



**CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO: QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA E
TRANSFERÊNCIA DE MASSA EM BIORREATOR CILÍNDRICO HORIZONTAL
AGITADO**

Rutsatz, M.D.¹; Casagrande, W.B.¹; Santos, J.H.Z. dos³; Ayub, M.A.Z.², Secchi, A.R.¹

¹Grupo de Integração, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP)
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - Brasil
E-MAIL: {marcus, arge}@enq.ufrgs.br

²Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43212, Campus do Vale. CEP 91540-000 – Porto Alegre – RS – Brasil
E-MAIL: mazayub@ufrgs.br

³Instituto de Química (IQ), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Av. Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale. CEP 91501-970, Caixa Postal 15003, Porto Alegre – RS – Brasil
E-MAIL: jhzds@iq.ufrgs.br

Resumo:

Em bioprocessos, cultivo em estado sólido (CES), ou semi-sólido (CSS), pode ser definido como o cultivo envolvendo sólidos insolúveis na ausência, ou quase, de água livre. Desta forma, o CES se distingue dos cultivos submersos (CSm), onde os substratos e microrganismos encontram-se dissolvidos ou suspensos em grande quantidade de água.

A quantificação da biomassa ao longo do cultivo é de importância fundamental para caracterizar o crescimento microbiano e essencial nos estudos de cinética e modelagem do processo. Entretanto, a natureza insolúvel do meio nos CES impede a utilização das metodologias tradicionalmente consagradas no CSm. Desta forma, várias alternativas já foram propostas na literatura, e uma das mais promissoras envolve a determinação da taxa de produção de CO₂, que é relacionada ao crescimento. A medida pode ser realizada por cromatografia gasosa. A técnica tem a vantagem de ser uma medida on-line e não-destrutiva, de resposta rápida, que pode ser inclusive utilizada para criar estratégias de controle do processo.

Além disso, foram estudados os fenômenos de transferência de massa num biorreator cilíndrico horizontal agitado para CES. O substrato utilizado, resíduo industrial fibroso de soja, tem natureza pastosa, enquanto trabalhos encontrados na literatura lidam com substratos de natureza particulada. Utilizando-se corantes artificiais comuns, pôde-se estudar o padrão de mistura do agitador e o tempo para obter mistura satisfatória nas direções radial e axial. Os resultados auxiliarão na determinação do tipo de modelo matemático adequado para representar o biorreator.

Palavras Chaves: Cultivo em estado sólido, estimação de biomassa, crescimento, taxa de produção de CO₂, transferência de massa.

1 INTRODUÇÃO

Cultivo Em estado sólido

Em bioprocessos, cultivo em estado sólido (CES), ou cultivo semi-sólido (CSS), pode ser definido como o cultivo envolvendo sólidos insolúveis na ausência (ou quase ausência) de água visível.

Entretanto, o substrato deve conter umidade suficiente para sustentar o crescimento e o metabolismo microbiano (Pandey, 2003). O CES imita o crescimento de microrganismos na natureza em sólidos úmidos e é considerado responsável pelo início das técnicas fermentativas na Antiguidade (Mitchell e Lonsane, 1992). A fermentação do pão, por exemplo, pode ser



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

classificada como CES.

Assim, o CES se distingue dos cultivos submersos (CSm), onde os substratos e microrganismos se encontram dissolvidos ou suspensos em grande quantidade de água. As fermentações para produção de cerveja e vinho são cultivos submersos.

Gervais e Molin (2003) lembram que, mesmo em CES, os microrganismos estão em meio líquido, já que as transferências de massa se dão num filme líquido que circunda os microrganismos. Assim, em geral, três fases estão presentes nos CES, sólido, líquido e gás, em oposição aos sistemas bifásicos do CSm.

