

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Cultivo em Estado Sólido: Modelagem e
Quantificação de Biomassa em Biorreator
Cilíndrico Horizontal Agitado**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcus Darci Rutsatz

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Cultivo em Estado Sólido: Modelagem e
Quantificação de Biomassa em Biorreator
Cilíndrico Horizontal Agitado**

Marcus Darci Rutsatz

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia

Orientador:

Prof. Dr. Argimiro Resende Secchi

Co-orientador:

Prof. Dr. Marco Antônio Zacchia Ayub

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação *Cultivo em Estado Sólido: Modelagem e Quantificação de Biomassa em Biorreator Cilíndrico Horizontal Agitado*, elaborada por Marcus Darci Rutsatz, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr^a. Marla Azário Lansarin

Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

Prof. Dr^a. Rosane Rech

Agradecimentos

A Deus, por sempre iluminar meu caminho.

À UFRGS, instituição da qual faço parte há quase uma década, e à qual devo alguns dos melhores momentos da minha vida.

Ao Professor Argimiro Resende Secchi, meu orientador. Como falei há alguns dias a um colega novo no mestrado: “O Arge nunca vai te deixar na mão.” Creio que isto define bem o que ele representou durante o trabalho.

Ao Professor Marco Antônio Zacchia Ayub, que se revelou um ótimo amigo, uma pessoa de posições claras, sempre se preocupando com a qualidade do trabalho.

Ao Professor João Henrique Zimnoch dos Santos, do Instituto de Química, cuja ajuda foi bem além das dúvidas sobre cromatografia.

Ao futuro engenheiro químico Wagner Bertuol Casagrande, que foi meu fiel escudeiro durante os experimentos, enfrentando comigo os momentos de decepção e compartilhando os de alegria.

Aos colegas do Bioteclab e do PPGEQ. Prefiro não citá-los individualmente, para evitar cometer uma injustiça. O apoio mútuo entre os colegas é, sem dúvida, uma das principais forças motrizes do trabalho.

A meu pai, minha mãe e minhas irmãs, que me incentivaram a cursar o mestrado. Sem seu apoio, certamente eu não teria sequer iniciado esta jornada.

À Siomara, meu amor e companheira, o melhor motivo que tenho para querer ser melhor. Dividimos, juntos, a experiência do mestrado, sempre ajudando um ao outro, sendo compreensivos mesmo nos fins de semana em que não podíamos estar juntos.

Finalmente, à CAPES, pelo apoio financeiro.

Resumo

Em bioprocessos, cultivo em estado sólido (CES) 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), nos quais os substratos e microrganismos encontram-se dissolvidos ou suspensos em grande quantidade de água. Muitos aspectos importantes de engenharia de processo ainda precisam ser desenvolvidos em CES, como a quantificação de biomassa, a cinética de reações e as transferências de massa e energia. Neste trabalho, estudou-se um processo de cultivo em estado sólido em biorreator de tambor agitado utilizando um resíduo industrial fibroso de soja (RIFS) como substrato para o crescimento da bactéria *Bacillus circulans* BL53.

Inicialmente, foram realizados testes de mistura utilizando corantes alimentícios para avaliar a eficiência da homogeneização promovida pelas pás agitadoras. O teste utilizando corantes espelha-se em outros encontrados na literatura, porém o substrato aqui utilizado tem natureza pastosa, contra os de natureza particulada de outros trabalhos. Concluiu-se que a homogeneização é satisfatória.

Foi realizada a estimativa da biomassa no cultivo através da taxa de produção de CO₂, analisado por cromatografia gasosa. Com o uso de um modelo de correlação, obteve-se bons resultados para as primeiras horas de cultivo, porém os erros de estimativa tornaram-se muito grandes após 20 horas de cultivo. Este é um resultado comum também em outros trabalhos semelhantes encontrados, já que o erro da estimativa é cumulativo, e o único parâmetro monitorado (produção de CO₂) pode falhar na detecção de mudanças do metabolismo microbiano.

Além disso, foi desenvolvido um modelo cinético, que relaciona as concentrações de biomassa, açúcares redutores totais e acetato, além da produção de CO₂, no cultivo. O acetato é um produto metabólico com efeito bactericida. Por consequência deste efeito, houve queda na contagem de células viáveis após aproximadamente 15 horas de cultivo. No geral, houve boa correlação com dados experimentais, porém outros desenvolvimentos são necessários para aprimorar o modelo. A produção de CO₂, por exemplo, não foi bem descrita pelo modelo. A inclusão de medições de consumo de oxigênio, uma estequiometria de reação definida e balanços de massa e energia podem trazer melhorias significativas às predições e à aplicabilidade do modelo.

Abstract

Solid state cultivations (SSC) may be defined as the cultivation involving insoluble solids in the absence, or near absence, of free water. Therefore, SSC is distinguished from submerged cultivations (SmC), where substrates and microorganisms are dissolved or suspended in large quantities of water. Many important engineering aspects of SSC are still to be developed, like biomass quantification, reaction kinetics, mass and energy transfers. This work dealt with a solid state cultivation process carried out in an agitated drum bioreactor, using an industrial fibre soybean residue (IFSR) as substrate for the growth of the bacterium *Bacillus circulans* BL53.

Mixing tests were carried out in order to evaluate the efficiency of the homogeneization promoted by the mixing paddles. Common food grade dyes were used in these experiments, similar to other works in the literature. However, the viscous nature of ISFR greatly differs from the particulates used in other works. Homogeneization was concluded to be satisfactory.

Biomass was estimated through the CO₂ production rate, which was determined by gas chromatography. Using a correlation model, good results were obtained for the first hours of the cultivation, but the estimation errors became too large after 20 hours. This is a common result also in other works, since the estimation error is cumulative, and the only monitored parameter (CO₂ production) may fail the detection of metabolic changes of the microorganism.

A kinetic model of the process was also developed, relating biomass, total reducing sugars and acetate concentrations, in addition to CO₂ production. Acetate is a metabolic product which has bactericidal effect. As a consequence, viable cell count dropped after approximately 15 hours cultivation. A general good correlation with experimental data was obtained, but the model may be further improved. For example, the model was unable to describe the CO₂ production satisfactorily. The inclusion of oxygen uptake measurements, a defined reaction stoichiometry, together with mass and energy balances may significantly improve model predictions and applicability.

Sumário

Resumo.....	V
Abstract	VI
Sumário	VII
Lista de figuras.....	IX
Lista de tabelas	X
Lista de símbolos.....	XI
Introdução.....	1
Fundamentos e Revisão Bibliográfica	4
2.1 Cultivo em Estado Sólido	4
2.1.1 Uso de bactérias em CES	9
2.1.2 O pH em CES	10
2.2 Quantificação de Biomassa em Cultivo em Estado Sólido	11
2.2.1 Métodos diretos	13
2.2.2 Métodos indiretos - Medida de componentes da biomassa	14
2.2.2.1 Nitrogênio e Proteína	15
2.2.2.2 Ácidos nucleicos	16
2.2.2.3 Glicosamina	16
2.2.2.4 Ergosterol.....	17
2.2.3 Métodos indiretos – Medidas de atividade metabólica.....	18
2.2.3.1 Respirometria.....	18
2.2.3.2 Massa seca do leito	21
2.2.3.3 Produção de enzimas extracelulares	21
2.2.3.4 Medidas de fluorescência	22
2.2.3.5 ATP	22
2.2.3.6 Ácidos orgânicos	23
2.2.4 Outras técnicas	23
2.3 Modelagem Matemática de Biorreatores para Cultivo em Estado Sólido.....	24
2.3.1 Biorreatores de leito fixo	26
2.3.2 Biorreatores de bandejas	30
2.4 Biorreatores de leito fluidizado	33
2.5 Biorreatores de tambor rotatório.....	34
2.6 Biorreatores de Tambor Agitado	37
2.7 Metabolismo e crescimento	38
2.8 Estimação de biomassa através dos gases de saída	43

Materiais e Métodos	45
3.1 Instalações e equipamentos.....	45
3.2 Biorreator cilíndrico horizontal agitado (BCHA)	46
3.3 Microrganismo.....	47
3.4 Preservação da cultura	47
3.5 Preparo de inóculo	47
3.6 Preparo do meio de cultivo	48
3.7 Condições do cultivo	49
3.8 Água do encamisamento do biorreator	49
3.9 Quantificação de biomassa	50
3.10 pH do meio de cultivo	50
3.11 Análises do extrato aquoso	51
3.11.1 Preparo do extrato aquoso	51
3.11.2 Açúcares redutores.....	51
3.11.3 Acetato	51
3.12 Medição da umidade relativa do ar de saída do biorreator.....	52
3.13 Análise de umidade do meio de cultura.....	52
3.14 Análise do CO ₂ liberado no cultivo	52
3.14.1 Análise por Cromatografia Gasosa	52
3.14.2 Calibração da medida de CO ₂ no CG	53
3.14.3 Análise de CO ₂ e O ₂ em analisador de gases.....	53
3.15 Testes de mistura no biorreator.....	54
3.16 Estimação de biomassa através da produção de CO ₂	55
3.17 Modelagem do crescimento microbiano	57
3.18 Resolução dos modelos e estimação de parâmetros	57
3.19 Seleção e estimação de parâmetros.....	58
Resultados e Discussão	60
4.1 Calibração da medida de CO ₂ no cromatógrafo a gás	60
4.2 Testes de mistura	61
4.3 Temperatura da água de encamisamento	63
4.4 Umidade do leito ao longo dos cultivos	64
4.5 Observações gerais durante os cultivos	65
4.6 pH do meio de cultivo	66
4.7 Quantificação de biomassa por contagem em placas	67
4.8 Açúcares Redutores	70
4.9 Modelagem do crescimento microbiano	71
4.10 Estimação da biomassa através da taxa de produção de CO ₂	72
4.11 Desenvolvimento de modelo cinético.....	75
4.12 Estimação dos parâmetros do modelo cinético.....	77
Conclusões e Perspectivas.....	85
Referências Bibliográficas	88
Obras Consultadas	94
Apêndice A - Problemas enfrentados durante os experimentos.....	96
Anexo I – Algoritmo SELEST.....	100

Lista de figuras

Figura 2.1: Árvore decisória para validação de método indireto baseado em componente da biomassa.	15
Figura 2.2: Exemplo do aumento do erro de estimação da biomassa.	20
Figura 2.3: Classificação dos biorreatores de CES em função das características de agitação e aeração.	26
Figura 2.4: Descrição dos fenômenos de transferência de energia em biorreatores de leito fixo tradicional e Zymotis.	27
Figura 2.5: Comparação entre modelos para biorreatores de bandejas.	31
Figura 2.6: Esquema de biorreator de leito fluidizado.	33
Figura 2.7: Efeitos considerados em modelos de biorreatores de leito fluidizado.	34
Figura 2.8: Possíveis regimes de movimentação do leito em biorreatores de tambor rotatório.	35
Figura 2.9: Efeitos considerados em modelo para biorreator de tambor rotatório.	35
Figura 2.10: Os vários perfis cinéticos empíricos utilizados em CES.	40
Figura 3.1: Visões externa e interna do BCHA.	46
Figura 3.2: Disposição inicial da fibra nos testes de mistura.	55
Figura 3.3: Descrição simplificada do algoritmo SELEST.	59
Figura 4.1: Curva de calibração obtida para análise de CO ₂ em CG.	60
Figura 4.2: Comparação entre as medidas de concentração de CO ₂ (em %) obtidas pelo cromatógrafo a gás e pelo analisador de gases.	61
Figura 4.3: Aspecto do biorreator ao início e após 15 minutos no teste de mistura radial.	62
Figura 4.4: Aspecto do biorreator ao início e após 45 minutos no teste de mistura axial.	62
Figura 4.5: Temperatura de entrada e saída da água de encamisamento.	64
Figura 4.6: Evolução da umidade no meio de cultivo	65
Figura 4.7: Variação do pH ao longo dos cultivos.	67
Figura 4.8: Evolução da biomassa ao longo dos cultivos.	67
Figura 4.9: Evolução do pH e da concentração de biomassa ao longo dos cultivos.	68
Figura 4.10: Comparação entre concentração de biomassa e de ácido acético.	69
Figura 4.11: Comparação entre concentração de biomassa e de açúcares redutores.	71
Figura 4.12: Ajuste dos dados de biomassa ao modelo logístico.	72
Figura 4.13: Exemplo de cromatograma obtido na análise de CO ₂ no ar de saída do biorreator.	72
Figura 4.14: Taxa de produção de CO ₂	73
Figura 4.15: Resultados da estimação de biomassa a partir da taxa de produção de CO ₂ , para três experimentos.	74
Figura 4.16: Predições do modelo desenvolvido em comparação com os dados experimentais.	81
Figura 4.17: Predições do modelo com relação à produção de CO ₂	82
Figura 4.18: Estimação de biomassa através dos parâmetros $Y_{CO_2/X}$ e m_{CO_2} do modelo cinético.	83
Figura A.1: Curva de porcentagem de CO ₂ no ar de saída do biorreator apresentando efeito da variação da vazão de ar.	97
Figura A.2: Aspecto de colônias colabadas de <i>Bacillus circulans</i> BL53.	99

Lista de tabelas

Tabela 2.1: Comparação entre CES e CSm.....	6
Tabela 2.2: Algumas aplicações de CES.	7
Tabela 3.1: Composição do Luria Broth.....	47
Tabela 3.2: Composição do RIFS	48
Tabela 3.3: Composição do meio mineral.....	48
Tabela 3.4: Composição do meio PCA utilizado.....	50
Tabela 3.5: Modelos cinéticos de crescimento em CES	57
Tabela 4.1: Parâmetros do modelo cinético presentes nos balanços de biomassa, açúcares redutores e acetato.	78
Tabela 4.2: Parâmetros estimados para o modelo cinético	79
Tabela 4.3: Efeito dos parâmetros sobre as saídas do modelo cinético.....	79
Tabela 4.4: Matriz de correlação para os parâmetros estimados do modelo cinético	80
Tabela 4.5: Parâmetros $Y_{CO_2/X}$ e m_{CO_2} estimados para o modelo cinético.	81

Lista de símbolos

Símbolo	Unidade	Significado
A	g.s.h^{-1}	Taxa para reação enzimática de hidrólise de polissacarídeos
A_{ba}	m^2	Área de troca convectiva de calor entre leito e <i>headspace</i> do biorreator
A_{bp}	m^2	Área de troca convectiva de calor entre leito e parede do biorreator
A_c	$\text{g}_{Ac}.\text{g}^{-1}$	Concentração de acetato
A_{pa}	m^2	Área de troca convectiva de calor entre parede e <i>headspace</i> do biorreator
A_{pe}	m^2	Área de troca convectiva de calor entre parede do biorreator e o exterior
A_s	m^2	Área superficial do leito
a_x	m^{-1}	Área da interface ar/biofilme por unidade de volume do biorreator
B_1	[adim]	Constante da equação de Hougen-Watson
B_2	[adim]	Constante da equação de Hougen-Watson
b	$^{\circ}\text{C}$	Parâmetro de sensibilidade da taxa de crescimento à mudança de temperatura
Bi	[adim]	Número de Biot
c_1	K^{-1}	Constante empírica da equação de Ratkowsky
c_2	K^{-1}	Constante empírica da equação de Ratkowsky
C^{CO_2}	$\text{g}_{CO_2}.\text{g}^{-1}$	Concentração de CO_2
$C_{in}^{CO_2}$	$\text{L}_{CO_2}.\text{L}_{ar}^{-1}$	Concentração de CO_2 no ar de entrada
$C_{out}^{CO_2}$	$\text{L}_{CO_2}.\text{L}_{ar}^{-1}$	Concentração de CO_2 no ar de saída
C^{O_2}	$\text{g}_{O_2}.\text{g}^{-1}$	Concentração de O_2
C_{O_2}	$\text{g}_{O_2}.\text{g}_{gás}^{-1}$	Concentração de O_2 na fase gás
$C_{in}^{O_2}$	$\text{L}_{O_2}.\text{L}_{ar}^{-1}$	Concentração de O_2 no ar de entrada
$C_{out}^{O_2}$	$\text{L}_{O_2}.\text{L}_{ar}^{-1}$	Concentração de O_2 no ar de saída
$C_{O_2}^f$	$\text{g}_{O_2}.\text{g}^{-1}$	Concentração de O_2 no biofilme
$C_{O_2}^x$	$\text{g}_{O_2}.\text{g}_{gás}^{-1}$	Concentração de O_2 no <i>headspace</i> entre bandejas
$C_{O_2}^b$	$\text{g}_{O_2}.\text{g}^{-1}$	Concentração de O_2 no leito
Cp_a	$\text{J}.\text{g}^{-1}.\text{K}^{-1}$	Calor específico do ar

C_{pb}	$J.g^{-1}.K^{-1}$	Calor específico médio do leito
C_{pG}	$J.g^{-1}.K^{-1}$	Calor específico da fase gasosa
C_{pp}	$J.g^{-1}.K^{-1}$	Calor específico parede do biorreator
C_{ps}	$J.g^{-1}.K^{-1}$	Calor específico das partículas sólidas
C_{pVAP}	$J.g^{-1}.K^{-1}$	Calor específico do vapor de água
C_{pw}	$J.g^{-1}.K^{-1}$	Calor específico da água
C_{VAP}	$g_w.g^{-1}$	Concentração de vapor de água nos poros do leito
CPR	$g_{CO_2}.g^{-1}.h^{-1}$	Taxa de produção de CO_2
C_w	$g_w.g^{-1}$	Concentração de água no leito
$D_{O_2}^b$	$m^2.h^{-1}$	Difusividade efetiva do O_2 nos poros do leito
D_{VAP}^*	$m^2.h^{-1}$	Difusividade efetiva do vapor de água no leito
E_D	$J.mol^{-1}$	Energia de ativação para o decaimento (morte ou inativação) celular
E_G	$J.mol^{-1}$	Energia de ativação para o crescimento celular
f	K^{-1}	Coefficiente linear na aproximação à equação de Antoine.
F	$g.h^{-1}$	Vazão de ar
F_{in}	$L.h^{-1}$	Vazão de entrada de ar
F_{out}	$L.h^{-1}$	Vazão de saída de ar
F_w	$g.h^{-1}$	Vazão de água (entrando ou saindo)
ΔG_D	$J.mol^{-1}$	Varição de energia livre para inativação celular
h	$J.h^{-1}.m^{-2}.K^{-1}$	Coefficiente de troca convectiva de calor
H	J	Entalpia
H_b	m	Altura do leito
h_{ba}	$J.h^{-1}.m^{-2}.K^{-1}$	Coefficiente de troca convectiva de calor entre leito e <i>headspace</i> do biorreator
h_{bp}	$J.h^{-1}.m^{-2}.K^{-1}$	Coefficiente de troca convectiva de calor entre leito e parede do biorreator
h_{pa}	$J.h^{-1}.m^{-2}.K^{-1}$	Coefficiente de troca convectiva de calor entre parede e <i>headspace</i> do biorreator
h_{pe}	$J.h^{-1}.m^{-2}.K^{-1}$	Coefficiente de troca convectiva de calor entre parede do biorreator e o exterior
H_{O_2}	[adim]	Constante da Lei de Henry para o O_2
k	h^{-1}	Constante de decaimento exponencial de primeira ordem
K	$UFC.g^{-1}.h^{-1}$	Taxa de crescimento linear
k_1	$(g_{Ac}.g^{-1})^{-n}.h^{-1}$	Taxa de reação de inativação celular devido ao acetato
k_2	$(g_{Ac}.g^{-1})^{-p}.h^{-1}$	Taxa de reação de hidrólise de polissacarídeos

K_a	$m \cdot h^{-1}$	Coeficiente de transferência mássica de O_2 na interface ar/biofilme
k_a	$J \cdot h^{-1} \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$...	Condutividade térmica do ar
k_b	$J \cdot h^{-1} \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$...	Condutividade térmica média do leito
k_D	h^{-1}	Velocidade específica de decaimento (morte ou inativação) celular
k_{exp}	[adim].....	Parâmetro empírico
K_i	$g_S \cdot g^{-1}$	Constante de inibição pelo substrato
k_s	$J \cdot h^{-1} \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$...	Condutividade térmica dos sólidos secos
K_S	$g_S \cdot g^{-1}$	Constante de Monod para o substrato S
K_{O_2}	$g_{O_2} \cdot g^{-1}$	Constante de Monod para o O_2
k_w	$g \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$	Coeficiente de transferência de massa
L	[adim].....	Razão entre a taxa de crescimento específico no início da fase de desaceleração e a taxa de crescimento específico na fase de aceleração
m	$g \cdot UFC^{-1} \cdot h^{-1}$	Taxa de produção/consumo para manutenção (não-associada ao crescimento)
M_B	g	Massa do leito
M_G	g	Massa da fase gasosa
M_S	g	Massa seca do leito
m_{CO_2}	$g \cdot UFC^{-1} \cdot h^{-1}$	Velocidade específica de produção de CO_2 para manutenção celular (não-associada ao crescimento)
m_{O_2}	$g \cdot UFC^{-1} \cdot h^{-1}$	Velocidade específica de consumo de O_2 para manutenção celular (não-associada ao crescimento)
M_{CO_2}	$g \cdot mol^{-1}$	Massa molar do CO_2
M_{O_2}	$g \cdot mol^{-1}$	Massa molar do O_2
n	[adim].....	Ordem da reação de morte celular em relação ao acetato
p	[adim].....	Ordem da reação de hidrólise de polissacarídeos em relação à biomassa
R	$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$	Constante universal dos gases
r	m	Coordenada radial
R_b	m	Raio do leito
r_x	$UFC \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	Taxa de crescimento
r_Q	$J \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$	Taxa de geração de energia metabólica
r_{H_2O}	$g \cdot h^{-1}$	Taxa de geração metabólica de água
r_{O_2}	$g_{O_2} \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	Taxa de consumo de O_2
S	$g_S \cdot g^{-1}$	Concentração de substrato

T	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura
t	h	Tempo
t_a	h	Instante de tempo de troca de fase de crescimento (da aceleração rápida para a desaceleração lenta)
T_a	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura do ar
T_b	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura do leito
T_{in}	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura do ar na entrada
T_{max}	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura máxima para crescimento
T_{min}	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura mínima para crescimento
T_{opt}	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura ótima para crescimento
T_{out}	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura do ar na saída
T_p	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura da parede do biorreator
T_{viz}	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura da vizinhança
T_w	$^{\circ}\text{C}$	Temperatura da água de resfriamento
V	L	Volume utilizado do biorreator
V_p	m^3	Volume da parede do biorreator
V_z	$\text{m}\cdot\text{h}^{-1}$	Velocidade superficial do ar na direção vertical
v_{CO_2}	$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	Volume molar do CO_2
v_{O_2}	$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	Volume molar do O_2
W	$\text{g}_w\cdot\text{g}^{-1}$	Umidade do leito (em base seca)
X	$\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$	Concentração de biomassa
x	m	Coordenada cartesiana horizontal
X_{max}	$\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$	Concentração máxima de biomassa na equação logística
y_a	$\text{g}_w\cdot\text{g}^{-1}$	Concentração de vapor no ar do <i>headspace</i>
y_{EQ}	$\text{g}_w\cdot\text{g}^{-1}$	Concentração de vapor em equilíbrio com o leito
y_{in}	$\text{g}_w\cdot\text{g}^{-1}$	Concentração de vapor no ar na entrada
y_{out}	$\text{g}_w\cdot\text{g}^{-1}$	Concentração de vapor no ar na saída
$Y_{Ac/X}$	$\text{g}_{Ac}\cdot\text{UFC}^{-1}$	Razão de produção de acetato por biomassa formada
Y_{X/O_2}	$\text{UFC}\cdot\text{g}_{O_2}^{-1}$	Razão de formação de biomassa por O_2 consumido
Y_{X/CO_2}	$\text{UFC}\cdot\text{g}_{CO_2}^{-1}$	Razão de formação de biomassa por CO_2 produzido
$Y_{X/P}$	$\text{UFC}\cdot\text{g}_P^{-1}$	Razão de biomassa formada por produção/consumo de produto/substrato
$Y_{Q/X}$	$\text{J}\cdot\text{UFC}^{-1}$	Razão de geração de calor metabólico por biomassa formada
$Y_{S/X}$	$\text{g}_S\cdot\text{UFC}^{-1}$	Razão de consumo de substrato por biomassa formada
z	m	Coordenada vertical

a $g_{Ac} \cdot UFC^{-1}$	Parâmetro de proporcionalidade entre redução da concentração de acetato e a velocidade de morte celular
\hat{I}[adim]	Emissividade das paredes do biorreator
e[adim]	Porosidade do leito
l_w $J \cdot g^{-1}$	Calor latente de evaporação da água
m h^{-1}	Velocidade específica de crescimento
m_{max} h^{-1}	Velocidade específica máxima de crescimento
m_{opt} h^{-1}	Velocidade específica de crescimento microbiano sob condições ótimas
m_{T_0} h^{-1}	Velocidade específica de crescimento na temperatura de referência
r_a $g \cdot m^{-3}$	Massa específica do ar
r_b $g \cdot m^{-3}$	Massa específica média do leito
r_p $g \cdot m^{-3}$	Massa específica da parede do biorreator
r_s $g \cdot m^{-3}$	Massa específica dos sólidos secos
s $J \cdot h^{-1} \cdot m^{-2} \cdot K^{-4}$	Constante de Stefan-Boltzmann

Capítulo 1

Introdução

Nas últimas décadas, o crescimento populacional, com o conseqüente aumento do consumo dos limitados recursos naturais do planeta, tem obrigado o homem a buscar alternativas aos processos produtivos tradicionais. Estas alternativas devem-se caracterizar pela substituição de fontes não-renováveis por renováveis, pela minimização do uso de energia e da geração de resíduos, e pela eficiência produtiva.

