura, a maioria dos resultados aqui apresentados não puderam ser discutidos com base em dados correlacionados, anteriormente publicados.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e inóculo

Thermoascus aurantiacus ATCC 204492 foi mantido em meio composto por 2%(p/V) de “bacto-malt extract ágar” e 2% (p/V) de ágar-ágar, e estocado a 4 °C. Os esporos foram obtidos após cultivo a 45 °C por 7 dias sendo o inóculo preparado colhendo-se, assepticamente, os esporos em água estéril, raspando-se a superfície do meio com alça de platina. A padronização do inóculo foi feita por contagem em Câmara de Neubauer sendo os meios de cultivo inoculados de forma a se obter uma concentração padrão de 10^4 esporos/grama de substrato.

2.2 Meios e condições de cultivo

O meio para os cultivos em estado sólido foi preparado a partir de bagaço de mandioca e farelo de arroz, na proporção 7:3, respectivamente, acrescido de 1% (p/p) de extrato de levedura. Os meios foram, inicialmente, esterilizados, por 30 minutos a 121 °C, em béchers de polipropileno, fechados com papel kraft. Em seguida, estes foram inoculados, na concentração padrão de 10^4 esporos/g de meio sólido, e a umidade foi corrigida, com adição de água destilada estéril. Foi avaliado o nível de umidade de 55%, diferente do valor trabalhado nos cultivos em frascos. Após esta etapa, o conteúdo dos frascos foi transferido, assepticamente, para reatores de colunas (Sistema de Raimbault), previamente preenchidas, no fundo, com algodão, material distribuidor de ar e papel de filtro, e esterilizadas por 30 minutos a 121 °C. Seguindo o preenchimento das colunas com o meio sólido inoculado, foram colocados, na parte superior destas, papel de filtro e algodão, sendo, então, fechadas e levadas ao banho termostático a 45 °C.

Para os estudos preliminares os cultivos foram conduzidos por 10 dias, sendo as colunas retiradas ao final deste período. Os estudos referentes a influência do nível de aeração sobre a produção da enzima também foram conduzidos por 10 dias, sendo retirada, no entanto, uma coluna, a cada 24 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.1 Reatores de coluna - Sistema de Raimbault

Os reatores de coluna, denominados Sistema de Raimbault, utilizados neste trabalho (DURAND, 2003) foram construídos de vidro, tendo volume útil de, aproximadamente, 80 mL, o que corresponde a 20 g de meio sólido. Sua base foi encaixada em um umidificador secundário, e o topo foi fechado, por uma rolha de poliuretano autoclavável, perfurado por um tudo de vidro com 1,0 mm de diâmetro interno. A umidificação primária foi feita por um distribuidor de ar, construído a partir de um frasco Erlenmeyer de 1 L com 12 saídas de ar no topo, que recebeu ar comprimido, através de um tudo de vidro com extremidade revestida por material poroso, mergulhados diretamente em 500 mL de água destilada. O ar, previamente úmido, foi, então, distribuído pelas colunas, com entrada pelo fundo, passando, antes, pelo umidificador secundário, constituído por um Erlenmeyer de 250 mL, contendo água na mesma temperatura do cultivo. A quantidade de água utilizada neste umidificador secundário foi testada, preliminarmente, avaliando-se a possibilidade de utilização de 150, 200 e 250 mL. O controle da vazão da aeração, em cada coluna, foi feita pela instalação de fluxômetros, com faixa de leitura de 1 a 15 L/min, em cada saída de ar, do umidificador primário. Foram estudados valores de vazão de ar de 1 e 2 L/min. A fim de se trabalhar na melhor condição de distribuição do ar, e evitar a formação dos caminhos preferenciais, ao longo do meio sólido, avaliou-se a possibilidade de utilização de diferentes materiais, chamados de “distribuidores do ar”, no fundo das colunas. Foram testados, vidro, algodão, material poroso (pedra pomes), vidro picado e vidro misturado ao meio sólido. Para controlar a temperatura no interior das doze colunas, que faziam parte do sistema, as mesmas, juntamente com os umidificadores secundários, foram colocadas em um banho termostaticado, com circulação de água.

A Figura 1 ilustra o esquema do Sistema de Raimbault, como foi utilizado neste trabalho.

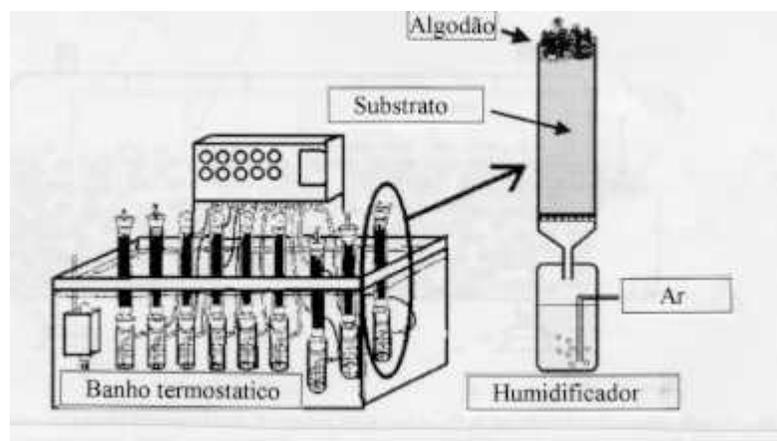


Figura 1 – Esquema ilustrativo do Sistema de Rimbault (Fonte: DURAND, 2003)

2.3 Extração das enzimas

A extração da enzima do meio fermentado foi feita pela incubação de uma alíquota de 1 g de amostra, previamente seca a 35 °C por 24 horas, com 15 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0, na temperatura de 30 °C, velocidade de agitação de 200 rpm, por 30 minutos. Após, esta mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e filtrada a vácuo utilizando-se papel de filtro Wathman N° 1.

2.4 Procedimentos analíticos

2.4.1 Ensaio enzimático

A atividade de xilanases foi determinada utilizando-se solução 1% (p/V) de xilana “birchwood” (Sigma), conforme procedimento descrito por BAILEY et al. (1992). Os açúcares redutores liberados da reação foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), utilizando-se solução de xilose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 μmol de açúcares redutores por minuto.

A atividade foi expressa em U/grama de matéria seca.

2.4.3 Determinação de umidade

A umidade das amostras foi determinada, gravimetricamente, após secagem a 35 °C por 24 horas.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Umidade inicial dos meios e do volume de água nos umidificadores secundários

No início dos estudos para a utilização dos reatores de coluna nos cultivos em estado sólido para a produção de xilanases, foram encontradas algumas dificuldades operacionais, em função das características do processo, que são importantes de serem relatadas para que futuros trabalhos utilizando o Sistema de Raimbault, especialmente com fungos termófilos, sejam estruturados de forma adequada, pois a maior dificuldade em relação a operacionalização deste sistema, neste trabalho, foi em relação à adaptação às condições de cultivo em elevada temperatura.

Um dos problemas encontrados, devido a alta temperatura utilizada nos cultivos (45 °C), foi a condensação de líquido, no topo das colunas, que não estavam imersas no banho termostático, em função da diferença de temperatura entre o sistema de cultivo e o ambiente externo. O líquido condensado retornava, pelo tubo de vidro colocado na rolha de poliuretano, que fechava as colunas, acarretando umidificação excessiva dos meios e consequente contaminação, entre 24 e 48 horas de cultivo. Esta dificuldade foi contornada revestindo a parte superior das colunas com um isolante térmico, utilizado na construção civil, de nome comercial POLIPEX. Além disto, o ambiente externo, dentro do possível, foi mantido na temperatura, a mais próxima possível, da temperatura dos cultivos.

Ainda em função da elevada temperatura do cultivo, observou-se o esgotamento da água utilizada nos umidificadores secundários, onde as colunas estavam encaixadas, que estavam imersos no banho, até 72 horas de cultivo. Assim, verificou-se que o volume utilizado inicialmente, 150 mL, não estava sendo suficiente, o que acarretou completo ressecamento do meio sólido, paralisando o processo. Como esta água não poderia ser repostada ao longo dos cultivos, foi avaliada a possibilidade de se utilizar volumes maiores como 200 e 250 mL.

Além disto, em função da utilização de dois sistemas de umidificação nos cultivos, foi observado que, nas primeiras 24 horas, quando ainda não havia um expressivo crescimento celular, a água que estava sendo arrastada para o interior das colunas, pela dupla umidificação, não estava sendo adsorvida pelo meio sólido, que já estava umidificado na sua máxima capacidade de adsorção (70%), causando excesso de umidade e, conseqüentemente, uma rápida contaminação do processo. Sendo assim, a umidade inicial dos meios foi reduzida para 55% para a realização dos ensaios posteriores.

O Quadro 1 mostra a identificação das colunas, em função das variáveis estudadas nesta etapa do processo.

Quadro 1: Identificação das colunas em função da variação da umidade do meio e do volume de água no umidificador secundário

Coluna	Umidade inicial do meio (%)	Volume de água no umidificador secundário (mL)
1	55	150
2	55	200
3	55	250

Os cultivos onde foram utilizados 250 mL de água, não foram possíveis de serem mantidos, pois, nas primeiras 24 horas, os meios se encontravam com uma quantidade excessiva de água, levando à rápida contaminação dos processos. A condição onde se utilizou 150 mL de água também apresentou dificuldades, impossíveis de serem superadas, pois este volume foi totalmente esgotado, não sendo possível manter a umidade do meio, após 72 horas de cultivo. Portanto a condição viável para a produção da enzima nos reatores de coluna, foi aquela onde se utilizou 200 mL de água no umidificador secundário, combinada com a umidade inicial de 55%, obtendo, após 10 dias de cultivo, atividade de xilanasesde 1.280 U/gms e umidade do meio de 55%.

É interessante ressaltar que, como houve transferência de massa (água) para os meios, em função do sistema duplo de umidificação, foi possível iniciar os cultivos com umidade menor, 55%, sem prejuízo para o desenvolvimento do microrganismo, pois a condição de umidade ideal para o crescimento celular, 70%, foi atingida, com a transferência de água pela umidificação.

3.1.2 Influência da aeração

3.1.2.1 Distribuidores de ar

A eficiência da aeração nas colunas foi também uma preocupação nesta etapa dos estudos preliminares. Visando a melhor distribuição do ar nas colunas e a não formação de caminhos preferenciais, diferentes materiais, aqui denominados de distribuidores de ar, foram testados. O Quadro 2 descreve a identificação das colunas de acordo com os materiais utilizados e a Figura 2 ilustra o esquema de montagem das colunas.

Quadro 2 – Identificação das colunas de acordo com o material utilizado para a distribuição do ar

Coluna	Material utilizado como distribuidor de ar
1	Cones de vidro
2	Algodão
3	Pedra pomes
4	Vidro picado
5	Cones de vidro misturados ao meio sólido

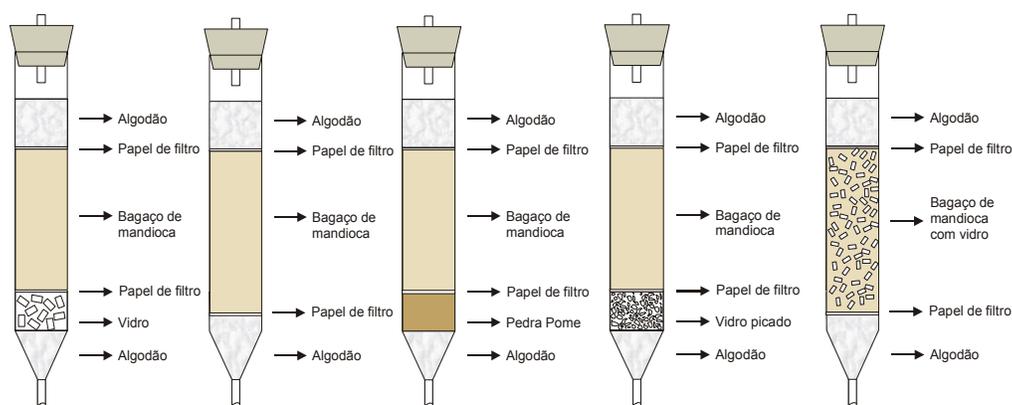


Figura 2 – Esquema ilustrativo de montagem das colunas em função do material distribuidor de ar utilizado.

Os resultados obtidos, em termos de produção de xilanases e a variação da umidade dos meios, após 10 dias de cultivo, foram obtidos, a partir da tomada de amostra em três pontos geometricamente divididos nas colunas, denominados: 1 – Topo ; 2 – Meio ; 3 – Fundo. A Figura 3 ilustra estes resultados, para cada coluna.

A análise estatística dos dados, feita pelo Teste de Tukey, utilizando o programa ORIGIN 6.0, mostrou que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os dados obtidos, em termos de produção de xilanases, entre as amostras retiradas nos três pontos de amostragem (Topo, Meio e Fundo) bem como entre os cultivos realizados com diferentes materiais distribuidores de ar. Assim, optou-se pela utilização do vidro picado, que apresentou maior facilidade para utilização.

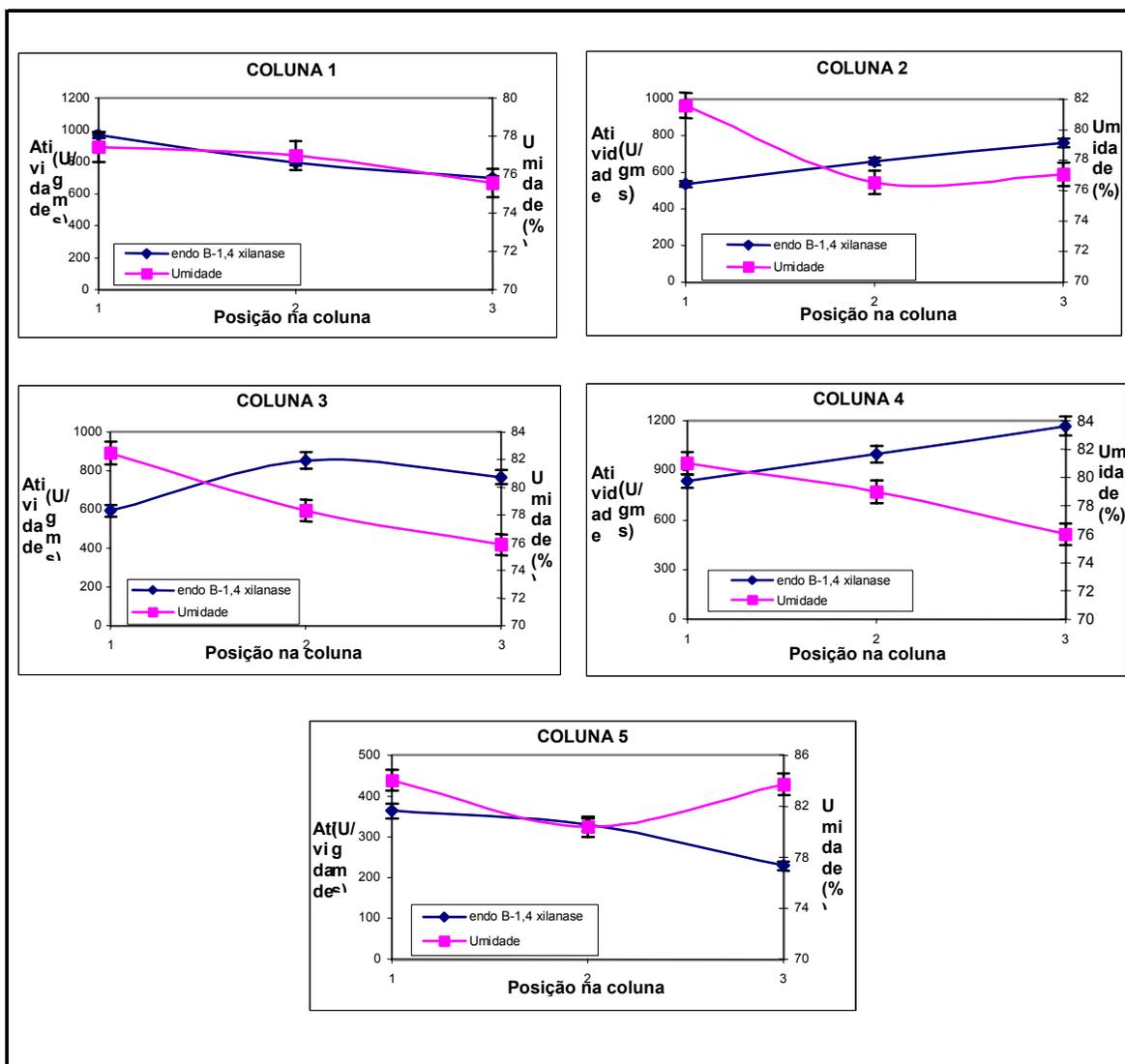


Figura 3– Atividade de xilanases e variação da umidade nos três pontos de amostragem das colunas, onde se utilizou diferentes materiais distribuidores de ar (após 10 dias de cultivo).

As barras de erro nos gráficos correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

3.1.2 Nível de aeração

A influência do nível de aeração empregado nos cultivos, sobre a formação dos metabólitos, foi realizada, controlando-se, pelos fluxômetros instalados no sistema, a vazão de ar de entrada em cada coluna. Os resultados em termos de produção de xilanases, para cada nível de aeração testado, estão mostrados na Figura 4.

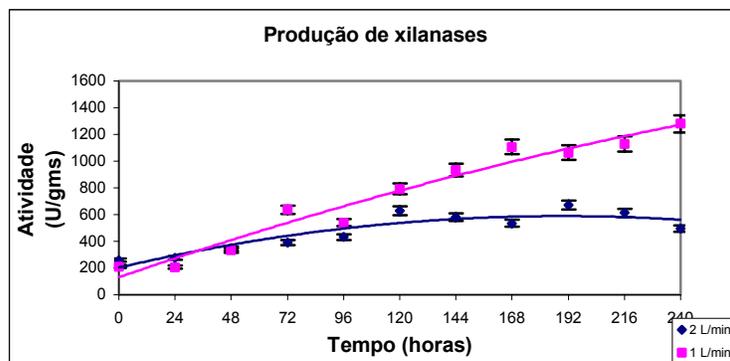


Figura 4 – Perfil da variação da atividade de xilanases com o tempo nos cultivos em reatores de coluna em diferentes níveis de aeração.

Observou-se que o nível de aeração afetou a produção da enzima, sendo mais favorável a condição de menor vazão. Como a aeração tem relação direta com a manutenção da umidade dos meios, esta foi avaliada e os resultados estão mostrados na Figura 5.

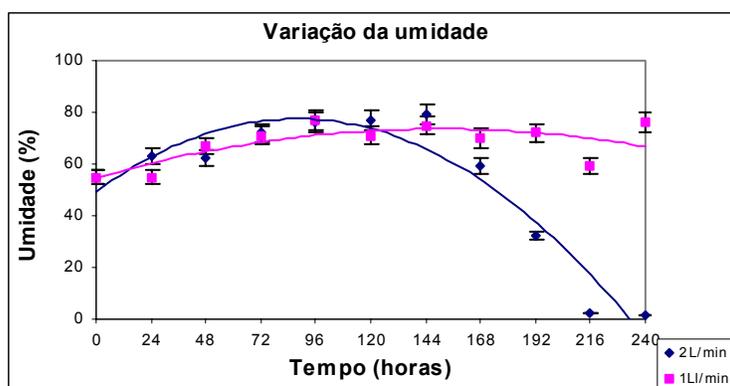


Figura 5 – Perfil da variação da umidade com o tempo nos cultivos em reatores de coluna em diferentes níveis de aeração.