Pandey (1994) aponta que, embora os registros da utilização de CES venham desde a Antiguidade, na fabricação de pães, queijos e koji (alimento fermentado típico do Extremo Oriente), a partir da década de 1940, início da biotecnologia moderna, os processos em meio sólido foram completamente negligenciados no Ocidente em benefício dos processos submersos. O autor afirma não haver uma razão clara para esta escolha, mas talvez tenha sido decorrência do sucesso da produção da penicilina em CSm. Poucos trabalhos foram realizados em CES nas décadas seguintes, até que na década de 1980 ressurgiu o interesse por estes processos.

Atualmente, vários trabalhos apontam vantagens na utilização de CES em comparação a CSm (Lonsane, 1994; Raimbault, 1998), como:

- Utilização de substratos mais baratos, em geral, resíduos agro-industriais.
- Menor necessidade de condições assépticas, devido ao menor risco de contaminação
- Menor gasto energético
- Menor uso de água
- Menor geração de efluentes líquidos
- Maior transferência de oxigênio, favorecendo processos aeróbios
- Menor volume de equipamento
- Menor capital inicial
- Maior concentração final de produtos, reduzindo custos do processamento “downstream”.

Entretanto, o nível de desenvolvimento dos processos de CES ainda está bastante atrás do obtido pelos processos de CSm. Isto decorre do fato

de que muitos importantes aspectos científicos e de engenharia ainda estão pouco caracterizados em CES. A maior parte do trabalho ainda é qualitativo ou empírico, devido às dificuldades encontradas na quantificação de parâmetros importantes como biomassa (Mitchell e Lonsane, 1992). Por isso, ainda não há informação suficiente sobre a cinética de reações em CES e a modelagem dos processos ainda precisa ser muito estudada (Pandey, 2003).

Os trabalhos em CES concentram-se quase que totalmente na utilização de fungos filamentosos. Em geral, acredita-se que tais organismos seriam mais adequados, devido à capacidade de gerar hifas que penetram no substrato sólido e por sua maior adaptabilidade a condições de baixa atividade de água. Entretanto, já há um bom número de trabalhos que obtêm sucesso no uso de bactérias em CES (Heck, 2005).

Quantificação de biomassa em CES

A biomassa é um parâmetro fundamental na caracterização do crescimento microbiano, logo, sua medida é essencial para estudos cinéticos de cultivos em estado sólidos. Entretanto, a medida direta da biomassa em CES é bastante difícil, devido à dificuldade de separar o microrganismo do substrato (Mitchell, 1992), e técnicas consagradas nas culturas submersas não podem ser aplicadas. Segundo Lekha e Lonsane (1994), a cinética e a modelagem matemática do crescimento microbiano em CES têm recebido pouca atenção devido à dificuldade em estimar a biomassa.

Mitchell (1992) aponta ainda a questão de como expressar a quantidade de biomassa em CES: em termos absolutos (gramas de peso seco) ou como concentração (grama de peso seco por grama de meio de cultivo). Esses valores irão diferir porque normalmente a massa do meio diminui significativamente ao longo do cultivo devido à conversão do substrato em dióxido de carbono. Além disso, há a questão de se usar base seca ou úmida para a concentração de biomassa no meio. De qualquer forma, é importante que o método de expressar estes valores seja cuidadosamente descrito, para que comparações possam ser feitas.

Segundo o mesmo autor, métodos ideais para estimar biomassa em CES devem apresentar as seguintes características:

- Obtenção de resultados com rapidez, de forma a permitir tomada de decisões durante o processo.
- Ser barato, tanto em termos de aparelhagem como de reagentes.



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

- Ser simples em sua execução, já que operadores deverão precisar apenas de treinamento básico.
- Ser reprodutível, preciso e não-suscetível à interferência por componentes do substrato.

Há uma grande variedade de metodologias que são utilizadas para quantificar biomassa, e, novamente, a grande maioria se destina aos cultivos envolvendo fungos filamentosos. Percebe-se que cada trabalho pode exigir uma metodologia diferente, de acordo com o sistema trabalhado (microrganismo, substrato).