Nesse contexto, os bioprocessos têm-se apresentado como uma alternativa aos tradicionais processos químicos estudados na Engenharia Química, com a vantagem de serem mais ecologicamente corretos e utilizarem recursos naturais renováveis.

Entretanto, a viabilidade econômica dos bioprocessos depende, a exemplo dos processos químicos, de um entendimento da relação entre a cinética de reação e os fenômenos de transporte associados à conversão de reagentes em produtos, tanto em micro como em macro escala. Assim, é importante perceber o papel que engenheiros químicos, juntamente com biólogos, devem desempenhar no desenvolvimento desses processos.

Esta aplicação de princípios de engenharia química aos processos biológicos é importante especialmente no caso de produtos de baixo valor agregado e grande volume de produção, nos quais o sucesso depende de pequenos ganhos que se pode obter no processo.

Os cultivos em estado sólido (CES) se caracterizam por utilizarem substratos insolúveis, em geral resíduos agro-industriais, e reduzida quantidade de água. Assemelham-se, assim, aos processos fermentativos que ocorrem na natureza. Apresentam algumas vantagens em relação aos cultivos submersos (CSm), que utilizam grande quantidade de água e substratos mais refinados.

Por outro lado, ainda é necessário ampliar muito o desenvolvimento tecnológico dos CES, especialmente quanto à engenharia do processo. Exatamente os aspectos de cinética de reação e fenômenos de transporte, tão importantes para a viabilidade da produção, estão muito pouco caracterizados para as condições de CES.

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, e a agro-indústria brasileira teve forte expansão nos últimos anos, destacando-se como grande exportadora e geradora de renda longe dos tradicionais centros metropolitanos, levando assim dinamismo econômico para as regiões do interior do território, outrora economicamente dormentes. Logo, nosso país também é um importante gerador de resíduos agro-industriais, que, em geral, ainda estão subaproveitados, por vezes configurando inclusive problemas ambientais.

Além disso, o Brasil é líder mundial na produção de produtos biotecnológicos de grande volume, devido ao álcool combustível. Há décadas o País tem-se destacado na busca de fontes alternativas de energia, produzidas a partir de fontes renováveis, sendo o álcool o principal exemplo, seguido pelos recentes investimentos na produção de biodiesel.

Analisando esses argumentos, fica claro o grande potencial apresentado por nosso país no ramo da biotecnologia industrial, em especial para os cultivos em estado sólido. Estes processos ainda estão muito pouco desenvolvidos, mas surgem como uma alternativa muito

promissora. Desta forma, o esforço de trabalhos como este se justifica pela necessidade de maior entendimento dos aspectos de engenharia envolvidos nestes cultivos.

Este trabalho teve por objetivo estudar um processo de cultivo em estado sólido que utiliza um resíduo agroindustrial como substrato para o desenvolvimento de uma bactéria do gênero *Bacillus*, isolada de ambiente amazônico, produtora de enzimas de interesse comercial.

Especificamente, objetivou-se:

- estudar a transferência de massa e a dinâmica de mistura em um biorreator cilíndrico horizontal agitado (BCHA), utilizando um substrato sólido pastoso, diferente daqueles já estudados na literatura, que são particulados.
- desenvolver metodologia para estimação da biomassa no processo a partir da sua taxa de produção de CO₂.
- monitorar o comportamento de diferentes parâmetros mensuráveis durante o cultivo, buscando o entendimento dos fenômenos físicos e químicos envolvidos no processo.
- iniciar o desenvolvimento de modelos matemáticos para descrever o processo, baseando-se nas variáveis monitoradas nos experimentos.

Esta dissertação foi dividida em 5 capítulos, um apêndice e um anexo, sendo que esta Introdução corresponde ao primeiro capítulo. O Capítulo 2 compõe-se de uma revisão bibliográfica sobre cultivos em estado sólido, quantificação de biomassa e modelagem matemática destes processos. O terceiro capítulo trata da metodologia adotada nos experimentos em laboratório e durante a fase de modelagem do sistema, enquanto o quarto traz os resultados obtidos e a discussão de seu significado. No Capítulo 5, são apresentadas as conclusões do trabalho e perspectivas para trabalhos futuros. Finalmente, no Apêndice A estão listados alguns problemas enfrentados na realização do trabalho, que prejudicaram os resultados finais; e no Anexo I há uma informação adicional sobre a metodologia do trabalho.

Capítulo 2

Fundamentos e Revisão Bibliográfica

2.1 Cultivo em Estado Sólido

Mitchell e Lonsane (1992) já apontavam a dificuldade de se definir precisamente o conceito de “cultivo em estado sólido”. Pandey (2003) definiu cultivo em estado sólido (CES) como o cultivo de microrganismos em substratos sólidos insolúveis na ausência (ou quase ausência) de água livre. Esta definição, ainda que um tanto vaga e incapaz de delimitar fronteiras claras entre cultivos sólidos e submersos (CSm), estabelece a diferença básica entre estes dois conceitos: a quantidade de água (Mitchell et al., 2000).

Exemplos clássicos de CES são as fermentações do pão e de alguns queijos. Já o conceito de CSm está representado nas fermentações alcoólicas para produção de bebidas ou álcool combustível.

Nos CES, uma matriz sólida adsorve a quantidade (limitada) de água que é fornecida para o processo, diferentemente dos CSm, em que os substratos e microrganismos se encontram dissolvidos ou suspensos em grande quantidade de água. Entretanto, também em CES, o substrato deve conter umidade suficiente para sustentar o crescimento e o

metabolismo microbiano (Pandey, 2003), mas a água encontra-se fundamentalmente adsorvida em uma matriz sólida.

O CES imita o crescimento de microrganismos na natureza em sólidos úmidos e é considerado responsável pelo início das técnicas fermentativas na Antigüidade (Mitchell e Lonsane, 1992).

Gervais e Molin (2003) lembram que, mesmo em CES, os microrganismos estão em meio líquido, já que as transferências de massa ocorrem em um filme líquido que circunda os microrganismos. Assim, em geral, três fases estão presentes nos CES (sólido, líquido e gás), em oposição aos sistemas bifásicos (gás + líquido) do CSm. Os autores apontam ainda que uma das principais diferenças entre CES e CSm é a possibilidade de agitação. Os cultivos líquidos costumam ser tratados como reações em meio homogêneo, perfeitamente misturado, enquanto a alta viscosidade do meio no CES reduz a possibilidade de agitação, já que as tensões de cisalhamento originadas poderiam danificar o microrganismo.

Múltiplos termos já foram utilizados na literatura em referência a cultivos em estado sólido, p.ex.: fermentação em meio sólido, fermentação em fase sólida, processo em estado sólido, fermentação de sólidos úmidos, fermentação semi-sólida, cultivo semi-sólido, cultura de superfície, fermentação “koji”, entre outros (Mitchell e Lonsane, 1992).

Pandey (1994) aponta que, embora os registros da utilização de CES venham desde a Antigüidade, na fabricação de pães, queijos e koji (alimento fermentado típico do Extremo Oriente), os processos em meio sólido foram completamente negligenciados no Ocidente a partir da década de 1940, em benefício dos processos submersos. O autor afirma ainda que não houve uma razão clara para esta opção, mas talvez tenha sido decorrência do sucesso da produção da penicilina em CSm. Conforme Mitchell e Lonsane (1992), não foi realizada nenhuma comparação entre os aspectos econômicos das duas técnicas ao se optar pelo desenvolvimento em CSm. Pandey (1994) complementa que, nas décadas seguintes, poucos

trabalhos foram realizados em CES, até que na década de 1980 ressurgiu o interesse por estes processos.

A Tabela 2.1 apresenta algumas diferenças importantes entre cultivos submersos e cultivos em estado sólido.

Tabela 2.1: Comparação entre CES e CSm

Cultivo em estado sólido	Cultivo submerso
Meio de cultivo não é fluido	Meio de cultivo é fluido
Profundidade do leito costuma ser limitante	Profundidade sempre é maior
Substrato sólido adsorve água, e nutrientes consumidos provêm destes sólidos úmidos	Nutrientes estão dissolvidos na água
A formação de gradientes de concentração e temperatura é comum nos processos	Agitação garante uniformidade do meio.
Quantidade de água é restrita, apenas suficiente para manter os níveis de crescimento.	A água é abundante, sem uma padronização.
Sistema envolve três fases: sólido, líquido e gás.	Sistema envolve apenas fases líquida e gasosa.
Fase líquida é descontínua	Fase líquida é contínua
Inóculo grande	Inóculos menores, a não ser que o processo demande.
Bactérias e leveduras crescem aderindo-se às partículas de substrato	Células ficam uniformemente distribuídas no líquido em culturas agitadas.
Exemplos: pão, queijos	Exemplos: bebidas alcoólicas

Fonte: Adaptado de Mitchell e Lonsane, 1992.

Vários processos de cultivo em estado sólido têm sido pesquisados e desenvolvidos. As aplicações são bastante diversificadas, indo das de baixa tecnologia, como o aumento de valor nutricional e produção de biomassa, e chegando até algumas de alta tecnologia como produção de enzimas, compostos orgânicos e antibióticos. Os tipos de resíduos agroindustriais utilizados também são extremamente diversificados. A Tabela 2.2 apresenta algumas aplicações desenvolvidas de CES.

Tabela 2.2: Algumas aplicações de CES.

Aplicação/Produto	Substrato	Microrganismo	Referência
Enriquecimento protéico	Palha de trigo	<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Endomycopsis fibuliger</i>	Laukevics et al. (1984)
Amiloglucosidase	Farelo de trigo e farinha de milho	<i>Aspergillus niger</i>	Ghildyal et al. (1985)
Celulase	Farelo de trigo	<i>Trichoderma reesei</i> e <i>Sporotrichum cellulophilum</i>	Kim et al. (1985)
Delignificação	Madeira de vidoeiro (bétula)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Mudgett e Paradis (1985)
α -amilase	Farelo de trigo	<i>Bacillus licheniformis</i>	Lonsane e Ramesh (1990)
Delignificação	Palha de trigo	<i>Trametes versicolor</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i>	Valmaseda et al. (1991)
Etanol	Meio líquido adsorvido em bagaço de cana	<i>Schwanniomyces castellii</i>	Saucedo-Castañeda et al. (1992a)
Protease	Farelo de trigo	<i>Aspergillus niger</i>	Padmanabhan et al. (1993)
β -galactosidade	Soro de leite desproteinado adsorvido em <i>grits</i> de milho ou farelo de trigo	<i>Kluyveromyces lactis</i>	Becerra e González Siso (1996)
Inulinase	Farelos de arroz e trigo, bagaço de côco e farinha de milho	<i>Staphylococcus sp.</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Selvakumar e Pandey (1999)
Ácido giberélico	Meio líquido adsorvido em amberlite	<i>Gibberela fujikuroi</i>	Gelmi et al. (2002)
Ácido cítrico	Bagaço de mandioca	<i>Aspergillus niger</i>	Prado et al. (2004)
Xilanase	Fibra de soja	<i>Bacillus coagulans</i>	Heck et al. (2005)

Robinson et al. (2001) afirmam que o CES tem potencial para, no futuro, substituir com vantagens o CSm na produção de metabólitos secundários.

Vários trabalhos apontam vantagens na utilização de CES em comparação a CSm (Mitchell e Lonsane, 1992; Lonsane, 1994; Raimbault, 1998), como:

-
- utilização de substratos mais baratos (que não precisam ser solúveis), em geral, resíduos agro-industriais;
 - como a atividade de água (A_w) é mais baixa que em CSm, há menor risco de contaminação, reduzindo a necessidade de condições assépticas (por vezes o substrato sequer é esterilizado), e também a necessidade de mão-de-obra especializada;
 - menor gasto energético;
 - menor uso de água, que leva a uma menor geração de efluentes líquidos, além de menor volume de equipamento e, conseqüentemente, menor capital inicial;
 - maior transferência de oxigênio, favorecendo processos aeróbios;
 - maior concentração final de produtos, reduzindo custos do processamento *downstream*;
 - alguns parâmetros não precisam ser controlados com o mesmo rigor que em CSm

Ramesh e Lonsane (1991) relatam que a produção de α -amilase por *Bacillus licheniformis* M27 em CES minimizou o efeito de inibição por substrato que era observado em CSm.

Apesar de a redução de custos ser muito citada por aqueles que defendem os CES, falta na literatura um número maior de comparações de ordem econômica entre CES e CSm (Mitchell e Lonsane, 1992; Raimbault, 1998), ficando como exemplo o trabalho de Ghildyal et al. (1985), sobre a produção de amiloglucosidase por *Aspergillus niger*. Estes autores concluíram que, para este caso, o processo em CES era economicamente vantajoso.

Entretanto, Mitchell e Lonsane (1992) e Pandey (2003) também apontam algumas desvantagens nos CES em comparação aos CSm:

- o cultivo em estado sólido é restrito a microrganismos que se adaptem às condições de baixa disponibilidade de água;

- a transferência de massa e energia é menos efetiva no meio sólido, o que pode gerar gradientes consideráveis de concentração e temperatura, que podem vir a limitar o crescimento;
- os tempos de cultivo costumam ser mais longos;
- extratos obtidos pela lixiviação (*leaching*) dos produtos do cultivo costumam ser bastante viscosos, o que pode dificultar algumas etapas *downstream*;
- muitos importantes aspectos científicos e de engenharia ainda estão pouco caracterizados em CES, sendo a maior parte do trabalho ainda qualitativa ou empírica, devido às dificuldades encontradas na quantificação de parâmetros importantes do cultivo, como biomassa;
- vários tipos de sensores (pH, concentração) utilizados em CSm são inadequados para CES;
- ainda não há informação suficiente sobre a cinética de reações em CES e a modelagem dos processos ainda precisa ser muito estudada;

Raimbault (1998) afirma que, devido à dificuldade em medir e controlar os parâmetros ambientais, como é feito em CSm, os microrganismos que têm sido selecionados para CES são mais tolerantes em relação às condições de cultivo.

2.1.1 Uso de bactérias em CES

Os trabalhos desenvolvidos em CES estão ligados principalmente à utilização de fungos filamentosos. Este fato deve-se principalmente à idéia de que as técnicas de CES não seriam aplicáveis ao cultivo de bactérias, devido ao maior requerimento de água por parte destas. Além disso, fungos são capazes de formar hifas que penetram nos poros dos substratos sólidos, enquanto bactérias, em geral, não têm esta habilidade (Lonsane e Ramesh, 1990).

Mitchell (1992a) afirma que os processos de CES envolvendo bactérias e leveduras são poucos em número, mas são de grande importância na natureza e na indústria de alimentos. Exemplos são a compostagem (bactérias termofílicas), a ensilagem (*Lactobacilli*),

a produção de alimentos orientais como o *natto* (*Bacillus subtilis*), a microflora secundária de queijos (*Lactobacillus* e *Propionibacterium*) e a produção de pão (levedura *Saccharomyces*).

O desenvolvimento de processos não-tradicionais com bactérias ainda é escasso, destacando-se processos para produção de α -amilase com bactérias do gênero *Bacillus* (Ramesh e Lonsane, 1991) e a produção de inulinase por *Staphylococcus* sp (Pandey et al., 2000).

2.1.2 O pH em CES

O pH do meio de cultura pode variar em resposta ao metabolismo microbiano. O caso mais óbvio é a excreção de ácidos orgânicos, como acético ou lático, que farão o pH cair. Por outro lado, o consumo destes mesmos ácidos presentes no meio pode causar o aumento do pH (Prior et al., 1992).

A utilização da fonte de nitrogênio também pode causar alteração no pH. Com sais de amônio (NH_4^+), o pH tende a cair durante o cultivo, já que o metabolismo deste cátion libera um íon hidrogênio. Por outro lado, quando a fonte de nitrogênio é nitrato (NO_3^-), íons hidrogênio do meio são consumidos para reduzir o nitrato a $\text{R}-\text{NH}_3^+$. O pH também aumenta quando aminas orgânicas são deaminadas (Prior et al., 1992).

Normalmente, o pH em CES é determinado pela medida tomada em suspensões ou extratos aquosos da amostra sólida (Raghavarao et al., 2003).

Conforme Prior et al. (1992), em alguns trabalhos, utiliza-se pH baixo como meio de impedir o desenvolvimento de contaminantes, especialmente em processos onde o substrato não é esterilizado.

Os mesmos autores afirmam ainda que o controle de pH pela adição de soluções concentradas de ácido ou base, como comumente se faz em CSm, é impraticável em CES. Porém é possível obter certo grau de controle de pH em CES utilizando diferentes proporções

de sais de amônio e uréia no substrato (Raimbault, 1998). O nitrato de amônio (NH_4NO_3), isoladamente, também tem sido utilizado para este fim. Os mesmos autores afirmam ainda que os maiores problemas em termos de controle de pH podem-se dar em biorreatores estáticos, onde é difícil evitar mudanças locais de pH.

Muitos trabalhos, entretanto, não apresentam nenhum tipo de preocupação com o controle do pH. Considera-se que o próprio substrato sólido possui propriedades tamponantes, o que eliminaria a necessidade do controle (Lonsane e Ramesh, 1990).

Prado et al. (2004), estudando a produção de ácido cítrico em CES, adicionaram uréia ao meio para controle do pH nas primeiras 24h, quando se formava a maior parte da biomassa. Após este período, o pH do meio começava a cair.

Considerando estes aspectos, pode-se afirmar que a dificuldade em controlar o pH em CES configura outra desvantagem em relação aos CSm, já que a falta deste controle pode impedir a obtenção de alguns produtos específicos, de alto valor agregado.

2.2 Quantificação de Biomassa em Cultivo em Estado Sólido

A biomassa é um parâmetro fundamental na caracterização do crescimento microbiano, logo, sua medida é essencial para estudos cinéticos de cultivos em estado sólido. Entretanto, a medida direta da biomassa em CES é bastante difícil, devido à dificuldade de separar o microrganismo do substrato, especialmente no caso de fungos filamentosos (Mitchell, 1992b), e pela natureza insolúvel do meio de cultivo, que impede o uso de técnicas tradicionais dos CSm, como peso-seco e turbidimetria (Madrid e Felice, 2005). A cinética e a modelagem matemática do crescimento fúngico em CES têm recebido pouca atenção devido à dificuldade em estimar a biomassa (Lekha e Lonsane, 1994).

Mitchell (1992b) 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.
- 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, 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 (substrato, microrganismo).

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

- Métodos diretos:
 - Separação direta da biomassa da matriz sólida;
- Métodos indiretos:
 - Medida de algum componente da biomassa; e

- Medidas de atividade metabólica.

2.2.1 Métodos diretos

Em geral, envolvem a separação da biomassa do substrato e, por isso, dificilmente podem ser utilizados para fungos filamentosos. No caso de culturas com bactérias e leveduras, a quantificação de biomassa pode ser mais fácil, já que a separação de microrganismo e substrato é mais simples (Lekha e Lonsane, 1994). Entretanto, os métodos diretos são todos destrutivos e não-aplicáveis on-line.

Saucedo-Castañeda et al. (1992a) produziram etanol com a levedura *Schwanniomyces castellii* em meio líquido absorvido num suporte inerte de bagaço de cana moído com granulometria de 0,3-0,8 mm. Para a quantificação de biomassa, o meio era sonificado com água esterilizada e filtrado em peneira de 50 μm , sendo o filtrado utilizado para contagem de células em hemocítmetro e para determinar peso seco. A granulometria controlada do suporte inerte permitia o uso desta técnica.

Sugama e Okazaki (1979) utilizaram técnica semelhante. Para quantificação de biomassa, o seu substrato, farinha de arroz, foi digerido com um preparado enzimático e então filtrado. Entretanto, resíduos não-digeríveis do substrato interferiam na estimacão, e este método não é apropriado para substratos com teores consideráveis de insolúveis.