Pode-se observar que, com a utilização da vazão de aeração de 2 L/min, foi possível manter o teor de umidade adequado ao cultivo apenas até, aproximadamente, 130 h, havendo, a partir daí, uma queda progressiva, resultando no total ressecamento do meio após 216h de processo. A maior atividade da enzima, obtida na condição de menor aeração, vai ao encontro dos resultados obtidos por outros autores. A velocidade de aeração foi considerada, por DOMÍNGUEZ et al. (2001), como o parâmetro mais importante para a produção de enzimas ligninolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* em cultivo em estado sólido, utilizando um biorreator de tambor rotativo. Neste caso, a produção da enzima manganês peroxidase aumentou 3 vezes quando se fez uso do menor nível de aeração, 0,5 vvm. KALOGERIS et al. (2003), no entanto, fazendo uso

deste tipo de reator, obtiveram resultados contrários para a produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* pois, nas condições de operação em que utilizaram altos níveis de aeração, 15 L de ar/min/Kg de farelo de trigo, obteve-se elevada atividade de xilanase (4.490 U). Outros autores, entretanto, trabalhando com reatores de coluna, constataram que o uso de menores velocidades de aeração foram mais favoráveis à produção de diferentes compostos. SHOJAOSADAI & BABAEIPOUR (2002) obtiveram maior produção de ácido cítrico, por *Aspergillus niger*, fazendo uso de um menor nível de aeração, 0,8 L/min. GHILDYAL et al. (1994) também obtiveram uma maior produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* quando fizeram uso da velocidade de aeração, em um reator de coluna, de 5 L/min, que, dentre outros valores testados, foi o menor utilizado. Neste caso, constatou-se, entretanto, que o aumento da velocidade de aeração foi favorável a redução do gradiente de temperatura no meio sólido. No entanto, devido a geometria das colunas, que compõem o Sistema de Raimbault, e ao uso de poucas gramas de meio sólido, a temperatura do leito de fermentação, a princípio, pode ser mantida com facilidade, pois a remoção do calor, pela parede das colunas, é eficiente (DURAND, 2003). Assim, a preocupação com a influência do nível de aeração no processo esteve centrada, neste trabalho, sobre a umidade do meio e a formação da enzima de interesse.

4 – CONCLUSÕES

O sistema de Raimbault, para ser utilizado no cultivo de fungos termófilos, precisa ser adaptado, de modo a operar nas condições de elevada temperatura. A umidade inicial do meio sólido pode ser reduzida, para o cultivo neste sistema, uma vez que, no estágio inicial, água é transferida ao meio pelo emprego de dupla umidificação. A aeração é um fator de influência sobre a produção de xilanases e a manutenção da umidade dos meios nos reatores de coluna.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, M.J. ; BIELY, P. ; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, **23**(3): 257 – 271, 1992.
- CANNEL, E. ; MOO-YOUNG, M. Solid-State Fermentation Systems. **Process Biochemistry**, **6**: 2 – 7, 1980.

COUTO, S.R. ; RATTO, M. ; DOMÍNGUEZ, A. ; SANROMÁN, A. Strategies for improving lignolytic enzymes activities in semi-solid-state bioreactors. **Process Biochemistry**, **36**: 995 – 999, 2001.

DE ARAUJO, A A ; LEPILLEUR, C. ; DELCOURT, S. ; COLAVITTI, P. ; ROUSSOS, S. Laboratory scale bioreactors for study of fungal physiology and metabolism in solid state fermentation system. In: ROUSSOS, S. ; LONSANE, B.K. ; RAIMBAULT, M. ; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Eds.) **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 93-111, 1997.

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

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, **13**(2 –3): 113 – 125, 2003.

GHILDYAL, N.P. ; GOWTHAMAN, M.K. ; RAO, R.K.S.M.S. ; KARANTH, N.G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. **Enzyme Microbial Technology**, **16**: 253 – 257, 1994.

HALTRICH, D. ; NIDETZKY, B. ; KULBE, K.D. ; STEINER, W. ; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, **58**: 137 – 161, 1996.

HAN, Y.W. ; Oxygen Requirement for Growth of *Candida utilis* on Semisolid Straw Substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, **30**: 672 – 674, 1987.

KALOGERIS, E. ; INIOTAKI, F. ; TOPAKAS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, **86**: 207 – 213, 2003.

KOLICHESKI, M.B. Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando como Substrato Bagaço de Mandioca. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, Curitiba, PR, 1995.

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

MITCHELL, D.A. ; BEROVIC, M. ; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, **68**: 61 – 138, 2000.

MORAES, R.O. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação em substrato sólido em colunas de Raimbault. **Dissertação de Mestrado**. FEQ, UNICAMP, Campinas, SP, 1999.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, **13**(2-3): 81 – 84, 2003.

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

4.2 Cultivo em reatores de coluna – 2ª PARTE

ARTIGO 3:

**“PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO EM MEIO SÓLIDO UTILIZANDO OS
REATORES DE COLUNA DE RAIMBAULT”**

PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO EM MEIO SÓLIDO UTILIZANDO OS REATORES DE COLUNA DE RAIMBAULT

Márcia Brandão Palma¹ ; Agenor Furigo Junior²

- 1 – Departamento de Engenharia Química, Universidade Regional de Blumenau, CP 1507, Blumenau, SC, 89010-971, e-mail: palma@furb.br
- 2 – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, Florianópolis, SC, 88040-900, e-mail: agenor@enq.ufsc.br

RESUMO:

Utilizou-se os reatores de coluna de Raimbault para produção de xilanases, por cultivo em estado sólido, com o fungo termófilo *Thermoascus aurantiacus*. O meio de cultivo foi composto por bagaço de mandioca e farelo de arroz na proporção 7:3 e as condições de cultivo foram temperatura: 45 °C, concentração de inóculo: 10⁴ esporos/g, umidade do meio: 55%, velocidade de aeração: 1L/min, massa de meio sólido: 20 g, tempo de cultivo: 240 horas. Os resultados obtidos foram comparados com a produção realizada em frascos verificando-se produtividade de 5,33 e 7,66 U/gms.h, respectivamente, resultado que indica, possivelmente, que algum parâmetro não controlado nos reatores pode estar influenciando o processo. A umidade dos meios nos reatores de coluna teve uma redução menos acentuada do que nos frascos, indicando que neste processo a melhor umidade para a produção da enzima parece não ser a mesma para o crescimento do microrganismo. O cultivo nas colunas não induziu atividade de celulasas e proteases em valores que possam comprometer uma eventual aplicação industrial da enzima produzida.

PALAVRAS CHAVE: xilanases, cultivo em estado sólido, reatores de coluna, sistema de Raimbault.

1 – INTRODUÇÃO

A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses, correspondendo a cerca de 8% do peso seco da biomassa da maioria dos resíduos agroindustriais. As xilanases (EC 3.2.1.8) são as principais enzimas responsáveis pela degradação aleatória da cadeia principal deste polissacarídeo, podendo ser obtida, por microrganismos, especialmente os fungos filamentosos. Devido a relevância das aplicações industriais das xilanases, particularmente nos processos de biopolpação para a produção de papel, há interesse na produção destas enzimas por fungos termófilos, alcalino-tolerantes e não indutores de celulasas (WOODWARD, 1984 ; DA SILVA et al., 1997 ; HALTRICH et al., 1996).

A obtenção destas enzimas por cultivo em estado sólido vem sendo apresentada por muitos autores (SOUZA et al., 1999 ; GHANEM et al., 2000 ; BAKIR et al., 2001

KALOGERIS et al., 2003). Neste tipo de cultivo, o microrganismo cresce em meio com ausência de água livre, simulando processos que ocorrem na natureza como a degradação da madeira, a compostagem e o crescimento de fungos em alimentos (RAMANA MURTHY et al., 1993).

Os reatores de coluna, conhecidos como Sistema de Raimbault, foram desenvolvidos para um processo de enriquecimento protéico de substrato sólido, na França, entre 1975 e 1980, sendo patenteado em 1976. Neste sistema é possível se efetuar a aeração diretamente nos meios sólidos além de se ter eficiência na remoção do calor gerado no processo, pela parede das colunas. Além disto, apresenta baixo custo de montagem e facilidade de operação (DE ARAUJO et al., 1997 ; DURAND, 2003). Este sistema foi recentemente utilizado para a produção de ácido cítrico e de β -galactosidase por espécies de *Aspergillus niger* e *Scopulariopsis* sp., respectivamente (KOLICHESKI, 1995; MORAES, 1999), não se tendo, entretanto, dados na literatura mostrando sua utilização para produção de xilanases.

O objetivo principal deste trabalho, portanto, foi avaliar a produção de xilanases por cultivo em meio sólido utilizando os reatores de coluna de Raimbault e comparar os resultados obtidos nos cultivos em frascos, verificando a influência de alguns parâmetros, que puderam ser controlados nos reatores de coluna, sobre a produção da enzima.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e inóculo

Thermoascus aurantiacus ATCC 204492 foi mantido em meio composto por 2%(p/V) de ágar extrato de malte e 2% (p/V) de ágar-ágar, e estocado a 4 °C. Os esporos foram obtidos após cultivo a 45 °C por 7 dias sendo o inóculo preparado colhendo-se, assepticamente, os esporos em água estéril, raspando-se a superfície do meio com alça de platina. A padronização do inóculo foi feita por contagem em Câmara de Neubauer sendo os meios de cultivo inoculados de forma a se obter uma concentração padrão de 10^4 esporos/grama de substrato.

2.2 Meios e condições de cultivo

O meio para os cultivos em estado sólido foi preparado a partir de bagaço de mandioca e farelo de arroz, na proporção 7:3, respectivamente, acrescido de 1% (p/p) de extrato de

levedura. Os meios foram, inicialmente, esterilizados, por 30 minutos a 121 °C, em béchers de polipropileno, fechados com papel kraft. Em seguida, estes foram inoculados, na concentração padrão de 10^4 esporos/g de meio sólido, e a umidade foi corrigida, com adição de água destilada estéril para 55 e 70%, para os meios utilizados nos reatores e nos frascos, respectivamente. Para o cultivo em estufa, os frascos foram incubados a 45 °C, em estufa com injeção de ar umidificado e revestida com plástico. Para o cultivo nos reatores, o conteúdo dos frascos foi transferido, assepticamente, para as colunas, previamente preenchidas, no fundo, com algodão, vidro picado e papel de filtro, e esterilizadas por 30 minutos a 121 °C. Seguindo o preenchimento das colunas com o meio sólido inoculado, foram colocados, na parte superior destas, papel de filtro e algodão, sendo, então, fechadas e levadas ao banho termostático a 45 °C.

Os cultivos, em frascos e reatores de coluna, foram conduzidos por 240 horas, sendo retirada um frasco e/ou uma coluna, a cada 24 horas, para análises. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

2.2.1 Reatores de coluna – Sistema de Raimbault

Os cultivos foram conduzidos em reatores de coluna denominados Sistema de Raimbault (DURAND, 2003) construídas de vidro, com volume útil de, aproximadamente, 80 mL, o que corresponde a 20 g de meio sólido. Sua base foi encaixada em um umidificador secundário, e o topo foi fechado, por uma rolha de poliuretano autoclavável, perfurado por um tudo de vidro com 1,0 mm de diâmetro interno. A umidificação primária foi feita por um distribuidor de ar, construído a partir de um frasco Erlenmeyer de 1 L com 12 saídas de ar no topo, que recebeu ar comprimido, através de um tudo de vidro com extremidade revestida por material poroso, mergulhados diretamente em 500 mL de água destilada. O ar, previamente úmido, foi, então, distribuído pelas colunas, com entrada pelo fundo, passando, antes, por um umidificador secundário, constituído por um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 200 mL de água na mesma temperatura do cultivo. O controle da vazão da aeração, em cada coluna, em 1 L/min, foi feita pela instalação de fluxômetros, com faixa de leitura de 1 a 15 L/min, em cada saída de ar, do umidificador primário. A Figura 1 mostra o sistema de cultivo utilizado neste trabalho.



Figura 1 – Sistema fermentativo para cultivo em meio sólido utilizando reatores de coluna.

2.3 Extração das enzimas

A extração das enzimas do meio fermentado foi feita pela incubação de uma alíquota de 1 g de amostra, previamente seca a 35 °C por 24 horas, com 15 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0, na temperatura de 30 °C, velocidade de agitação de 200 rpm, por 30 minutos. Após, esta mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e filtrada a vácuo utilizando-se papel de filtro Wathman N° 1.

2.4 Procedimentos analíticos

2.4.1 Ensaio enzimáticos

A atividade de xilanases foi determinada utilizando-se solução 1% (p/V) de xilana “birchwood” (Sigma), conforme procedimento descrito por BAILEY et al. (1992). Os açúcares redutores liberados da reação foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), utilizando-se solução de xilose como padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 μ mol de açúcares redutores por minuto.

A atividade das proteases totais foi avaliada utilizando-se azocaseína como padrão, conforme descrito por CHARNEY & TOMARELLI (1947). Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima que produz uma diferença unitária

de absorvância entre o branco reacional e a amostra por minuto, nas condições de ensaio.

As atividades de endo β -1,4 glucanase ou carboximetilcelulase (Cx) (EC 3.2.1.4) e exo β -1,4 glucanase ou avicelase (C1) (EC 3.2.1.74) foram determinadas segundo técnica descrita por TANAKA et al. (1981) que consiste em conduzir a hidrólise de uma solução de carboximetilcelulose 0,44% em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5 para a atividade da fração Cx e de uma suspensão a 1,1%, no mesmo tampão, de celulose microcristalina (Avicel) para C1. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático a 1 mL dos substratos e procedendo a reação a 50 °C por 60 minutos. A quantidade de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959) e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de glicose, por minuto, a 50 °C.

Todas as atividades foram expressas em U/grama de matéria seca.

2.4.2 Determinação de proteínas

O conteúdo de proteínas das amostras, foi determinado pelo método proposto por LOWRY et al. (1951), após procedimento de extração realizado com 0,1 g de amostra, 1 mL de NaOH 1 N e 1 mL de água destilada, que foram misturados e levados a um banho de água fervente por 5 minutos. Após, os tubos foram resfriados e centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm, sendo o sobrenadante utilizado para análise. O teor de proteína foi calculado pela equação de uma curva padrão feita com soluções de albumina bovina.

2.4.3 Determinação de umidade e pH

A umidade das amostras foi determinada, gravimetricamente, após secagem a 35 °C por 24 horas. Estas amostras, resultantes da determinação da umidade, foram suspensas em 10 mL de água destilada e o pH foi lido após 10 minutos de repouso, com agitação intermitente.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item, a produção das enzimas, bem como a variação do pH e umidade dos meios, foram analisados, comparativamente, aos resultados referentes ao cultivo em frascos, nos quais foi obtida a maior produção de xilanases, que foi verificada, conforme relatado no

Artigo 1, no cultivo em que se utilizou a composição de meio 7:3 entre bagaço de mandioca e farelo de arroz. Como as condições, no que diz respeito ao inóculo e composição de meio, temperatura e pH, foram as mesmas nos cultivos conduzidos em frascos (10 g) e nos reatores de coluna (20 g), esta análise comparativa permite se ter uma visão mais clara da influência de alguns fatores que puderam ser controlados nos reatores de coluna, ao contrário dos frascos, como a injeção de ar úmido, com controle de vazão, diretamente no meio sólido, além da umidificação, em duas etapas, do conteúdo das colunas.

3.1. Produção de xilanases

A comparação entre a produção de xilanases obtida nos cultivos realizados nos reatores de coluna e nos frascos está ilustrada na Figura 2.

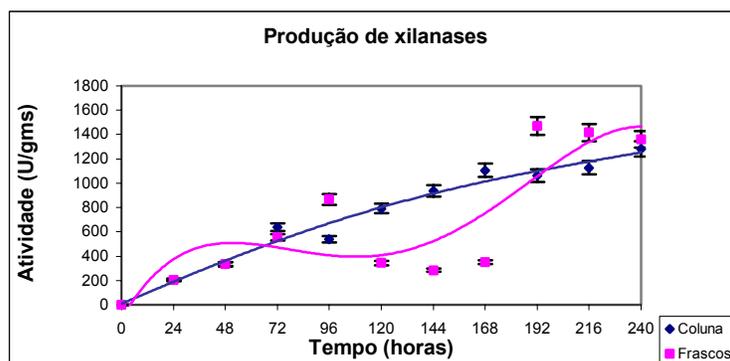


Figura 2 – Comparação entre a produção de xilanases nos cultivos em reatores de coluna e frascos.

As barras de erro nos gráficos correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

O perfil da produção da enzima, ao longo do tempo, apresenta variações no cultivo nos reatores de coluna, sendo mais homogêneo neste processo, possivelmente em função das condições ambientais estarem mais controladas. Entretanto, a produtividade alcançada no cultivo em frascos, 7,66 U/gms.h, não se repetiu no cultivo em reatores de coluna, onde se alcançou o valor máximo de 5,33 U/gms.h. A concentração de proteínas nos meios e as atividades específicas de xilanase estão ilustradas nas Figuras 3 e 4, respectivamente, mostrando que, mesmo com maior concentração de proteínas no meio sólido nos cultivos em reatores de coluna, a atividade específica também foi maior no cultivo em frascos. PANDEY et al. (1996), em um estudo comparativo entre a produção de glicoamilase por *Aspergillus niger* por cultivo em frasco e reatores de coluna, verificaram que houve aumento da produção da enzima nos reatores, que esteve

condicionado, entretanto, à altura de preenchimento do meio sólido nas colunas. Os autores constataram que a utilização de alturas de leito de 9, 18 e 22 cm nas colunas promoveu um aumento da produção da enzima, em relação ao obtido nos frascos, de 38%, 53% e 42%, respectivamente, não havendo, no entanto, diferença significativa na produção de glicoamilase entre os cultivos nos reatores, empregando-se os três valores de altura de leito avaliados. No presente trabalho, utilizou-se, em todos os cultivos, 20 g de meio sólido em cada coluna, o que corresponde a 12 cm de altura de leito, o que pode, segundo o relato destes autores, ter influência no processo, em função do grau de compactação do substrato.

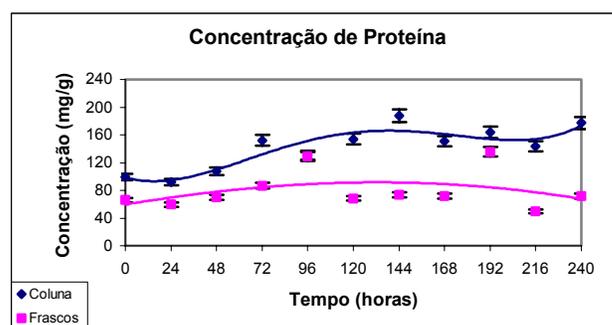


Figura 3 - Comparação entre a concentração de proteínas nos cultivos em reatores de coluna e frascos.

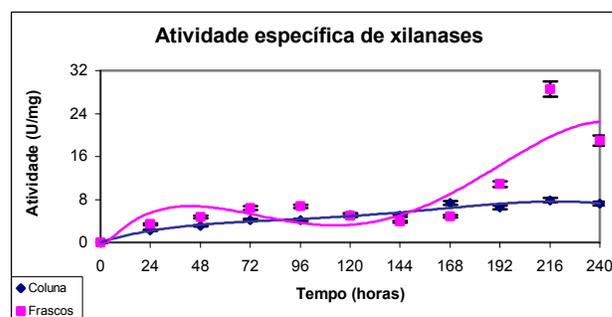


Figura 4 - Comparação entre a atividade específica de xilanasas nos cultivos em reatores de coluna e frascos.