As metodologias utilizadas se encaixam basicamente nestas categorias (Lekha e Lonsane, 1994; Mitchell, 1992; Raimbault, 1998):

- Métodos diretos, com a separação direta da biomassa da matriz sólida. Exemplo: contagem em placas.
- Métodos indiretos, com medida de algum componente da biomassa ou medidas de atividade metabólica (respiração, produção de enzimas).

Os autores concordam que, no caso de bactérias e leveduras, os métodos de contagem em placas são aplicáveis.

Entre os métodos indiretos, a medida da atividade respiratória merece destaque. A respiração é o processo metabólico pelo qual os microrganismos aeróbios obtêm a maior parte de sua energia para o crescimento, consumindo O_2 e produzindo CO_2 . Estas atividades estão, portanto, associadas ao crescimento e podem ser utilizadas para a estimativa da biomassa (Mitchell, 1992; Raimbault, 1998).

É interessante notar que todos os trabalhos na literatura utilizam a medição de apenas um dos dois gases (oxigênio e gás carbônico) na estimativa de biomassa.

A determinação da produção de CO_2 (CPR – carbon dioxide production rate) envolve a medida da concentração do gás no ar de entrada e saída do biorreator. Conhecendo-se a vazão de ar que entra e sai, além da quantidade de meio de cultivo contida no biorreator, obtém-se o valor de CPR, conforme Koutinas et al (2003):

$$CPR = \frac{F \cdot (C_{out}^{CO_2} - C_{in}^{CO_2}) \cdot M_{CO_2}}{M \cdot V_{CO_2}} \quad (1)$$

Onde:

CPR	taxa de produção de CO_2 (carbon dioxide production rate) ($g_{CO_2}/g_{leito} \cdot h$)
F	vazão de ar que entra e sai no biorreator (L/h)
$C_{out}^{CO_2}$	concentração de CO_2 no ar que sai do biorreator (v/v)
$C_{in}^{CO_2}$	concentração de CO_2 no ar que entra no biorreator (v/v)
M	massa do leito (g_{leito})
M_{CO_2}	massa molecular do CO_2 (g_{CO_2}/mol)
V_{CO_2}	volume molar do CO_2 (L/mol)

Esta medida tem a grande vantagem de ser uma técnica online e não-destrutiva (Raimbault, 1998), mas para ser utilizado na estimativa de biomassa, precisa ser calibrado por algum outro método.

A medida da produção de CO_2 é mais poderosa quando acoplada a um modelo matemático para correlação. O termo modelo de correlação indica um modelo que relacione a quantidade de biomassa a um parâmetro mensurável. Modelos de correlação não são, assim, modelos de crescimento, já que não fazem predição sobre o comportamento do parâmetro medido. A utilidade destes modelos reside no fato de que, acompanhando-se o perfil do parâmetro medido, pode-se construir um perfil de biomassa (Mitchell, 1992).

A correlação entre CPR e biomassa costuma ser descrita por modelos do tipo Luedeking-Piret, que consideram um termo associado ao crescimento e outro termo de manutenção, não associado ao crescimento (Sugama e Okazaki, 1979; Sato et al, 1983), conforme a equação 2:

$$CPR = Y_{CO_2/X} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{CO_2} \cdot X \quad (2)$$

Onde:

$Y_{CO_2/X}$	quociente da produção de CO_2 em relação à biomassa ($g_{CO_2}/celulas$)
X	biomassa (celulas)
m_{CO_2}	coeficiente de produção de CO_2 não associado ao crescimento ($g_{CO_2}/celulas \cdot h$)

A razão entre produção de CO_2 e consumo de O_2 , chamado de quociente respiratório (RQ), pode mudar com a fase de crescimento (Raimbault, 1998). E, segundo Sato et al (1983), se o RQ não é constante, então os parâmetros do modelo de correlação entre CPR e biomassa também não seriam constantes, o que representa uma limitação da técnica.