Sato et al. (1983) homogeneizaram amostras de *Candida lipolytica* cultivadas em arroz. A suspensão foi filtrada para remover os sólidos e as células de levedura foram quantificadas por contagem em placas ou hemocítmetro.

Alguns estudos levaram ao desenvolvimento de meios de cultivo modelo, nos quais é possível recuperar totalmente a biomassa, mas cuja aplicabilidade se limita à pesquisa laboratorial, como na calibração de métodos indiretos. Mitchell et al. (1989) utilizaram cultivos em membranas, as quais retiam a biomassa, enquanto permitiam a passagem de nutrientes do substrato. Weber et al. (1999) desenvolveram um meio sólido à base de κ -

carragena, o qual pode ser solubilizado com água desmineralizada, permitindo a recuperação total da biomassa.

Estudos em escala laboratorial, utilizando placas de Petri, permitem estimar a biomassa fúngica pela extensão linear do micélio. Smits et al. (1996) utilizaram esta medida para validar métodos indiretos de estimação da biomassa em CES.

Para bactérias e leveduras, apesar do reduzido número de trabalhos que utilizam estes microrganismos em CES, diversos autores concordam que os métodos de contagem em placas são apropriados para quantificar biomassa (Mitchell, 1992b; Lekha e Lonsane, 1994; Raimbault, 1998). Madrid e Felice (2005) classificam a contagem em placas, juntamente com peso-seco, como métodos de referência para desenvolvimento de técnicas de estimação de biomassa. Pirt (1975) afirma que a contagem em placas é o método mais sensível para quantificar biomassa, e que deve-se utilizar meio rico nas placas ao invés de meio mínimo. Cita como desvantagem do método, entretanto, erros inevitáveis de amostragem.

Mitchell (1992b) frisa que as técnicas de contagem em placas também já foram testadas para fungos filamentosos, porém, os resultados são questionáveis, uma vez que não há uma relação direta entre a quantidade de biomassa e o número de fragmentos de micélio formados durante a homogeneização. Além disso, este processo levaria à morte de muitos fragmentos de micélio. Por fim, esporos fúngicos contariam como células vivas, apesar de estarem inativas no momento da amostragem.

2.2.2 Métodos indiretos - Medida de componentes da biomassa

No caso do cultivo de fungos, que representa a grande maioria dos trabalhos em CES, a biomassa não pode ser estimada de forma confiável pelos métodos diretos, e por isso foram desenvolvidas metodologias que quantificam um determinado componente do microrganismo e relacionam à quantidade total de biomassa. Tomaselli Scotti et al. (2001)

apontam que as metodologias que se baseiam na medida de um componente da biomassa devem satisfazer algumas condições, conforme mostrado na Figura 2.1.

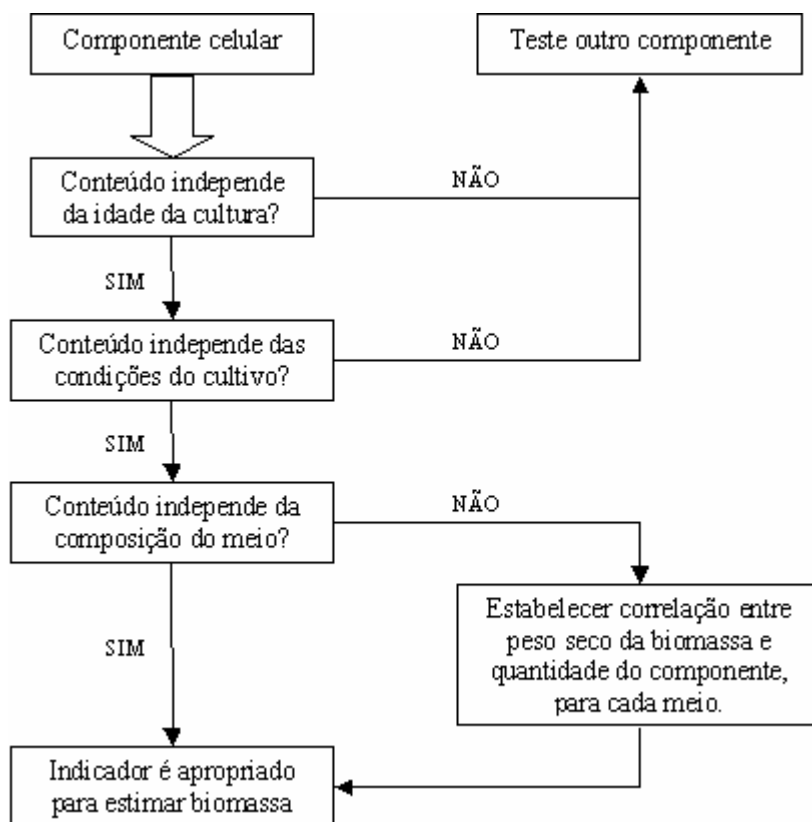


Figura 2.1: Árvore decisória para validação de método indireto baseado em componente da biomassa. Fonte: Adaptado de Tomaselli Scotti et al. (2001).

2.2.2.1 Nitrogênio e Proteína

São os componentes da biomassa de medição mais imediata. Diferentes métodos já foram testados: Kjeldahl, Lowry e Biureto. Não é considerado um método muito apropriado, já que a proteína presente no substrato interfere na medida, e diferentes trabalhos mostram que o conteúdo protéico da biomassa não é constante (Mitchell, 1992b). Só é recomendado para substratos com baixo teor de proteína. Como exemplo, há o trabalho de Carrizales et al. (1981), que utilizaram farinha de mandioca, de baixo conteúdo protéico, suplementada com sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio, o que permitia separar nitrogênio orgânico de inorgânico durante a análise.

2.2.2.2 Ácidos nucléicos

Bajracharya e Mudgett (1980) utilizaram a medida de DNA para estimar biomassa de *Aspergillus oryzae* em arroz. O conteúdo inicial de DNA do substrato foi descontado das medidas, já que pôde ser provado que o fungo não produzia DNA-ases extracelulares. Porém, em cultivos submersos, percebeu-se que o conteúdo de DNA da biomassa do fungo caía na fase estacionária. Assim, para o CES, os autores utilizaram a quantidade média para converter a medida de DNA em biomassa.

Métodos baseados na determinação de DNA ou RNA, além de serem caros, só são viáveis se o substrato não contiver quantidades significativas destes componentes, nem interferentes (Lekha e Lonsane, 1994). Exemplos de substrato seriam alguns materiais celulósicos. Ainda assim, não há trabalhos recentes utilizando esta técnica.

Conforme Priest (1977) bactérias do gênero *Bacillus* são produtoras de várias enzimas hidrolíticas extracelulares, incluindo nucleases, enquanto o RIFS, por ser um resíduo de componentes vegetais, certamente possui ácidos nucléicos. Estes fatos já impedem a utilização dessa técnica neste trabalho.

2.2.2.3 Glicosamina

A N-acetilglicosamina (NAG) é o monômero da quitina (poli-N-acetilglicosamina), componente da parede celular de fungos. A medida envolve a hidrólise química da quitina e quantificação da glicosamina liberada (Lekha e Lonsane, 1994).

Pode ocorrer interferência na medida no caso do cultivo em resíduos agrícolas complexos, que podem conter glicosamina em glicoproteínas. Nestes substratos, entretanto, a quantidade de glicosamina presente deve permanecer constante (Mitchell, 1992b).

A precisão do método depende de se estabelecer um fator de conversão confiável entre o conteúdo de glicosamina e o peso seco da biomassa. A principal desvantagem do método é exatamente que este fator de conversão varia de acordo com o meio e as condições

de cultivo, e fatores obtidos de cultivos submersos podem não ser apropriados para o cultivo em meio sólido. Além disso, o procedimento analítico é longo e tedioso, podendo levar até 24 horas (Lekha e Lonsane, 1994).

Ooijkaas et al. (1998) verificaram aumento no conteúdo de glicosamina em *Coniothyrium minutans*, cultivado em placas de Petri, ao longo do tempo de cultivo.

Ainda assim, é o método mais comumente utilizado para estimar biomassa fúngica em CES.

Recentemente, alguns trabalhos de modelagem em CES têm utilizado o conteúdo de glicosamina diretamente como parâmetro de biomassa, sem fazer uso de fatores de conversão (Smits et al., 1996; Smits et al., 1998).

Na literatura não é citado nenhum componente celular de bactérias que possa ser utilizado como parâmetro de biomassa em CES com a mesma eficiência que a glicosamina de fungos.

2.2.2.4 Ergosterol

Ergosterol é o esterol predominante na membrana celular de fungos. Compostos da membrana celular são interessantes para realizar estimativa de biomassa, já que costumam ser rapidamente degradados após a morte celular e porque se assume que a área da membrana é bem correlacionada ao volume celular. Além disso, o conteúdo de esteróis parece manter-se aproximadamente constante na biomassa fúngica. Assim, o ergosterol é bastante utilizado para determinar biomassa fúngica no solo, em grãos de cereais e em material em decomposição (Olsson et al., 2003), bem como em CES (Lekha e Lonsane, 1994).

Matcham et al. (1985) compararam diferentes técnicas de estimativa de biomassa para *Agaricus bisporus* e afirmaram que a análise de ergosterol é mais simples e rápida do que a de glicosamina, já que aquele pode ser separado por cromatografia líquida (HPLC) e

quantificado facilmente por espectrofotometria em UV. Além disso, afirmam ainda que o método do ergosterol foi mais sensível para níveis baixos de crescimento do micélio.

Entretanto, outros trabalhos indicam que o conteúdo específico de ergosterol pode variar muito com idade da cultura, composição do meio e condições de cultivo, tornando a técnica inadequada (Mitchell, 1992b).

2.2.3 Métodos indiretos – Medidas de atividade metabólica

2.2.3.1 Respirimetria

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 são, portanto, associadas ao crescimento e podem ser utilizadas para a estimativa da biomassa (Mitchell, 1992b; Raimbault, 1998).

A determinação do consumo de O_2 (OUR – oxygen uptake rate) e da produção de CO_2 (CPR – carbon dioxide production rate) envolve a medida da concentração destes gases no ar de entrada e de saída do biorreator. Conhecendo-se a vazão de ar que entra e que sai, além da quantidade de meio de cultivo contida no biorreator, obtêm-se os valores de OUR e CPR.

Tem a grande vantagem de ser uma técnica *on-line* e não-destrutiva (Raimbault, 1998), mas para ser utilizada na estimativa de biomassa, precisa ser calibrada por algum outro método de referência.

Conforme Mitchell (1992b), as medidas do consumo de O_2 ou da produção de CO_2 são mais poderosas quando acopladas 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.

Já que CO_2 e O_2 são produto gerado e substrato consumido pelo metabolismo celular, a correlação entre CPR ou OUR e biomassa costuma ser descrita por variantes do modelo de Luedeking-Piret (Luedeking e Piret, 1959), considerando um termo associado ao crescimento e outro termo de manutenção, não associado ao crescimento (Sugama e Okazaki, 1979; Sato et al., 1983; Mitchell, 1992b), conforme as Equações 2.1 e 2.2:

$$CPR = \frac{1}{Y_{X/\text{CO}_2}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{\text{CO}_2} \cdot X \quad (2.1)$$

$$OUR = \frac{1}{Y_{X/\text{O}_2}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{\text{O}_2} \cdot X \quad (2.2)$$

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

Trabalhando em CSm, Petkov e Davis (1996) desenvolveram uma taxa de consumo de oxigênio modificada (OUR_x), que levava em conta dois diferentes estados da biomassa de *Corynebacterium glutamicum*: crescimento puro (RQ = 1,05) e fase de produção de L-lisina (RQ = 2,0). A Equação 2.2 foi reescrita utilizando esta taxa modificada (Equação 2.3).

$$\text{OUR}_x = \left(\frac{2,0 - \text{RQ}}{2,0 - 1,05} \right) \cdot \text{OUR} \quad (2.3)$$

$$\text{OUR}_x = \frac{1}{Y_{X/\text{O}_2}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{\text{O}_2} \cdot X \quad (2.4)$$

Conforme Lekha e Lonsane (1994), o CPR sozinho falha em reconhecer o início da fase estacionária no desenvolvimento de fungos, sendo a precisão da técnica maior nos

estágios iniciais do crescimento. De fato, o erro na estimativa tende a aumentar ao longo do processo (Figura 2.2) pela natureza cumulativa deste erro; visto que, utilizando os modelos apresentados, a estimativa da biomassa em qualquer instante de tempo dependerá sempre das estimativas feitas nos instantes de tempo anteriores.

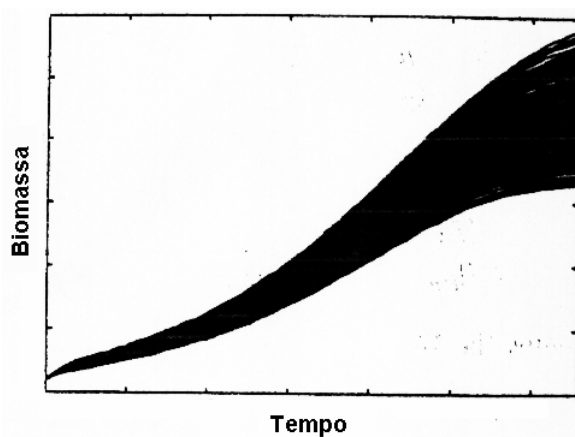


Figura 2.2: Exemplo do aumento do erro de estimativa da biomassa. A região hachurada representa o intervalo de confiança da estimativa, que aumenta ao longo do tempo. Fonte: Adaptado de Biagiola et al. (2001).

De qualquer forma, o monitoramento do consumo de O_2 e da produção de CO_2 produz uma ótima medida da atividade metabólica do microrganismo, sendo muito interessante como ferramenta inclusive 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.

A concentração de oxigênio pode ser medida através de medidores específicos, paramagnéticos ou polarográficos. Em experimentos de escala laboratorial, Ramstack et al. (1979) e Ooijkaas et al. (1998) utilizaram cromatógrafo a gás conectado *on-line* ao processo, equipado com coluna tipo peneira molecular 5Å e detector de condutividade térmica (TCD). É possível também utilizar o método manométrico, como Kim et al. (1985), onde a amostra é colocada em uma câmara que contém ainda uma solução alcalina. O metabolismo microbiano

irá consumir O₂ e liberar CO₂. Este último será absorvido pela solução alcalina, gerando uma queda de pressão na câmara, que pode ser relacionada então à OUR.

O método mais indicado para medir a concentração de CO₂ é um medidor por infravermelho, por sua resposta rápida (Saucedo-Castañeda et al., 1992b). A análise por cromatografia a gás também é viável em escala laboratorial (Ramstack et al., 1979; Saucedo-Castañeda et al., 1992a; Ooijkaas et al., 1998). Sugama e Okazaki (1979) e Carrizales et al. (1981) borbulharam o ar de saída do biorreator em soluções alcalinas, as quais absorviam o CO₂ e eram posteriormente tituladas para se obter a quantidade de gás carbônico liberada pelo sistema.

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

2.2.3.2 Massa seca do leito

Terebiznik e Pilosof (1999) relacionaram biomassa à perda de massa seca do leito. Esta relação é esperada, uma vez que, conforme Smits et al. (1996 e 1998), a perda de massa seca do leito é diretamente proporcional à produção de CO₂. Entretanto, esta técnica tem pouca aplicabilidade para sistemas maiores que a escala laboratorial.

2.2.3.3 Produção de enzimas extracelulares

Vários autores apontam relações lineares entre a produção de determinadas enzimas extracelulares, em geral hidrolases, e o crescimento microbiano (Mitchell, 1992b). Entretanto, poucos trabalhos utilizam a atividade enzimática diretamente para estimar biomassa.

Matcham et al. (1985) apontam que a produção da enzima laccase por *Agaricus bisporus* em CES foi proporcional à extensão do micélio ao longo de 30 dias de cultivo. Smits et al. (1996) concluíram que as atividades de protease e xilanase de uma linhagem de *Trichoderma reesei* em farelo de trigo estavam associadas ao crescimento da biomassa ao longo das 125 horas de cultivo.

2.2.3.4 Medidas de fluorescência

Fluorescência é o resultado de um processo em três estágios que ocorre em certas moléculas (em geral, hidrocarbonetos poliaromáticos ou heterocíclicos) chamadas de corantes fluorescentes. O processo responsável pela fluorescência está relacionado aos níveis de energia das moléculas e ao “salto” de um elétron de um estado de alta energia para um de energia mais baixa, emitindo simultaneamente um fóton (Madrid e Felice, 2005).

A absorção de radiação UV por uma molécula excita um elétron a um estado de energia mais elevado. A molécula tende a rapidamente perder este excesso de energia, por exemplo por colisões com moléculas vizinhas. A fluorescência ocorre quando a molécula retorna ao estado fundamental pela liberação de um fóton.

Conforme Madrid e Felice (2005), fluorescência é a técnica *on-line* de determinação de biomassa mais utilizada. Pode ser utilizada *in-situ* nos cultivos submersos.

Hisiger e Jolicoeur (2005) utilizaram sensores de fluorescência para quantificar NAD(P)H, triptofano e riboflavinas em cultivo submerso. As concentrações destas substâncias puderam ser correlacionadas à concentração de biomassa.

Outra forma de utilizar a fluorescência envolve a marcação do meio com algum corante fluorescente adicionado ao meio de cultura. Soderstrom (1977) utilizou diacetato de fluorosceína (FDA). Esta substância não é fluorescente até ser enzimaticamente hidrolisada por esterases. Esta técnica é, portanto, uma medida de atividade enzimática, e apenas regiões ativas do micélio irão fluorescer. Várias culturas fúngicas foram testadas isoladamente, e uma boa correlação pôde ser obtida entre a fluorescência, crescimento e respiração.

2.2.3.5 ATP

Assumindo que células vivas de determinado microrganismo possuam quantidade aproximadamente constante de ATP, o qual é rapidamente perdido quando da morte celular,

esta medição pode ser um bom parâmetro para estimar biomassa. Uma forma rápida de quantificar ATP é por bioluminescência (Madrid e Felice, 2005).

Entretanto, Mitchell (1992b) afirma que a medida de ATP no CES pode fornecer apenas uma estimativa grosseira da biomassa, já que algumas regiões da biomassa podem estar mais ativas que outras.

2.2.3.6 Ácidos orgânicos

Raimbault (1998) afirma que, frequentemente, a produção de ácidos orgânicos está associada ao crescimento. A medida pode ser efetuada pelo monitoramento do pH, por titulação ou análise em HPLC de extratos aquosos.

Porém, não há trabalhos que utilizem esta medida diretamente como parâmetro para estimar a biomassa.

2.2.4 Outras técnicas

Peñaloza et al. (1991) estimaram o crescimento micelial baseando-se na diferença de condutividade elétrica entre substrato e biomassa, obtendo boa correlação e propondo um modelo.

Auria et al. (1993) estudaram a relação entre a queda de pressão do ar soprado em um biorreator de leito fixo e o crescimento de um fungo filamentoso. O aumento do micélio reduz porosidade do leito, aumentando a perda de carga do ar. Foi possível criar uma relação entre o crescimento microbiano e a queda de pressão, que é um parâmetro facilmente mensurável *on-line*. Um ponto interessante da técnica é o fato de ser sensível ao início da formação dos conídios. Sua aplicabilidade, porém, é bastante restrita.

Dubey et al. (1998) desenvolveram um método ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), que quantifica a reatividade de um anti-corpo contra o micélio de *Aspergillus niger*. O método foi avaliado como rápido, específico e bastante sensível.

Bellon-Maurel et al. (2003), em seu artigo de revisão, apontam várias técnicas que poderiam servir à estimação de biomassa em CES, algumas já testadas, outras apenas idealizadas, como:

- SEM (Microscopia Eletrônica de Varredura), que permitiria acompanhar visualmente crescimento do microrganismo.
- FT-IR (Infra-Vermelho) e FT-IR PAS (Foto-Acústico) podem ser utilizados para quantificar determinados compostos presentes no meio, como um componente da biomassa que possa ser relacionado ao crescimento. Conforme Lekha e Lonsane (1994), a ligação amida das proteínas produz uma absorção característica no espectro infra-vermelho. São utilizados *on-line* em CSm, mas em CES ainda demandam amostragem do meio.
- a visão artificial, com o uso de um analisador de imagens, permitiria acompanhar crescimento dos microrganismos, e poderia ainda ser acoplada à utilização de marcadores fluorescentes.
- sensores de aroma, como narizes artificiais (*e-noses*) ou cromatógrafos a gás, para quantificar produtos voláteis associados ao crescimento.
- sensores capazes de realizar tomografia, ou seja, o mapeamento 3-D do cultivo, utilizando ressonância magnética, por exemplo.

2.3 Modelagem Matemática de Biorreatores para Cultivo em Estado Sólido

Mitchell et al. (2000a) revisaram os fenômenos que devem ser levados em conta no desenvolvimento de modelos para processos de cultivo em estado sólido, dividindo-os em de micro e macroescala.

a) Fenômenos em microescala:

- Crescimento microbiano e taxa de morte em resposta às condições ambientais.

- A forma de crescimento microbiana, especialmente se o crescimento ocorrer na forma de um micélio ou de um biofilme de organismos unicelulares.
- O efeito do crescimento microbiano sobre o ambiente, pela liberação de enzimas e produtos, e pelo consumo de nutrientes.
- Difusão intra-partículas de compostos como O_2 , CO_2 , prótons (pH), enzimas, nutrientes solúveis, produtos de hidrólise e do metabolismo.
- Transferência entre as regiões interparticulares e a partícula de substrato ou biomassa de compostos como O_2 , CO_2 , água, e produtos voláteis do metabolismo.
- Destruição da partícula devido ao crescimento, se a fonte de carbono contribui à estrutura física da partícula sólida.

b) Fenômenos em macroescala:

- Fluxo de ar para dentro e para fora do biorreator, levando energia e compostos como O_2 , CO_2 , e água.
- Se o bioreactor é operado com aeração forçada ou agitação, fluxo de ar no espaço interpartículas, levando energia e compostos como O_2 , CO_2 e H_2O .
- Convecção natural, difusão, e condução, que são normalmente sem importância na direção de corrente de ar, mas podem ser importante na direção normal à corrente de ar ou na ausência de aeração forçada.
- Condução pela parede do biorreator e resfriamento convectivo para a vizinhança, que pode ser ar ou uma camisa de água.
- Efeitos de cisalhamento causados pela agitação dentro do biorreator, inclusive dano para o microrganismo em si, ou para a integridade das partículas de substrato.

Os modelos apresentados na literatura utilizam várias simplificações destes fenômenos, até porque muitos são de difícil quantificação. Os trabalhos na área têm se preocupado principalmente com o balanço energético. Muitos ignoram os balanços de massa,

seja de substrato, seja de água, no leito. As cinéticas de crescimento e a estequiometria dos processos também têm recebido atenção limitada.