Além disto, de acordo com os perfis de variação de umidade, nos dois cultivos, mostrados na Figura 5, a teoria apresentada por HAN et al. (1997), NARAHARA et al. (1982) e KIM et al. (1985), já discutida no Artigo 1, que afirma que o valor de umidade ótimo para a produção de enzimas, em substratos sólidos, não necessariamente coincide com o valor correspondente para a obtenção da máxima concentração celular, parece se aplicar no processo aqui estudado, uma vez que a produtividade e a atividade específica de xilanasas, obtidas em condições de menor umidade, nos cultivos em frascos, foram

maiores que os valores obtidos nos cultivos em reatores de coluna. Este fato é reforçado pelos resultados apresentados por GOMES et al. (1994) que verificaram que a condição ótima de umidade para a produção de xilanases por *Thermomyces lanuginosus* e *Thermoascus aurantiacus*, em meio a base de farelo de trigo, foi de 80 e 50%, respectivamente, tendo sido, neste último caso, alcançada uma atividade máxima de produção da enzima de cerca de 700 U/g.

Assim, os resultados sugerem que a umidade do meio e, possivelmente, a massa de substrato, sejam fatores relevantes para a produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* nos reatores de coluna, o que confere com a conclusão obtida por SOUZA et al. (1999) para a produção desta enzima, pela mesma espécie de fungo termófilo, que obtiveram atividade de 2700 U/g de bagaço de cana-de-açúcar, quando estes fatores foram otimizados.

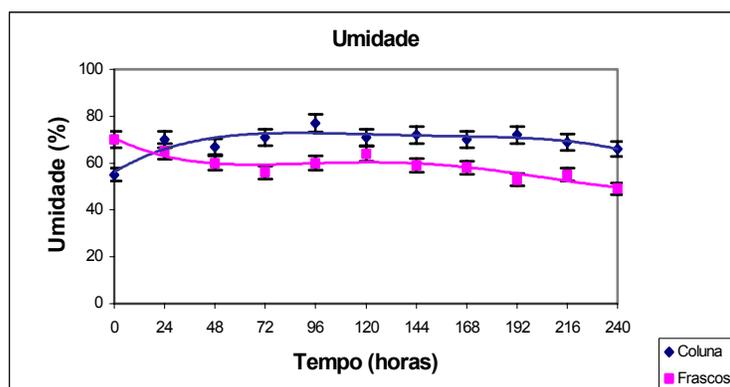


Figura 5 – Comparação entre a variação da umidade com o tempo nos cultivos em reatores de coluna e em frascos.

3.2 Produção de celulases e proteases

O acompanhamento da produção das celulases (C1 e Cx), indesejáveis para aplicações industriais das xilanases, das proteases, que poderiam ser induzidas pela presença do farelo de arroz como fonte de nitrogênio orgânico, foi efetuado também no cultivo em reatores de coluna e os resultados obtidos, comparando com os dados referentes aos cultivos em frascos, estão ilustrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. Pode-se observar que, em relação à produção das celulases, houve diferenças entre a produção nos frascos e nos reatores de coluna, mas a indução destas, assim como das proteases, foi muito pequena, quando comparadas as atividades de xilanases obtidas.

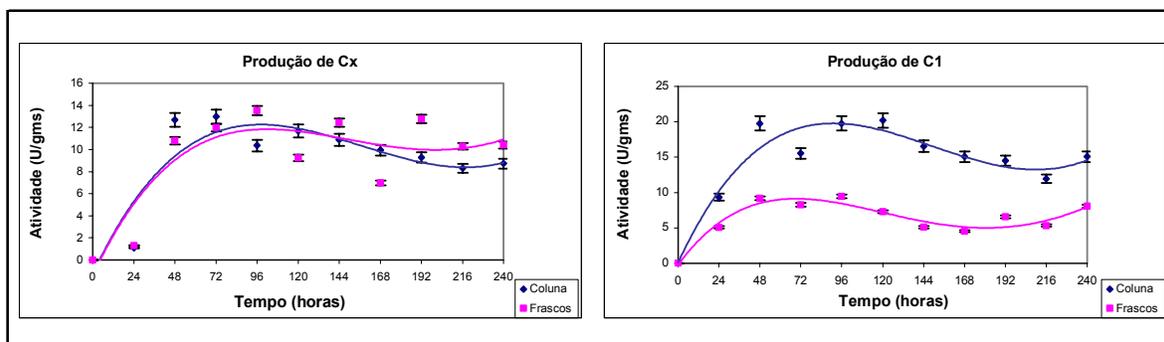


Figura 6 – Comparação entre a atividade de carboximetilcelulase – Cx e Avicelase – C1 nos cultivos em reatores de coluna e frascos.

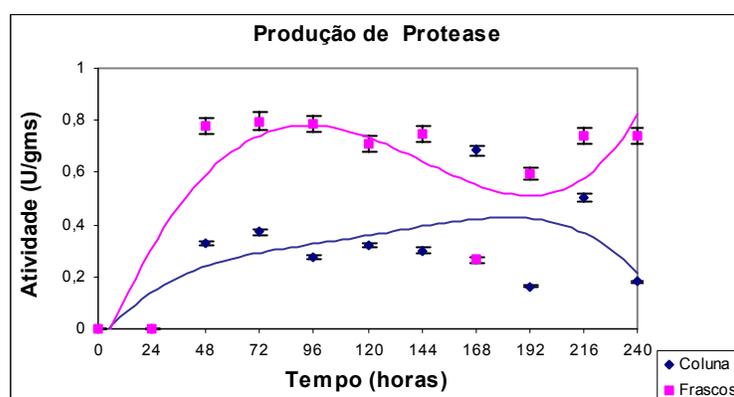


Figura 7– Comparação entre a atividade de protease nos cultivos em reatores de coluna e frascos.

4 – CONCLUSÕES

A produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* nos reatores de coluna de Rimbault mostrou ser eficiente, obtendo-se valores de atividade comparáveis com outros dados da literatura sendo, no entanto, menores que os obtidos nos cultivos em frascos. A umidade dos meios foi mais eficientemente mantida nos reatores de coluna, mas há indicações de que o teor de umidade ótima para a produção da enzima é menor do que para o crescimento celular. As condições de cultivo não induziram elevadas atividades de celulases e proteases.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, M.J. ; BIELY, P. ; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, **23**(3): 257 – 271, 1992.

BAKIR U. ; YAVASCAOGLU, S. ; GUVENC, F. ; ERSAYIN, A. Na endo β -1,4-xylanase from *Rhizopus arryzae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, **29**: 328 – 334, 2001

CHARNEY, J. ; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological Chemistry**, **171**: 501-505, 1947.

DA SILVA, R. ; FRANCO, C.M.L. ; GOMES, E. Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. **Boletim da SBCTA**, **31**(2): 249 – 260, 1997.

DE ARAUJO, A A ; LEPILLEUR, C. ; DELCOURT, S. ; COLAVITTI, P. ; ROUSSOS, S. Laboratory scale bioreactors for study of fungal physiology and metabolism in solid state fermentation system. In: ROUSSOS, S. ; LONSANE, B.K. ; RAIMBAULT, M. ; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Eds.) **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 93-111, 1997.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, **13**(2 –3): 113 – 125, 2003.

GHANEM, N.B. ; YUSEF, H.H. ; MAHROUSE, H.K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. **Bioresource Technology**, **73**: 113 – 121, 2000.

GHILDYAL, N.P. ; GOWTHAMAN, M.K. ; RAO, R.K.S.M.S. ; KARANTH, N.G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. **Enzyme Microbial Technology**, **16**: 253 – 257, 1994.

GOMES, D.J. ; GOMES, J. ; STEINER, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Biotechnology**, **33**: 87 – 94, 1994.

HALTRICH, D. ; NIDETZKY, B. ; KULBE, K.D. ; STEINER, W. ; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, **58**: 137 – 161, 1996.

HAN, Y.W. ; GALLAGHER, D.J. ; WILFRED, A. G. Phytase production bt *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. **Journal of Industrial Microbiology**, **2**: 195 – 200, 1987.

KALOGERIS, E. ; INIOTAKI, F. ; TOPAKAS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Performance of na intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, **86**: 207 – 213, 2003.

KOLICHESKI, M.B. Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando como Substrato Bagaço de Mandioca. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, Curitiba, PR, 1995.

KIM, J.H. ; HOSOBUCHI, M. ; KISHIMOTO, M. ; SEKI, T. ; YOSHIDA, T. ; TAGUCHI, H. Cellulase Production by a Solid State Culture System. **Biotechnology and Bioengineering**, **7**: 1445 – 1450, 1985

LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A L. ; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, **193**: 265 – 275, 1951.

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

MORAES, R.O. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação em substrato sólido em colunas de Raimbault. **Dissertação de Mestrado**. FEQ, UNICAMP, Campinas, SP, 1999.

NARAHARA, H. ; KOYAMA, Y. ; YOSHIDA, T. ; PICHANGKURA, S. ; UEDA, R. ; TAGUCHI, H. Growth and Enzyme Production in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**, **60(4)**: 311 – 319, 1982.

PANDEY, A. ; SELVAKUMAR, P. ; ASHAKUMARY, L. Performance of a column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. **Process Biochemistry**, **31(1)**: 43 – 46, 1996.

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

SOUZA, M.C.O. ; ROBERTO, I.C. ; MILAGRES, A.M.F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Applied Microbiology Biotechnology**, **52**: 768 – 772, 1999.

TANAKA, T. ; TANIGUCHI, M.A ; MATSUMO, R. ; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*. **Journal Fermentation Technology**, **59(3)**: 177-183, 1981.

WOODWARD, J. Xylanases: Functions, Properties and Applications. In: **Introduction to Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, Cap. 2:9 – 30, 1984.

4.3 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

ARTIGO 4:

“ ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO”

ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE XILANASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO

Márcia Brandão Palma¹ ; Agenor Furigo Junior²

- 1 – Departamento de Engenharia Química, Universidade Regional de Blumenau, CP 1507, Blumenau, SC, 89010-971, e-mail: palma@furb.br
- 2 – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, Florianópolis, SC, 88040-900, e-mail: agenor@enq.ufsc.br

RESUMO:

Neste trabalho foram determinados alguns parâmetros cinéticos relativos ao crescimento de *Thermoascus aurantiacus* e à produção de xilanases em cultivo em estado sólido. A biomassa microbiana foi obtida pela medida do conteúdo de glicosamina que foi padronizada com dados de massa micelial seca proveniente de um cultivo líquido. A partir destes dados, e da atividade da enzima, determinou-se os valores de μ_{XMAX} ($0,0061 \text{ h}^{-1}$) e μ_{PMAX} ($45,07 \text{ U/gms.h}$). A produção da enzima mostrou-se associada ao crescimento celular durante a fase exponencial e o fator de conversão célula em produto, $Y_{P/X}$, foi de $10,02 \text{ U/mg}$ de biomassa. No entanto, observou-se que a máxima produção da enzima ocorreu após esta fase, reforçando a idéia de que as melhores condições para a produção enzimática podem não ser as mesmas para o crescimento celular. A partir da medida do consumo de oxigênio, fazendo uso de um eletrodo, foi possível determinar a velocidade do consumo de O_2 em função da massa de bagaço fermentado (M.OUR) durante todo o cultivo, a qual, juntamente com os dados de biomassa, obtidos da glicosamina, possibilitou a determinação dos valores da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), ao longo do tempo, além do fator de conversão oxigênio em célula, $Y_{X/O}=0,0189 \text{ g biomassa/mmol } O_2$ e do coeficiente de manutenção celular, $m_o=0,00325 \text{ mmol } O_2/\text{g biomassa.h}$, que correspondeu a 20% do valor de QO_2 .

PALAVRAS CHAVE: xilanases, cultivo em estado sólido, *Thermoascus aurantiacus*, glicosamina, oxigênio.

1 – INTRODUÇÃO

O cultivo em estado sólido pode ser definido como o processo no qual o crescimento do microrganismo ocorre em meio com ausência de água não retida no substrato, simulando processos biológicos que ocorrem na natureza como degradação da madeira, compostagem e crescimento de fungos em alimentos (LONSANE et al., 1991). A produção de enzimas, via de regra, por esta forma de cultivo, é um processo atrativo, sob o ponto de vista econômico, devido, principalmente, à possibilidade de obtenção de uma maior concentração enzimática por unidade de volume, o que facilita, consideravelmente, os processo de purificação, que representam um custo significativo na produção

enzimática (MADAMWAR & PATEL, 1992 ; CASTILHO et al., 2000). A produção de xilanases, por cultivo em estado sólido, é um dos processos que se destacam haja vista, principalmente, a relevância das aplicações industriais desta enzima, especialmente nas indústrias de celulose e papel (SOUZA et al., 1999 ; GHANEM et al., 2000 ; NARANG et al., 2001 ; LU et al., 2003).

A maioria dos processos em meio sólido são conduzidos por fungos filamentosos, cujo crescimento acontece pela extensão das pontas das hifas sobre a superfície sólida (LONSANE et al., 1985). A adesão dos fungos filamentosos às partículas do substrato, durante o crescimento nos cultivos em meio sólido, segundo CORDOVA-LOPEZ et al. (1996), é uma importante propriedade destes microrganismos favorecendo a absorção dos nutrientes. No entanto, esta forte ligação a uma matriz sólida implica na impossibilidade de separação entre o micélio e o substrato e, conseqüentemente, na determinação, de forma direta, da biomassa formada (LONSANE et al., 1985 ; MAIORANO et al., 1992 ; NIGAM & SINGH, 1994 ; MITCHELL et al., 2000 ; PANDEY et al., 2000).

Existem vários métodos indiretos para a dosagem de biomassa nos cultivos em meio sólido que se baseiam na medida de alguma atividade metabólica ou de algum componente específico da biomassa (LEKHA & LONSANE, 1994). É importante ressaltar, entretanto, que, para representar o crescimento da biomassa, o indicador selecionado deve ser constante durante o crescimento do microrganismo e sob diferentes condições de cultivo (SCOTTI et al., 2001). O método de dosagem do conteúdo de glicosamina tem por princípio a quantificação de um constituinte da parede celular dos fungos, que é, basicamente, formada pela quitina, um polímero linear insolúvel, constituído por ligações α -1,4 de acetilglicosamina (AIDOO et al., 1981). Esta metodologia vem sendo usada em muitos trabalhos, conduzidos com diferentes microrganismos, atendendo as exigências para ser considerada um adequado indicador de biomassa (GELMI et al., 2000 ; SCOTTI et al., 2001 ; FENICE et al., 2003). Especificamente como indicador do crescimento de *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em meio sólido, a medida da glicosamina mostrou bons resultados nos trabalhos de KALOGERIS et al. (1999) e KALOGERIS et al. (2003).

O consumo de oxigênio, durante o metabolismo dos fungos aeróbios, está associado ao crescimento celular e tem sido utilizado para a estimativa de biomassa nos cultivos em meio sólido. A medida do oxigênio é simples, rápida e pode ser feita diretamente no sistema fermentativo, utilizando-se um analisador de oxigênio ou um cromatógrafo gasoso (DEGRANDES et al., 1991 ; LEKHA & LONSANE, 1994 ; TEREbiznik & PILOSOF,

1999). Entretanto, para a estimativa da biomassa, a partir destes dados, é necessário que se obtenha um modelo de correlação entre o consumo do oxigênio e a formação de biomassa, como o proposto por SATO et al. (1983). Segundo TEREbiznik & PILOSOF (1999) métodos baseados na composição dos constituintes celulares dos fungos são utilizados para determinar a correlação nos modelos e, dentre estes, a medida de glicosamina é a mais utilizada.

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo determinar indiretamente a concentração de biomassa de *Thermoascus aurantiacus* formada no cultivo em meio sólido, utilizando a medida do conteúdo de glicosamina e, a partir destes dados, somados aos dados relativos ao consumo de oxigênio pelo microrganismo, determinar alguns parâmetros cinéticos do processo, importantes para seu controle e otimização.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e inóculo

Thermoascus aurantiacus ATCC 204492 foi mantido em meio composto por 2%(p/V) de ágar extrato de malte e 2% (p/V) de ágar-ágar, e estocado a 4 °C. Os esporos foram obtidos após cultivo a 45 °C por 7 dias sendo o inóculo preparado colhendo-se, assepticamente, os esporos em água estéril, raspando-se a superfície do meio com alça de platina. A padronização do inóculo foi feita por contagem em Câmara de Neubauer sendo os meios de cultivo inoculados de forma a se obter uma concentração padrão de 10^4 esporos/grama de substrato.

2.2 Meios e Condições de cultivo

O meio para os cultivos em estado sólido foi preparado a partir de bagaço de mandioca e farelo de arroz, na proporção 7:3, respectivamente, acrescido de 1% (p/p) de extrato de levedura. Os meios foram, inicialmente, esterilizados, por 30 minutos a 121 °C, em béchers de polipropileno, fechados com papel kraft. Em seguida, estes foram inoculados, na concentração padrão de 10^4 esporos/g de meio sólido, e a umidade foi corrigida para 55%, com adição de água destilada estéril. Após esta etapa, o conteúdo dos frascos foi transferido, assepticamente, para as colunas, previamente preenchidas, no fundo, com algodão, vidro picado e papel de filtro, e esterilizadas por 30 minutos a 121 °C. Seguindo o preenchimento das colunas com o meio sólido inoculado, foram colocados, na parte

superior destas, papel de filtro e algodão, sendo, então, fechadas e levadas ao banho termostático a 45 °C. Utilizou-se, neste trabalho o sistema de reatores de coluna denominado “Sistema de Raimbault”, conforme descrito em DURAND (2003).

Os cultivos foram conduzidos por 240 horas, sendo retirada uma coluna, a cada 24 horas, para análises. Todos os cultivos foram realizados em triplicata.

2.3 Cultivos líquidos

Os cultivos líquidos foram realizados em condições estáticas a partir de diferentes composições de meio, onde foram determinados o peso seco do micélio formado e o teor de glicosamina desta biomassa seca. Esta etapa foi feita utilizando-se três composições de meio de cultivo, preparados em água destilada.

1. 1% (p/V) de xilana “birchwood”;
2. 1% (p/V) de PDA (potato dextrose agar – Merck) líquido ;
3. 1% (p/V) de extrato de farelo de arroz 20%.

Todos os meios foram acrescidos de 0,1% (p/v) de extrato de levedura e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Os cultivos foram conduzidos a 45 °C, em Erlenmeyers de 125 ml, contendo 25 mL de meio, que foram inoculados com suspensão de esporos na concentração de 10⁴ esporos/mL. A duração dos cultivos foi de 10 dias e, a cada intervalo de 12 horas, um frasco foi retirado para amostragem. Foram determinados, de cada frasco, o peso seco do micélio e o teor de glicosamina desta biomassa seca.

2.4 Extração da enzima

A extração da enzima do meio fermentado foi feita pela incubação de uma alíquota de 1 g de amostra, previamente seca a 35 °C por 24 horas, com 15 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0, na temperatura de 30 °C, velocidade de agitação de 200 rpm, por 30 minutos. Após, esta mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e filtrada a vácuo utilizando-se papel de filtro Wathman N° 1.

2.5 Procedimentos analíticos

2.5.1 Ensaio enzimático

A atividade de xilanases foi determinada utilizando-se solução 1% (p/V) de xilana birchwood (Sigma), conforme procedimento descrito por BAILEY et al. (1992). Os açúcares redutores liberados da reação foram dosados pelo método do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959), utilizando-se solução de xilose como padrão.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberação de 1 μmol de açúcares redutores por minuto.

A atividade foi expressa em U/grama de matéria seca.

2.5.2 Determinação da biomassa

Para determinação da biomassa formada nos cultivos em estado sólido foi utilizada a medida do conteúdo de glicosamina, utilizando-se a metodologia descrita por AIDOO et al. (1981). A obtenção dos valores de biomassa, foi realizada pela correlação estabelecida entre esta medida e o peso seco do micélio, obtidos em cultivos líquidos. Os resultados foram expressos em mg de glicosamina por g de biomassa seca, nos cultivos líquidos e em mg de glicosamina por g de meio sólido, nos cultivos em meio sólido.

2.6 Determinação da velocidade de consumo de oxigênio

A velocidade de consumo de oxigênio foi obtida conforme relatado por MAIORANO et al. (1992), que descrevem uma adaptação do método proposto por SATO et al. (1983). Para esta determinação as amostras foram retiradas, dos cultivos nos reatores de coluna, a cada 24 horas para análise e introduzida no sistema conforme esquema ilustrado na Figura 1.