De qualquer forma, o monitoramento da produção de CO_2 produz uma boa medida da atividade



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

2 MATERIAIS E MÉTODOS

metabólica do microrganismo, sendo muito interessante como ferramenta no controle do processo. Saucedo-Castañeda et al (1992b) desenvolveram sistema de controle para um biorreator de leito fixo, tendo como parâmetro de controle a taxa de aeração do leito, de forma a manter a concentração de CO_2 no ar de saída constante em níveis baixos e assim conseguir rendimentos ótimos na produção de biomassa em todas as alturas do leito.

Biorreatores de CES

A literatura traz um grande número de tipos de biorreatores que têm sido utilizados para desenvolver trabalhos em cultivo em estado sólido, como leito fixo, bandejas, tambor rotatório, leito fluidizado.

Este trabalho se concentra na utilização de um biorreator cilíndrico horizontal agitado (BCHA), conforme descrito por Heck (2005). Este tipo de biorreator tem sido pouco explorado pelos trabalhos descritos na literatura, por ser pouco adequado ao cultivo de fungos filamentosos. Entretanto, possui grande potencial para a aplicação no caso de microrganismos como bactérias e leveduras.

Os trabalhos que utilizam este tipo de biorreator costumam considerá-lo como homogêneo (Mitchell et al, 2003; Nagel et al, 2000). Não foram encontrados na literatura modelos que descrevessem as heterogeneidades da mistura.

Nagel et al (2000) realizaram experimentos com grãos de trigo coloridos e concluíram que o grau de mistura obtido é função do número de revoluções das pás, e não do tempo de agitação. Além disso, perceberam que a mistura radial é bastante rápida (6 revoluções para homogeneização), enquanto a axial é lenta (mais de 120 revoluções), sendo recomendável que as pás sejam em forma de V, para impulsionar as partículas também na direção axial. Para o desenvolvimento de estratégias de controle do processo, no mesmo trabalho, o biorreator foi considerado homogêneo.

O substrato utilizado por aqueles autores difere, entretanto, do apresentado neste trabalho. Os grãos de trigo formam um sistema particulado, enquanto o RIFS forma uma pasta. Esta diferença deverá se refletir na forma como o substrato se mistura.

Heck (2005), utilizando o mesmo sistema apresentado neste trabalho, desconsiderou as eventuais heterogeneidades do leito.

Biorreator cilíndrico horizontal agitado (BCHA):

O biorreator utilizado nos experimentos está apresentado nas figuras 1 e 2. Compõe-se de um corpo cilíndrico em aço inox 304, com encamisamento para circulação de água. As dimensões do cilindro são 40cm de comprimento e 20cm de diâmetro.



Figura 1: Visão externa do BCHA



Figura 2: Visão interna do BCHA.

Nota-se que o biorreator possui pás de agitação retas, sem inclinação, ligadas a um eixo central por onde também entra o fluxo de ar.

Preparo de inóculo:

O inóculo para os cultivos em BCHA é preparado em 400mL de meio LB. O meio é esterilizado a 120°C por 15min, resfriado à temperatura ambiente



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

e inoculado com *Bacillus circulans* BL53. O inóculo cresce durante 18 a 20h em shaker a 37°C com agitação orbital.

O meio LB é utilizado por ser totalmente solúvel, permitindo assim a padronização do inóculo pela absorbância a 620nm. O inóculo é ajustado à absorbância 1,0 com água destilada, de forma a ter-se uma condição inicial padrão no cultivo.

Preparo do meio de cultivo:

O meio de cultivo utilizado foi o resíduo industrial fibroso de soja (RIFS), subproduto da produção de proteína isolada de soja, que foi obtido junto a uma empresa da região. A composição do RIFS foi analisada por Heck(2001), e está reproduzida na tabela 1:

Tabela 1: Composição do RIFS

Proteína	29,4%
Carboidratos	56,7%
Hemicelulose	23,5%
Celulose	16,3%
Açúcares totais	16,9%
Umidade	10,1%

Fonte: Adaptado de Heck (2001)

O preparo do meio seguiu os procedimentos apresentados por Heck (2005), adicionando-se 800g de RIFS (granulometria média mesh 30) a 4400mL de meio mineral e esterilizando-se a 120°C por 20min. O meio mineral é composto de sais dissolvidos em água de acordo com a tabela 2.