Vários tipos de biorreatores têm sido utilizados em CES. Conforme sua construção e operação (agitação, aeração, etc.), os modelos utilizados para descrevê-los mudam bastante. A Figura 2.3 apresenta uma classificação simples de biorreatores para CES de acordo com as características de agitação do leito (infrequente ou ausente, ou contínua) e aeração (forçada ou não-forçada).

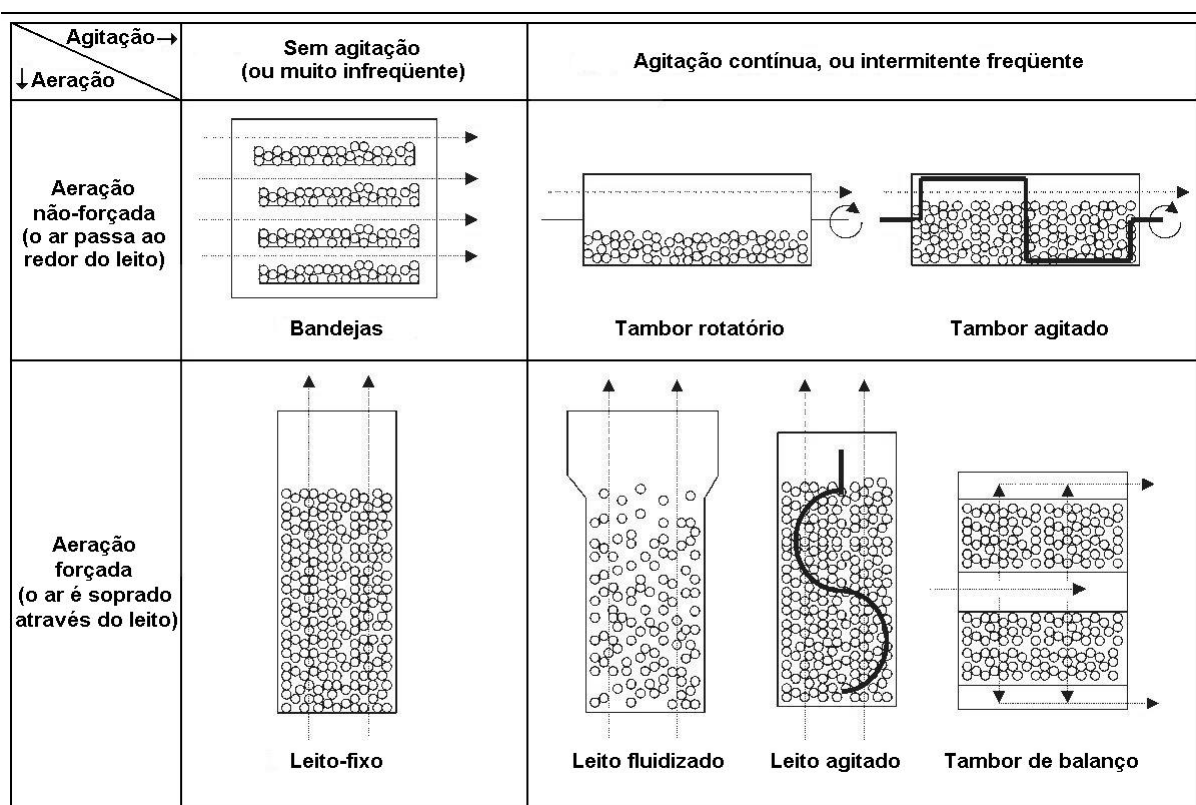


Figura 2.3: Classificação dos biorreatores de CES em função das características de agitação e aeração. As setas retas indicam o sentido da aeração. Fonte: Adaptado de Mitchell et al. (2000a).

2.3.1 Biorreatores de leito fixo

Os biorreatores de leito fixo representam um dos tipos mais simples de biorreatores para CES. A natureza estática do leito o torna próprio para o desenvolvimento de organismos sensíveis às tensões de cisalhamento decorrentes da agitação, como os fungos. Sua aplicabilidade em escala industrial, porém, ainda é difícil, mas boas alternativas, como o

biorreator Zymotis, têm surgido (Mitchell et al., 2000a). As dificuldades para *scale-up* surgem da própria natureza estática do leito, reduzidas transferências de massa e energia, e da compactação do substrato em leitos de grandes dimensões.

A Figura 2.4 apresenta um esquema dos fenômenos de transferência de massa e energia comuns em biorreatores de leito fixo. A ocorrência de gradientes de temperatura no leito é praticamente inevitável, e o grande desafio de engenharia é minimizar estes gradientes.

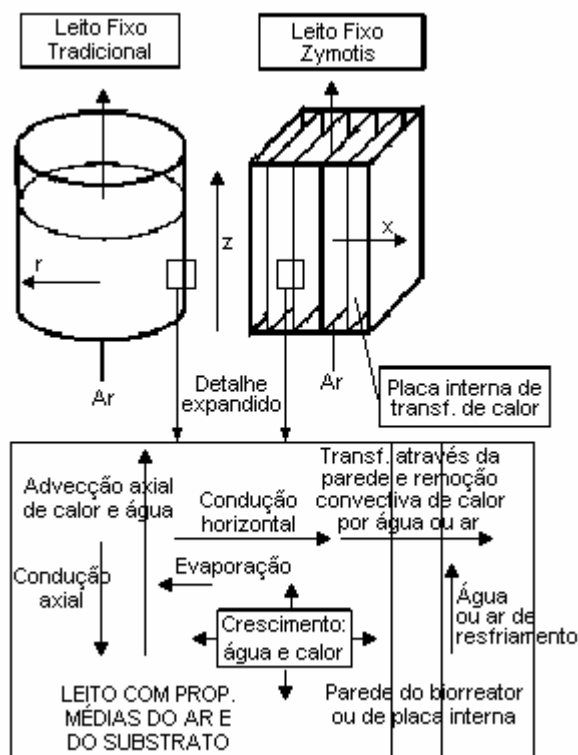


Figura 2.4: Descrição dos fenômenos de transferência de energia em biorreatores de leito fixo tradicional e Zymotis.

Fonte: Mitchell et al. (2003).

No caso de leitos cilíndricos, costuma-se ignorar a condução axial, já que os gradientes de temperatura mais pronunciados estão na direção radial, e a transferência axial se dá principalmente pela advecção do ar. No biorreator Zymotis, onde placas resfriadoras verticais estão colocadas paralelamente a pequena distância, para manter uma maior homogeneidade de temperatura no leito, a condução na direção vertical é desprezível frente à horizontal.

O balanço energético macroscópico em coordenadas cilíndricas, segundo Sangsurasak e Mitchell (1998), é dado por:

$$\mathbf{r}_b \cdot C p_b \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right) + \mathbf{r}_a \cdot (C p_a + f \cdot \mathbf{I}_w) \cdot V_z \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial z} \right) = \left[\frac{1}{r} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \left(r \cdot k_b \cdot \frac{\partial T}{\partial r} \right) \right] + k_b \cdot \left(\frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \right) + r_Q \quad (2.5)$$

Os termos da Equação 2.5 correspondem à variação de entalpia no leito, remoção de calor pelo ar e por evaporação de água, condução nas direções radial e axial e geração de calor metabólico.

Conforme Mitchell et al. (2003), caso o leito seja largo o suficiente, a condução radial pode ser insignificante para a remoção de calor, e o termo entre colchetes na Equação 2.5 pode ser eliminado.

Considera-se que o ar mantém-se saturado em vapor ao longo do leito, e o termo $f \mathbf{I}_w$, presente nos balanços de massa e energia, surge desta consideração, já que a evaporação de água aumenta o calor específico aparente do ar. Esta relação deveria ser descrita pela equação de Antoine, mas a aproximação linear é aceitável em uma faixa de variação de temperatura de aproximadamente 20°C, como nos cultivos (Mitchell et al., 2003).

O balanço está sujeito às seguintes condições de contorno:

Na base do leito (entrada de ar):

$$z = 0 \rightarrow T = T_a \quad (2.6)$$

No topo do leito (saída do ar):

$$z = H_b \rightarrow \frac{\partial T}{\partial z} = 0 \quad (2.7)$$

No centro do biorreator:

$$r = 0 \rightarrow \frac{\partial T}{\partial r} = 0 \quad (2.8)$$

Na parede do biorreator:

$$r = R_b \rightarrow \frac{\partial T}{\partial r} = \frac{Bi}{R_b} \cdot (T_w - T) \quad (2.9)$$

Sendo:

$$Bi = \frac{h \cdot R_b}{k_b} \quad (2.10)$$

As propriedades devem ser calculadas como médias ponderadas dos valores no ar e no sólido:

$$\mathbf{r}_b = \mathbf{e} \cdot \mathbf{r}_a + (1 - \mathbf{e}) \cdot \mathbf{r}_s \quad (2.11)$$

$$k_b = \mathbf{e} \cdot k_a + (1 - \mathbf{e}) \cdot k_s \quad (2.12)$$

$$Cp_b = \frac{(\mathbf{e} \cdot \mathbf{r}_a \cdot (Cp_a + f \cdot \mathbf{I}_w) + (1 - \mathbf{e}) \cdot \mathbf{r}_s \cdot Cp_s)}{\mathbf{r}_b} \quad (2.13)$$

Para o biorreator de leito-fixo do tipo Zymotis, entretanto, este balanço deve ser feito em coordenadas retangulares, conforme Mitchell e Meien (2000). A condução axial é desprezada, já que as placas resfriadoras removem a maior parte do calor gerado.

$$\mathbf{r}_b \cdot Cp_b \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial t} \right) + \mathbf{r}_a \cdot (Cp_a + f \cdot \mathbf{I}_w) \cdot V_z \cdot \left(\frac{\partial T}{\partial z} \right) = k_b \cdot \left(\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \right) + r_Q \quad (2.14)$$

Este balanço está sujeito às seguintes condições de contorno:

Na base do leito (entrada de ar):

$$z = 0 \rightarrow T = T_a \quad (2.15)$$

No centro do espaço entre placas:

$$x = 0 \rightarrow \frac{\partial T}{\partial x} = 0 \quad (2.16)$$

Na superfície das placas:

$$x = L \rightarrow k_b \cdot \frac{\partial T}{\partial x} = -h \cdot (T - T_w) \quad (2.17)$$

Os biorreatores de leito fixo, se ainda encontram dificuldade de aplicação na escala industrial, são extremamente úteis em escala laboratorial, nas fases iniciais de desenvolvimento de processos, podendo fornecer valiosas informações sobre cinética de crescimento e metabolismo do microrganismo.

2.3.2 Biorreatores de bandejas

Biorreatores de bandejas consistem em uma câmara, que pode ser pequena como uma incubadora ou grande como uma sala, na qual são colocadas bandejas de substrato inoculado. O ambiente é controlado através da temperatura e da umidade do ar que é soprado para dentro da câmara. Constituem, portanto, sistemas não-agitados com aeração não-forçada. Bastante simples, são empregados há séculos no Oriente na fabricação de alimentos tradicionais (shoyu, miso). A dificuldade em automatizar o trabalho com as bandejas, entretanto, cria uma demanda por grande quantidade de mão-de-obra (Mitchell et al., 2000a).

Conforme Mitchell et al. (2003), os primeiros modelos de biorreatores de bandejas assumiam estado pseudo-estacionário para escrever os balanços de oxigênio ou energia no leito. Os modelos mais recentes, de Rajagopalan e Modak (1994) e Smits et al. (1999) consideram os balanços de massa e energia, sem assumir o estado pseudo-estacionário.

O modelo de Rajagopalan e Modak (1994) considera uma bandeja com aeração não forçada. O fluxo de ar passa no topo da bandeja, na direção x^+ (Figura 2.5), e o oxigênio difunde para dentro do leito poroso. Admite-se a existência de um biofilme de biomassa cobrindo as partículas no leito, e o consumo de O_2 no biofilme foi equacionado através de uma aproximação do estado pseudo-estacionário. A taxa de crescimento seguiu uma equação logística, considerando ainda o oxigênio como único limitante, segundo cinética de Monod.

As equações para representar este modelo são:

$$\frac{\partial C_{O_2}^x}{\partial t} = -V_X \cdot \frac{\partial C_{O_2}^x}{\partial x} - \frac{D_{O_2}^b}{z_h} \cdot \frac{\partial C_{O_2}}{\partial z} \Bigg|_{z=H_b} \quad (2.18)$$

$$\frac{\partial C_{O_2} \cdot e}{\partial t} = D_{O_2}^b \cdot \frac{\partial^2 C_{O_2}}{\partial z^2} - K_a \cdot a_x \cdot (C_{O_2} - H_{O_2} \cdot C_{O_2}^f) \quad (2.19)$$

$$K_a \cdot a_x \cdot (C_{O_2} - H_{O_2} \cdot C_{O_2}^f) = r_s \cdot Y_{O_2/X} \cdot r_X \quad (2.20)$$

$$r_X = m_{\max} \cdot \frac{C_{O_2}^f}{(K_{O_2} + C_{O_2}^f)} \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \quad (2.21)$$

$$\frac{\partial X}{\partial t} = r_x \quad (2.22)$$

Na Equação 2.19, a transferência de oxigênio para dentro do leito se dá por difusão, apenas, enquanto a concentração do gás na superfície do biofilme está em equilíbrio com a concentração nos poros seguindo a lei de Henry.

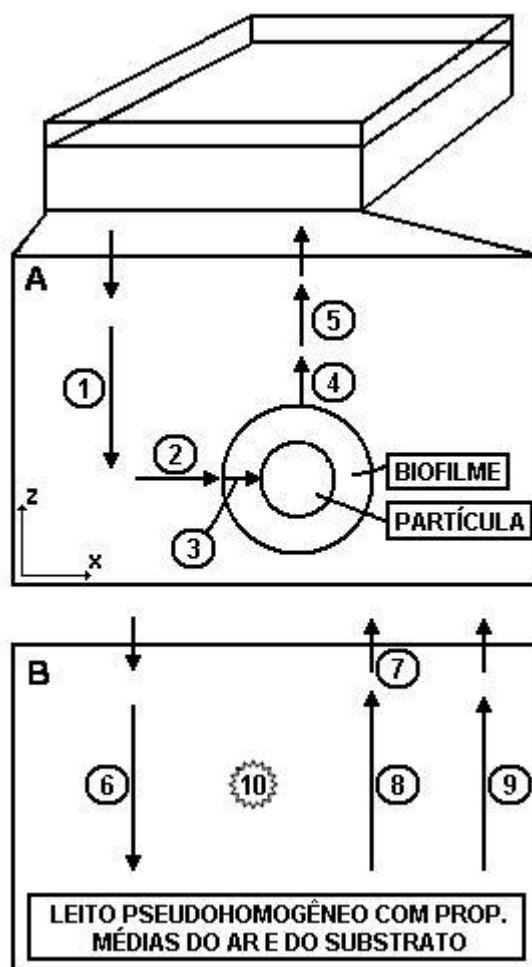


Figura 2.5: Comparação entre modelos para biorreatores de bandejas.

A – Rajagopalan e Modak (1994); B – Smits et al. (1999).

- 1) Difusão de O_2 , 2) transferência de O_2 entre o meio e o biofilme, 3) difusão e consumo de O_2 no biofilme,
- 4) liberação de calor metabólico, 5) condução de calor, 6) difusão de O_2 , 7) evaporação, 8) difusão de água,
- 9) condução de calor, 10) consumo de O_2 e produção de água e calor na reação de crescimento.

Fonte: Mitchell et al. (2003).

Conforme Mitchell et al. (2000b), assumir a existência de um biofilme na superfície das partículas é mais apropriado para microrganismos unicelulares (bactérias e leveduras) do que para fungos.

Note-se que a porosidade do leito pode ser descrita como variável no tempo. No trabalho em questão, um balanço semelhante foi desenvolvido para o CO₂.

A taxa específica de crescimento máxima foi considerada dependente da temperatura e descrita por uma equação polinomial de quinta ordem.

Nenhum balanço de água foi escrito e o balanço de energia envolvia apenas condução e geração metabólica de calor, conforme Equação 2.23.

$$r_s \cdot Cp_s \cdot \frac{\partial T}{\partial t} = k_b \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + r_Q \quad (2.23)$$

As condições de contorno para o problema são:

$$\text{Na superfície do leito: } C_{O_2} = C_{O_2}^x \quad (2.24)$$

$$-k_b \cdot \frac{\partial T}{\partial z} = h \cdot (T_a - T) \quad (2.25)$$

Já o modelo de Smits et al. (1999) não utiliza o conceito de biofilme (Figura 2.5) e faz uma descrição mais simples do balanço de O₂ no leito (Equação 2.26), novamente havendo apenas difusão para dentro do leito, com consumo pelo microrganismo. Apresenta, entretanto, um avanço no sentido de levar em conta as possíveis mudanças na umidade, incluindo um balanço de água (Equação 2.27), composto de geração metabólica de água, variação na concentração de vapor no ar dos poros devido à variação de temperatura (considera-se que o ar se mantém saturado) e difusão de vapor d'água nos poros. Por fim, condução, geração metabólica de calor e evaporação de água entram no balanço entálpico (Equação 2.28).

$$\frac{\partial C_{O_2}^b}{\partial t} = D_{O_2}^b \cdot \frac{\partial^2 C_{O_2}^b}{\partial z^2} - r_{O_2} \quad (2.26)$$

$$\frac{\partial C_w}{\partial t} = r_{H_2O} - \left[\frac{\partial C_{VAP}}{\partial t} - D_{VAP}^* \cdot \frac{\partial^2 C_{VAP}}{\partial z^2} \right] \quad (2.27)$$

$$\frac{\partial H}{\partial t} = k_b \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + r_Q + I_w \cdot D_{VAP}^* \cdot \frac{\partial^2 C_{VAP}}{\partial z^2} \quad (2.28)$$

O balanço de água, entretanto, é de necessidade duvidosa, uma vez que as simulações mostraram que a difusão de água pode ser pouco significativa (Smits et al., 1999).

2.4 Biorreatores de leito fluidizado

Neste biorreator, as partículas de substrato são fluidizadas por ar (ou outro gás) soprado verticalmente a uma velocidade suficientemente alta. É importante notar que este *design* não é aplicável a todos os tipos de substrato, uma vez que a aplicabilidade depende das características de fluidização das partículas (Mitchell et al., 2000a).

Este modelo consiste basicamente de uma câmara vertical, a qual é alargada na parte superior para impedir que as partículas sejam carregadas para fora do biorreator. Na parte inferior costuma haver um misturador, que quebra eventuais agregados de partículas que se formam. Um esquema deste tipo de biorreator pode ser visualizado na Figura 2.6.

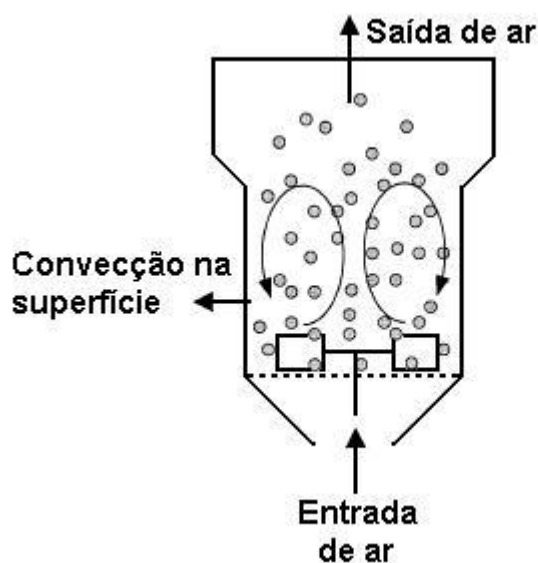


Figura 2.6: Esquema de biorreator de leito fluidizado.
Fonte: Mitchell et al. (2000b).

Segundo Mitchell et al. (2000a), já foram construídos biorreatores de leito fluidizado para CES relativamente grandes, utilizados industrialmente. Entretanto, há poucos trabalhos na literatura aberta que utilizam este tipo de equipamento.

A modelagem é bastante simplificada, já que o alto fluxo de ar sobre partículas pequenas torna a transferência de calor intensa no leito, enquanto que eventuais perdas de umidade podem ser repostas por aspersão. A preocupação maior nos modelos são os fenômenos intra-partícula. A Figura 2.7 apresenta de forma simplificada os efeitos comumente considerados no desenvolvimento de modelos para biorreatores de leito fluidizado.

A praticidade no estudo deste tipo de biorreator, pela possibilidade de utilizar modelos mais simplificados, é contrabalançada por um aumento nos custos de operação devido às altas taxas de aeração necessárias, o que pode tornar o processo menos interessante (Mitchell et al., 2000a).

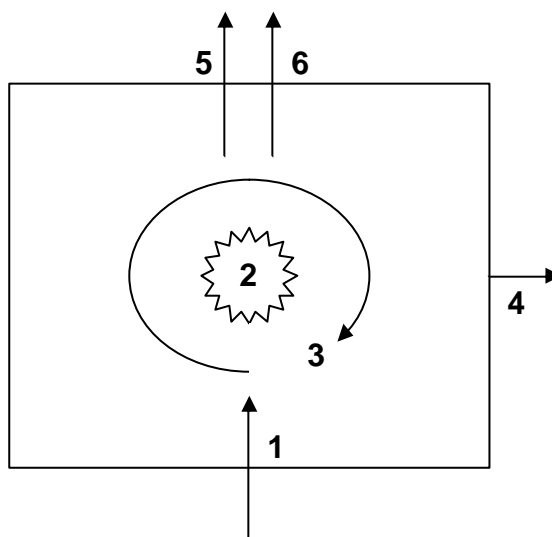


Figura 2.7: Efeitos considerados em modelos de biorreatores de leito fluidizado.

1 – Entrada de ar; 2 – Geração metabólica de calor; 3 – Mistura; 4 – Transferência convectiva de calor através das paredes do biorreator; 5 – Saída de ar; 6 – Evaporação de água.

Fonte: Mitchell et al. (2000a).

2.5 Biorreatores de tambor rotatório

Os biorreatores de tambor rotatório consistem de um cilindro horizontal que gira ao redor de seu eixo. A entrada de ar costuma ser localizada em uma das extremidades do cilindro, e a saída na oposta. Este tipo de equipamento tem despertado interesse porque

proporciona uma agitação suave no leito, o que é muito importante quando se trabalha com fungos filamentosos, por exemplo.

Hardin et al. (2002) estudaram a dinâmica de mistura nestes biorreatores e citaram seis possíveis regimes de movimentação do leito, cuja ocorrência depende da velocidade de rotação do cilindro. Estes regimes são apresentados na Figura 2.8.