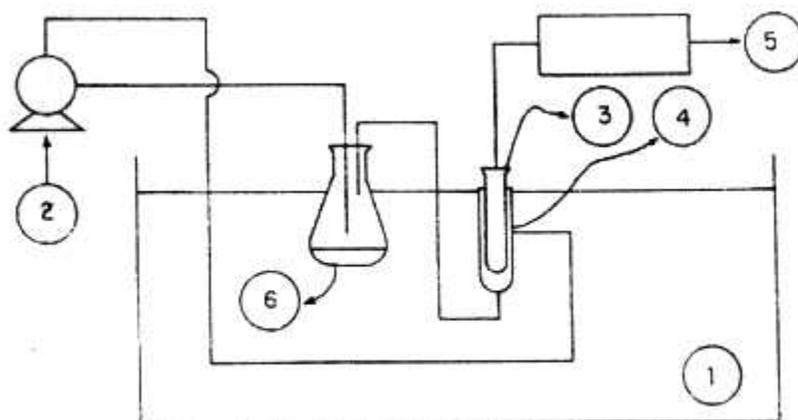


Figura 1 – Esquema do sistema para determinação da velocidade do consumo de oxigênio (Fonte: MAIORANO et al. (1992))

Onde:

- 1 – Banho termostático
- 2 – Bomba peristáltica
- 3 – Eletrodo para medida de oxigênio
- 4 – Suporte para o eletrodo

5 – Analisador de oxigênio

6 – Erlenmeyer de 250 mL com a amostra

A velocidade de consumo de oxigênio, considerada constante em um determinado intervalo de tempo, foi calculada, com base na lei dos gases ideais, conforme o descrito por MAIORANO et al. (1992), pela equação 1:

$$OUR = \frac{(P_{O_{2i}} - P_{O_{2t}}).V}{M.R.T.\nabla t} \quad (1)$$

Onde:

OUR = velocidade de consumo de oxigênio (mmol O₂/gms.h)

$P_{O_{2i}}$ = pressão parcial do oxigênio inicial (mmHg)

$P_{O_{2t}}$ = pressão parcial do oxigênio, após o tempo de medida, em minutos (mmHg)

V = volume total de gás no sistema de medida (L)

M = massa seca de bagaço fermentado (gms)

R = constante universal dos gases = 62,36 (mmHg . L/K.mol)

T = temperatura da medida (K)

∇t = intervalo de tempo no qual é realizada a medida (min)

A partir dos dados referentes ao consumo de O₂ (mmol), foram obtidos os valores de OUR, pela equação (1) que, neste trabalho, foram expressos em função da massa de bagaço fermentado, ou seja, M.OUR. Portanto, a velocidade de consumo de O₂ em função da massa de bagaço fermentado, M.OUR, foi obtida, para cada amostra retirada dos cultivos, pela regressão linear entre os valores O₂ consumido (mmol O₂) e tempo de medida (min), sendo M.OUR (mmol O₂/h) o valor corresponde ao coeficiente angular obtido na regressão. A velocidade específica de respiração celular, QO₂, expressa em mmol O₂/g biomassa.h, foi obtida pela divisão do valor de M.OUR (mmol O₂/h) pela massa celular (g biomassa), obtida pelo teor de glicosamina, correspondente ao intervalo de amostragem.

3.9.1 Determinação das velocidades específicas

A determinação das velocidades específicas, definidas como:

- Velocidade específica de crescimento celular:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

- Velocidade específica de formação de produto (xilanases):

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (6)$$

expressas em h^{-1} , foram obtidas pelo método de Le Duy & Zajic (LE DUY & ZAJIC, 1973), conforme descrito em HISS (2001).

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da biomassa em meio sólido

Para esta determinação utilizou-se a medida do conteúdo de glicosamina do micélio, estabelecendo, anteriormente, uma correlação entre esta medida e peso da biomassa seca, obtida em cultivo líquido. Foram utilizadas três composições de meio líquido sendo aquela constituída por 1% de extrato de farelo de arroz a que apresentou os melhores resultados. A Figura 2 mostra a curva de calibração entre a biomassa e a concentração de glicosamina.

Esta mesma correlação, entre conteúdo de glicosamina e biomassa seca, obtida de um cultivo líquido, foi estabelecida por outros autores, que fizeram uso desta metodologia indireta para determinação da massa celular nos cultivos em meio sólido, como relatado nos trabalhos de AIDOO et al. (1981), BANDELIER et al. (1997), GELMI et al. (2000), SCOTTI et al. (2001), KALOGERIS et al. (2003) e FENICE et al. (2003). Outro parâmetro, entretanto, foi utilizado por GUTIERREZ-CORREA & TENGARDY (1998), que correlacionaram o conteúdo de glicosamina com a porcentagem de proteína no micélio seco. De acordo com as observações feitas por SCOTTI et al. (2001), é imperativo que o constituinte celular, selecionado para ser o indicativo do crescimento microbiano, se mantenha constante, em relação à biomassa formada, ao longo do desenvolvimento do fungo. Esta constatação, em relação aos dados deste trabalho, pode ser vista também na Figura 2 que traz resultados semelhantes aos obtidos pelos autores acima mencionados e por DESGRANDES et al. (1991).

A relação entre conteúdo de glicosamina e biomassa, obtida neste trabalho, foi de 10,7 mg de glicosamina/g biomassa, que é o valor correspondente ao coeficiente angular da equação de linearização, mostrada na Figura 2. Valores próximos a este foram

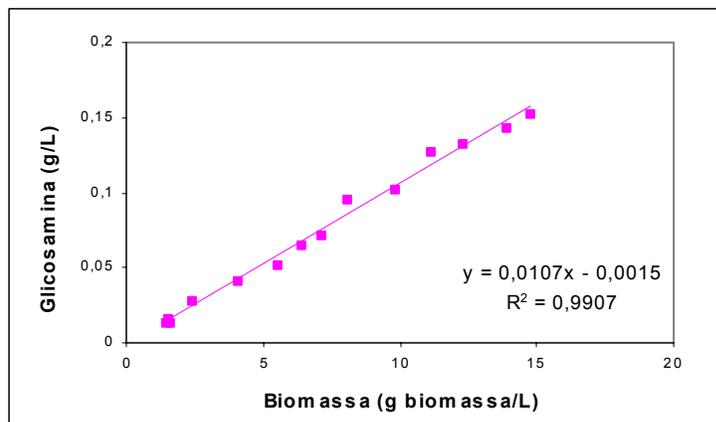


Figura 2 – Curva de calibração entre a biomassa de *Thermoascus aurantiacus* crescido em meio líquido, a base de extrato de farelo de arroz, e o conteúdo de glicosamina na biomassa.

encontrados em outros trabalhos como o de NARAHARA et al. (1982) que, no cultivo de *Aspergillus oryzae*, obtiveram a relação de 9,7 mg de glicosamina/g biomassa seca. SMITS et al. (1996) verificaram que a proporção entre glicosamina e biomassa seca de *Trichoderma reesei* foi de 8,1 mg/g e GELMI et al. (2000) obtiveram, para *Gibberella fujikoroii*, a relação de 8,3 mg de glicosamina/g de biomassa seca.

Os resultados de quatro repetições de cultivo estão mostrados na Figura 3 e as mudanças no aspecto visual do meio com 24 horas, e após 240 de cultivo, em função do crescimento celular, estão mostradas na Figura 4.

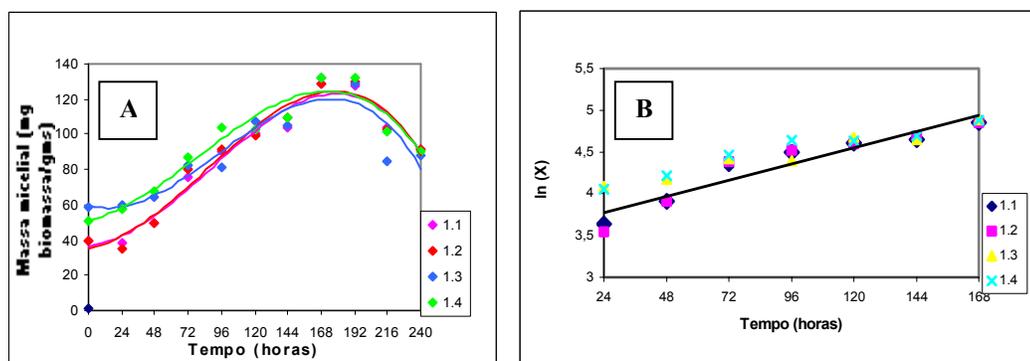


Figura 3 – (A) Massa micelial formada ao longo do tempo e (B) valores de $\ln(X)$ ao longo do tempo nas quatro repetições dos cultivos em estado sólido (1.1, 1.2, 1.3, 1.4) conduzidos em reatores de coluna de Raimbault.

Os resultados mostram que o crescimento de *Thermoascus aurantiacus* segue o modelo exponencial podendo-se observar a fase exponencial de crescimento entre 24 e 168 horas e um curto período relativo à fase de latência (0 – 24 horas). Trabalhos

descrevendo modelos cinéticos para crescimento de diferentes microrganismos crescidos em diferentes meios sólidos são apresentados na literatura como os de ASHLEY et al. (1999) para *Aspergillus niger* em substrato amiláceo, NAGEL et al. (2000) para *Aspergillus oryzae* em grãos de trigo, GELMI et al. (2002) para *Gibberella fujikuroi* em Amberlite IRA-900 e ERKMEN & ALBEN (2002) para *Aspergillus niger* em semolina. No entanto, resultados relativos à modelagem da cinética de crescimento de *Thermoascus aurantiacus* em meio sólido à base de bagaço de mandioca não foram encontrados na literatura.



Figura 4 – Ilustração da modificação visual do meio de cultivo entre 24 e 240 horas, em função do crescimento celular.

Alguns trabalhos, nos quais foram avaliados diferentes metodologias indiretas para a determinação da biomassa nos cultivos em estado sólido, constataram a influência de alguns fatores sobre o método de dosagem do conteúdo de glicosamina do micélio, como composição do meio, idade da cultura e condições de cultivo (DEGRANDES et al., 1991 ; SMITS et al., 1996 ; OOIJKAAS, et al., 1998 ; SCOTTI et al., 2001).

No entanto, esta metodologia vem sendo bastante utilizada e os resultados obtidos, por diferentes autores, estão mostrados no Quadro 1. Comparando-se os valores máximos obtidos neste trabalho, 132,25 mg biomassa/gms, com os apresentados no Quadro 1, pode-se observar que houve boa produção micelial de *Thermoascus aurantiacus* nos cultivos em estado sólido conduzidos nos reatores de coluna.

Quadro 1 –Valores máximos de biomassa, determinados pelo conteúdo de glicosamina, em diferentes processos conduzidos em estado sólido.

Microrganismo	Biomassa (mg/gms)	Referência
<i>Aspergillus ficuum</i>	85,0	HAN et al., 1997
<i>Aspergillus niger</i>	30,0	PANDEY et al., 1996
<i>Aspergillus oryzae</i>	35,0	NARAHARA et al., 1982
<i>Cunninghamella elegans</i>	170,0	SCOTTI et al., 2001
<i>Gibberella fujikoroii</i>	15,0	BANDELIER et al., 1997
<i>Gibberella fujikoroii</i>	39,7	GELMI et al., 2000
<i>Panus tigrinus</i>	69	FENICE et al., 2003
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	29,3	KALOGERIS et al., 1999
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	60,9	KALOGERIS et al. 2003
<i>Trichoderma reesei</i>	9,0	SMITS et al., 1996
<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Aspergillus phoenicis</i>	240,0	GUTIERREZ-CORREA & TENGERDY, 1998

É importante ressaltar, entretanto, que PANDEY et al. (1996) verificaram diferenças nos valores de biomassa obtidos, fazendo uso da técnica de glicosamina, nos cultivos em reatores de coluna para produção de glicoamilase por *Aspergillus niger*, em função da altura de preenchimento das colunas com o meio sólido, sendo, o maior valor de biomassa, encontrado nos cultivos onde se utilizou 18 cm de altura de leito, dentre outras alturas testadas (4,5, 9,0, e 22,0 cm). GUTIERREZ-CORREA & TENGERDY (1998) constataram, ainda, influência do tipo de fonte de nitrogênio utilizada, orgânica ou inorgânica, na formação da biomassa de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus phoenicis*, também avaliada pela técnica da glicosamina, e KALOGERIS et al. (2003), também fazendo uso desta técnica para determinação da biomassa de *Thermoascus aurantiacus*, verificaram a influência da umidade do meio e da temperatura do cultivo sobre a formação

da biomassa. Neste caso, os mais elevados valores foram obtidos nas condições de 80% de umidade e 49 °C de temperatura.

3.1.1 Determinação das velocidades específicas

A partir dos dados da biomassa formada nos cultivos em meio sólido foi possível efetuar a determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{x_{max}}$). Utilizando-se, ainda, os valores relativos a atividade de xilanases, obtida nos cultivos, ilustrados na Figura 5, pôde-se determinar a velocidade específica máxima de formação de produto ($\mu_{p_{max}}$).

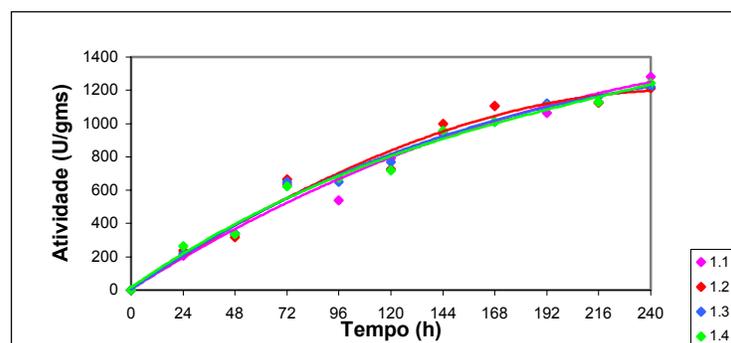


Figura 5 – Atividade de xilanases produzida ao longo do tempo nas quatro repetições dos cultivos em estado sólido (1.1, 1.2, 1.3, 1.4) conduzidos em reatores de coluna de Raimbault.

A Tabela 1 mostra os resultados de $\mu_{x_{max}}$ e $\mu_{p_{max}}$ obtidos nas quatro repetições dos cultivos e o valor médio, com o respectivo desvio padrão, destes parâmetros.

Os valores de $\mu_{x_{max}}$, são inferiores aos encontrados para outros fungos crescidos em cultivos em estado sólido, como $0,23 \text{ h}^{-1}$, para *Giibberella fujikuroi* (GELMI et al., 2000), $0,10$ e $0,22 \text{ h}^{-1}$, para *Aspergillus oryzae* (SUGAMA & OKAZAKI, 1979 ; NARAHARA et al., 1982) e $0,15 \text{ h}^{-1}$, para *Trichoderma reesei* (SMITS et al., 1996) Cabe ressaltar, entretanto, que o *Thermoascus aurantiacus* é um fungo de crescimento lento, sendo necessárias 240 horas para o seu cultivo, o que é um tempo longo, quando comparado a estes outros fungos, que têm tempo de cultivo variando de 32 a 150 horas.

A correlação entre a formação de biomassa e a produção de xilanases está ilustrada na Figura 6, mostrando associação entre a formação de biomassa e a produção da enzima na fase exponencial do crescimento celular, isto é, entre 24 e 168 horas.

Tabela 1 – Valores de $\mu_{x\max}$ e $\mu_{p\max}$ obtidos nas quatro repetições dos cultivos em estado sólido (1.1, 1.2, 1.3, 1.4) conduzidos em reatores de coluna de Raimbault.

Cultivo	$\mu_{x\max}$ (h^{-1})	Valor Médio
1.1	0,0068	$0,0061 \pm 0,0005 h^{-1}$
1.2	0,0057	
1.3	0,0055	
1.4	0,0064	
$\mu_{p\max}$ (U/gms.h)		
1.1	40,25	$45,07 \pm 2,59 U/gms.h$
1.2	45,58	
1.3	46,56	
1.4	47,91	

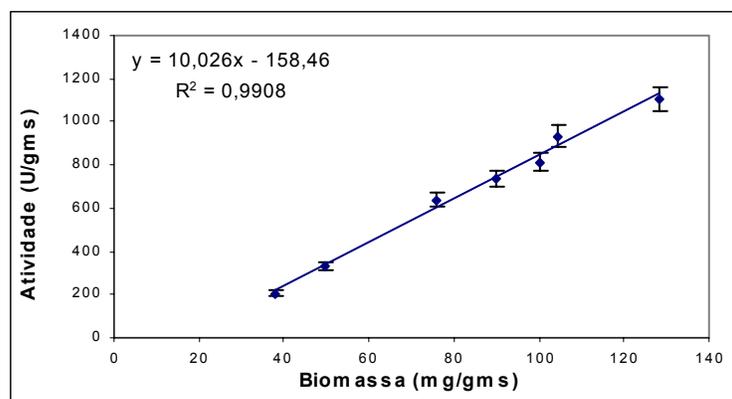


Figura 6 – Atividade de xilanases em função da biomassa formada.

As barras de erro correspondem ao desvio padrão em torno da média dos valores.

Este mesmo resultado, também para produção de xilanase por *Thermoascus aurantiacus*, foi encontrado por KALOGERIS et al. (2003) que obtiveram a correlação entre o crescimento de *Thermoascus aurantiacus* em meio sólido à base de farelo de trigo e a produção de celulasas e hemicelulasas eficientemente descrita pelo modelo cinético de Le Duy. Este modelo, aplicável quando as células necessitam de um período de tempo para seu metabolismo que antecede a formação de produtos (Brown & Vass (1973) citados por KALOGERIS et al. 2003), parece ser aplicável ao processo aqui estudado. SMITS et al. (1996), também obtiveram resultados comprovando a associação entre a produção de xilanase e a formação de biomassa de *Trichoderma reesei*.

A partir da correlação mostrada na Figura 6 foi possível se determinar o fator de rendimento de produto (xilanases) por grama de biomassa produzida, $Y_{P/X}$, que teve o valor de 10,02 U/mg de biomassa.

3.2 Determinação dos parâmetros cinéticos do consumo de oxigênio

A medida da velocidade de consumo de oxigênio é uma técnica que possibilita a obtenção de valores referentes ao crescimento celular nos cultivos em estado sólido, de acordo com o descrito por SATO et al. (1983). No entanto, neste trabalho, esta medida foi utilizada para o acompanhamento da cinética do processo, determinando-se, além das velocidades de consumo de oxigênio em função da massa de bagaço fermentado (M.OUR), também a velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) e o coeficiente de manutenção celular (m_o).

Inicialmente, determinou-se o intervalo de tempo em que seria feita a medida do consumo de oxigênio. Para isto, mediu-se, de cada amostra retirada dos cultivos realizados nos reatores de coluna, o consumo de oxigênio, a cada 1 minuto, durante 120 minutos, para que fosse identificada a faixa de linearidade desta medida. A partir destes resultados verificou-se a correlação entre a medida do consumo do oxigênio (mmol O_2) e o tempo (min) desta medida, para diferentes intervalos, e obteve-se que, durante os 30 minutos iniciais, o perfil do consumo de oxigênio pôde ser aproximado como sendo linear. A Tabela 2 traz os valores médios dos ajustes dos valores de consumo de oxigênio (y) com o tempo de medida (x), resultantes de três repetições.

Tabela 2 – Ajuste dos valores de consumo de oxigênio (y) com o tempo de medida, 30 minutos (x).