Tabela 2: Composição do meio mineral

MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,41 g/L
CaCl ₂	0,02 g/L
KH ₂ PO ₄	1,00 g/L
K ₂ HPO ₄	1,00 g/L
NH ₄ NO ₃	1,00 g/L
FeCl ₃ ×6H ₂ O	0,05 g/L

O meio foi resfriado até 37°C, sendo então adicionados 200mL de inóculo padronizado a absorbância 1,0. A mistura foi homogeneizada e transferida para dentro do biorreator.

Condições do cultivo:

A agitação do biorreator foi ajustada a 4rpm, o fluxo de água no encamisamento foi mantido a 37°C, e a aeração foi feita com ar umidificado a 37°C, a uma vazão de 4L/min.

Testes de mistura:

Com o objetivo de ter uma avaliação qualitativa da

agitação proporcionada pelas pás do biorreator, foram realizados testes de mistura.

Utilizou-se duas porções de 400g de RIFS com 2200mL de água. Uma foi colorida com 0,3g de corante azul brilhante, e a outra com 0,3g de corante amarelo tartrazina. Após esterilização a 120°C por 20min, ambas foram resfriadas até a temperatura ambiente. Adicionou-se mais 200mL de água a cada porção, misturando bem. Este procedimento buscava reproduzir aquele normalmente adotado nos cultivos, sem inoculação de microrganismo.

Dois tipos de teste de mistura foram realizados, buscando qualificar as velocidades de mistura radial e axial.

Para avaliar a mistura radial, as porções de fibra reconstituída foram distribuídas, sem se misturar, no sentido longitudinal dentro do biorreator, conforme mostra a figura 3.

No caso da avaliação da mistura axial, as porções de fibra foram distribuídas na outra direção, conforme figura 4.



Figura 3: Disposição inicial da fibra no teste de mistura radial



Figura 4: Disposição inicial da fibra no teste de mistura axial



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

Em ambos os casos, o biorreator foi fechado e a agitação foi ajustada para 4rpm (rotação normal utilizada nos cultivos). Em intervalos regulares, parou-se a agitação e observou-se o grau de mistura das duas cores (azul e amarelo) dentro do biorreator.

Quantificação de biomassa:

Em intervalos regulares, pequenas amostras foram retiradas do biorreator para quantificação de biomassa.

Imediatamente, procedeu-se a diluição seriada da amostra e plaqueamento em meio PCA (plate count agar) pela técnica do espalhamento com alça de Drigalski. As placas foram armazenadas em estufa a 37°C, e a contagem das colônias foi feita após 15 a 20h.

Análise do CO₂ liberado:

O ar de saída do biorreator foi continuamente conduzido a um cromatógrafo a gás (CG) modelo Shimadzu GC-14B, equipado com uma válvula de injeção automática marca VICI, coluna Supelco Carboxen 1006 Plot 30m x 0,53mm, detector TCD (a 230°C). O gás de arraste e referência utilizado foi hélio a 30mL/min (arraste) e 10mL/min (referência), medidos com a coluna a 35°C. O perfil de temperatura na coluna iniciou com 6min a 35°C, seguindo-se de aquecimento de 25°C/min até 110°C, mantendo-se esta temperatura por 3min. Segue-se resfriamento até 35°C. Nestas condições, o tempo de retenção do CO₂ foi de 4,2min. A amostragem automática do gás de saída do biorreator foi realizada a cada 20min.

Para quantificar o CO₂ no ar que entra no biorreator, foram feitas análises cromatográficas do ar antes e depois do cultivo.