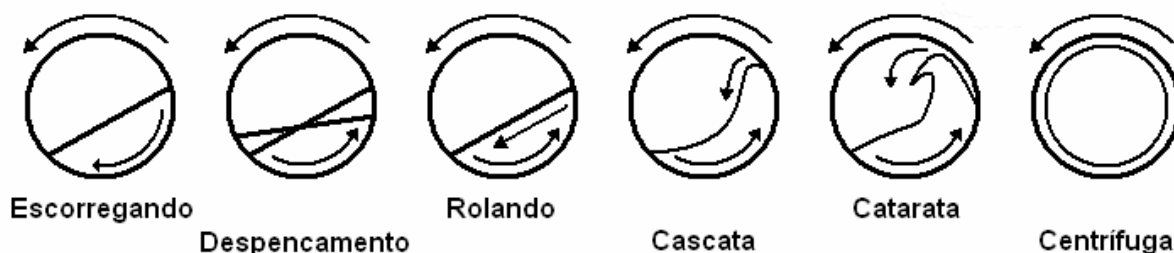


Figura 2.8: Possíveis regimes de movimentação do leito em biorreatores de tambor rotatório.

Fonte: Adaptado de Hardin et al. (2002).

A literatura apresenta modelos que dividem o espaço interno do biorreator em leito sólido, *headspace* e parede (Hardin et al., 2002; Mitchell et al., 2003), conforme apresentado na Figura 2.9.

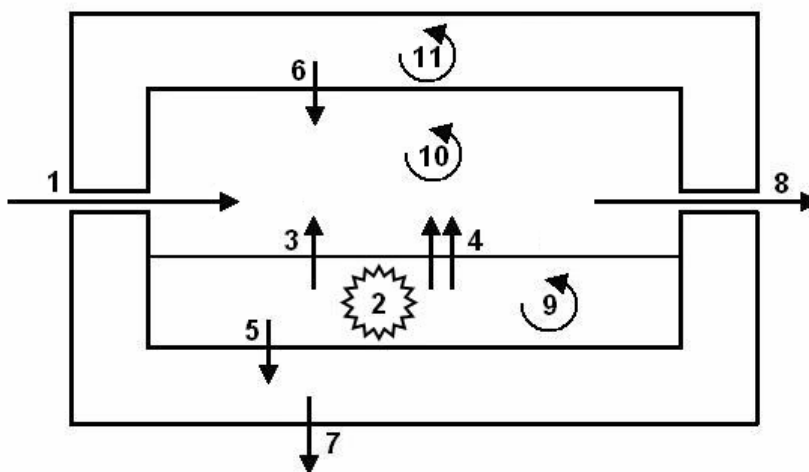


Figura 2.9: Efeitos considerados em modelo para biorreator de tambor rotatório.

- 1 – Entrada de ar; 2 – Geração de calor metabólico; 3 – Transferência advectiva de calor entre leito e o ar;
- 4 – Evaporação de água do leito, com retirada de energia; 5 – Condução entre leito e parede do biorreator;
- 6 – Advecção entre ar e parede do biorreator; 7 – Perda advectiva de calor para o ambiente; 8 – Saída de ar;
- 9 – Mistura no leito; 10 – Mistura no ar; 11 – Homogeneidade térmica na parede do biorreator.

Fonte: Mitchell et al. (2000a).

Conforme Mitchell et al. (2003), para esta situação, o balanço de energia no leito

fica:

$$(Cp_S + Cp_W \cdot W) \cdot \frac{d(T_b \cdot M_S)}{dt} = r_Q - h_{bp} \cdot A_{bp} \cdot (T_b - T_p) - h_{ba} \cdot A_{ba} \cdot (T_b - T_a) + \\ - k_W \cdot A_{ba} \cdot (y_{EQ} - y_a) \cdot [T_b \cdot Cp_W + I_W - (T_b - T_a) \cdot Cp_{VAP}] \quad (2.29)$$

O termo do lado esquerdo da Equação 2.29 descreve a variação de entalpia do leite. Os termos do lado direito representam a geração de calor metabólico, as trocas convectivas do leite com a parede do biorreator e o ar de *headspace*, e a remoção de calor por evaporação de água.

O balanço de energia no ar de *headspace* é:

$$(Cp_G + Cp_{VAP} \cdot y_a) \cdot \frac{d(T_a \cdot M_G)}{dt} = T_{in} \cdot F_{in} \cdot (Cp_G + Cp_{VAP} \cdot y_{in}) + \\ - T_a \cdot F_{out} \cdot (Cp_G + Cp_{VAP} \cdot y_a) + \\ + k_W \cdot A_{ba} \cdot (y_{EQ} - y_a) \cdot T_a \cdot Cp_{VAP} + \\ + h_{ba} \cdot A_{ba} \cdot (T_b - T_a) + h_{pa} \cdot A_{pa} \cdot (T_p - T_a) \quad (2.30)$$

Novamente, o termo do lado esquerdo descreve a variação de entalpia do sistema considerado. Já os dois primeiros termos do lado direito representam a entrada e saída de energia com o ar, o terceiro termo, a energia adquirida através da água evaporada do leite, e os dois últimos contabilizam as trocas convectivas do ar com o leite e a parede do biorreator.

Na parede, considerando as trocas convectivas com o leite, o ar de *headspace* e ainda com o meio externo, o seguinte balanço de energia foi escrito:

$$V_p \cdot \mathbf{r}_p \cdot Cp_p \cdot \frac{dT_p}{dt} = h_{bp} \cdot A_{bp} \cdot (T_b - T_p) - h_{pa} \cdot A_{pa} \cdot (T_p - T_a) - h_{pe} \cdot A_{pe} \cdot (T_p - T_e) \quad (2.31)$$

O balanço de água no leite, considerando evaporação e geração metabólica, é:

$$\frac{d(M_S \cdot W)}{dt} = -k_W \cdot A_{ba} \cdot (y_{EQ} - y_a) + r_{H_2O} \quad (2.32)$$

Já o balanço de água no ar de *headspace* pode ser descrito pela Equação 2.33, que leva em conta a entrada e a saída de água com o ar e a evaporação de água do leite.

$$\frac{d(M_G \cdot y_a)}{dt} = F_{in} \cdot y_{in} - F_{out} \cdot y_a + k_W \cdot A_{ba} \cdot (y_{EQ} - y_a) \quad (2.33)$$

Hardin et al. (2002) desenvolveram um modelo que levava em conta o tipo de agitação e o conseqüente regime de movimentação do leito (conforme Figura 2.8). Além disso, compararam diferentes formas para descrever o comportamento do ar de *headspace*:

- mistura perfeita;
- considerando plug-flow;
- empregando o conceito de Central Jet Residence Time Distribution (RTD), que divide o headspace em duas regiões: uma central de plug-flow, ao longo do eixo de rotação, e uma zona morta junto às paredes;

Concluíram que o conceito de Central Jet RTD oferece uma alternativa mais simples e realista para a solução do problema.

2.6 Biorreatores de Tambor Agitado

Biorreatores de tambor agitado possuem pás para agitação interna, promovendo uma maior homogeneização dos perfis de temperatura e de concentração no leito. Apesar de seu grande potencial para aplicação em escala industrial, têm recebido pouca atenção em termos de modelagem para CES. Conforme atesta Mitchell et al. (2000a), apenas tambores rotatórios têm recebido atenção, pois o tipo de movimento destes causa menor dano ao micélio de fungos filamentosos. Entretanto, bactérias são menos sensíveis à tensão de cisalhamento gerada pelo movimento das pás, e tambores agitados apresentam-se como uma alternativa bastante viável neste caso. É interessante notar que vários elementos considerados na modelagem de tambores rotatórios também são aplicáveis em tambores agitados.

Muitas vezes, biorreatores de tambor permitem a instalação de bicos aspersores de água, além de encamisamento. Estes dispositivos, junto com a própria agitação, permitem um melhor controle e homogeneidade da temperatura no leito (Nagel et al., 2001), através do resfriamento evaporativo e troca convectiva nas paredes.

Boa parte da modelagem fenomenológica destes biorreatores pode se basear nas considerações aplicadas aos tambores rotatórios: três regiões homogêneas (leito, *headspace* e parede) que trocam massa e energia entre si. Assim, modelos similares ao representado pelas Equações 2.29 a 2.33 podem ser utilizados.

Pena y Lillo et al. (2001) utilizaram um modelo que assume mistura perfeita, utilizando medições *on-line* (temperatura e umidade relativa do ar que entra e sai do biorreator) para estimar o conteúdo de água do leito. O balanço de energia utilizado foi:

$$Cp_b \cdot k_{exp} \cdot \frac{dT_b}{dt} = r_Q - F \cdot \left[Cp_a \cdot (T_{out} - T_{in}) + Cp_{VAP} \cdot (y_{out} \cdot T_{out} - y_{in} \cdot T_{in}) \right] + \\ - \left[Cp_{VAP} \cdot T_b \cdot (y_{out} - y_{in}) - I_w \cdot (y_{out} - y_{in}) \right] + \\ - \left[h \cdot A_s \cdot (T_b - T_{viz}) + \mathcal{S} \cdot \epsilon \cdot (T_b^4 - T_{viz}^4) \right] + F_w \cdot Cp_w \cdot (T_w - T_b) \quad (2.34)$$

Este balanço considera geração metabólica de calor, diferenças na entalpia do gás na entrada e na saída do biorreator, resfriamento evaporativo, trocas convectivas e radiativas, e o último termo da equação conta por escoamento de água saindo e adição de água por aspersão à temperatura T_w . A inclusão do parâmetro empírico k_{exp} foi necessária para corrigir distorções produzidas pela consideração de homogeneidade do leito.

No mesmo trabalho, o balanço de água no leito foi expresso por:

$$\frac{d(M_s \cdot W)}{dt} = r_{H_2O} + F_w - F \cdot (y_{out} - y_{in}) \quad (2.35)$$

Leva-se em conta, assim, a geração metabólica de água, entrada por aspersão e saída por escoamento, evaporação e alteração no conteúdo sólido seco no biorreator.

2.7 Metabolismo e crescimento

Sendo os microrganismos os operários em ação durante um cultivo, consumindo a matéria-prima para gerar os produtos de interesse, o conhecimento de sua cinética de crescimento e de metabolismo torna-se importante para a modelagem matemática de processos biotecnológicos. Entretanto, o desenvolvimento deste tipo de trabalho têm se dado à base de equações essencialmente empíricas.

Basicamente, 4 tipos de cinéticas de crescimento são utilizadas em modelagem de CES (Mitchell et al., 2004):

– Linear

$$\frac{dX}{dt} = K \quad (2.36)$$

onde K é a taxa de crescimento linear.

– Exponencial

$$\frac{dX}{dt} = \mathbf{m} \cdot X \quad (2.37)$$

onde \mathbf{m} é a taxa de crescimento específico.

– Logística

$$\frac{dX}{dt} = \mathbf{m} \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (2.38)$$

onde X_{\max} é a máxima quantidade de biomassa possível.

– Duas fases (aceleração rápida e desaceleração lenta)

$$t < t_a \rightarrow \frac{dX}{dt} = \mathbf{m} \cdot X \quad (2.39)$$

$$t \geq t_a \rightarrow \frac{dX}{dt} = \left[\mathbf{m} \cdot L \cdot e^{-k(t-t_a)} \right] \cdot X \quad (2.40)$$

onde t_a é o instante de tempo de troca de fase de crescimento (da aceleração rápida para a desaceleração lenta), L é a razão entre a taxa de crescimento específico no início da fase de desaceleração e a taxa de crescimento específico na fase de aceleração, e k é uma constante de decaimento exponencial de primeira ordem, a qual causa a desaceleração do crescimento.

Essas equações de crescimento produzem curvas como as apresentadas na Figura 2.10.

Ainda segundo os mesmos autores, a maioria dos pesquisadores tem empregado equações logísticas para descrever cinéticas de crescimento.

Além da forma da equação cinética, é importante também levar em consideração a influência dos fatores ambientais sobre os parâmetros de crescimento. Estes fatores incluem concentração das fontes de nutrientes (carbono e nitrogênio, p.ex.), concentração de oxigênio, concentração de produtos, temperatura, pH e atividade de água (Mitchell et al., 2000a). A influência ambiental comumente é incluída no valor da taxa de crescimento microbiano (μ).

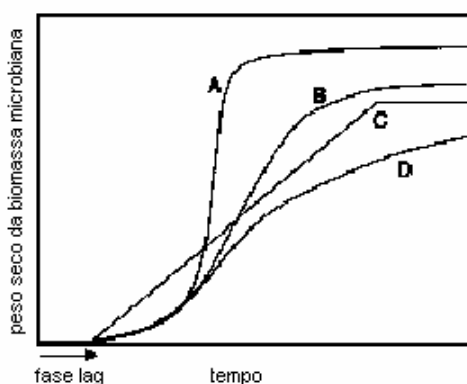


Figura 2.10: Os vários perfis cinéticos empíricos utilizados em CES.

(A) exponencial, (B) logístico, (C) linear, (D) duas fases.

Fonte: Adaptado de Mitchell et al. (2004).

Diferentes propostas existem para o equacionamento desta influência. A equação mais conhecida é a de Monod, onde um único nutriente é considerado como limitante do crescimento:

$$m = m_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (2.41)$$

onde m_{\max} é a taxa máxima de crescimento específico, S é a concentração do nutriente limitante e K_S é a constante de saturação de Monod.

Nessa equação, caso o nutriente seja inibidor do crescimento a altas concentrações, pode-se incluir um termo de inibição por substrato, através da constante de inibição pelo substrato, K_i (Andrews, 1968):

$$\mathbf{m} = \mathbf{m}_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S + S^2/K_i} \quad (2.42)$$

Para a temperatura, considerada em muitos casos o principal limitante do crescimento em CES, as propostas existentes costumam se relacionar à tradicional equação de Arrhenius, como a equação de Hougen-Watson, utilizada por Mitchell e Meien (2000):

$$\mathbf{m} = \mathbf{m}_{\max} \cdot \frac{B_1 \cdot \exp\left(\frac{-E_G}{R \cdot T}\right)}{1 + B_2 \cdot \exp\left(\frac{-\Delta G_D}{R \cdot T}\right)} \quad (2.43)$$

onde E_G representa a energia de ativação para o crescimento celular, e ΔG_D a variação de energia livre para a inativação celular.

Szewczyk e Myszk (1994) dividiram a biomassa em viva e morta, incluindo um termo de morte relacionado à temperatura.

$$\mathbf{m} = \mathbf{m}_0 \cdot \exp\left(\frac{-E_G}{R \cdot T}\right) - k_D \cdot \exp\left(\frac{-E_D}{R \cdot T}\right) \quad (2.44)$$

Smits et al. (1998) cita a equação de Ratkowsky (Ratkowsky et al., 1983):

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \{c_1 \cdot (T - T_{\min}) \cdot [1 - \exp(c_2 \cdot (T - T_{\max}))]\}^2 \quad (2.45)$$

onde T_{\max} e T_{\min} são as temperaturas máxima e mínima, além das quais teoricamente não é possível haver crescimento, e c_1 e c_2 são parâmetros empíricos.

Sangsurasak e Mitchell (1998) propuseram as seguintes equações empíricas para descrever o efeito da temperatura sobre a taxa de crescimento:

$$T \leq T_{opt} \rightarrow \mathbf{m} = \mathbf{m}_{opt} \quad (2.46)$$

$$T_{opt} \leq T \leq T_{\max} \rightarrow \mathbf{m} = \left(\frac{b + (T_{\max} - T_{opt})}{(T_{\max} - T_{opt})} \right) \cdot \left(\frac{\mathbf{m}_{opt} \cdot (T_{\max} - T)}{b + (T_{\max} - T)} \right) \quad (2.47)$$

$$T \geq T_{\max} \rightarrow \mathbf{m} = 0 \quad (2.48)$$

onde o parâmetro b representa a sensibilidade da taxa de crescimento à mudança de temperatura, T_{opt} é a temperatura ótima para o crescimento e μ_{bpt} a taxa de crescimento específico nesta temperatura.

Os efeitos de atividade de água (A_w) e pH são ainda mais complexos para equacionar, e raramente são levados em conta nos modelos. Costumam ser deixados de lado, e os modelos consideram que os cultivos ocorrem sem variação nestes parâmetros. Outras áreas de estudo, como a Microbiologia de Alimentos, modelam a influência do pH no desenvolvimento de microrganismos através de relações polinomiais (Gibson e Hocking, 1997), parabólicas (Pitt, 1993) ou lineares (Ratkowsky et al., 1982).

A combinação de efeitos sobre a taxa de crescimento é possível, mas surge a questão de como realizar esta operação. Tipicamente, os efeitos são multiplicados, utilizando-se a forma da Equação 2.49 (Mitchell et al., 2000a):

$$\mu = \mu_{\max} \cdot f(S) \cdot f(X) \cdot f(O_2) \cdot f(T) \cdot f(pH) \cdot f(A_w) \quad (2.49)$$

Além disso, não se pode esquecer a própria influência do microrganismo sobre o meio, como pela geração de calor metabólico. Este efeito deve ser considerado para os balanços energéticos e costuma ser descrito por uma equação que o associa ao crescimento (Sangsurasak e Mitchell, 1998):

$$r_Q = r_s \cdot (1 - e) \cdot Y_{Q/X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (2.50)$$

onde r_s é a massa específica seca do leito, e é a porosidade do leito, e $Y_{Q/X}$ representa a geração de calor metabólico na reação de crescimento.

Cooney et al. (1968) mostraram que a geração de calor metabólico relaciona-se linearmente com a produção de CO_2 e o consumo de O_2 , em diferentes microrganismos (*E. coli*, *C. intermedia*, *B. subtilis*, *A. niger*).

2.8 Estimação de biomassa através dos gases de saída

O consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono resultam da respiração, o processo metabólico pelo qual microrganismos aeróbios obtém a maior parte de sua energia para o crescimento. Sendo assim, estas atividades metabólicas estão associadas ao crescimento e podem ser utilizadas para estimar a formação de biomassa (Raimbault, 1998). As quantidades de CO₂ produzido e O₂ consumido podem ser quantificadas pelo acompanhamento dos gases de saída do biorreator.

Conforme Mitchell (1992b), as medidas de CPR ou OUR são mais úteis quando associadas à utilização de um “modelo de correlação”. A aplicação destes modelos, que envolvem predição do crescimento através do CPR e do OUR, demanda o uso de métodos numéricos para resolver as equações diferenciais geradas (Raimbault, 1998).

Considerando que o CO₂ é um produto metabólico e o O₂ um nutriente consumido, costuma-se utilizar modelos do tipo Luedeking-Piret (Luedeking e Piret, 1959). Descreve-se a produção e o consumo de substâncias pelo metabolismo microbiano utilizando uma única equação, composta de um termo associado ao crescimento e um termo de manutenção.

$$\frac{dp}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \cdot \frac{dX}{dt} + m \cdot X \quad (2.51)$$

ou então:

$$\frac{dp}{dt} = \left(\frac{m}{Y_{X/P}} + m \right) \cdot X \quad (2.52)$$

Para o caso da produção de gás carbônico e consumo de oxigênio, obtém-se:

$$CPR = \frac{dC^{CO_2}}{dt} = \frac{1}{Y_{X/CO_2}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{CO_2} \cdot X \quad (2.53)$$

ou

$$CPR = \frac{dC^{CO_2}}{dt} = \left(\frac{m}{Y_{X/CO_2}} + m_{CO_2} \right) \cdot X \quad (2.54)$$

e

$$OUR = -\frac{dC^{O_2}}{dt} = \frac{1}{Y_{X/O_2}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{O_2} \cdot X \quad (2.55)$$

ou

$$OUR = -\frac{dC^{O_2}}{dt} = \left(\frac{m}{Y_{X/O_2}} + m_{O_2} \right) \cdot X \quad (2.56)$$

As considerações do modelo assim construído são, basicamente:

- Fluxos de entrada e de saída de ar são iguais.
- CO_2 e O_2 não se acumulam no meio.

Koutinas et al. (2003) calcularam a CPR e a OUR, em meio líquido, por:

$$CPR = \frac{F \cdot (C_{out}^{CO_2} - C_{in}^{CO_2})}{V} \cdot \frac{M_{CO_2}}{v_{CO_2}} \quad (2.57)$$

$$OUR = \frac{F \cdot (C_{in}^{O_2} - C_{out}^{O_2})}{V} \cdot \frac{M_{O_2}}{v_{O_2}} \quad (2.58)$$

Para o meio sólido, substitui-se o volume do biorreator (V) pela massa do leito (M_B), que é mais representativa neste sistema.

$$CPR = \frac{F \cdot (C_{out}^{CO_2} - C_{in}^{CO_2})}{M_B} \cdot \frac{M_{CO_2}}{v_{CO_2}} \quad (2.59)$$

$$OUR = \frac{F \cdot (C_{in}^{O_2} - C_{out}^{O_2})}{M_B} \cdot \frac{M_{O_2}}{v_{O_2}} \quad (2.60)$$

A análise de gases de saída é uma técnica on-line de estimação de biomassa em CES, e suas grandes vantagens são a natureza não-intrusiva e não-destrutiva da técnica, as possibilidades de controlar o quociente respiratório, garantindo um nível ótimo de oxidação do substrato, e de incorporar controles automáticos para o processo através da taxa de aeração (Raimbault, 1998).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Para atingir os objetivos propostos, foram realizados alguns experimentos em biorreator, procurando estudar a dinâmica da mistura e a relação entre crescimento do microrganismo, produção e consumo de alguns compostos durante o cultivo.

3.1 Instalações e equipamentos

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia (BioTecLab) I e II do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) e no Laboratório de Computação da Pós-Graduação (LACOP) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Leituras de ensaios espectrofotométricos foram realizadas em aparelho marca “Hitachi” modelo U-1100 (Japão). Este aparelho foi utilizado na análise de açúcares redutores totais e na padronização do inóculo.

Equipamentos, materiais e meios de cultura foram esterilizados em autoclaves verticais: Phoenix Equipamentos modelo AV75 (Brasil) ou Ralf Winter (Brasil).

Operações que demandam ambiente estéril, como o preparo de inóculo e a análise de contagem em placa, foram realizadas em capela de fluxo marca Trox (Technik do Brasil).

3.2 Biorreator cilíndrico horizontal agitado (BCHA)

O biorreator utilizado nos experimentos é do tipo tambor horizontal agitado e está apresentado na Figura 3.1. Fabricado por uma metalúrgica da região, a partir de projeto desenvolvido no Laboratório, compõe-se de um corpo cilíndrico em aço inox 304, com encamisamento que permite circulação de água para o controle de temperatura. As dimensões do cilindro são 40cm de comprimento e 20cm de diâmetro, perfazendo um volume interno de aproximadamente 12 litros. O volume aproximado do encamisamento é de 2,5 litros.

Há pás de agitação retas, sem inclinação, ligadas a um eixo central. Por este eixo central entra também o fluxo de ar, que é distribuído ao longo de todo o comprimento do cilindro. A aeração é, assim, não forçada, já que o ar não é impulsionado através do leito.



Figura 3.1: Visões externa e interna do BCHA.