Amostra	Equação	R ²
24	$y = 0,0119x + 0,0171$	0,9906
48	$y = 0,0284x + 0,1378$	0,9824
72	$y = 0,0305x + 0,0287$	0,9987
96	$y = 0,0208x + 0,1262$	0,983
120	$y = 0,0219x + 0,0331$	0,9964
144	$y = 0,0364x + 0,0821$	0,9819
168	$y = 0,0235x + 0,0792$	0,9811
192	$y = 0,0257x + 0,072$	0,9878
216	$y = 0,0229x + 0,0603$	0,9801
240	$y = 0,0136x + 0,0191$	0,99

Deve-se ressaltar que, mesmo após 30 minutos de medida, quando observou-se mais intensamente o desvio da linearidade, a concentração, em mmol de O_2 consumido, continua aumentando, indicando que há respiração celular. No entanto, este desvio da linearidade, deve-se, possivelmente, à redução da umidade dos meios, dificultando a transferência de oxigênio bem como à diminuição do espaço interpartículas em função do crescimento celular, o que, conseqüentemente, diminui a velocidade do consumo do O_2 .

O coeficiente angular das equações de linearização, apresentadas na Tabela 2, refere-se ao valor da velocidade de consumo do O_2 em função da massa de bagaço fermentado, M.OUR, dado em mmol O_2 /h. A Figura 7 ilustra esta velocidade relacionada com a massa micelial formada (mg biomassa/gms), onde pode-se observar uma correlação linear entre os dados referentes à fase exponencial de crescimento. SMITS et al. (1996), entretanto, observaram que, nos pontos onde houve elevado nível de formação de biomassa de *Trichoderma reesei* ocorreu diminuição da velocidade de consumo do oxigênio, em cultivo em estado sólido conduzido em frascos, onde não há controle do acúmulo de calor. Este fato foi considerado, pelos autores, um dado bastante significativo, especialmente em sistemas de cultivos heterogêneos, como os cultivos em estado sólido, onde, além da velocidade de consumo de oxigênio, há também uma velocidade de geração de calor, que influencia na formação da biomassa. No entanto, quando este fator é controlado, como no trabalho de NARAHARA et al. (1982), que realizaram o cultivo em estado sólido em um reator onde não se observou a formação de gradientes termais, é possível se obter o aumento na velocidade de consumo de oxigênio paralelo ao aumento da concentração de biomassa, como foi verificado, pelos autores, no cultivo de *Aspergillus oryzae*, nestas condições. É importante lembrar que, no trabalho aqui apresentado, utilizou-se os reatores de coluna de Raimbault, onde não se esperava encontrar acúmulo de calor, o que parece ter acontecido, tendo em vista as observações destes autores.

A correlação apresentada na Figura 7 mostra, ainda, que é possível obter o valor da massa micelial formada, a partir dos dados referentes à velocidade de consumo de oxigênio. No entanto, esta determinação restringe-se a faixa de dados onde se observa relação direta entre o aumento destas duas variáveis que, neste caso, ocorreu no intervalo entre 24 e 120 horas, o que corresponde ao valor de M.OUR de 0,012 e 0,035 mmol O_2 /h.

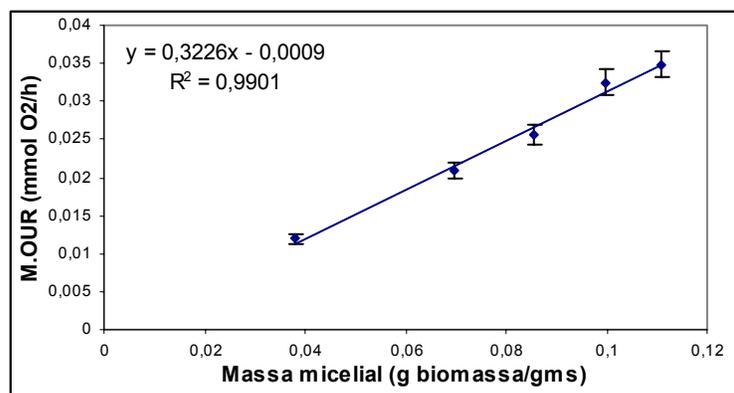


Figura 7. Correlação entre a velocidade de consumo de oxigênio (M.OUR) e a massa micelial formada, obtida pela medida do conteúdo de glicosamina.

Para o cálculo da velocidade específica de consumo de oxigênio, partiu-se dos valores das velocidades de consumo de O₂ por grama de bagaço fermentado, isto é, OUR (mmol/gms.h), e dos valores de biomassa formada, X, expressa em g biomassa/gms, a partir da medida do conteúdo de glicosamina. Como foi utilizado todo o conteúdo das colunas nas determinações da velocidade de consumo de O₂, inicialmente, o valor de M correspondeu a 20 g. No entanto, após certo tempo de cultivo, a massa de bagaço fermentado proveniente dos reatores de coluna atingiu valores menores, em função, principalmente, da perda de umidade. Assim, para esta determinação, o conteúdo de bagaço fermentado nas colunas foi previamente pesado, para depois ser utilizado nos ensaios de medida de O₂. Determinou-se, então, a velocidade específica de consumo de O₂, QO₂ (mmol O₂/g biomassa.h), cujos resultados estão ilustrados na Figura 8.

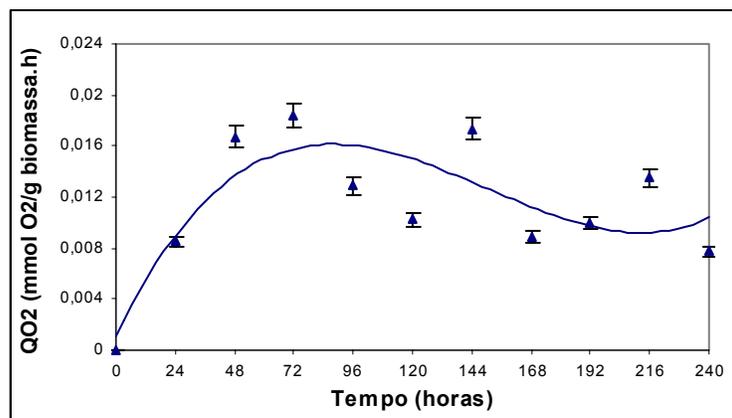


Figura 8– Velocidade específica de consumo de oxigênio.

Cabe ressaltar ainda que o coeficiente angular obtido na correlação apresentada na Figura 7 (0,3 mmol O₂.gms/g biomassa.h), quando dividido pela massa de bagaço fermentado utilizada nos ensaios (M=20 gms), corresponde ao valor de QO₂ médio mostrado na Figura 8, entre o período de 48 a 120 horas, que equivale a fase exponencial de crescimento, onde se tem QO₂ constante.

Como a velocidade total de consumo de oxigênio é igual à velocidade de consumo devido ao crescimento do microrganismo mais a velocidade de consumo que independe do crescimento (NARAHARA et al., 1982 ; SATO et al., 1983, KIM et al., 1985 , SMITS et al., 1996), pode-se escrever que:

$$QO_2 = \left(\frac{1}{Y_{x/O}}\right) \cdot \mu_x + m_0 \quad (2)$$

Onde:

QO₂= velocidade específica de consumo de oxigênio (mmol O₂/g biomassa.h)

Y_{x/O} = fator de conversão de oxigênio em células (g biomassa/mmol O₂)

m₀ = coeficiente de manutenção celular (mmol O₂/g biomassa.h)

X = massa celular (g/gms)

μ_x = velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹)

t = tempo de fermentação (h)

Assim, fazendo-se a regressão linear entre os valores de QO₂ e μ_x, conforme ilustrado na Figura 9, determinou-se os valores de Y_{x/O} e m₀.

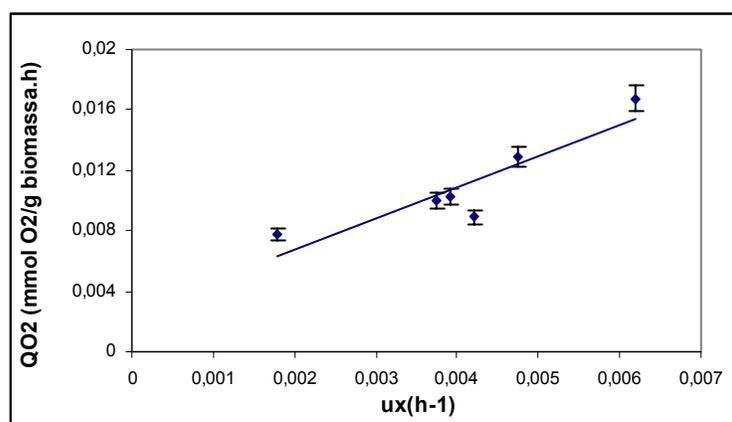


Figura 9 – Velocidade específica de consumo de oxigênio (QO₂) em função da velocidade específica de crescimento celular (μ_x)

Encontrou-se, para o fator de conversão, $Y_{X/O}$, o valor de 0,0189 g biomassa/mmol O_2 e para o coeficiente de manutenção celular, m_O , o valor de 0,00325 mmol O_2 /g biomassa.h. A comparação destes dados com outros, publicados na literatura, deve ser feita com a ressalva de que são dados provenientes de outros microrganismos que possuem metabolismo diferenciado em relação ao *Thermoascus aurantiacus*. Para melhor discussão, entretanto, entre outros valores de $Y_{X/O}$ e m_O é importante que estes tenham sido obtidos nas mesmas condições aqui descritas, isto é, cultivo em estado sólido e obtenção de μ_x pela medida do conteúdo de glicosamina, como é o caso do trabalho de KIM et al. (1985), para *Sporotrichum cellulophilum*, onde foram encontrados, para $Y_{X/O}$ o valor de 0,05 g biomassa/mmol O_2 e para m_O o valor de 0,75 mmol O_2 /g biomassa.h, ambos superiores aos valores encontrados neste trabalho. SMITS et al. (1996) também procederam as determinações destes parâmetros cinéticos fazendo uso da medida de glicosamina no cultivo em meio sólido de *Trichoderma reesei* obtendo-se, para $Y_{X/O}$, um valor muito inferior ao aqui apresentado, 0,006 g biomassa/mmol O_2 , e para m_O , um valor muito superior, 6,62 mmol O_2 /g biomassa.h. Outros trabalhos encontrados na literatura, descrevem o valor de $Y_{X/O}$ e m_O , obtidos, no entanto, a partir de dados de μ_x provenientes de um cultivo submerso. Este é o caso do trabalho de SATO et al. (1983), que descrevem os dados referentes ao cultivo de *Candida lipolytica* e MAIORANO et al. (1992), para *Aspergillus oryzae*. Nestes dois trabalhos foram obtidos, para $Y_{X/O}$, os valores de 0,042 e 0,0010 g biomassa/mmol O_2 , e para m_O , 0,0017 e 0,0031 mmol O_2 /g biomassa.h, respectivamente. NARAHARA et al. (1982) mostraram os valores destes parâmetros, medidos, entretanto, a partir da velocidade de produção de CO_2 , mas correlacionada com μ_x obtida a partir da medida da glicosamina, encontrando-se $Y_{X/CO_2}=14,9$ g biomassa/mol CO_2 e $m_{CO_2}=0,00179$ mol CO_2 /g biomassa.h.

É importante, ainda, ressaltar, que o valor do coeficiente de manutenção celular m_O obtido (0,00325 mmol O_2 /g biomassa.h) corresponde a 20% da velocidade específica máxima de consumo de oxigênio (0,0189 mmol O_2 /g biomassa.h), o que pode ser considerado um bom resultado para este tipo de cultivo, uma vez que 80% do oxigênio se destina a formação de biomassa.

4 – CONCLUSÕES

A utilização da medida do conteúdo de glicosamina, para determinação da biomassa formada nos cultivos, foi adequada para o processo. O crescimento celular está associado

à produção da enzima, na fase exponencial, no entanto, a máxima produção da enzima não ocorre nesta fase. Aliando-se os valores obtidos pela medida da glicosamina com os dados referentes à velocidade do consumo de oxigênio é possível se determinar parâmetros cinéticos importantes para o processo como as velocidades específicas de crescimento celular e formação do produto bem como o fator de conversão de biomassa em produto ($Y_{P/X}$) e de oxigênio em célula ($Y_{X/O}$) além do coeficiente de manutenção celular (m_o). Neste caso, foi ainda possível estabelecer uma correlação entre a velocidade de consumo de oxigênio (M.OUR) e a biomassa formada, na fase exponencial de crescimento. O valor do coeficiente de manutenção celular foi correspondente a 20% da velocidade específica máxima de consumo de oxigênio, o que mostra um bom aproveitamento do oxigênio para formação de biomassa.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDOO, K.E. ; HENDRY, R. ; WOOD, B.J. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **12**: 6-9, 1981.

ASHLEY, V.M. ; MITCHELL, D.A. ; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, **3**(2): 141 – 150, 1999.

BAILEY, M.J. ; BIELY, P. ; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, **23**(3): 257 – 271, 1992.

BANDELIER, S. ; RENAUD, R. ; DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in a aseptic pilot-scale reactor. **Process Biochemistry**, **32**(2): 141 – 145, 1997.

CASTILHO L.R. ; POLATO, C.M.S. ; BARUQUE, E.A ; SANT'ANNA JR., G.L. ; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, **4**: 239 – 247, 2000.

CORDOVA-LOPEZ, J. ; GUTIERREZ-ROJAS, M. ; HUERTA, S. ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. ; FAVELA-TORRES, E. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. **Biotechnology Techniques**, **10**(1): 1 – 6, 1996.

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

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, **13**(2 –3): 113 – 125, 2003.

ERKMEN, O. ; ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, **52**: 161 – 166, 2002.

FENICE, M. ; SERMANNI, G.G. ; FEDERICI, F. ; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**, **100**: 77 – 85, 2003.

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

GHANEM, N.B. ; YUSEF, H.H. ; MAHROUSE, H.K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. **Bioresource Technology**, **73**: 113 – 121, 2000.

GUTIERREZ-CORREA, M. ; TENDERDY, R.P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, **20**(1): 45 – 47, 1998.

HAN, Y.W. ; GALLAGHER, D.J. ; WILFRED, A. G. Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. **Journal of Industrial Microbiology**, **2**: 195 – 200, 1987.

HISS, H. Cinética dos Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. ; LIMA, U.A. ; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. (Eds.), **Biotecnologia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., V.6, p.93-122, 2001.

KALOGERIS, E. ; FOUNTOUKIDES, G. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. **Bioresource Technology**, **67**: 313 – 315, 1999.

KALOGERIS, E. ; INIOTAKI, F. ; TOPAKAS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, **86**: 207 – 213, 2003.

KIM, J.H. ; HOSOBUCHI, M. ; KISHIMOTO, M. ; SEKI, T. ; YOSHIDA, T. ; TAGUCHI, H. Cellulase Production by a Solid State Culture System. **Biotechnology and Bioengineering**, **7**: 1445 – 1450, 1985

LE DUY, A. ; ZAJIC, J.E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, **15**(4): 805 – 810, 1973.

LEKHA, P.K. ; LONSANE, B.K. Biomass Estimation in Solid State Fermentation In: PANDEY, A (Ed.), **Solid State Fermentation**, Wiley Eastern Limited, India, p.38-48, 1994.

LONSANE, B.K. ; GHILDYAL, N.P. ; BUDIATMAN, S. ; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, **7**: 258 – 265, 1985.

LONSANE, B.K. ; SAUCEDO-CASTANEDA, G. ; RAIMBAULT, M. ; ROUSSOS, S. ; VINIEGRA-GONZALES, G. ; GHILDYAL, N.P. ; RAMAKRISHMA, M. ; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up Strategies for Solid State Fermentation Systems: a review. **Process Biochemistry**, **26**: 1 – 15, 1991.

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

MADAMWAR, D. ; PATEL, S. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **8**: 183 – 186, 1992.

MAIORANO, A.E. ; BONOMI, A. ; SCHMIDELL, W. ; OGAKI, Y. Determinação do Crescimento Celular em Fermentações em Estado Sólido. **Publicação IPT**, 1992.

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

MITCHELL, D.A. ; BEROVIC, M. ; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, **68**: 61 – 138, 2000.

NAGEL, F.J.J.I. ; TRAMPER, J. ; BAKKER, M.S.N. ; RINZEMA, A Temperature Control in a Continuously Mixed Bioreactor for Solid-State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, **72(2)**: 219 – 230, 2000.

NARAHARA, H. ; KOYAMA, Y. ; YOSHIDA, T. ; PICHANGKURA, S. ; UEDA, R. ; TAGUCHI, H. Growth and Enzyme Production in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**, **60(4)**: 311 – 319, 1982.

NARANG, S. ; SAHAI, V. ; BISARIA, V.S. Optimization of xylanase production by *Melanocarpus albomyces* IIS68 in solid state fermentation using response surface methodology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **91(4)**: 425 – 7, 2001.

NIGAN, P. ; SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, **6**: 405 – 423, 1994.

OOIJKAAS, L.P. ; TRAMPER, J. ; BUITELAAR, R.M. Biomass estimation of *Coniothyrium minitans* in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, **22**: 480 – 486, 1998.

PANDEY, A. ; SELVAKUMAR, P. ; ASHAKUMARY, L. Performance of a column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. **Process Biochemistry**, **31**(1): 43 – 46, 1996.

PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. ; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, **35**: 1153 – 1169, 2000.

SATO, K. ; NAGATANI, M. ; NAKAMURA, K. ; SATO, S. Growth Estimation of *Candida lipolytica* from Oxygen Uptake in a Solid State Culture with Forced Aeration. **Journal Of Fermentation Technology**, **61**(6): 623 – 629, 1983.

SCOTTI, C.T. ; VERGOIGNAN, C. ; FERON, G. ; DURAND, A. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, **7**: 1 – 5, 2001.

SMITS, J.P. ; RINZEMA, A. ; TRAMPER, J. ; VAN SONSBECK, H.M. ; KNOL, W. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Applied Microbiology Biotechnology**, **46**: 489 – 498, 1996.

SOUZA, M.C.O. ; ROBERTO, I.C. ; MILAGRES, A.M.F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Applied Microbiology Biotechnology**, **52**: 768 – 772, 1999.

SUGAMA, S. ; OKAZAKI, N. Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. **Journal of Fermentation Technology**, **57**(5): 408 – 412, 1979.

TEREBIZNIK, M.R. ; PILOSOFF, A M.R. Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter. **Biotechnology Techniques**, **13**: 215 – 219, 1999.

5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os resultados obtidos neste trabalho levaram as seguintes conclusões:

Produção de xilanases:

- *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 produziu níveis de atividade de xilanases, 1.471 U/gms, comparáveis a outros dados de literatura, quando o meio, para o cultivo em estado sólido, constituído por bagaço de mandioca, foi suplementado com 30% de fonte de nitrogênio orgânica, na forma de farelo de arroz. A produção da enzima mostrou, entretanto, ser influenciada pela concentração desta suplementação nos meios ;
- A produtividade de xilanases, no sistema de reatores de coluna de Raimbault (5,33 U/gms.h), foi inferior ao obtido nos cultivos em frascos (7,66 U/gms.h), havendo indicações de que a umidade ótima para produção da enzima é menor do que para o crescimento celular. A umidade dos meios e a aeração, controlada nos reatores de coluna, mostraram influência sobre a produção de xilanases ;
- As condições dos cultivos, nos frascos e nos reatores de coluna, não induziram elevadas atividades de celulasas e proteases ;

Utilização dos reatores de coluna de Raimbault:

- Os reatores de coluna de Raimbault, para serem utilizados no cultivo de fungos termófilos, precisa ser adaptado, para operar nas condições de elevada temperatura. A umidade inicial do meio sólido é mantida ao longo do cultivo nos reatores, mas o valor inicial pode ser reduzido, devido a dupla umidificação do sistema.