Calibração da medida de CO₂ no CG

A calibração do CG para a medição do CO₂ será realizada pela injeção de volumes conhecidos de gás puro, utilizando-se seringa de injeção comum para cromatografia. O volume injetado poderá ser convertido em concentração de CO₂ dividindo-se pelo volume do loop do injetor automático (280µL). Assim, o sinal gerado no cromatograma será relacionado com a concentração de CO₂. Para obter maior precisão, as injeções devem ser repetidas várias vezes para cada volume utilizado.

Este método de calibração mostrou-se surpreendentemente reprodutível, comprovado pelo alto coeficiente de correlação, e os resultados

obtidos para uma outra condição de operação do CG estão apresentados na figura 5.

pH

Medidas de pH do substrato serão realizadas em suspensão aquosa com 10% de amostra do meio de cultivo, utilizando potenciômetro da marca “Nova Técnica” modelo NT pH/Brasil.

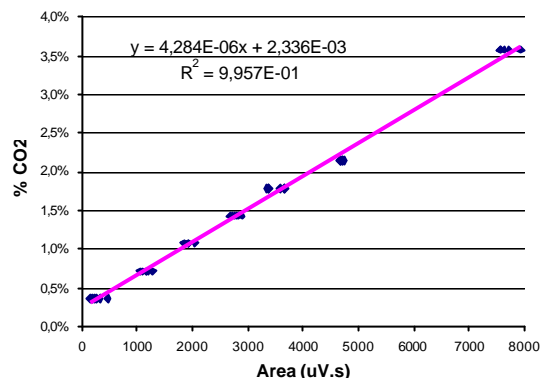


Figura 5: Curva de calibração obtida para análise de CO₂ em CG

Umidade do leito

A umidade do leito será medida conforme método descrito em Carvalho e Jong (2002). Toma-se aproximadamente 5g de amostra e mistura-se com areia tratada em cápsula previamente seca (mínimo 3h em estufa a 80°C) e pesada. A cápsula, após pesada com amostra, é levada à estufa a 105°C por 3 horas, resfriada em dessecador e novamente pesada. A diferença das pesagens é atribuída à água da amostra.

Umidade relativa do ar de entrada e saída

Para realizar balanços de água no sistema, é necessário monitorar a umidade do ar de entrada e saída do biorreator.

A umidade do ar de entrada do biorreator, quando não for ar saturado, será controlada pelo uso de soluções saturadas de sais no umidificador, conforme descrito por Labuza et al (1985).

Já a umidade do ar de saída será monitorada com o uso de um medidor de temperatura e umidade modelo Center 310.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Testes de mistura

Nos testes de mistura, verificou-se que o biorreator possui ótima capacidade de mistura na direção



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

radial, sendo que em menos de 15min de agitação a 4rpm (total de 80 revoluções) não há mais diferenças de cor no leito, conforme pode ser observado na figura 6.

Porém, foram identificadas zonas mortas dentro do biorreator, que não são atingidas pelas pás e, por isso, acumulam pequena quantidade de substrato que não se mistura muito rapidamente com o resto do leito. Estas zonas mortas localizam-se na fina camada que reveste as paredes do biorreator, com aproximadamente 3mm de espessura e nas extremidades do eixo. Estas regiões, entretanto, correspondem a menos de 5% do volume do leito.



Figura 6: Aspecto do biorreator após 15 minutos de teste de mistura radial.

Já na direção axial, a mistura é mais lenta, conforme esperado devido à configuração das pás. A figura 7 mostra o aspecto interno do biorreator aos 45 minutos de agitação (180 revoluções). Percebe-se que a massa está bem misturada, entretanto, as zonas mortas ainda não se misturaram. Esta mistura mais completa só será obtida após quase das horas de agitação.



Figura 7: Aspecto do biorreator após 45 minutos de teste de mistura axial.

Estes resultados concordam com os resultados de Nagel et al (2000), que também perceberam que a homogeneização na direção radial se dá muito mais rapidamente que na direção axial. Entretanto, cabe ressaltar que a mistura completa no sistema particulado de Nagel et al (2000) se deu muito mais rapidamente (6 revoluções em teste de mistura radial e 120 revoluções em teste de mistura axial).