Através de duas escotilhas localizadas no corpo do biorreator é possível, com uma concha longa e esterilizada, retirar amostras do meio de cultivo.

3.3 Microrganismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi *Bacillus circulans* BL53, isolado de ambiente amazônico e já utilizado em outros estudos no laboratório (Heck, 2001; Heck, 2005).

3.4 Preservação da cultura

Para estocagem prolongada, o microrganismo foi inicialmente cultivado em meio Luria-Bertani (LB) por 18 horas, e 0,5 mL deste meio foi adicionado a 0,5 mL de glicerol previamente esterilizado em tubos Eppendorf e estocado a -20°C. O microrganismo também foi mantido em tubos de ágar inclinado contendo meio LB, a partir dos quais realizava-se a inoculação nos experimentos.

A composição do meio LB está apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição do Luria Broth

Peptona	10,0 g.L ⁻¹
Extrato de levedura	5,0 g.L ⁻¹
NaCl	5,0 g.L ⁻¹

3.5 Preparo de inóculo

O inóculo foi preparado em meio LB. O meio foi esterilizado a 121°C por 15min, resfriado à temperatura ambiente e inoculado com *Bacillus circulans* BL53. O inóculo cresceu durante 18 a 20h em incubadora orbital agitada (Nova Técnica Ind. e Com. Ltda. - Brasil) a 37°C com agitação orbital.

3.6 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, determinada por Heck (2001), está apresentada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: 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 de cultivo foi realizado de forma similar à apresentada por Heck (2005): 800g de RIFS (granulometria média mesh 30) adicionados a 4000mL de meio mineral. O meio foi transferido para o biorreator e o conjunto foi esterilizado a 120°C por 30min.

O meio mineral é composto de sais dissolvidos em água de acordo com a Tabela 3.3.

O meio foi resfriado até 37°C, sendo então adicionados 800mL de inóculo padronizado à $OD_{620} = 1,0$.

Tabela 3.3: Composição do meio mineral

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,41 g.L ⁻¹
$CaCl_2$	0,02 g.L ⁻¹
KH_2PO_4	1,00 g.L ⁻¹
K_2HPO_4	1,00 g.L ⁻¹
NH_4NO_3	1,00 g.L ⁻¹
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,05 g.L ⁻¹

Fonte: Heck (2005)

3.7 Condições do cultivo

A agitação do biorreator foi ajustada a 4 rpm, o fluxo de água no encamisamento foi mantido a 37°C, e a aeração foi feita com ar estéril umidificado a 37°C, a uma vazão de 4L.min⁻¹. O ar foi aquecido pela passagem em uma serpentina de cobre (3mm de diâmetro interno por 2m de comprimento) mergulhada em banho termostático a 37°C, e umidificado pelo borbulhamento em um frasco contendo água destilada estéril, colocado dentro de uma estufa mantida a 37°C. A mangueira de ar possuía 2 metros de comprimento dentro da estufa, de forma a garantir a temperatura do ar, e um pequeno trecho externo (aproximadamente 20cm), que foi coberto com isolante, até o biorreator.

Em intervalos regulares, pequenas amostras (30 a 50 g) foram retiradas do biorreator para quantificação de biomassa, determinação de pH, de umidade do meio e demais análises *off-line*.

Para garantir a ausência de microrganismos contaminantes no cultivo, realizou-se teste de Gram, e, além disso, foi observada a morfologia das colônias desenvolvidas nas placas de contagem.

3.8 Água do encamisamento do biorreator

A água para controle de temperatura no encamisamento do biorreator foi fornecida por um banho termostático Frigomix B (B.Braun Int. - Alemanha), mantido a 37°C. As temperaturas de entrada e saída da água do encamisamento foram medidas automaticamente a cada 2 minutos por 2 termorresistências Pt-100 e armazenadas em um sistema de aquisição de dados LogBox Standard (Novus – Brasil) para coleta posterior.

3.9 Quantificação de biomassa

A quantificação de biomassa foi realizada através da contagem em placas. Em capela de fluxo, tomaram-se 3g da amostra do cultivo, que foram adicionados a 27mL de água peptonada previamente esterilizada em tubo de ensaio. A mistura foi agitada em sonicador (B.Braun Int. - Alemanha) por 3 minutos, de forma a garantir que a biomassa fosse separada da fibra e suspensa no líquido. Deste tubo tomou-se 1mL para novo tubo com 9mL de água peptonada, procedendo-se assim diluição seriada até 10^{-6} ou 10^{-7} . O plaqueamento foi feito em triplicata em meio PCA (*Plate Count Agar*) pela técnica de espalhamento com alça de Drigalski. As placas foram armazenadas em estufa a 37°C , a contagem das colônias foi feita após 12 e 18h, e a biomassa foi expressa em termos de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de meio úmido.

A composição do meio PCA utilizado está apresentada na Tabela 3.4.

Tabela 3.4: Composição do meio PCA utilizado

Peptona	5,0 g.L ⁻¹
Extrato de levedura	2,5 g.L ⁻¹
Glicose	1,0 g.L ⁻¹
Ágar bacteriológico	24,0 g.L ⁻¹

3.10 pH do meio de cultivo

O pH foi analisado em amostra do meio de cultivo ressuspensa a 10% em água destilada (Instituto Adolfo Lutz, 1985). As medidas foram feitas em potenciômetro da marca "Renè Graf".

3.11 Análises do extrato aquoso

3.11.1 Preparo do extrato aquoso

Seguindo a metodologia de Heck (2001), o extrato aquoso foi produzido através da extração de componentes solúveis presentes no meio de cultivo, incluindo-se substâncias como as enzimas hidrolíticas e açúcares redutores. Para tanto, 10g da amostra do cultivo foram adicionados de igual quantidade de água destilada a 4°C em erlenmeyer de 125mL. Após 30 minutos em agitador orbital Certomat MO (B.Braun Int. – Alemanha) a 240rpm, a mistura foi centrifugada a 2.500g por 20 minutos na temperatura de 4°C em centrífuga Sygma modelo 4K15 (Alemanha). O sobrenadante foi recolhido e congelado para posterior análise.

3.11.2 Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram quantificados no extrato aquoso pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Adicionaram-se 100µL de amostra a 1mL de solução de DNS, agitou-se a mistura rapidamente e levou-se a banho de água fervente por 10 minutos. Após resfriamento, leu-se a absorvância da amostra a 570nm (Chaplin, 1986). Curvas-padrão foram construídas utilizando glicose.

3.11.3 Acetato

A análise de acetato foi realizada por cromatografia gasosa, com técnica adaptada de Williams e Onwudili (2005). Utilizou-se cromatógrafo a gás marca Shimadzu modelo GC-14B, equipado com coluna capilar Carbowax de 60m x 0,25mm e detector de chama ionizante (FID). O gás de arraste utilizado foi H₂, a 100kPa. O perfil de temperatura na coluna foi 1 minuto a 100°C; aquecimento a 5°C por minuto até 200°C; manutenção nessa temperatura por 3 minutos. O acetato era eluído em aproximadamente 6,5 minutos. O volume de amostra injetado foi de 1µL. A calibração da medida foi realizada pela técnica de padrão externo (Smith, 1988).

3.12 Medição da umidade relativa do ar de saída do biorreator

Para monitorar a umidade relativa e temperatura na saída do biorreator foi utilizado um termo-higrômetro marca Center modelo 310, ligado a um computador para aquisição de dados *on-line*. O sensor foi instalado no primeiro *trap*, logo após a saída do biorreator, o qual foi envolvido com isolante térmico, bem como o curto trajeto até ele (alguns centímetros).

Para determinar a umidade relativa do ar de entrada, realizou-se um teste no qual o medidor de umidade relativa e temperatura foi instalado após os umidificadores, na posição onde estaria o biorreator. Esta umidade relativa foi considerada constante ao longo da duração do cultivo, como foi possível verificar durante esse teste.

3.13 Análise de umidade do meio de cultura

A umidade do leito foi medida conforme método descrito em Carvalho e Jong (2002). Tomaram-se aproximadamente 5g de amostra, que foram misturados com areia tratada em cápsula previamente seca (mínimo 3h em estufa a 80°C) e pesada. A cápsula, após pesada com amostra, foi levada à estufa a 80°C por 6 horas, resfriada em dessecador e novamente pesada. Essa operação foi repetida até se obter pesagens consecutivas iguais. A diferença entre o peso inicial e o peso seco foi atribuída à umidade da amostra.

3.14 Análise do CO₂ liberado no cultivo

3.14.1 Análise por Cromatografia Gasosa

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⁻¹ (arraste) e 10mL.min⁻¹ (referência), medidos com a coluna a 35°C. O perfil de temperatura na coluna iniciou com 6 minutos a 35°C, seguindo-se aquecimento de 25°C.min⁻¹ até 110°C. Esta temperatura era mantida por 3 minutos. Nessas condições, o tempo de retenção do CO₂ foi de aproximadamente 4 minutos. A amostragem automática do gás de saída do biorreator foi realizada a cada 20 minutos.

Para garantir condições padronizadas do ar que era amostrado pelo CG, a saída de ar do biorreator foi conectada a dois *traps*: um primeiro para reter material sólido que eventualmente saía do biorreator e outro resfriado para condensação de água. Em seguida, o ar passava ainda por uma coluna de sílica, que retirava a umidade ainda não condensada, de forma a enviar apenas ar seco ao cromatógrafo.

Para quantificar o CO₂ no ar que entra no biorreator, necessário para calcular a taxa de produção do gás, foram feitas análises cromatográficas do ar vindo do compressor antes e depois do cultivo.

3.14.2 Calibração da medida de CO₂ no CG

A calibração do CG para a medição do CO₂ foi realizada pela técnica de padrão externo (Smith, 1988), com injeção de volumes conhecidos de gás puro (Dióxido de Carbono USP – White Martins, Brasil), utilizando-se seringa de injeção comum de cromatografia. O volume injetado foi convertido em concentração de CO₂ dividindo-se pelo volume do loop do injetor automático (280µL). Assim, o sinal gerado no cromatograma foi relacionado com a concentração de CO₂. Para obter maior precisão, as injeções foram repetidas várias vezes para cada volume utilizado.

3.14.3 Análise de CO₂ e O₂ em analisador de gases

O ar conduzido até o CG foi também analisado utilizando-se um analisador de gases Mocon Pac Check Model 650 (Minneapolis, EUA). Este instrumento, comumente utilizado

para análise de gás em embalagens de alimentos, realiza medições simultâneas de CO₂ e O₂. A concentração do primeiro é determinada por um eletrodo infra-vermelho, e a do segundo, por um eletrodo polarimétrico de óxido de zircônio.

As análises utilizando este aparelho foram realizadas em intervalos de aproximadamente 1 hora, durante os cultivos.

Entretanto, o uso do analisador de gases ficou prejudicado devido à baixa resolução das medições do aparelho, da ordem de décimos de %, enquanto que as variações na concentração de CO₂ e O₂ durante o processo não passavam de 1%.

3.15 Testes de mistura no biorreator

Com o objetivo de obter uma avaliação qualitativa da agitação proporcionada pelas pás do biorreator, foram realizados testes de mistura utilizando corantes alimentícios, de forma a desenvolver trabalho semelhante aos de Nagel et al. (2001) e Schutyser et al. (2001). Nesses trabalhos, entretanto, os substratos utilizados eram particulados (grãos de trigo), o que diferencia este trabalho daqueles.

Utilizaram-se duas porções de 400g de RIFS com 2000mL 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. Adicionaram-se mais 400mL 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. No caso da avaliação da mistura

axial, as porções de fibra foram distribuídas na outra direção, conforme mostrado na Figura 3.2.

Em ambos os casos, o biorreator foi fechado e a agitação foi ajustada a 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. Fotografias foram obtidas utilizando uma câmera digital Olympus C-960 Zoom.

Este teste simples forneceu dados qualitativos sobre os padrões de mistura do biorreator.



Figura 3.2: Disposição inicial da fibra nos testes de mistura.
Esquerda: teste de mistura radial; Direita: teste de mistura axial.

3.16 Estimação de biomassa através da produção de CO₂

A relação entre a taxa de produção de CO₂ e a biomassa foi descrita por uma equação do tipo Luedeking-Piret (Luedeking e Piret, 1959), como comumente é feito na literatura (Sugama e Okazaki, 1979; Sato et al., 1983; Mitchell, 1992b).

$$\frac{dC^{CO_2}}{dt} = CPR = \frac{1}{Y_{X/CO_2}} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{CO_2} \cdot X \quad (3.1)$$

Ressalte-se que a forma apresentada pela Equação 2.54 não seria aplicável aqui, pois os dados experimentais permitiriam a obtenção apenas de uma taxa de crescimento específica (m) aparente. O uso da forma que inclui a derivada da quantidade de biomassa em relação ao tempo é mais apropriada, pois se reorganiza a Equação 3.1 para isolar a taxa de crescimento, obtendo-se:

$$\frac{dX}{dt} = Y_{X/CO_2} \cdot (CPR - m_{CO_2} \cdot X) \quad (3.2)$$

O valor da taxa de produção de CO₂ foi calculado conforme Koutinas et al. (2003):

$$CPR = \frac{F \cdot (C_{out}^{CO_2} - C_{in}^{CO_2}) \cdot M_{CO_2}}{M_B \cdot v_{CO_2}} \quad (3.3)$$

As considerações do modelo são, basicamente:

1. CO₂ não se acumula no meio.
2. Fluxos de entrada de ar e de saída de gás são iguais.
3. A massa do leito não se altera significativamente durante o cultivo.

A primeira consideração é bastante plausível, dada a baixa solubilidade do gás.

A segunda costuma ser utilizada na literatura e, neste trabalho, produz um erro inferior a 2%, pois a taxa de produção de CO₂ é baixa ao longo de todo o cultivo, e é, ao menos em parte, contrabalançada por consumo de O₂. Medir o fluxo de gás na saída do biorreator, neste caso, além de naturalmente impreciso seria prejudicado pela existência de vazamentos de gás no biorreator (ver Apêndice).

A terceira consideração justifica-se novamente pela baixa produção de CO₂. Ao longo de 40 horas de cultivo, a quantidade acumulada de CO₂ gerado foi de aproximadamente 65g. Mesmo considerando diferentes rotas metabólicas possíveis, esta quantidade de gás corresponderia à perda de menos de 1% da massa seca inicial do leito. Complementando isto, as análises mostraram que a umidade do leito não se alterou significativamente ao longo do tempo (ver Capítulo 4).

3.17 Modelagem do crescimento microbiano

Os dados de biomassa obtidos nos experimentos foram ajustados aos quatro diferentes modelos cinéticos citados por Mitchell et al. (2004) para CES (Tabela 3.5):

Tabela 3.5: Modelos cinéticos de crescimento em CES

Tipo de modelo	Forma diferencial	Parâmetros a estimar
Linear	$\frac{dX}{dt} = K$	K
Exponencial	$\frac{dX}{dt} = \mathbf{m} \cdot X$	\mathbf{m}
Logístico	$\frac{dX}{dt} = \mathbf{m} \cdot X \cdot \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$	\mathbf{m}, X_m
Duas fases	$t < t_a \rightarrow \frac{dX}{dt} = \mathbf{m} \cdot X$ $t \geq t_a \rightarrow \frac{dX}{dt} = [\mathbf{m} \cdot L \cdot e^{-k(t-t_a)}] \cdot X$	\mathbf{m}, L, k, t_a

Fonte: Mitchell et al. (2004)

3.18 Resolução dos modelos e estimação de parâmetros

Os modelos, constituídos por sistemas de equações diferenciais ordinárias, foram resolvidos utilizando-se o método da retrodiferenciação (BDF) com ordem e passo variável (Brenan et al., 1995), com tolerância relativa de 10^{-5} e tolerância absoluta de 10^{-6} nas variáveis.

Para todos os modelos testados, a estimação dos parâmetros foi realizada de forma a minimizar a soma dos quadrados dos erros de predição, utilizando o método *Particle Swarm Optimization* (PSO) de busca aleatória para obtenção de soluções aproximadas, refinadas pelo método de Levenberg-Marquardt com atualização da matriz Hessiana pela técnica de BFGS (Edgar e Himmelblau, 1988), ambos implementados em MATLAB v.5.3. Utilizou-se uma tolerância relativa de 10^{-6} para as variáveis de decisão e para a função-objetivo.

A utilização de um método de busca aleatória, nestes problemas de estimação, justifica-se, pois os modelos, e, por consequência, as funções-objetivo, são relativamente simples, mas apresentam mínimos locais, o que pode prejudicar o desempenho dos métodos de busca multivariável e analíticos, muito dependentes de uma boa estimativa inicial.

3.19 Seleção e estimação de parâmetros

As estimativas dos parâmetros foram refinadas pelo uso do algoritmo SELEST, desenvolvido por Secchi et al. (2006). Com base na matriz de sensibilidade do sistema, o algoritmo calcula o efeito de cada parâmetro nas variáveis medidas e a sua independência linear em relação aos demais parâmetros. O produto destas duas grandezas é definido como a identificabilidade (*identifiability*) do parâmetro, a qual pode ser entendida como a capacidade que se tem, com os dados experimentais disponíveis, de estimar o parâmetro com precisão.

A maior identificabilidade determina qual parâmetro será estimado em cada etapa do processo. O algoritmo prevê critérios de parada quando as condições do sistema já não permitirem uma estimação precisa dos parâmetros.

A Figura 3.3 apresenta uma descrição simples dos passos do algoritmo SELEST. Uma descrição mais detalhada é fornecida no Anexo I.

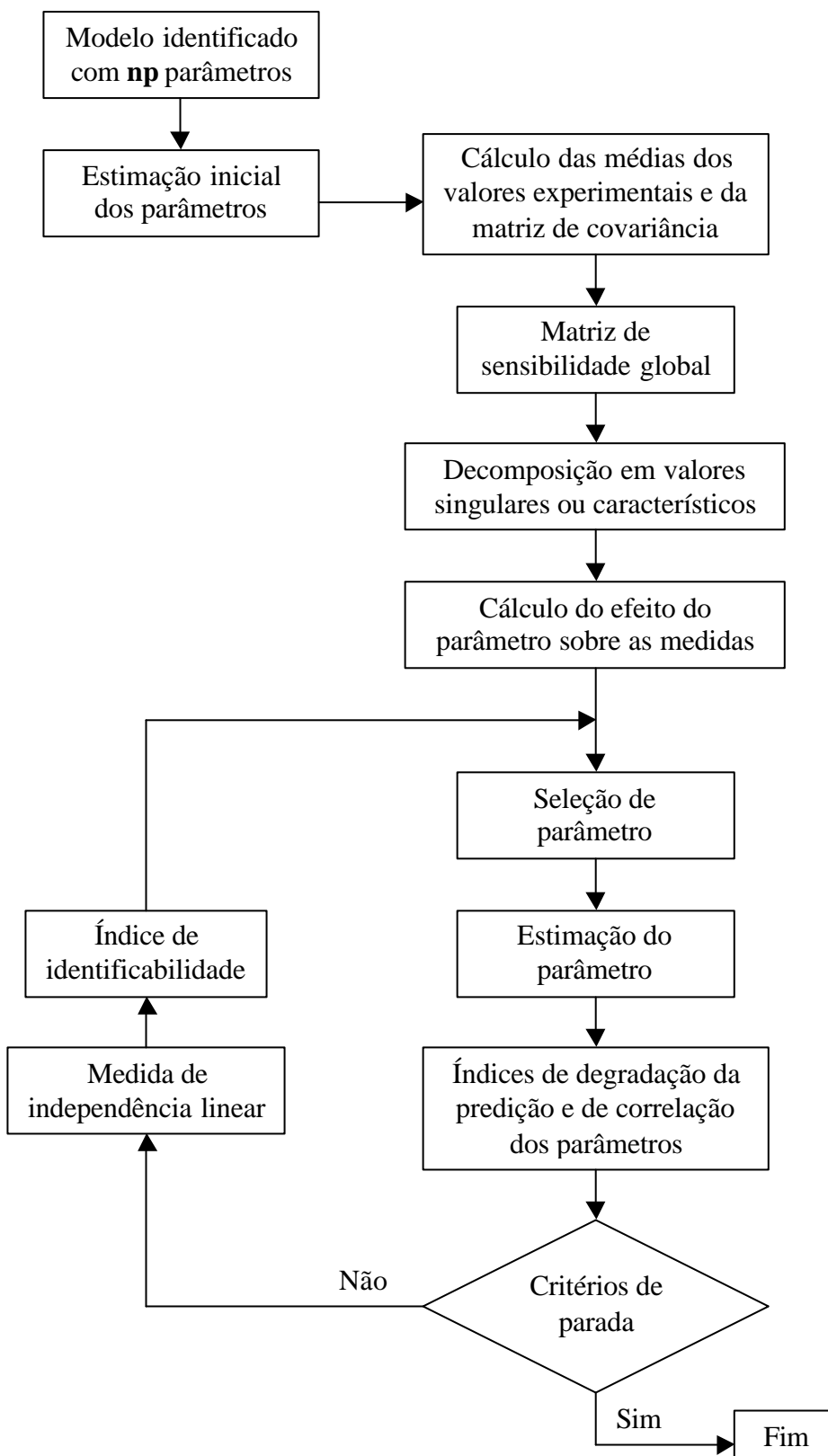


Figura 3.3: Descrição simplificada do algoritmo SELEST.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Calibração da medida de CO₂ no cromatógrafo a gás

A Figura **Erro! Fonte de referência não encontrada.** mostra a curva de calibração para a medição de CO₂ no CG, obtida pelo método de calibração com padrão externo, com injeção de volumes conhecidos de gás puro. O método mostrou-se bastante reprodutível, o que foi comprovado pelo alto coeficiente de correlação.

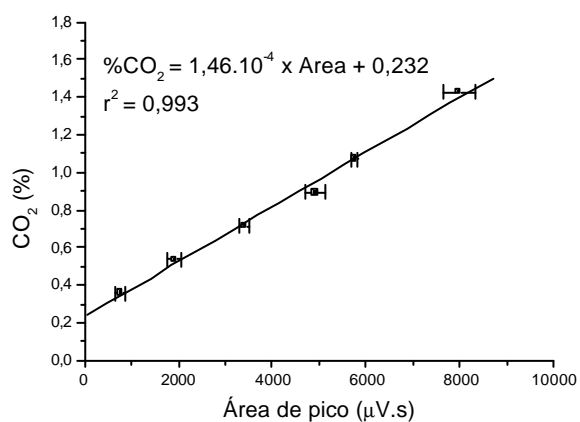


Figura 4.1: Curva de calibração obtida para análise de CO₂ em CG.

Medições de CO₂ realizadas paralelamente no cromatógrafo e no analisador de gases vieram a confirmar a boa qualidade da calibração feita no primeiro, conforme mostrado na Figura 4.2.