Determinação dos parâmetros cinéticos

- A utilização da medida do conteúdo de glicosamina, para determinação da biomassa formada nos cultivos, foi adequada para este processo, atendendo as exigências para ser considerada um bom indicador de formação de biomassa em um cultivo em meio sólido. Aliando-se os valores obtidos por esta metodologia com os dados referentes à velocidade do consumo de oxigênio é possível se determinar parâmetros cinéticos importantes para o processo como as velocidades específicas de crescimento celular e formação do produto, bem como o fator de conversão de oxigênio em célula ($Y_{X/O}$) e o coeficiente de manutenção celular (m_O);
- A produção da enzima mostrou-se associada ao crescimento celular, durante a fase exponencial. No entanto, a máxima produção da enzima ocorreu após esta fase;
- O valor de m_O obtido foi correspondente a 20% do valor da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2), indicando que as condições do processo são favoráveis ao crescimento do microrganismo.

Como sugestões para trabalhos futuros, propõe-se:

- Avaliar a utilização de outras fontes de nitrogênio na composição do meio de cultivo, incluindo fontes de natureza inorgânica ;
- Avaliar a presença de outras enzimas do complexo xilanolítico ;

- Controlar a umidade do meio de forma a diferenciá-la no período do crescimento e no período de formação da enzima ;
- Variar a altura de preenchimento dos reatores de coluna e avaliar a influência desta variação sobre a produção de enzima e a formação da biomassa ;
- Avaliar estratégias para melhorar o sistema de inoculação nas colunas;
- Estudar aspectos referentes aos tratamentos finais do processo, incluindo metodologias para recuperação, purificação e caracterização das xilanases produzidas.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM – Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca, 2003. Endereço eletrônico: <http://abam.com.br>. Acessado em 11/01/2003.

ABDEL-FATTAH, Y.R. ; OLAMA, Z.A. L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, **38**: 115 – 122, 2002.

AGUILAR, C.N. ; AUGUR, C. ; FAVELA-TORRES, E. ; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. **Process Biochemistry**, **36**: 565 – 570, 2001.

AIDOO, K.E. ; HENDRY, R. ; WOOD, B.J. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **12**: 6-9, 1981.

AIDOO, K.E. ; HENDRY, R. ; WOOD, J.B. Solid Substrate Fermentations. **Advances in Applied Microbiology**, **28**: 201 – 237, 1982.

ALAN, M. ; GOMES, I. ; MOHIUDDIN, G. ; HOQ, M.M. Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces laniginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, **16**: 298 – 302, 1994.

ASHLEY, V.M. ; MITCHELL, D.A. ; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, **3**(2): 141 – 150, 1999.

AUER, C.G. Levantamento de fungos termófilos associados a pilhas de cavacos de *Eucalyptus sp.* **Dissertação de Mestrado**, Escola Superior de Agricultura Luiz Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1986.

BAILEY, M.J. ; BIELY, P. ; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, **23**(3): 257 – 271, 1992.

BAKIR U. ; YAVASCAOGLU, S. ; GUVENC, F. ; ERSAYIN, A. Na endo β -1,4-xylanase from *Rhizopus arylae*: production, partial purification and biochemical characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, **29**: 328 – 334, 2001

BANDELIER, S. ; RENAUD, R. ; DURAND, A. Production of gibberellic acid by fed-batch solid state fermentation in a aseptic pilot-scale reactor. **Process Biochemistry**, **32**(2): 141 – 145, 1997.

BEG, Q.K. ; BHUSHAN, B. ; KAPOOR, M. ; HOONDAL, G.S. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, **27**: 459 – 466, 2000.

BERTOLIN, T. E. Estudo da influência da adição de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em processo semi-sólido. **Tese de Doutorado**, USP, São Paulo, SP, 1997.

BIELY, P. Microbial Xylanolytic Systems. **Trends in Biotechnology**, **3**: 286–295, 1985.

BIESEBEKE, R. TE ; RUIJTER, G. ; RAHARDJO, Y.S.P. *et alii*. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yest Research**, **2**: 245 – 248, 2002.

BIM, M. A ; FRANCO, T.T. Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching. **Journal of Chromatography B**, **743**: 349 – 356, 2000.

BISWAS, S.R. ; MISHRA, A.K. ; NANDA, G. Xylanase and β -Xylosidase Production by *Aspergillus ochraceus* during Growth on Lignocelluloses. **Biotechnology and Bioengineering**, **31**: 613 – 616, 1988.

BORZANI, W. A weighing method to identify the microbial growth phases in solid-state fermentaion tests. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **16**: 601 – 605, 2000.

BRAMORSKI, A. ; SOCCOL, C.R. ; CHRISTEN, P. . REVAH, S. Fruity Aroma Production by *Ceratocystis fimbriata* in a Solid Cultures from Agro-Industrial Wastes. **Revista de Microbiologia**, **28**: 208 – 212, 1998.

BRAND, D. ; PANDEY, A ; ROUSSOS, S. ; SOCCOL, C.R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, **27**: 127 – 133, 2000.

CANNEL, E. ; MOO-YOUNG, M. Solid-State Fermentation Systems. **Process Biochemistry**, **6**: 2 – 7, 1980.

CASTILHO, L.R. ; MEDRONHO, R.A ; ALVES, T.L.M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, **71**: 45 – 50, 2000a.

CASTILHO L.R. ; POLATO, C.M.S. ; BARUQUE, E.A ; SANT'ANNA JR., G.L. ; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, **4**: 239 – 247, 2000b.

CEPA/SC – Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina, 2003. Endereço eletrônico: <http://www.icepa.com.br>. Acessado em 11/01/2003.

CEREDA, M.P. Caracterização dos Resíduos da Industrialização da Mandioca. In: CEREDA, M.P. (Ed.) **Industrialização da Mandioca no Brasil**. Paulicéia, São Paulo, SP, p.11-50, 1994.

CHARNEY, J. ; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biological Chemistry**, **171**: 501-505, 1947.

CHEILAS, T. ; STOUPIS, T. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KATAPODIS, P. ; MAMMA, D. ; HATZINIKOLAOU, D.G. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Hemicellulolytic activity of *Fusarium oxysporum* grown on sugar beet pulp. Production of extracellular arabinase. **Process Biochemistry**, **35**: 557 – 561, 2000.

CHEN, H. ; XU, F. ; LI, Z. Solid-state production of biopulp by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded wheat straw as substrate. **Bioresource Technology**, **81**: 261 – 263, 2002.

COCHET, N. ; NONUS, M. ; LEBEAULT, J.M. Solid-State Fermentation of Sugar-Beet. **Biotechnologist Letters**, **10(7)**: 491 – 496, 1988.

CORDOVA-LOPEZ, J. ; GUTIERREZ-ROJAS, M. ; HUERTA, S. ; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. ; FAVELA-TORRES, E. Biomass estimation of *Aspergillus niger* growing on real and model supports in solid state fermentation. **Biotechnology Techniques**, **10(1)**: 1 – 6, 1996.

COSTA, J.A.V. ; ALEGRE, R.M. ; HASAN, S.D.M. Packing density and thermal conductivity determination for rice bran solid-state fermentation. **Biotechnology Techniques**, **12(10)**: 747 – 750, 1998.

COURI, S. ; TERZI, S.C. ; PINTO, G.A.S. ; FREITAS, S.P. ; COSTA, C.A. da Hydrolitic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, **36**: 255-61, 2000.

COUTO, S.R. ; RATTO, M. ; DOMÍNGUEZ, A. ; SANROMÁN, A. Strategies for improving lignolytic enzymes activities in semi-solid-state bioreactors. **Process Biochemistry**, **36**: 995 – 999, 2001.

DALSENTER, F.D.H. Contribuição ao Estudo da Aplicação da Proposta Zeri para um Resíduo Agroindustrial Utilizando Processo Biotecnológico. **Dissertação de Mestrado**, FURB, Blumenau, SC, 2000.

DAMASO, M.C.T. ; ANDRADE, C.M.M.C. ; PEREIRA JR., N. Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **84-86**: 821 – 835, 2000.

DA SILVA, R. ; YIM, D.K. ; PARK, Y.K. Purification and Characterization of Thermostable Xylanases from Thermophilic *Humicola* sp. And their Application in Pulp Improvement. **Revista de Microbiologia**, **25(2)**: 112 – 118, 1994.

DA SILVA, R. ; FRANCO, C.M.L. ; GOMES, E. Pectinases, Hemicelulases e Celulases, Ação, Produção e Aplicação no Processamento de Alimentos: Revisão. **Boletim da SBCTA**, **31(2)**: 249 – 260, 1997.

DE ARAUJO, A A ; LEPILLEUR, C. ; DELCOURT, S. ; COLAVITTI, P. ; ROUSSOS, S. Laboratory scale bioreactors for study of fungal physiology and metabolism in solid state fermentation system. In: ROUSSOS, S. ; LONSANE, B.K. ; RAIMBAULT, M. ; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Eds.) **Advances in Solid State Fermentation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 93-111, 1997.

DEL BIANCHI, V.L. ; MORAES, I.O. ; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHMIDELL, W. ; LIMA, U.A. ; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. (Eds.), **Biotecnologia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., V.2, p.247-276, 2001.

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

DOMÍNGUEZ, M. ; MEJÍA, A ; BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Respiration studies on *Penicillium* solid-state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **89(5)**: 409 – 413, 2000

DOMÍNGUEZ, A. ; RIVELA, I. ; COUTO, S.R. ; SANROMÁN, M.A. Design of a new rotating drum bioreactor for ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on na inert support. **Process Biochemistry**, **37**: 549 – 554, 2001.

DUARTE, M.C.T. ; PELLEGRINO, A.C.A. ; PORTUGAL, E.P. ; PONEZI, A.N. ; FRANCO, T.T. Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, **31**: 90 – 4, 2000.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, **13(2 –3)**: 113 – 125, 2003.

DURAND, A. ; BROISE, D. de la ; BLACHÈRE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnology**, **8**: 59 – 66, 1988.

DURAND, A. ; RENAUD, R. ; ALMANZA, S. ; MARATRAY, J. ; DIEZ, M. ; DESGRANGES. Solid State Fermentation Reactors: From Lab Scale to Pilot Plant. **Biotechnology Advances**, **11**: 591 – 597, 1993.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Mandioca e Fruticultura, 2003. Endereço eletrônico <http://www.cnpmf.embrapa.br/mandioca.htm>. Acessado em 11/01/2003.

ERKMEN, O. ; ALBEN, E. Mathematical modeling of citric acid production and biomass formation by *Aspergillus niger* in undersized semolina. **Journal of Food Engineering**, **52**: 161 – 166, 2002.

FENG, K.C. ; LIU, B.L. ; TZENG, Y.M. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. **Bioprocess Engineering**, **23**: 25 – 29, 2000.

FENICE, M. ; SERMANNI, G.G. ; FEDERICI, F. ; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**, **100**: 77 – 85, 2003.

FERRAZ, A. ; CÓRDOVA, A. M. ; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme and Microbial Technology**, **32**: 59 – 65, 2003.

FERREIRA, G. ; BOER, C.G. ; PERALTA, R.M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, **173**: 335 – 339, 1999.

FUJIAN, X. ; HONGZHANG, C. ; ZUOHU, L. Effect of periodically dynamic changes of air on cellulase production in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, **30**: 45 – 48, 2002.

GAWANDE, P.V. ; KAMAT, M.Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. **Journal of Applied Microbiology**, **87**: 511 – 519, 1999.

GELMI, C. ; PÉREZ-CORREA, R. ; GONZÁLEZ, M. ; AGOSIN, E. Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on a inert support. **Process Biochemistry**, **35**: 1227-1233, 2000.

GELMI, C. ; PÉREZ-CORREA, R. ; AGOSIN, E. Modelling *Gibberella fujikuroi* and GA₃ production in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, **37**: 1033-1040, 2002.

GERVAIS, P. ; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, **13**(2-3): 85-101, 2003.

GESSESSE, A ; MAMO, G. High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. By using solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, **25**: 68 – 72, 1999.

GHANEM, N.B. ; YUSEF, H.H. ; MAHROUSE, H.K. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional. **Bioresource Technology**, **73**: 113 – 121, 2000.

GHILDYAL, N.P. ; GOWTHAMAN, M.K. ; RAO, R.K.S.M.S. ; KARANTH, N.G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. **Enzyme Microbial Technology**, **16**: 253 – 257, 1994.

GOMES, D.J. ; GOMES, J. ; STEINER, W. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Biotechnology**, **33**: 87 – 94, 1994.

GOUDAR, C.T. ; ELLIS, T.G. Explicit oxygen concentration expression for estimation of extant biodegradation kinetics from respirometric experiments. **Biotechnology and Bioengineering**, **75**(1): 74 – 81, 2001.

GOWTHAMAN, M.K. ; GHILDYAL, N.P. ; RAGHAVA RAO, K.S.M.S. ; KARANTH, N.G. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed bed solid state fermenters: the effect of gaseous concentration gradients. **Journal of Chemical, Technology and Biotechnology**, **56**: 233 – 239, 1993a.

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

GOWTHAMAN, M.K. ; RAGHAVA RAO, K.S.M.S. ; GHILDYAL, N.P. ; KARANTH, N.G. Estimation of k_La in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. **Process Biochemistry**, **30**(1): 9 – 15, 1995.

GUMBIRA-SAID, E. ; GREENFIELD, P.F. ; MITCHELL, D.A. ; DOELE, H.W. Operational Parameters for Packed Beds in Solid-State Cultivation. **Biotechnology Advances**, **11**: 599 – 610, 1993

GUPTA, S. ; KUHAD, R.C. ; BHUSHAN, B. ; HOONDAL, G.S. Improved xylanase production from a haloalkalophilic *Staphylococcus* sp. SG-13 using inexpensive agricultural residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **17**: 5 – 8, 2001.

GUTIERREZ-CORREA, M. ; TENDERDY, R.P. Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. **Biotechnology Letters**, **20**(1): 45 – 47, 1998.

HADDADIN, M.S. ; ABDULRAHIM, S.M. ; AL-KHAWALDEH, G.Y. ; ROBINSON, R.K. Solid state fermentation of waste pomace from olive processing. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, **74**: 613 – 618, 1999.

HALTRICH, D. ; NIDETZKY, B. ; KULBE, K.D. ; STEINER, W. ; ZUPANCIC, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, **58**: 137 – 161, 1996.

HAN, Y.W. ; Oxygen Requirement for Growth of *Candida utilis* on Semisolid Straw Substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, **30**: 672 – 674, 1987.

HAN, Y.W. ; GALLAGHER, D.J. ; WILFRED, A. G. Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. **Journal of Industrial Microbiology**, **2**: 195 – 200, 1987.

HAN, B.Z. ; NOUT, R.M.J. Effects of temperature, water activity and gas atmosphere on mycelial growth of temperate fungi *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* and *R. microsporus* var. *oligosporus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, **16**: 853 – 858, 2000.

HASAN, S.D.M. ; COSTA, J.A.V. ; SANZO, A.V.L. Heat transfer simulation of solid state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology Techniques**, **12**(10): 787 – 791, 1998.

HISS, H. Cinética dos Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. ; LIMA, U.A. ; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. (Eds.), **Biotecnologia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., V.6, p.93-122, 2001.

HONGZHANG, C. ; FUJIAN, X. ; ZHONGHOU, T. ; ZUOHU, L. A novel Industrial-Level Reactor with Two Dynamic Changes of Air for Solid-State Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **93**(2): 211 – 214, 2002.

HOURS, R. A. ; SAKAI, T. Protopectinase Production in Solid State Culture of *Aspergillus awamori*. **Biotechnology Letters**, **16**(7): 721 – 726, 1994.

INGELBRECHT, J.A ; VERWIMP, T. ; DELCOUR, J.A Endoxylanases in Durum Wheat Semolina Processing: solubilization of arabinoxylans, action of endogenous inhibitors, and effects on rheological properties. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, **48**: 2017 – 2122, 2000.

JAIN, A. ; GARG, S.K ; JOHRI, B.N. Properties of a Thermostable Xylanase Produced by *Melanocarpus albomyces* IIS-68 in Solid State Fermentation. **Bioresource Technology**, **64**: 225 – 228, 1998.

JALEEL, S.A. ; SRIKANTA, S. ; GHILDYAL, N.P. ; LONSANE, B.K. Simultaneous Solid Phase Fermentation and Saccharification of Cassava Fibrous Residue for Production of Ethanol. **Starch**, **40**(2): 55 – 58, 1988.

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, **11**: 1 – 5: 2000.

KALOGERIS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. **Journal of Biotechnology**, **60**: 155 – 163, 1998.

KALOGERIS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Mode of action of a minor xylanase from *Thermoascus aurantiacus* on polysaccharides and model substrates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **87**(6): 819 – 21, 1999a.

KALOGERIS, E. ; FOUNTOUKIDES, G. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. **Bioresource Technology**, **67**: 313 – 315, 1999b.

KALOGERIS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; VRSANSKÁ, M. ; KEKOS, D. ; BIELY, P. ; MACRIS, B.J. Catalytic properties of the endoxylanase I from *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, **11**: 491 – 501, 2001.

KALOGERIS, E. ; INIOTAKI, F. ; TOPAKAS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresource Technology**, **86**: 207 – 213, 2003.

KANG, M.K. ; MAENG, P.J. ; RHEE, Y.H. Purification and Characterization of Two Xylanases from Alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202. **Applied and Environmental Microbiology**, **62**(9): 3480 – 3482, 1996.

KIM, J.H. ; HOSOBUCHI, M. ; KISHIMOTO, M. ; SEKI, T. ; YOSHIDA, T. ; TAGUCHI, H. Cellulase Production by a Solid State Culture System. **Biotechnology and Bioengineering**, **7**: 1445 – 1450, 1985

KOHLI, U. ; NIGAM, P. ; SINGH, D. ; CHAUDHARY, K. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. **Enzyme and Microbial Technology**, **28**: 606 – 610, 2001.

KOLICHESKI, M.B. Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido Utilizando como Substrato Bagaço de Mandioca. **Dissertação de Mestrado**, UFPR, Curitiba, PR, 1995.

KULKARNI, N. ; SHENDYE, A ; RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology**, **23**: 411 – 456, 1999.

LE DUY, A. ; ZAJIC, J.E. A geometrical approach for differentiation of na experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, **15**(4): 805 – 810, 1973.

LEKHA, P.K. ; LONSANE, B.K. Biomass Estimation in Solid State Fermentation In: PANDEY, A (Ed.), **Solid State Fermentation**, Wiley Eastern Limited, India, p.38-48, 1994.

LONSANE, B.K. ; GHILDYAL, N.P. ; BUDIATMAN, S. ; RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, **7**: 258 – 265, 1985.

LONSANE, B.K. ; SAUCEDO-CASTANEDA, G. ; RAIMBAULT, M. ; ROUSSOS, S. ; VINIEGRA-GONZALES, G. ; GHILDYAL, N.P. ; RAMAKRISHMA, M. ; KRISHNAIAH, M.M. Scale-up Strategies for Solid State Fermentation Systems: a review. **Process Biochemistry**, **26**: 1 – 15, 1991.

LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A L. ; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, **193**: 265 – 275, 1951.

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

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

LU, M.Y. ; MADDOX, I.S. ; BROOKS, J.D. Citric Acid Production by *Aspergillus Niger* in Solid-Substrate Fermentation. **Bioresource Technology**, **54**: 235 – 239, 1995.

MACHUCA, A. *Thermoascus aurantiacus* (cepa brasileira): aspectos de crescimento, produção enzimática e utilização no tratamento de materiais lignocelulósicos. **Dissertação de Mestrado**, I.B., UNICAMP, Campinas, SP, 1991.

MACHUCA, A. ; FERRAZ, A. Hydrolitic and oxidative enzymes produced by white-and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, **29**: 386 – 391, 2001.

MADAMWAR, D. ; PATEL, S. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **8**: 183 – 186, 1992.

MADAMWAR, D. ; PATEL, S. ; PARIKH, H. Solid State Fermentation for Cellulase and β -Glucosidase Production by *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **67(6)**: 424 – 426, 1989.