Com estes resultados, aliados aos dados da literatura, decidiu-se tratar o leito do biorreator como homogêneo. O fato da mistura axial ser lenta é contrabalançado pela distribuição do ar de entrada ao longo de toda a extensão do cilindro.

Quantificação de biomassa e correlação com produção de CO₂

Os resultados obtidos em cultivo piloto estão apresentados na figura 6.

A quantificação da produção de CO₂ apresentada na figura 8 ainda não está completa, pois as medidas ainda devem ser calibradas. Entretanto, sabe-se da proporcionalidade entre área do pico de CO₂ e concentração.

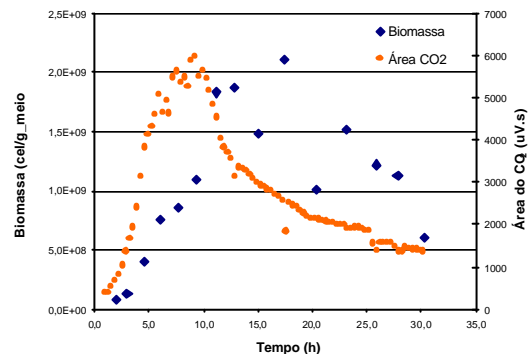


Figura 8: Resultados de biomassa e produção de CO₂ em cultivo em estado sólido piloto.

Percebe-se que a análise de biomassa está sujeita a imprecisões. Para corrigir esta distorção, pode ser necessário filtrar os dados por meio de ajuste a uma curva de crescimento. O tipo de curva mais comumente utilizado para CES é a logística (Mitchell et al, 2004) :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (3)$$

Onde:

μ Taxa de crescimento (h⁻¹)
 X_{\max} Conteúdo máximo de biomassa (celulas)

Além disso, neste experimento foi notada a queda



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

na concentração de biomassa após aproximadamente 15h de cultivo. Esta queda não pode ser atribuída somente à imprecisão da análise, mas há uma hipótese possível para explicar o fenômeno: o aumento da umidade do meio de cultura, que poderia ter aumentado a massa do leito e, assim, diluído a concentração de biomassa. Esta hipótese, que ainda terá de ser verificada, reforça a preocupação de Mitchell (1992) com a forma de expressar a quantidade de biomassa no leito, em valores absolutos ou como concentração sobre a massa seca do leito.

Exemplo da correlação entre produção de CO₂ e biomassa em cultivo submerso

Para mostrar a boa correlação que pode ser obtida entre produção de CO₂ e biomassa, foram utilizados dados não publicados de cultivo submerso em batelada simples da levedura *Kluyveromyces marxianus* em soro de queijo.

A figura 7 ilustra as curvas de biomassa obtidas experimentalmente, e a curva predita pelo modelo de correlação utilizando os dados de produção de CO₂.

Os parâmetros do modelo foram estimados minimizando a soma dos quadrados dos erros de predição, utilizando o método dos poliedros flexíveis de Nelder-Mead (Método Simplex), implementado no software Matlab v.5.3.

Por outro lado, no momento em que o mesmo modelo foi utilizado para estimar a biomassa em cultivo em batelada alimentada, os resultados ainda não foram satisfatórios, o que expõe algumas limitações da técnica.

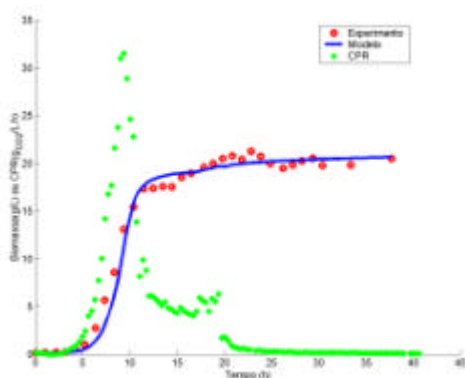


Figura 7: Estimação da biomassa pela produção de CO₂ em cultivo submerso.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A quantificação de biomassa, apesar de ser um parâmetro fundamental para o desenvolvimento de bioprocessos, ainda tem de ser muito estudada em CES. As técnicas desenvolvidas têm se destinado basicamente aos processos envolvendo fungos filamentosos, enquanto a análise por contagem em placas, tradicionalmente recomendada para bactérias, ainda não mostra a precisão desejada.