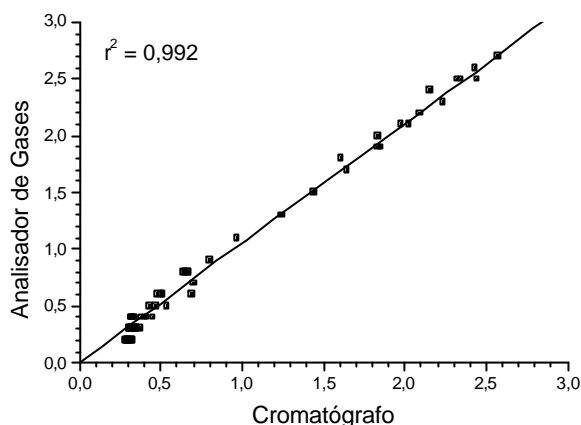


Figura 4.2: Comparação entre as medidas de concentração de CO₂ (em %) obtidas pelo cromatógrafo a gás e pelo analisador de gases.

4.2 Testes de mistura

Nos testes de mistura, verificou-se que o biorreator possui ótima capacidade de mistura na direção radial, sendo que em menos de 15 minutos de agitação a 4 rpm (total de 60 revoluções) não há mais diferenças de cor no leito, conforme pode ser observado na Figura 4.3.

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. Entretanto, estima-se que estas regiões correspondam a menos de 5% do volume do leito.



Figura 4.3: Aspecto do biorreator ao início e após 15 minutos no teste de mistura radial.

Já na direção axial, a mistura é mais lenta, conforme esperado devido à configuração das pás. A Figura 4.4 mostra o aspecto interno do biorreator aos 45 minutos de agitação a 4 rpm (180 revoluções). Percebe-se que a massa está bem misturada, entretanto, as zonas mortas, como o fundo do cilindro, ainda não se misturaram. Esta mistura mais completa só será obtida após quase duas horas de agitação.



Figura 4.4: Aspecto do biorreator ao início e após 45 minutos no teste de mistura axial.

Estes resultados concordam com os 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 daquele trabalho se deu muito mais rapidamente (6 revoluções em teste de mistura radial e 120 revoluções em

teste de mistura axial), já que foram usadas pás em “V” e o substrato era particulado (grãos de trigo).

Com estes resultados, decidiu-se, a exemplo dos demais trabalhos encontrados na literatura (Nagel et al., 2000; Heck, 2005), tratar o leito do biorreator como homogêneo, pois a dinâmica da mistura no biorreator é mais rápida que a dinâmica de processos biológicos. O fato da mistura axial ser mais lenta que a radial é compensado pela distribuição do ar de entrada ao longo de toda a extensão do cilindro e pela homogeneidade inicial do biorreator.

Este resultado, entretanto, é unicamente qualitativo, já que não era possível fazer nenhum tipo de quantificação do grau de mistura do sistema. Tentando aprimorar este aspecto, entrou-se em contato com o Laboratório de Processamento de Sinais e Imagens (LAPSI) da UFRGS, para avaliar a possibilidade de desenvolver um trabalho visando quantificar o grau de mistura ao longo do tempo.

Instalando-se uma câmera com uma fonte de luz em uma das escotilhas, poder-se-iam obter imagens em intervalos regulares, as quais seriam processadas para determinar a frequência de ocorrência de cada tonalidade entre o amarelo e o azul. A partir daí, seria necessário desenvolver uma regra que determinasse o grau de mistura a partir da distribuição de frequência de ocorrência de cada tonalidade.

Até o momento, foi realizado apenas um teste com fotografias tiradas com uma câmera digital comum, no qual já foi confirmada a viabilidade do trabalho.

4.3 Temperatura da água de encamisamento

As medições de temperatura da água na entrada e na saída do encamisamento do biorreator mostraram que a camisa se mantém praticamente constante a 37°C (Figura 4.5). Variações nas medições são atribuídas à imprecisão do instrumento. Devido ao alto fluxo de

água (aproximadamente $6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, correspondente a uma velocidade linear de $70 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ na mangueira), a diferença de temperatura entre entrada e saída foi praticamente nula.

Além disso, verifica-se que não houve nenhum pico de temperatura da água. Espera-se um pico de geração de calor metabólico no instante de máximo crescimento da biomassa (Mitchell e Meien, 2000; Mitchell et al., 2000; Mitchell et al., 2003), o qual poderia se refletir na temperatura da água de encamisamento, caso a transferência de calor fosse limitada.

A partir desta observação pode-se concluir que a utilização de um modelo isotérmico para descrever o biorreator é adequada.

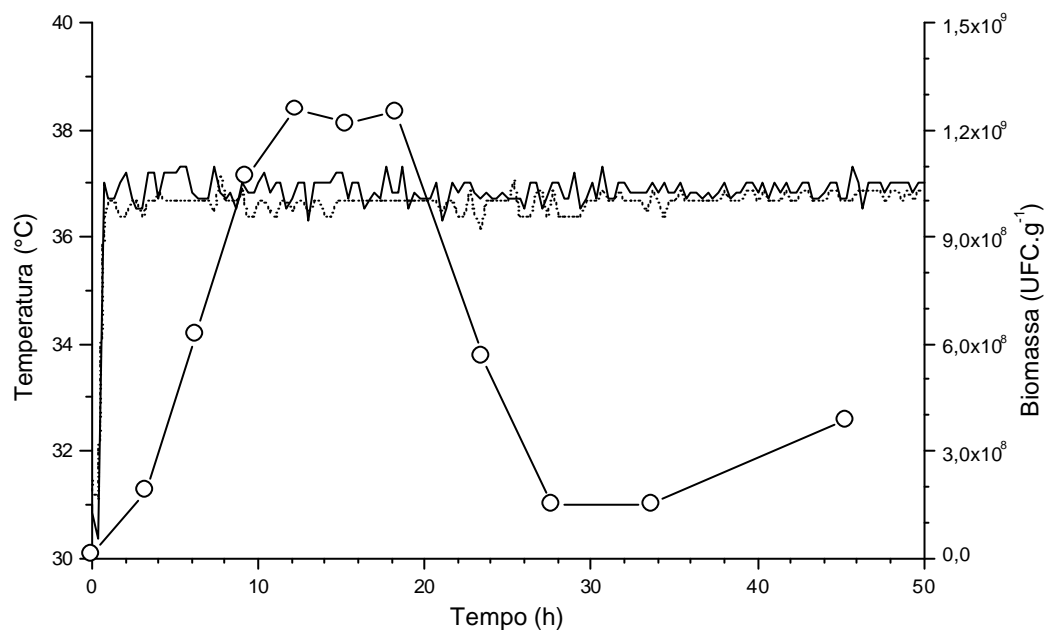


Figura 4.5: Temperatura de entrada e saída da água de encamisamento.
 Linha pontilhada: Temperatura na entrada; Linha contínua: Temperatura na saída;
 Linha contínua com círculos: Biomassa

4.4 Umidade do leito ao longo dos cultivos

A umidade do leito é muito importante em CES. A Figura 4.6 apresenta os resultados obtidos para este parâmetro durante os cultivos. A umidade do leito manteve-se estável dentro

de uma faixa estreita, entre 85% e 88%. Algumas considerações utilizadas nos modelos desenvolvidos baseiam-se na constância da umidade do leito.

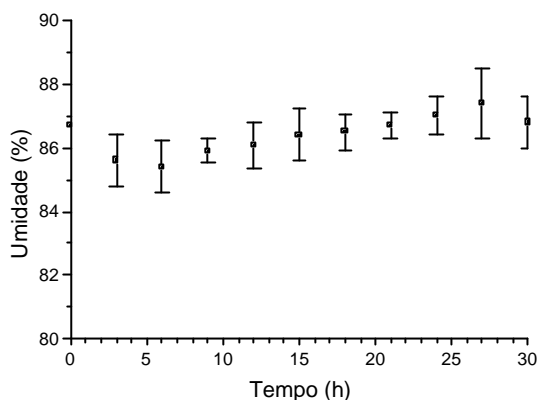


Figura 4.6: Evolução da umidade no meio de cultivo. Resultados são a média de três experimentos.

4.5 Observações gerais durante os cultivos

Vários aspectos interessantes do processo puderam ser observados, de forma basicamente qualitativa, durante os experimentos.

Ao início dos experimentos, o substrato apresentava-se como uma pasta úmida, porém consistente. Ao longo do cultivo, entretanto, o substrato foi se tornando mais liquefeito, apesar de o teor de umidade manter-se praticamente inalterado.

Esta alteração de aspecto do substrato pode ser explicada pela ação das enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases, proteases), que hidrolisaram componentes do RIFS, reduzindo sua capacidade de retenção de água. O microrganismo *Bacillus circulans* BL53 é sabidamente produtor destas enzimas (Heck, 2001 e 2005).

Conforme Mitchell et al (2000), estas alterações estruturais do substrato são comuns em CES, e, no caso de trabalhos de modelagem do processo, pode ser necessário levar este fato em consideração. Uma consequência desta alteração é a redução dos espaços vazios no

meio de cultivo (porosidade), o que, segundo os mesmos autores, prejudicaria a transferência de oxigênio.

Os extratos produzidos a partir das amostras do cultivo apresentaram certa viscosidade, o que, segundo Mitchell e Lonsane (1992), representa inclusive uma desvantagem comum em CES, que pode trazer dificuldades no processamento *downstream*. Entretanto, Heck (2005) purificou a enzima xilanase a partir deste mesmo extrato, utilizando procedimentos de precipitação fracionada com sulfato de amônio, cromatografia e gel-filtração. Nenhuma menção foi feita a dificuldades encontradas devido à viscosidade do extrato.

4.6 pH do meio de cultivo

Foi observada variação significativa no pH do meio de cultivo ao longo dos experimentos (Figura 4.7). O inóculo, produzido em meio líquido LB, chegava ao final da incubação com pH entre 7,5 e 8,0. Após a inoculação, o cultivo iniciava-se com pH do meio em 6,5. Após aproximadamente 10 horas de cultivo, nas quais o pH foi estável, verificou-se sistematicamente a queda do pH do meio para valores próximos a 5,5. Cabe ressaltar que a natureza do substrato, sólido e de composição complexa, impede o controle do pH como realizado em cultivos submersos (Prior et al., 1992).

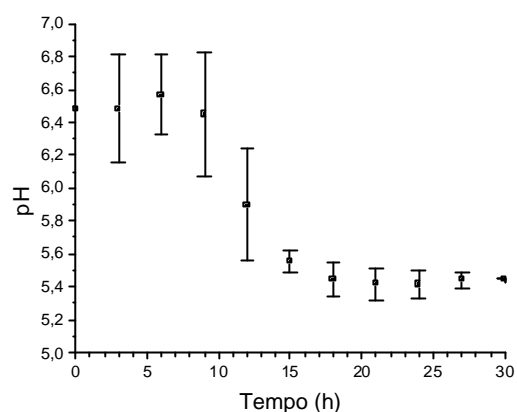


Figura 4.7: Variação do pH ao longo dos cultivos. Resultados são a média de três experimentos.

4.7 Quantificação de biomassa por contagem em placas

Paralelamente à queda de pH, observou-se também, em todos os experimentos, que a contagem de UFC no meio de cultivo atingia um máximo após aproximadamente 15 horas de cultivo, e então passava a declinar, conforme se observa na Figura 4.8. Há certa variabilidade nos resultados, mas pode-se distinguir claramente que a biomassa atingiu um valor máximo a aproximadamente 15 horas de cultivo, passando a um declínio pouco depois.

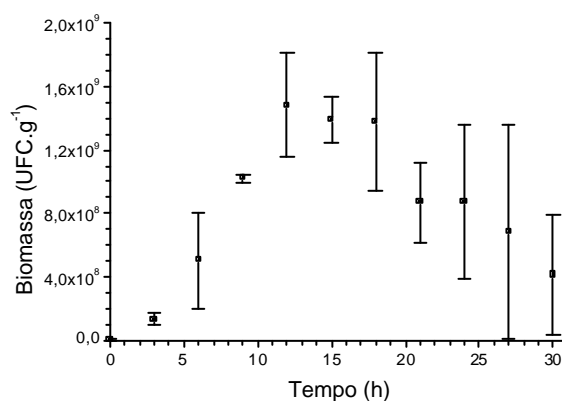


Figura 4.8: Evolução da biomassa ao longo dos cultivos. Resultados são média de três experimentos.

Unindo os gráficos das Figuras 4.7 e 4.8, pode-se visualizar como a queda do pH está associada ao crescimento do microrganismo, conforme preconiza a literatura (Figura 4.9).

Estas quedas no pH e na concentração de biomassa não eram esperados, mas repetiram-se em todos os experimentos, e então buscou-se possíveis explicações para o fenômeno.

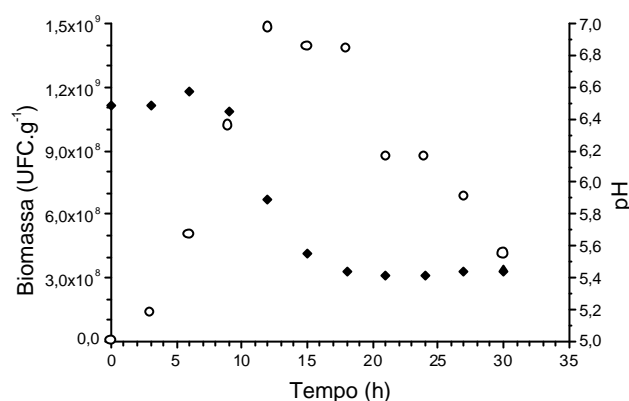


Figura 4.9: Evolução do pH e da concentração de biomassa ao longo dos cultivos.
 ○ = biomassa (UFC.g⁻¹); ♦ = pH
 Resultados são a média de três experimentos.

A queda no pH poderia inibir o crescimento do microrganismo, mas o pH alcançado (5,5) não seria capaz de causar morte celular.

É também pouco provável que a carência de algum nutriente essencial tenha causado este fenômeno. Havia ainda grande quantidade de fibra não consumida, o que garante fonte de carbono e nitrogênio (proteína). Porém a biodisponibilidade destes recursos não pode ser garantida. Por outro lado, ainda, devido à perda de estrutura da fibra, é provável que a transferência de oxigênio no meio de cultivo tenha se tornado limitante.

Vários micronutrientes são fornecidos pela adição do meio mineral. Alguns destes sais são pouco solúveis, como o CaCl_2 e o FeCl_3 , e poderiam estar presentes no meio em concentração de fato menor que a desejada. Entretanto, outros trabalhos utilizando bactérias do gênero *Bacillus* não se preocupam em fornecer tantos micronutrientes minerais ao microrganismo (Paavilainen et al., 1995; Asensi et al., 1997; Paavilainen et al., 1999).

A explicação mais provável para a queda da biomassa parece ser a produção de algum metabólito tóxico durante o cultivo. Paavilainen et al. (1995 e 1999) estudaram as rotas metabólicas de *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* e concluíram que a utilização de glicose ocorria quase que exclusivamente (90-93%) pela rota de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), sendo que o piruvato formado era convertido principalmente a ácido acético e fórmico. Asensi et al. (1997) identificaram que o ácido acético tem efeito bactericida *in vitro* sobre *Bacillus subtilis*, uma espécie próxima ao *B. circulans*. Este efeito é dependente do pH, sendo que, em pH 5,5, uma concentração de 17,4 μM (1 mg.L^{-1}) já produziu ação bactericida *in vitro*, enquanto que em pH 6 esta mesma concentração não se apresenta tóxica. Os autores procuraram explicar o efeito pela alteração do pH intracelular, causada pela entrada de moléculas de ácido não-dissociadas pela membrana, as quais se dissociam no ambiente neutro do citoplasma, reduzindo o pH interno da célula.

De fato, análise em extratos de um dos cultivos apontou a produção de acetato durante a fase de crescimento, chegando à concentração de $1,86 \text{ g.L}^{-1}$ no extrato aquoso (correspondendo a $3,71 \text{ g.kg}^{-1}$ no leite do biorreator) às 18 horas de cultivo, momento em que também se iniciou a queda da contagem de microrganismos, conforme Figura 4.10.

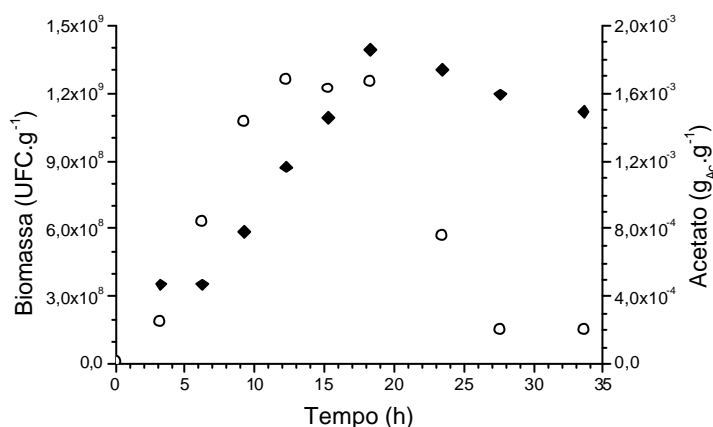


Figura 4.10: Comparação entre concentração de biomassa e de ácido acético.
○ = biomassa (UFC.g⁻¹); ♦ = acetato (g.kg⁻¹) no leite.

Cabe ressaltar, porém, que a queda na concentração de biomassa não é acompanhada de alteração na tendência da curva de produção de CO₂, como seria esperado, uma vez que se afirma relação entre produção de gás carbônico e crescimento microbiano. Esta discrepância conduz à idéia de possíveis erros de amostragem no biorreator. Biorreatores de tambor agitado têm sido tradicionalmente estudados como sistemas homogêneos, mas cultivos sólidos, por definição, caracterizam-se por heterogeneidade do meio.

O microrganismo poderia estar se desenvolvendo mais rapidamente junto às paredes do biorreator, numa fina camada (aproximadamente 3mm) formada pela fibra no início do cultivo, e mais lentamente no *bulk* do leito, onde era realizada a amostragem. Esta camada de parede poderia ter melhor acesso ao oxigênio. Porém, ao longo dos cultivos percebeu-se que a fibra perdia a capacidade de aderir às paredes do biorreator, desaparecendo a camada de parede.

Uma outra possibilidade levantada para explicar o fenômeno seria a formação de aglomerados de microrganismos não desmanchados com a agitação no sonicador. Estes aglomerados dariam origem a apenas uma colônia nas placas de contagem, ainda que formados por um número maior de células.

4.8 Açúcares Redutores

A variação da concentração de açúcares redutores no meio de cultivo acompanhou, aproximadamente, o desenvolvimento da biomassa, conforme pode ser observado na Figura 4.11. Desta observação conclui-se que a hidrólise dos polissacarídeos presentes no RIFS ocorre a velocidade maior que o consumo dos açúcares redutores formados pelo metabolismo bacteriano.

Apesar de não ter sido realizada a quantificação das enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases) no meio, pode-se inferir, pela geração de açúcares redutores, que a produção

daquelas está associada ao crescimento, como é citado em alguns trabalhos na literatura (Mitchell, 1992b; Matcham, 1985; Smits et al., 1996).

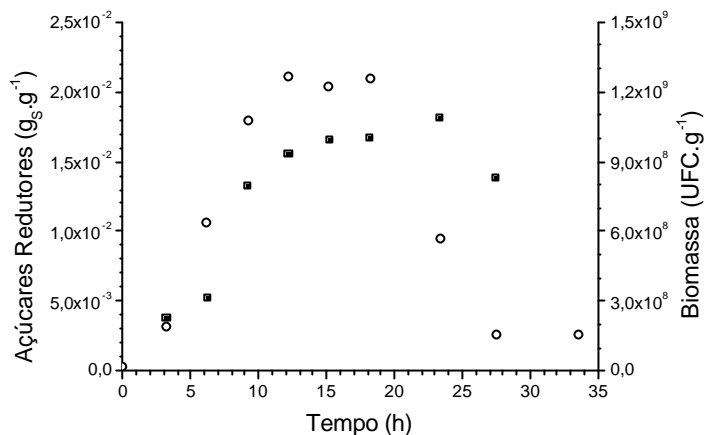


Figura 4.11: Comparação entre concentração de biomassa e de açúcares redutores.
○ = biomassa (UFC.g⁻¹); ■ = açúcares redutores (g.kg⁻¹) no leite.

4.9 Modelagem do crescimento microbiano

A queda na quantidade de biomassa medida, após algumas horas de cultivo, prejudica o ajuste da curva de crescimento aos modelos normalmente utilizados em trabalhos de modelagem de CES. O modelo logístico obtém resultados satisfatórios somente nas primeiras 20 horas, ou seja, antes da queda da biomassa (Figura 4.12), uma vez que não é capaz de descrever este tipo de comportamento. Os parâmetros m e X_{max} assim estimados foram:

$$m = 0,780 \pm 0,0386 \text{ h}^{-1} \quad X_{max} = 1,40 \cdot 10^9 \pm 6,07 \cdot 10^7 \text{ UFC.g}^{-1}$$

Os demais modelos citados por Mitchell et al. (2004) apresentaram-se ainda menos adequados para descrever a cinética observada, pois nenhum deles inclui um termo de morte microbiana.

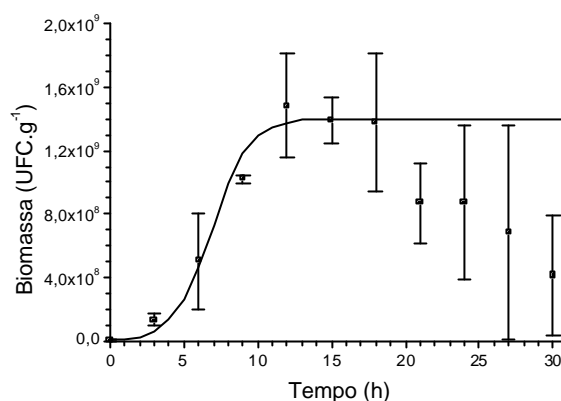


Figura 4.12: Ajuste dos dados de biomassa ao modelo logístico.

■ = dados experimentais; Linha = previsão do modelo

4.10 Estimação da biomassa através da taxa de produção de CO₂

Os cromatogramas obtidos para o CO₂ tiveram resolução satisfatória. Um exemplo está apresentado na Figura 4.13.