MAIORANO, A.E. ; BONOMI, A. ; SCHMIDELL, W. ; OGAKI, Y. Determinação do Crescimento Celular em Fermentações em Estado Sólido. **Publicação IPT**, 1992

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Endereço eletrônico: <http://www.agricultura.gov.br/spa/pagespa/index.htm> Acessado em 11/01/2003a.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Endereço eletrônico: http://www.agricultura.gov.br/pls/pubacs_cons/ap_consulta_noticia_cons?nm_titulo=mandioca Acessado em 11/01/2003b.

MENEZES, T.J.B. ; HENNIES, P.T. Sistema Celulolítico de *Aspergillus niger* em Substrato Sólido de Bagaço de Cana-de-Açúcar Tratado. **Coletânea ITAL**, **24(1)**: 61 – 74, 1994.

MILAGRES, A M. F. Produção de Xilanases por *Penicillium janthinellum* e aplicação das enzimas no branqueamento de polpas kraft. **Tese de Doutorado**, UNICAMP, Campinas, SP, 1994.

MILAGRES, A M.F. ; SALES, R.M. Evaluating the basidiomycetes *Poria medula-panis* and *Wolfiporia cocos* for xylanase production. **Enzyme and Microbial Technology**, **28**: 522 – 526, 2001.

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

MITCHELL, D.A. ; BEROVIC, M. ; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, **68**: 61 – 138, 2000a.

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

MOO-YOUNG, M. ; MOREIRA, A. R. ; TENDERDY, R.P. Principles of solid-substrate fermentation. In: SMITH, D.E. ; BERRY, D.R. KRISTIANSEN, B. (Eds). **The filamentous fungi**. V.4, p. 117, 1983.

MORAES, R.O. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação em substrato sólido em colunas de Raimbault. **Dissertação de Mestrado**. FEQ, UNICAMP, Campinas, SP, 1999.

MUDGETT, R.E. Solid State Fermentation. In: DEMAIN, A.L. ; SOLOMON, N.A. (Eds.) **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, American Society for Microbiology, Washington, p. 66-83, 1986.

NAGEL, F.J.J.I. ; TRAMPER, J. ; BAKKER, M.S.N. ; RINZEMA, A Temperature Control in a Continuously Mixed Bioreactor for Solid-State Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, **72(2)**: 219 – 230, 2000.

NANDAKUMAR, M.P. ; THAKUR, M.S. ; RAGHAVARAO, K.S.M.S. ; GHILDYAL, N.P. Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. **Letters in Applied Microbiology**, **29**: 380 – 384, 1999.

NARAHARA, H. ; KOYAMA, Y. ; YOSHIDA, T. ; PICHANGKURA, S. ; UEDA, R. ; TAGUCHI, H. Growth and Enzyme Production in a Solid-State Culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**, **60(4)**: 311 – 319, 1982.

NARANG, S. ; SAHAI, V. ; BISARIA, V.S. Optimization of xylanase production by *Melanocarpus albomyces* IIS68 in solid state fermentation using response surface methodology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **91(4)**: 425 – 7, 2001.

NATH, D. ; RAO, M. pH dependent conformational and structural changes of xylanase from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp (NCIM 59). **Enzyme and Microbial Technology**, **28**: 397 – 403, 2001.

NIGAM, P. ; ARMOUR, G. ; BANAT, I.M. ; SINGH, D. ; MARCHANT, R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. **Bioresource Technology**, **72**: 219 – 226, 2000.

NIGAM, P. ; SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal Basic Microbiology**, **6**: 405 – 423, 1994.

NSEREKO, V.L. ; MORGAVI, D.P. ; RODE, L.M. ; BEAUCHEMIN, K.A ; McALLISTER, T.A Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, **88**: 153 – 170, 2000.

NWE, N. ; CHANDRKRACHANG, S. ; STEVENS, W.F. ; MAW, T. ; TAN, T.K. ; KHOR, E. ; WONG, S.M. Production of fungal chitosan by solid state and submerged fermentation. **Carbohydrate Polymers**, **49(2)**: 235 – 237, 2002.

OIJKAAS, L.P. ; TRAMPER, J. ; BUITELAAR, R.M. Biomass estimation of *Coniothyrium minutans* in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, **22**: 480 – 486, 1998.

OOSTRA, J. ; TRAMPER, J. ; RINZEMA, A Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minutans* spores on oats. **Enzyme and Microbial Technology**, **27**: 652 – 663, 2000.

ORIOLE, E. ; SCHETTINO, B. ; VINEGRA-GONZALES, G. ; RAIMBAULT, M. Solid-state Culture of *Aspergillus niger* on Support. **Journal of Fermentation Technology**, **66(1)**: 57 – 62, 1988.

PALMA, M.B. ; MARIOTTO, J.R. ; FURIGO JUNIOR, A. Utilização de reatores de coluna para produção de endo β -1,4 xilanase por cultivo em meio sólido. In: **XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Anais**, DEQ, UFRN, Natal, RN, 2002.

PALMA, M.B. ; MILAGRES, A.M.F. ; PRATA, A.M.R. ; MANCILHA, I.M. Influence of Aeration and Agitation Rate on the Xylanase Activity from *Penicillium janthinellum*. **Process Biochemistry**, **31(2)**: 141 – 145, 1996.

PALMA, M.B. ; PINTO, A L. ; GOMBERT, A K. ; SEITZ, K.H. ; KIVATINITIZ, S.C. ; CASTILHO, L.R. ; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **84-86**: 1137 – 1145, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, **13(2-3)**: 81 – 84, 2003.

PANDEY, A. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. **Process Biochemistry**, **26**: 355 – 361, 1991.

PANDEY, A. ; RADHAKRISHNAN, S. Packed-bed column bioreactor for production of enzyme. **Enzyme and Microbiology Technology**, **14**: 486 – 488, 1992.

PANDEY, A. ; SELVAKUMAR, P. ; ASHAKUMARY, L. Performance of a column bioreactor for glucoamylase synthesis by *Aspergillus niger* in SSF. **Process Biochemistry**, **31(1)**: 43 – 46, 1996.

PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. ; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, **35**: 1153 – 1169, 2000a.

PANDEY, A ; SOCCOL, C.R. ; NIGAM, P. ; SOCCOL, V.T. ; VANDENBERGHE, L.P.S. ; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, **74**: 81 – 87, 2000b.

PANORAMA BRASIL. Endereço eletrônico: <http://www.br.news.yahoo.com>. Acessado em 11/01/2003.

RAMANA MURTHY, M.V. ; KARANTH, N.G. ; RAO, K.S.M.S.R. Biochemical Engineering Aspects of Solid-State Fermentation. In: **Advances in Applied Microbiology**, **38**: 99 – 147, 1993.

RAO, M.N.A.; MITHAL, B.M. ; THAKKUR, R.N. ; SASTRY, K.S.M. Solid State Fermentation for Cellulase Production by *Pestalotiopsis versicolor*. **Biotechnology and Bioengineering**, **25**: 869 – 872, 1983.

REDDY, P.R.M. ; MRUDULA, S. ; RAMESH, B. ; REDDY, G. ; SEENAYYA, G. Production of thermostable pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state

fermentation: optimization of enzyme leaching conditions using response surface methodology. **Bioprocess Engineering**, **23**: 107 – 112, 2000.

RIDDER, E.R. ; NOKES, S.E. ; KNUTSON, B.L. Optimization of Solid-State fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. **American Society of Agricultural Engineers**, **42(6)**: 1785 – 1790, 1999.

RIDE, J.P. ; DRYSDALE, R.B. A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. **Physiological Plant Pathology**, **2**: 7 – 15, 1972.

ROSENBLITT, A ; AGOSIN, E. ; DELGADO, J. ; PEREZ-CORREA, R. Solid substrate fermentation of *Monoascus purpureus*: growth, carbon balance, and consistency analysis. **Biotechnol. Prog.** **16**: 152 – 162, 2000.

ROUKAS, T. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **25**: 298-304, 2000.

RUIZ-ARRIBAS, A. ; FERNANDEZ-ABALOS, J.M. ; SANCHEZ, P. ; GARDA, A.L. ; SANTAMARIA, R.I. Overproduction, Purification, and Biochemical Characterization of a Xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. **Applied and Environmental Microbiology**, **61(6)**: 2414 – 2419, 1995.

SAHA, B.C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proleferatum*. **Process Biochemistry**, **37(11)**: 1279 – 1284, 2002.

SANTOS, E. dos. Produção de Xilanase por *Thermoascus aurantiacus* ATCC 204492 em Cultivo Semi-Sólido Utilizando Bagaço de Cana-de-Açúcar. **Dissertação de Mestrado**, FAENQUIL, Lorena, SP, 2001.

SARGANTANIS, J. ; KARIM, M.N. ; MURPHY, V.G. ; RYOO, D. Effect of Operating Conditions on Solid Substrate Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, **42**: 149 – 158, 1993.

SATO, K. ; NAGATANI, M. ; NAKAMURA, K. ; SATO, S. Growth Estimation of *Candida lipolytica* from Oxygen Uptake in a Solid State Culture with Forced Aeration. **Journal Of Fermentation Technology**, **61(6)**: 623 – 629, 1983.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. ; GUTIERREZ-ROJAS, M. ; RAIMBAULT, M. ; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, **35**, 802 – 808, 1990.

SCHIMIDEL, W. ; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. ; LIMA, U.A. ; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. (Eds.), **Biociencia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., V.2, p.179-190, 2001.

SCOTTI, C.T. ; VERGOIGNAN, C. ; FERON, G. ; DURAND, A. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, **7**: 1 – 5, 2001.

-
- SHOJAOSADATI, S.A. ; BABAEIPOUR, V. Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. **Process Biochemistry**, **37**: 909 – 914, 2002.
- SINGH, S. ; PILLAY, B. ; PRIOR, B. A Thermal stability of β -xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme and Microbial Technology**, **26**: 502 – 508, 2000.
- SMITS, J.P. ; RINZEMA, A. ; TRAMPER, J. ; VAN SONSBECK, H.M. ; KNOL, W. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Applied Microbiology Biotechnology**, **46**: 489 – 498, 1996.
- SMITS, J.P. ; RINZEMA, A. ; TRAMPER, J. ; VAN SONSBECK, H.M. ; HAGE, J.C. ; KAYNAK, A. ; KNOL, W. The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, **22**: 50 – 57, 1998.
- SOARES, M. ; CHRISTEN, P. ; PANDEY, A. ; SOCCOL, C.R. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, **35**: 857 – 861, 2000.
- SOCCOL, C.R. ; MARIN, B. ; RAIMBAULT, M. ; LEBEAULT, J.-M. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, **41**: 330 – 336, 1994.
- SOCCOL, C.R. ; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, **13**: 205 – 218, 2003.
- SOUZA, C.G.M. ; SIMÃO, R.C.G. ; PERALTA, R.M. Purification and characterization of alkali-tolerant xylanases from *Aspergillus tamarii*. **Revista de Microbiologia**, **29**: 93 – 98, 1998.
- SOUZA, D.F. ; SOUZA, C. G. M. ; PERALTA, R.M. Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, **36**: 835 – 838, 2001.
- SOUZA, M.C.O. Produção de Xilanase por *Thermoascus aurantiacus* em Meio Semi-Sólido. **Dissertação de Mestrado**, FAENQUIL, Lorena, SP, 1998.
- SOUZA, M.C.O. ; ROBERTO, I.C. ; MILAGRES, A.M.F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Applied Microbiology Biotechnology**, **52**: 768 – 772, 1999.
- SUGAMA, S. ; OKAZAKI, N. Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. **Journal of Fermentation Technology**, **57(5)**: 408 – 412, 1979.
- TANAKA, T. ; TANIGUCHI, M.A. ; MATSUMO, R. ; KAMIKUBO, T. Purification and properties of cellulases from *Eupenicillium javanicum*. **Journal Fermentation Technology**, **59(3)**: 177-183, 1981.

TENGERDY, R.P. Solid substrate fermentation for enzyme production. In: PANDEY, A. (Ed.) **Advances in Biotechnology**. New Delhi: Educational Publishers & Distributors, p.13-16,1998.

TEREBIZNIK, M.R. ; PILOSOF, A M.R. Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter. **Biotechnology Techniques**, **13**: 215 – 219, 1999.

THIEMANN, J.E. Construção de equipamentos de fermentação. In: SCHMIDELL, W. ; LIMA, U.A. ; AQUARONE, E. ; BORZANI, W. (Eds.), **Biotecnologia Industrial**, Edgard Blücher Ltda., São Paulo, SP,V.2, p.179-190, 2001.

TSAO, G.T. ; GONG, C.S. ; CAO, N.J. Repeated solid-phase fermentation and extraction for enzyme production. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, **84**(6): 505-524, 2000.

ul-HAQ, I. ; IDREES, S. ; RAJOKA, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, **37**: 637 – 641, 2002.

VALCHEVA, E. ; VELEVA, S. ; VALCHEV, I. ; DIMITROV, I. Kinetic model of xylanase action on kraft pulp. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, **71**(2): 231-238, 2000.

VANDENBERGHE, L.P.S. ; SOCCOL, C.R. ; PANDEY, A ; LEBEAULT, J.M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, **74**: 175 – 178, 2000.

WOODWARD, J. Xylanases: Functions, Properties and Applications. In: **Introduction to Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, Cap. 2:9 – 30, 1984.

WONG, K.K.Y. ; TAN, L.U.L. ; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4 Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications. **Microbiological Reviews**, **52**(3): 305 – 317, 1988.

WU, L.C. ; HANG, Y.D. Acid protease production from *Neosartorya fischeri* **Lebensm.-Wiss. u.- Technol.** **33**: 44-47, 2000

YANG, X. ; CHEN, H. ; GAO, H. ; LI, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, **78**: 277-80, 2001.

ZHENG, Z. ; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry**, **35**: 825 – 830, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS COM O TESTE DE MATERIAIS PARA DISTRIBUIÇÃO DO AR NAS COLUNAS

TABELA ANOVA ENTRE AS COLUNAS

[24/10/01 16:33 "/Data1" (2452206)]

One-Way ANOVA on columns selected between Col(Vidro) -> Col(Algodão):

Data	Mean	Variance	N
Vidro	82,02	189,3009	3
Algodão	65,24667	126,82103	3

F = 2,66996

p = 0,1776

At the 0,05 level,

the means are NOT significantly different.

[24/10/01 16:35 "/Data1" (2452206)]

One-Way ANOVA on columns selected between Col(Algodão) -> Col(Pedra):

Data	Mean	Variance	N
Algodão	65,24667	126,82103	3
Pedra	73,82333	176,12123	3

F = 0,72845

p = 0,44148

At the 0,05 level,

the means are NOT significantly different.

[24/10/01 16:36 "/Data1" (2452206)]

One-Way ANOVA on columns selected between Col(Pedra) -> Col(Vidropicado):

Data	Mean	Variance	N
Pedra	73,82333	176,12123	3
Vidropicado	100,11333	279,31773	3

F = 4,55273

p = 0,09979

At the 0,05 level,

the means are NOT significantly different.

[24/10/01 16:36 "/Data1" (2452206)]

One-Way ANOVA on columns selected between Col(Vidropicado) -> Col(Bagevidro):

Data	Mean	Variance	N
Vidropicado	100,11333	279,31773	3
Bagevidro	30,73333	48,91083	3

F = 43,99603

p = 0,00268

At the 0,05 level,

the means are significantly different.

RESULTADO DO TEST t (0,05) para cada coluna Diferença entre atividade no Topo, Meio e Fundo das colunas

[24/10/01 16:45 "/Data1" (2452206)]

One population t-Test on Data1 col(Vidro):

Data	Mean	Variance	N
Vidro	82,02	189,3009	3

t = 10,32533

p = 0,00925

At the 0,05 level,

the two means are significantly different.

[24/10/01 16:50 "/Data1" (2452206)]

One population t-Test on Data1 col(Algodão):

Data	Mean	Variance	N
Algodão	65,24667	126,82103	3

t = 10,03514

p = 0,00978

At the 0,05 level,

the two means are significantly different.

[24/10/01 16:57 "/Data1" (2452206)]

One population t-Test on Data1 col(Pedra):

Data	Mean	Variance	N
Pedra	73,82333	176,12123	3

t = 9,63493

p = 0,0106

**At the 0,05 level,
the two means are significantly different.**

[24/10/01 16:57 "/Data1" (2452206)]

One population t-Test on Data1 col(Vidropicado):

Data	Mean	Variance	N
Vidropicado	100,11333	279,31773	3

t = 10,37536

p = 0,00916

**At the 0,05 level,
the two means are significantly different.**

[24/10/01 16:58 "/Data1" (2452206)]

One population t-Test on Data1 col(Bagevidro):

Data	Mean	Variance	N
Bagevidro	30,73333	48,91083	3

t = 7,61146

p = 0,01683

**At the 0,05 level,
the two means are significantly different.**

ANEXO 2

CÁLCULO DAS VELOCIDADES ESPECÍFICAS PELO METODO DE LE DUY & ZAJIC

FMS 1.6

Velocidade específica de crescimento celular

Tempo(h)	X (g/g)	M (g/g)	dM/dt	mi	i	mAB	mBC	dCX	mNO	nNO	mMO	nMO	t (c)	cxcr	dX/dt
6,31579	0,0633	0,0633	0,000348	0,005503	1										
21,47368	0,06858	0,06858	0,000326	0,004747	2	0,000348	0,000303	0,000326	-3302,37	95942,74	-2870,81	39889,24	129,8851	-332986	0,000326
36,63158	0,07317	0,07317	0,0003	0,004093	3	0,000303	0,000296	0,0003	-3375,92	149251,4	-3302,37	95942,74	724,8207	-2297687	0,0003
51,78947	0,07766	0,07766	0,000305	0,003925	4	0,000296	0,000313	0,000305	-3191,14	189452,8	-3375,92	149251,4	-217,558	883709,7	0,000305
66,94737	0,08241	0,08241	0,000329	0,003995	5	0,000313	0,000345	0,000329	-2898,26	215996,6	-3191,14	189452,8	-90,6305	478667,2	0,000329
82,10526	0,08764	0,08764	0,000362	0,004133	6	0,000345	0,000379	0,000362	-2636,16	236421,7	-2898,26	215996,6	-77,9283	441852,8	0,000362
97,26316	0,09339	0,09339	0,000392	0,0042	7	0,000379	0,000405	0,000392	-2468,71	258825	-2636,16	236421,7	-133,795	589127	0,000392
112,4211	0,09953	0,09953	0,000407	0,004093	8	0,000405	0,00041	0,000407	-2440,89	292906,4	-2468,71	258825	-1224,8	3282503	0,000407
127,579	0,10574	0,10574	0,000396	0,003747	9	0,00041	0,000383	0,000396	-2613,43	353225,7	-2440,89	292906,4	349,5888	-560400	0,000396
142,7368	0,11154	0,11154	0,000348	0,003117	10	0,000383	0,000313	0,000348	-3197,87	480690,3	-2613,43	353225,7	218,0971	-216756	0,000348
157,8947	0,11628	0,11628	0,00025	0,002153	11	0,000313	0,000188	0,00025	-5318,56	880081,5	-3197,87	480690,3	188,3309	-121567	0,00025
173,0526	0,11913	0,11913	9,24E-05	0,000775	12	0,000188	-3,3E-06	9,24E-05	303158	-5,5E+07	-5318,56	880081,5	180,3702	-79228,1	9,24E-05
188,2105	0,11908	0,11908	-0,00014	-0,00116	13	-3,3E-06	-0,00027	-0,00014	3670,191	-718585	303158	-5,5E+07	180,4458	-56314	-0,00014
203,3684	0,11495	0,11495	-0,00045	-0,00393	14	-0,00027	-0,00063	-0,00045	1585,554	-334468	3670,191	-718585	184,2605	-42313,3	-0,00045
218,5263	0,10539	0,10539	-0,00086	-0,00816	15	-0,00063	-0,00109	-0,00086	918,1036	-207588	1585,554	-334468	190,0971	-33059,1	-0,00086
233,6842	0,08888	0,08888	-0,00137	-0,01547	16	-0,00109	-0,00166	-0,00137	602,4603	-145351	918,1036	-207588	197,1737	-26562,1	-0,00137
248,8421	0,06372	0,06372	-0,00201	-0,0315	17	-0,00166	-0,00235	-0,00201	424,7097	-108904	602,4603	-145351	205,0453	-21819,7	-0,00201
264	0,02803	0,02803	-0,00235	-0,084	18	-0,00235	0,000106	-0,00235	-9418,48	1243239	424,7097	-108904	137,3685	-50562,7	-0,00235