Por outro lado, a estimacão da biomassa por métodos indiretos, através da medida da produção de CO₂, representa uma perspectiva muito promissora para o monitoramento e controle de bioprocessos.

Nos próximos passos deste trabalho, haverá monitoramento da umidade no leito, da umidade relativa e temperatura do ar de entrada e saída do biorreator, além do monitoramento da temperatura de entrada e saída da água da camisa, de forma a estabelecer balanços de água e energia no sistema.

Será determinada a relação entre produção de CO₂ e redução de massa seca do leito. Segundo Nagel et al (2000), esta relação é linear, já que os sólidos do leito são convertidos em CO₂ pelo metabolismo microbiano. A medida da massa seca do leito é importante para que se possa escolher a melhor forma de expressar a quantidade de biomassa, conforme citado por Mitchell (1992).

Para desenvolver o estudo da transferência de massa no biorreator, está sendo estudada a possibilidade do uso de análise de imagens nos testes de mistura com corantes, para determinar um coeficiente efetivo de transferência de massa. Esta informação seria útil no momento de propor modelos adequados para descrever os fenômenos de transferência de massa no processo.

5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho conta com recursos dos órgãos de fomento CNPq e Capes.

6 REFERÊNCIAS

CARVALHO, H.H. e JONG, E.V. de (coords.); BELLÓ, R.M.; SOUZA, R.B. de; TERRA, M.F. **Alimetos: métodos físicos e químicos de análise**. Porto Alegre: Ed.Universidade/UFRGS, 2002.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.85-101, 2003.



Oktober Fórum 2005 – PPGEQ

HECK, J.X. **Produção, purificação e caracterização de uma xilanase (EC 3.2.1.8) excretada pelo isolado amazônico *Bacillus circulans* BL53 em cultivo semi-sólido.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. UFRGS, 2005.

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

LABUZA, T.P.; KAAANANE, A.; CHEN, J.Y. Effect of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity of two dehydrated foods. **Journal of Food Science**, v.50, p.385-391, 1985.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Biomass estimation in solid state fermentation. In: PANDEY, A. (ed.). **Solid state fermentation**. Wiley: New Delhi, India. 1994.

LONSANE, B.K. Resurgence of interest in solid-state fermentation: Reasons and justification. In: PANDEY, A. (ed.). **Solid state fermentation**. Wiley: New Delhi, India. 1994.

MITCHELL, D.A. Biomass estimation in solid-state cultivation. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. (Eds.) **Solid substrate cultivation**. Cap.4, p.53-63. London: Elsevier. 1992.

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K. Definition, characteristics and potential. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. (Eds.) **Solid substrate cultivation**. Cap.4, p.53-63. London: Elsevier. 1992.

MITCHELL D.A.; MEIEN, O.F.von; KRIEGER, N.; DALSENTER, F.D.H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. Berlin, v.17, p.15-26. 2004.

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**. New York. v.72(2), p.219-230. 2001.

PANDEY, A. Solid-state fermentation: An overview. In: PANDEY, A. (ed.). **Solid state fermentation**. Wiley: New Delhi, India. 1994.

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

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.1, p.1-15, 1998.

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** v.61, no.6, p.623-629, 1983.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LONSANE, B.K.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Control of carbon dioxide in exhaust air as a method for equal biomass yields at different bed heights in a column fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.37, p.580-582, 1992b.

SUGAMA, S.; OKAZAKI, N. Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. **Journal of Fermentation Technology** v.57, no.5, p.408-412, 1979.