Velocidade específica de formação de produto

Tempo(h)	X (g/g)	M (g/g)	dM/dt	mi	i	mAB	mBC	dCX	mNO	nNO	mMO	nMO	t (c)	cxcr	dX/dt
6,31579	0,05908	96,52562	2,659055	45,00755	1										
21,47368	0,059885	136,8313	3,063811	51,1617	2	2,659055	3,861974	3,260514	-0,25893	173,6237	-0,37607	121,9039	-441,527	287,9505	3,063811
36,63158	0,058314	195,3707	4,146788	71,11107	3	3,861974	4,532302	4,197138	-0,22064	239,4753	-0,25893	173,6237	-1719,52	618,8672	4,146788
51,78947	0,055252	264,0708	4,633551	83,8628	4	4,532302	4,744032	4,638167	-0,21079	312,5399	-0,22064	239,4753	-7419,76	1876,559	4,633551
66,94737	0,051446	335,9804	4,654541	90,4747	5	4,744032	4,571179	4,657606	-0,21876	386,9286	-0,21079	312,5399	9332,648	-1654,7	4,654541
82,10526	0,047512	405,2698	4,303907	90,58657	6	4,571179	4,087734	4,329456	-0,24463	458,1904	-0,21876	386,9286	2754,356	-215,62	4,303907
97,26316	0,043929	467,2313	3,663412	83,39336	7	4,087734	3,36771	3,727722	-0,29694	523,8865	-0,24463	458,1904	1256,06	150,9149	3,663412
112,4211	0,041045	518,2787	2,809603	68,45141	8	3,36771	2,485101	2,926406	-0,4024	585,4009	-0,29694	523,8865	583,2934	350,6848	2,809603
127,579	0,039071	555,9476	1,819344	46,5648	9	2,485101	1,51392	1,999511	-0,66054	656,6983	-0,4024	585,4009	276,1978	474,2594	1,819344
142,7368	0,038085	578,8954	0,803979	21,11014	10	1,51392	0,528161	1,02104	-1,89336	867,5006	-0,66054	656,6983	170,9912	543,7523	0,803979
157,8947	0,03803	586,9012	0,042115	1,107428	11	0,528161	-0,39817	0,064997	2,511505	168,2955	-1,89336	867,5006	158,7346	566,9584	0,042115
173,0526	0,038715	580,8658	-0,65496	-16,9175	12	-0,39817	-1,19106	-0,79462	0,839585	420,1833	2,511505	168,2955	150,6578	546,6733	-0,65496
188,2105	0,039815	562,8118	-1,40644	-35,3239	13	-1,19106	-1,77653	-1,4838	0,562896	439,1385	0,839585	420,1833	68,50747	477,7011	-1,40644
203,3684	0,040872	535,8834	-1,90975	-46,7254	14	-1,77653	-2,08055	-1,92854	0,480642	418,7248	0,562896	439,1385	-248,18	299,4391	-1,90975
218,5263	0,04129	504,3466	-2,05432	-49,7534	15	-2,08055	-2,02914	-2,05484	0,492821	377,5386	0,480642	418,7248	3381,849	2044,183	-2,05432
233,6842	0,040343	473,5892	-1,74013	-43,1335	16	-2,02914	-1,54827	-1,7887	0,645881	306,0277	0,492821	377,5386	467,2081	607,7883	-1,74013
248,8421	0,037168	450,1206	-0,83911	-22,5763	17	-1,54827	-0,56397	-1,05612	1,773155	-8,82805	0,645881	306,0277	279,307	486,4267	-0,83911
264	0,030769	441,5721	-0,56397	-18,3292	18	-0,56397	1,672621	-0,56397	-0,59786	299,7041	1,773155	-8,82805	130,1264	221,9062	-0,56397

ANEXO 3

VALORES MEDIDOS DO CONSUMO DE OXIGÊNIO (mmol O₂)

FMS 1.6

CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO CONSUMIDO

Tempo minutos	mmol O ₂									
	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	120 hs	144 hs	168 hs	192 hs	216 hs	240 hs
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0,004765	0,081003	0,040502	0,035737	0,042884	0,023824	0,042884	0	0,040502	0
2	0,050031	0,123887	0,078621	0,042884	0,073856	0,085768	0,076238	0	0,081003	0,033354
3	0,061943	0,178683	0,11674	0,100063	0,090533	0,147711	0,119122	0,054796	0,123887	0,047649
4	0,078621	0,226332	0,152476	0,164388	0,114357	0,190595	0,173918	0,095298	0,145329	0,069091
5	0,09768	0,269216	0,173918	0,202508	0,147711	0,262069	0,207272	0,128652	0,219185	0,08815
6	0,111975	0,3121	0,212037	0,22395	0,162006	0,295423	0,226332	0,152476	0,207272	0,10721
7	0,11674	0,352601	0,247774	0,266833	0,183448	0,357366	0,257304	0,188213	0,231097	0,126269
8	0,133417	0,385956	0,288275	0,290658	0,202508	0,40025	0,290658	0,226332	0,250156	0,128652
9	0,133417	0,412162	0,3121	0,319247	0,238244	0,438369	0,304953	0,266833	0,285893	0,147711
10	0,133417	0,450281	0,354984	0,345454	0,264451	0,49793	0,326394	0,285893	0,319247	0,169153
11	0,152476	0,483636	0,376426	0,364514	0,288275	0,528902	0,359749	0,3121	0,333542	0,183448
12	0,152476	0,51699	0,405015	0,388338	0,309717	0,562256	0,388338	0,338307	0,309717	0,188213
13	0,152476	0,550344	0,435987	0,433604	0,331159	0,597993	0,412162	0,354984	0,359749	0,209655
14	0,173918	0,593228	0,464576	0,447899	0,354984	0,633729	0,452664	0,376426	0,405015	0,221567
15	0,173918	0,621817	0,49793	0,464576	0,376426	0,664701	0,471723	0,40025	0,440752	0,228714
16	0,197743	0,652789	0,519372	0,486018	0,397868	0,70282	0,493165	0,421692	0,464576	0,245391
17	0,197743	0,683761	0,547962	0,514607	0,41931	0,724262	0,512225	0,471723	0,483636	0,262069
18	0,219185	0,707585	0,578933	0,528902	0,440752	0,759999	0,533667	0,50746	0,514607	0,264451
19	0,238244	0,726645	0,607523	0,543197	0,459811	0,788588	0,552726	0,531284	0,533667	0,285893
20	0,250156	0,733792	0,638494	0,564639	0,474106	0,81956	0,571786	0,555109	0,557491	0,300188
21	0,254921	0,759999	0,671849	0,574168	0,493165	0,848149	0,590846	0,574168	0,569404	0,307335

Tempo minutos	mmol O2									
	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	120 hs	144 hs	168 hs	192 hs	216 hs	240 hs
23	0,29304	0,805265	0,729027	0,609905	0,531284	0,900563	0,626582	0,607523	0,607523	0,338307
24	0,307335	0,81956	0,762381	0,628965	0,550344	0,929152	0,643259	0,6242	0,612287	0,343072
25	0,309717	0,838619	0,793353	0,633729	0,569404	0,957742	0,655171	0,643259	0,631347	0,362131
26	0,333542	0,857679	0,812413	0,652789	0,586081	0,976801	0,671849	0,662319	0,643259	0,362131
27	0,357366	0,869591	0,843384	0,667084	0,607523	0,998243	0,690908	0,678996	0,650407	0,378808
28	0,350219	0,893416	0,876739	0,681378	0,650407	1,010155	0,705203	0,695673	0,659936	0,378808
29	0,371661	0,910093	0,905328	0,70282	0,667084	1,031597	0,72188	0,71235	0,669466	0,402633
30	0,383573	0,924387	0,9363	0,717115	0,681378	1,053039	0,736174	0,726645	0,678996	0,402633
31	0,385956	0,938682	0,952977	0,73141	0,695673	1,074481	0,750469	0,743322	0,686143	0,416927
32	0,405015	0,938682	0,988713	0,743322	0,71235	1,095923	0,764764	0,755234	0,69329	0,431222
33	0,424075	0,950594	1,022067	0,748087	0,717115	1,119748	0,779058	0,769529	0,72188	0,433604
34	0,438369	0,967271	1,053039	0,762381	0,733792	1,14119	0,793353	0,786206	0,726645	0,450281
35	0,440752	0,993478	1,086393	0,781441	0,745704	1,162631	0,807648	0,8005	0,736174	0,455046
36	0,459811	1,041127	1,107835	0,793353	0,748087	1,184073	0,81003	0,814795	0,750469	0,469341
37	0,476488	1,055422	1,129277	0,910093	0,8005	1,212663	0,821942	0,826707	0,759999	0,469341
38	0,488401	1,064951	1,150719	0,993478	0,807648	1,224575	0,824325	0,836237	0,771911	0,483636
39	0,493165	1,069716	1,179309	1,01492	0,81956	1,243635	0,841002	0,852914	0,774294	0,483636
40	0,50746	1,081628	1,203133	1,026832	0,821942	1,262694	0,852914	0,805265	0,788588	0,502695
41	0,519372	1,093541	1,226957	1,043509	0,821942	1,281754	0,876739	0,81956	0,790971	0,502695
42	0,52652	1,105453	1,248399	1,043509	0,833855	1,296048	0,902945	0,833855	0,798118	0,519372
43	0,540814	1,114983	1,276989	1,055422	0,843384	1,315108	0,912475	0,845767	0,805265	0,531284
44	0,557491	1,124512	1,300813	1,069716	0,845767	1,341315	0,924387	0,860061	0,817177	0,536049
45	0,569404	1,126895	1,324638	1,076864	0,860061	1,362757	0,941064	0,874356	0,826707	0,550344
46	0,574168	1,138807	1,348462	1,091158	0,860061	1,377051	0,941064	0,886268	0,831472	0,567021
47	0,590846	1,148337	1,377051	1,095923	0,874356	1,400876	0,957742	0,902945	0,845767	0,567021
48	0,602758	1,160249	1,405641	1,110218	0,886268	1,417553	0,967271	0,919622	0,852914	0,581316
49	0,60514	1,169779	1,427083	1,12213	0,886268	1,427083	0,981566	0,933917	0,852914	0,581316
50	0,6242	1,181691	1,44376	1,134042	0,900563	1,448524	0,986331	0,945829	0,860061	0,581316
51	0,636112	1,191221	1,469966	1,143572	0,912475	1,469966	1,000625	0,960124	0,869591	0,59561
52	0,638494	1,205515	1,493791	1,145954	0,912475	1,496173	1,010155	0,974419	0,883886	0,597993
53	0,652789	1,176926	1,510468	1,160249	0,92677	1,550969	1,022067	0,986331	0,888651	0,597993

Tempo minutos	mmol O2									
	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	120 hs	144 hs	168 hs	192 hs	216 hs	240 hs
55	0,671849	1,169779	1,577176	1,184073	0,950594	1,593853	1,036362	1,012538	0,900563	0,61467
56	0,671849	1,188838	1,603383	1,193603	0,952977	1,612913	1,048274	1,026832	0,914858	0,628965
57	0,690908	1,195986	1,62959	1,207898	0,964889	1,634355	1,048274	1,038745	0,914858	0,628965
58	0,70282	1,207898	1,651032	1,217428	0,979183	1,653414	1,064951	1,050657	0,919622	0,628965
59	0,70282	1,21981	1,672474	1,224575	0,981566	1,665327	1,072099	1,064951	0,92677	0,643259
60	0,719497	1,234105	1,691534	1,236487	0,993478	1,686769	1,074481	1,076864	0,938682	0,643259
61	0,73141	1,246017	1,715358	1,248399	1,007773	1,705828	1,088776	1,091158	0,938682	0,643259
62	0,736174	1,260312	1,739182	1,257929	1,007773	1,724888	1,088776	1,098306	0,945829	0,657554
63	0,750469	1,272224	1,765389	1,267459	1,017303	1,743947	1,098306	1,098306	0,955359	0,657554
64	0,750469	1,281754	1,789214	1,279371	1,029215	1,763007	1,110218	1,114983	0,950594	0,657554
65	0,762381	1,291283	1,813038	1,288901	1,038745	1,782066	1,119748	1,124512	0,950594	0,671849
66	0,762381	1,305578	1,836862	1,296048	1,038745	1,803508	1,12213	1,155484	0,962506	0,671849
67	0,779058	1,319873	1,860687	1,310343	1,050657	1,822568	1,134042	1,172161	0,969654	0,686143
68	0,779058	1,32702	1,884511	1,31749	1,053039	1,841627	1,143572	1,184073	0,986331	0,688526
69	0,790971	1,338932	1,910718	1,322255	1,064951	1,860687	1,153102	1,195986	0,993478	0,688526
70	0,802883	1,348462	1,936925	1,331785	1,076864	1,870217	1,165014	1,207898	1,00539	0,700438
71	0,805265	1,365139	1,955985	1,341315	1,086393	1,891659	1,167396	1,212663	1,010155	0,700438
72	0,817177	1,379434	1,982191	1,353227	1,098306	1,929778	1,176926	1,215045	1,017303	0,714732
73	0,81956	1,388963	2,008398	1,362757	1,098306	1,929778	1,188838	1,226957	1,048274	0,714732
74	0,81956	1,398493	2,034605	1,379434	1,110218	1,95122	1,200751	1,23887	1,031597	0,714732
75	0,833855	1,410405	2,060812	1,388963	1,119748	1,972662	1,21028	1,250782	1,043509	0,729027
76	0,833855	1,422318	2,091784	1,400876	1,124512	1,986956	1,215045	1,260312	1,050657	0,73141
77	0,845767	1,431847	2,132285	1,417553	1,12213	1,986956	1,222193	1,262694	1,057804	0,73141
78	0,845767	1,44376	2,15611	1,419935	1,134042	2,001251	1,234105	1,274606	1,060187	0,745704
79	0,860061	1,455672	2,179934	1,427083	1,143572	2,02031	1,243635	1,288901	1,062569	0,745704
80	0,860061	1,465202	2,203758	1,441377	1,145954	2,041752	1,253164	1,300813	1,074481	0,745704
81	0,874356	1,479496	2,229965	1,460437	1,157867	2,053665	1,257929	1,310343	1,079246	0,759999
82	0,874356	1,486644	2,249025	1,467584	1,165014	2,077489	1,267459	1,322255	1,084011	0,759999
83	0,886268	1,496173	2,275232	1,479496	1,167396	2,089401	1,276989	1,32702	1,093541	0,774294
84	0,886268	1,510468	2,301439	1,491408	1,176926	2,108461	1,286518	1,33655	1,100688	0,774294
85	0,89818	1,519998	2,327645	1,503321	1,188838	2,12752	1,293666	1,33655	1,100688	0,783823

Tempo minutos	mmol O2									
	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	120 hs	144 hs	168 hs	192 hs	216 hs	240 hs
87	0,900563	1,543822	2,382442	1,529527	1,200751	2,168022	1,312725	1,357992	1,117365	0,786206
88	0,912475	1,553352	2,382442	1,536675	1,21028	2,189464	1,315108	1,367521	1,126895	0,798118
89	0,912475	1,565264	2,382442	1,553352	1,224575	2,208523	1,32702	1,377051	1,126895	0,8005
90	0,912475	1,577176	2,382442	1,562882	1,231722	2,2252	1,33655	1,388963	1,138807	0,8005
91	0,92677	1,589089	2,382442	1,572411	1,234105	2,246642	1,346079	1,396111	1,14119	0,8005
92	0,92677	1,598618	2,382442	1,581941	1,246017	2,256172	1,353227	1,410405	1,153102	0,8005
93	0,92677	1,612913	2,382442	1,596236	1,255547	2,275232	1,365139	1,419935	1,155484	0,814795
94	0,941064	1,627208	2,382442	1,608148	1,267459	2,299056	1,369904	1,422318	1,167396	0,814795
95	0,941064	1,63912	2,382442	1,62006	1,267459	2,315733	1,372286	1,43423	1,167396	0,82909
96	0,941064	1,651032	2,382442	1,62959	1,267459	2,34194	1,381816	1,453289	1,172161	0,82909
97	0,952977	1,665327	2,382442	1,643885	1,276989	2,358617	1,391346	1,462819	1,184073	0,838619
98	0,952977	1,679621	2,382442	1,653414	1,288901	2,375294	1,403258	1,472349	1,191221	0,843384
99	0,952977	1,689151	2,382442	1,662944	1,288901	2,382442	1,412788	1,481879	1,200751	0,843384
100	0,962506	1,705828	2,382442	1,672474	1,300813	2,382442	1,419935	1,491408	1,200751	0,852914
101	0,962506	1,729653	2,382442	1,682004	1,30796	2,382442	1,429465	1,500938	1,205515	0,852914
102	0,962506	1,729653	2,382442	1,691534	1,30796	2,382442	1,436612	1,510468	1,222193	0,852914
103	0,974419	1,743947	2,382442	1,701063	1,322255	2,382442	1,44376	1,517615	1,224575	0,852914
104	0,976801	1,755859	2,382442	1,715358	1,329402	2,382442	1,455672	1,529527	1,274606	0,864826
105	0,976801	1,774919	2,382442	1,72727	1,338932	2,382442	1,465202	1,539057	1,296048	0,864826
106	0,976801	1,786831	2,382442	1,7368	1,341315	2,382442	1,474731	1,548587	1,298431	0,864826
107	0,988713	1,798743	2,382442	1,751095	1,348462	2,382442	1,484261	1,558117	1,30796	0,864826
108	0,988713	1,813038	2,382442	1,760624	1,357992	2,382442	1,498556	1,567647	1,312725	0,879121
109	0,988713	1,82495	2,382442	1,772537	1,369904	2,382442	1,510468	1,574794	1,312725	0,879121
110	0,988713	1,83448	2,382442	1,786831	1,377051	2,382442	1,52238	1,584324	1,322255	0,879121
111	1,000625	1,846392	2,382442	1,796361	1,384199	2,382442	1,53191	1,593853	1,331785	0,879121
112	1,000625	1,858304	2,382442	1,810656	1,393728	2,382442	1,546205	1,598618	1,334167	0,893416
113	1,000625	1,870217	2,382442	1,820185	1,400876	2,382442	1,550969	1,608148	1,343697	0,893416
114	1,000625	1,879746	2,382442	1,832098	1,403258	2,382442	1,553352	1,615295	1,350844	0,902945
115	1,000625	1,891659	2,382442	1,84401	1,412788	2,382442	1,560499	1,624825	1,350844	0,902945
116	1,012538	1,905953	2,382442	1,858304	1,419935	2,382442	1,572411	1,636737	1,357992	0,902945
117	1,012538	1,917865	2,382442	1,870217	1,429465	2,382442	1,579559	1,641502	1,360374	0,91724

Tempo minutos	mmol O ₂									
	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs	120 hs	144 hs	168 hs	192 hs	216 hs	240 hs
119	1,012538	1,94169	2,382442	1,896423	1,448524	2,382442	1,601001	1,658179	1,369904	0,929152
120	1,012538	1,95122	2,382442	1,908336	1,455672	2,382442	1,608148	1,665327	1,369904	0,929152