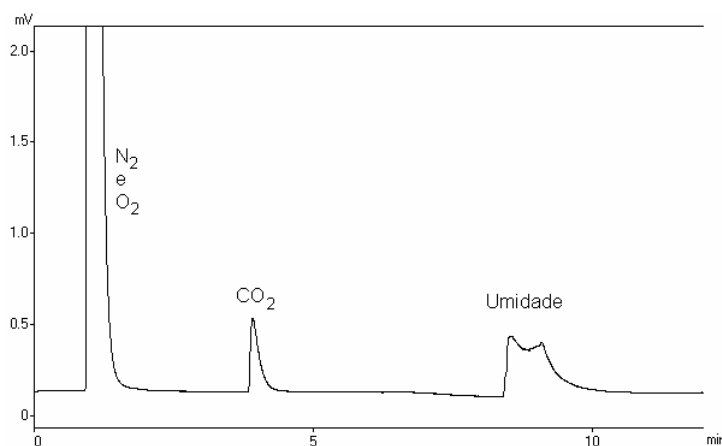


Figura 4.13: Exemplo de cromatograma obtido na análise de CO₂ no ar de saída do biorreator.

A Figura 4.14 mostra os resultados obtidos para a taxa de produção de CO₂ durante os cultivos. As curvas de CPR foram bastante reprodutíveis e seguiram o mesmo padrão apresentado por outros trabalhos encontrados na literatura (Sato et al., 1983; Kim et al., 1985; Smits et al., 1996; Koutinas et al., 2003; Prado et al., 2004): um rápido aumento inicial,

atingindo máximo com aproximadamente 8 horas de cultivo (próximo à metade da fase de crescimento), seguido de uma lenta redução, que se prolongava por dias. Em alguns experimentos, pode-se acompanhar esta lenta redução na taxa de produção de CO₂, que continuou por pelo menos mais seis dias, até atingir praticamente zero.

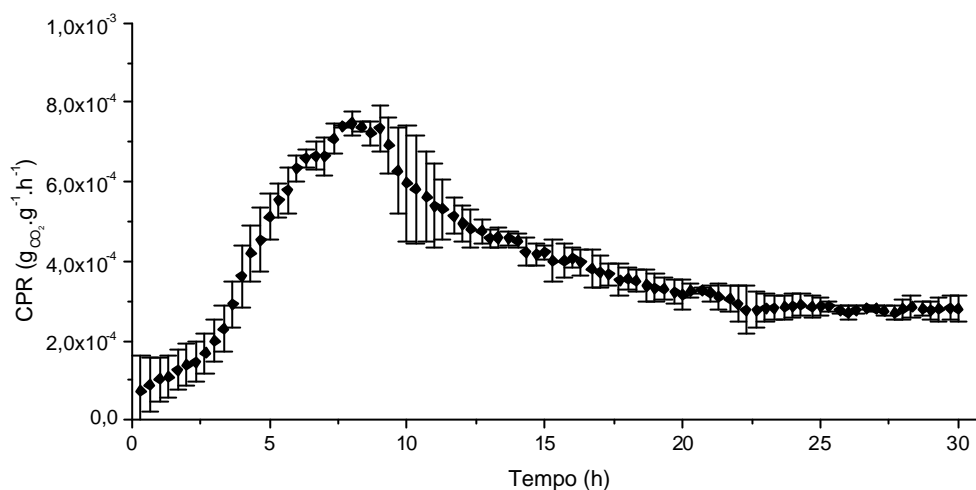


Figura 4.14: Taxa de produção de CO₂.
Resultados são média de três experimentos.

Os resultados de uma triplicata do cultivo em BCHA foram utilizados para estimar os parâmetros do modelo representado pela Equação 3.2, que relaciona a produção de CO₂ à biomassa.

Os valores obtidos para os parâmetros foram:

$$Y_{CO_2/X} = 2,76 \cdot 10^{-12} \text{ g}_{CO_2} \cdot \text{UFC}^{-1}$$

$$m_{CO_2} = 2,36 \cdot 10^{-13} \text{ g}_{CO_2} \cdot \text{UFC}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Os gráficos da Figura 4.15 comparam os resultados preditos pelo modelo, a partir dos dados de produção de CO₂, com a biomassa medida para três experimentos. Percebe-se que o modelo só conseguiu descrever satisfatoriamente a evolução da curva de biomassa durante as primeiras 20h de cultivo, ou seja, até a fase estacionária. Após este período, foi observada queda na contagem de células viáveis, o que o modelo utilizado não foi capaz de descrever.

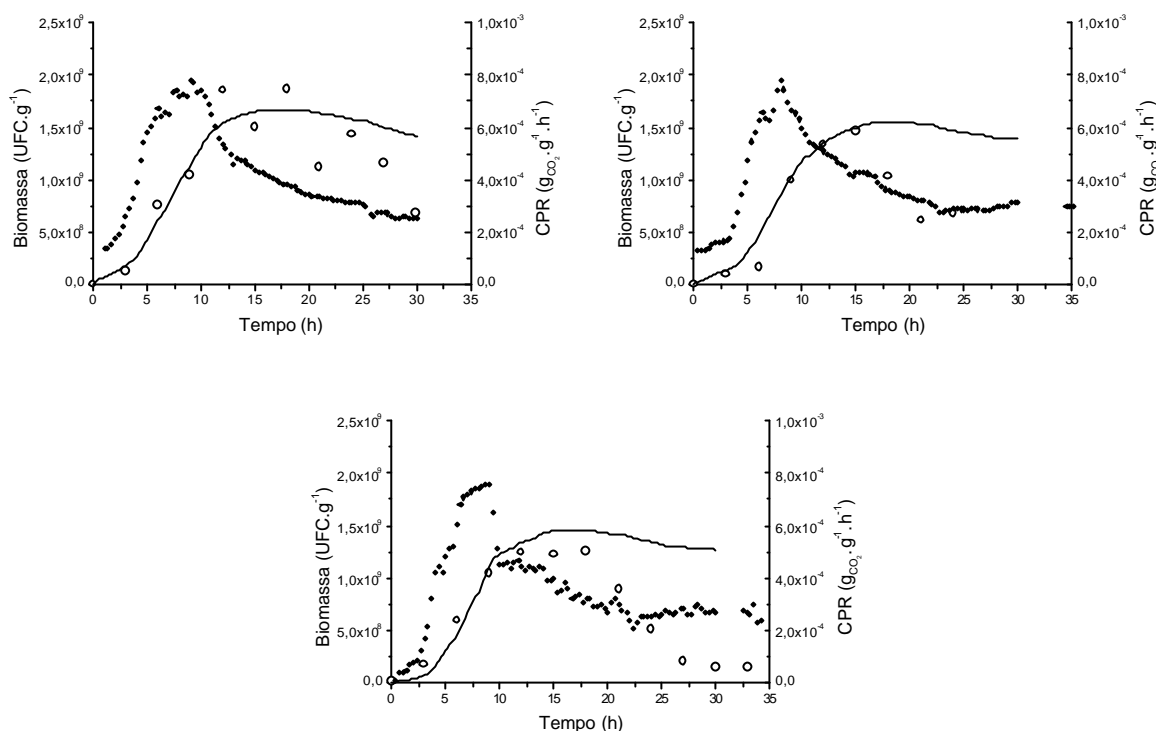


Figura 4.15: Resultados da estimação de biomassa a partir da taxa de produção de CO₂, para três experimentos. Linha sólida = previsão do modelo (UFC.g⁻¹); ○ = biomassa medida (UFC.g⁻¹); ♦ = taxa de produção de CO₂ (g_{CO₂}.g⁻¹.h⁻¹).

Este é um resultado comum nos trabalhos que buscam estimar biomassa em CES a partir de dados de atividade metabólica (produção de CO₂, consumo de O₂, atividade enzimática). Mitchell (1992) já apontava a dificuldade de estimar a biomassa a partir dos dados de produção de CO₂ após a fase de crescimento exponencial.

Matcham et al. (1984) mostraram que a atividade da enzima laccase é bom parâmetro para estimação de biomassa de *Agaricus bisporus* apenas nas primeiras 56h de cultivo.

Smits et al. (1996), utilizando também um modelo do tipo Luedeking-Piret para estimar biomassa a partir da produção de CO₂ e a produção de O₂, encontraram desvios entre a estimativa da equação e as medidas experimentais nos pontos de baixa e alta concentração de biomassa. Os primeiros, devido à menor dimensão, têm pouco efeito sobre a estimação da biomassa ao longo do cultivo e foram atribuídos a erro experimental. Entretanto, os autores não encontraram explicação para os desvios nas altas concentrações de biomassa e sugeriram, para trabalhos futuros, estender a equação para compensar tais desvios.

4.11 Desenvolvimento de modelo cinético

A partir dos dados experimentais de biomassa, açúcares redutores, acetato e produção de CO₂, foi desenvolvido um modelo cinético para descrever a evolução destas grandezas.

As seguintes observações puderam ser realizadas a partir dos resultados obtidos experimentalmente:

- A curva de crescimento do microrganismo atingiu um máximo após aproximadamente 15 horas de cultivo, passando a declinar.
- Sugere-se que este declínio esteja relacionado ao acúmulo de acetato no meio de cultivo, estando este fenômeno de acordo com outros trabalhos da literatura.
- A concentração de açúcares redutores no meio aumenta juntamente com a biomassa, sendo fruto da atividade enzimática do microrganismo.
- O leite não sofre alterações significativas de massa seca e umidade ao longo do cultivo.

Com base nestas observações, foi desenvolvido o modelo, cujas principais considerações são:

- 1) Microrganismo possui cinética de crescimento do tipo Monod, sendo os açúcares redutores seu substrato limitante.
- 2) Os açúcares redutores são consumidos pelos microrganismos e, concomitantemente, produzidos pela atividade enzimática (xilanases, celulases) destes.
- 3) Os produtos finais do metabolismo microbiano considerados são o gás carbônico e o ácido acético, sendo que este possui efeito bactericida.
- 4) Leite do biorreator não sofre alterações significativas de massa seca, umidade ou atividade de água ao longo do cultivo.
- 5) Influências do pH sobre a velocidade de crescimento e do metabolismo microbiano sobre o pH são desprezadas.

Com base nestas considerações, foi desenvolvido o equacionamento do modelo. A biomassa cresce dependente do nutriente limitante (açúcares redutores), com a velocidade específica de inativação celular dependente da concentração de acetato no meio.

$$\frac{dX}{dt} = \mathbf{m} \cdot X - k_D \cdot X \quad (4.1)$$

$$\mathbf{m} = \mathbf{m}_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (4.2)$$

$$k_D = k_1 \cdot Ac^n \quad (4.3)$$

Os açúcares redutores são consumidos pelo microrganismo e produzidos pela sua atividade enzimática, que é considerada proporcional somente à concentração de biomassa. Portanto, os polissacarídeos hidrolisados por esta atividade enzimática são considerados em excesso, o que gera uma simplificação da equação da velocidade de reação (A).

$$\frac{dS}{dt} = -Y_{S/X} \cdot \mathbf{m} \cdot X + A \quad (4.4)$$

$$A = k_2 \cdot X^p \quad (4.5)$$

O acetato é produzido pelo metabolismo microbiano, mas possui efeito bactericida descrito pela Equação 4.3. A curva experimental de acetato, entretanto, apresentou queda na concentração da substância a partir das 18 horas de cultivo (Figura 4.10). Para tentar explicar este fenômeno, foi introduzido um termo para representar esta redução da quantidade de acetato no meio, sendo o efeito proporcional à inibição causada pelo acetato no crescimento.

$$\frac{dAc}{dt} = Y_{Ac/X} \cdot \mathbf{m} \cdot X - \mathbf{a} \cdot k_D \cdot X \quad (4.6)$$

Este termo \mathbf{a} mostrou-se indispensável para que o modelo conseguisse se aproximar dos dados experimentais.

O gás carbônico é produzido pelo metabolismo microbiano, estando associado ao crescimento e à manutenção.

$$\frac{dC^{CO_2}}{dt} = CPR = Y_{CO_2/X} \cdot \frac{dX}{dt} + m_{CO_2} \cdot X \quad (4.7)$$

Aqui a utilização da Equação 2.54 seria justificada, e provavelmente até mais indicada. Entretanto, este balanço de CO₂ não influencia os demais, e, como será explicado mais adiante o uso da Equação 4.7 permite melhores comparações com os resultados obtidos para a estimação da biomassa a partir da taxa de produção de CO₂.

4.12 Estimação dos parâmetros do modelo cinético

Os parâmetros $Y_{CO_2/X}$ e m_{CO_2} foram estimados separadamente dos demais parâmetros do modelo, utilizando a predição de biomassa obtida com o modelo. Este procedimento facilitou a resolução do problema de estimação, sem prejuízos à qualidade da solução, uma vez que o balanço de CO₂ não influencia os demais. Por este motivo, a discussão sobre a estimação dos parâmetros também iniciará pelos balanços de biomassa, açúcares redutores e acetato; para depois lidar com o balanço de CO₂.

Assim, inicialmente se tinha um sistema de três equações diferenciais (Equações 4.1, 4.4 e 4.6) e nove parâmetros a estimar, que são apresentados na Tabela 4.1.

No processo de estimação, percebeu-se que, mesmo impondo limites máximos e mínimos para os parâmetros, era possível obter vários conjuntos de valores diferentes para os nove parâmetros, sendo que o modelo apresentava resposta similar em todos os casos, ou seja, erros de predição semelhantes.

Tabela 4.1: Parâmetros do modelo cinético presentes nos balanços de biomassa, açúcares redutores e acetato.

Parâmetro	Significado
m_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento
K_S	Constante de saturação de Monod
k_I	Taxa de reação de inativação celular devido ao acetato
n	Ordem da reação de morte celular em relação ao acetato
$Y_{S/X}$	Razão de consumo de substrato por biomassa formada
k_2	Taxa de reação de hidrólise de polissacarídeos
p	Ordem da reação de hidrólise de polissacarídeos em relação à biomassa
$Y_{Ac/X}$	Razão de produção de acetato por biomassa formada
a	Parâmetro de proporcionalidade entre redução da concentração de acetato e taxa de morte celular

A análise realizada com o algoritmo SELEST revelou alto grau de correlação entre os parâmetros, ou seja, imprecisões da estimação de um parâmetro são “compensadas” por imprecisões nas estimativas dos demais, de forma que o modelo forneça uma resposta que, com os dados disponíveis, parece satisfatória. A reduzida quantidade de dados experimentais disponíveis é que permite esta distorção e prejudica a estimação. Esta carência de dados aproveitáveis é explicada por problemas enfrentados durante os experimentos, descritos no Apêndice.

O algoritmo apontou que o parâmetro m_{max} , por exemplo, possui grande efeito sobre as saídas do modelo. Isto é esperado, uma vez que a velocidade específica de crescimento m que aparece nas três equações diferenciais, é diretamente proporcional a m_{max} . Entretanto, a alta correlação deste parâmetro com os demais faz com que sua identificabilidade seja a mais baixa e ele não possa ser estimado com precisão.

Buscando melhorar a estimativa dos parâmetros, decidiu-se fixar o valor de m_{max} em $0,78 \text{ h}^{-1}$, valor este que fora obtido anteriormente no ajuste ao modelo de crescimento

logístico, para estimar somente os outros oito parâmetros, com mais precisão. Esta medida surtiu efeito, e sete parâmetros puderam ser estimados com boa precisão (Tabela 4.2). Apenas o parâmetro K_S não pode ser refinado, permanecendo com uma estimativa grosseira. De qualquer forma, este é o parâmetro de menor efeito sobre as saídas do sistema (Tabela 4.3), o que é uma garantia de que, ainda assim, as incertezas do modelo estão minimizadas.

Tabela 4.2: Parâmetros estimados para o modelo cinético

Parâmetro	Valor	Unidade
m_{max}	0,78	h^{-1}
K_S	0,674	$g_S \cdot g^{-1}$
k_I	$0,154 \pm 1,06 \cdot 10^{-2}$	h^{-1}
n	$1,50 \pm 6,84 \cdot 10^{-2}$	
$Y_{S/X}$	$9,75 \cdot 10^{-8} \pm 1,27 \cdot 10^{-9}$	$g_S \cdot UFC^{-1}$
k_2	$7,10 \pm 0,941$	$g_S \cdot h^{-1}$
p	$1,01 \pm 3,13 \cdot 10^{-3}$	
$Y_{Ac/X}$	$1,02 \cdot 10^{-9} \pm 6,97 \cdot 10^{-11}$	$g_{Ac} \cdot UFC^{-1}$
a	$8,92 \cdot 10^{-10} \pm 7,26 \cdot 10^{-11}$	$g_{Ac} \cdot UFC^{-1}$

Tabela 4.3: Efeito dos parâmetros sobre as saídas do modelo cinético.

Parâmetro	Efeito
p	0,8318
k_2	0,3615
n	0,3593
$Y_{Ac/X}$	0,0346
k_I	0,0275
$Y_{S/X}$	0,0244
a	0,0208
K_S	0,0151

A Tabela 4.4 representa a matriz de correlação dos parâmetros estimados com o algoritmo SELEST. O diagnóstico final foi de que os parâmetros são muito correlacionados.

Ressalte-se ainda que, caso K_S ou m_{max} também tivessem sido estimados, as correlações aumentariam consideravelmente.

O parâmetro p foi o que apresentou o menor grau de correlação em relação aos demais. Aliando-se isso ao seu alto efeito sobre as saídas do modelo, este parâmetro torna-se o de maior identificabilidade. Além disso, o valor de p , praticamente igual a 1, mostra que a velocidade da reação de hidrólise dos polissacarídeos é controlada pela transferência de massa no leito.

Os parâmetros k_2 e $Y_{S/X}$ possuem alta correlação pois, uma vez que o valor de p é quase igual a 1 (e p é o parâmetro de maior identificabilidade), eles se contrabalançam na equação dos açúcares redutores. O aumento de um implica o aumento do outro, para manter o equilíbrio. Isto remete a um problema já na proposição do modelo, que não foi previsto. É semelhante a explicação para o caso do par $Y_{Ac/X}$ e a , fortemente correlacionados por se compensarem no balanço de acetato.

Já k_I e n , que também apresentam forte correlação, possuem dependência inversa: os aumentos de um acarretam redução do outro. A causa da forte correlação é o fato e o modo de ambos participarem da equação que define a taxa de morte, k_D .

Tabela 4.4: Matriz de correlação para os parâmetros estimados do modelo cinético

	p	k_2	n	$Y_{Ac/X}$	k_I	$Y_{S/X}$	a
p	1	0,150	0,028	0,185	-0,049	0,212	0,190
k_2	0,150	1	-0,525	0,377	0,544	0,998	0,381
n	0,028	-0,525	1	-0,829	-0,979	-0,514	-0,826
$Y_{Ac/X}$	0,185	0,377	-0,829	1	0,812	0,380	0,995
k_I	-0,049	0,544	-0,979	0,812	1	0,531	0,799
$Y_{S/X}$	0,212	0,998	-0,514	0,380	0,531	1	0,385
a	0,190	0,381	-0,826	0,995	0,799	0,385	1

Os resultados obtidos na simulação do modelo podem ser confrontados com os dados experimentais na Figura 4.16. Percebe-se que o modelo proposto apresentou boa concordância com os dados experimentais, conseguindo descrever de forma satisfatória o comportamento das variáveis biomassa, açúcares redutores e acetato no sistema.

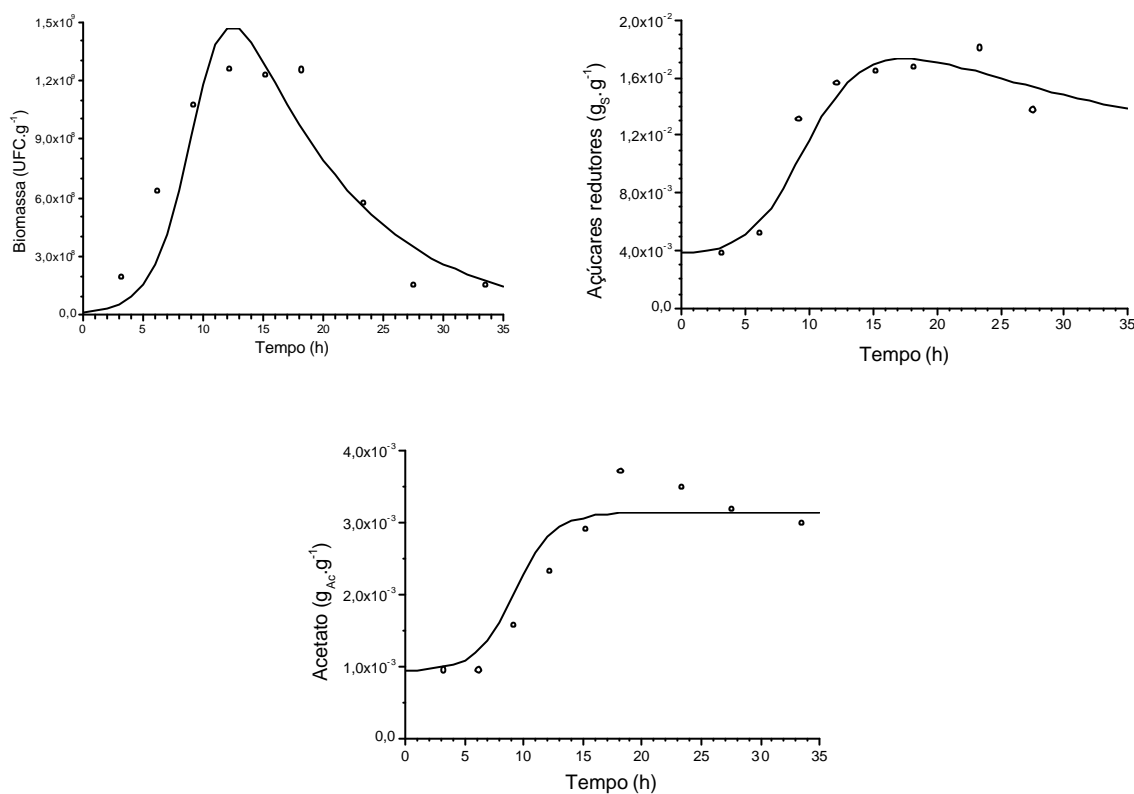


Figura 4.16: Predições do modelo desenvolvido em comparação com os dados experimentais.
○ = Dados experimentais; Linhas = Predições do modelo.

As predições da biomassa do modelo cinético, obtidas na primeira fase da estimação, conforme foi descrito, foram utilizadas para estimar os parâmetros $Y_{CO_2/X}$ e m_{CO_2} . Os valores obtidos constam na Tabela 4.5. Percebe-se que ambos divergem ligeiramente dos valores estimados diretamente a partir dos dados experimentais.

Tabela 4.5: Parâmetros $Y_{CO_2/X}$ e m_{CO_2} estimados para o modelo cinético.

$Y_{CO_2/X}$	$2,11 \cdot 10^{-12}$	$g_{CO_2} \cdot UFC^{-1}$
m_{CO_2}	$4,92 \cdot 10^{-13}$	$g_{CO_2} \cdot UFC^{-1} \cdot h^{-1}$

A Figura 4.17 apresenta a comparação entre a produção de CO_2 verificada experimentalmente e a predição feita pelo modelo. A curva obtida não acompanhou satisfatoriamente as tendências desenvolvidas pela curva experimental.

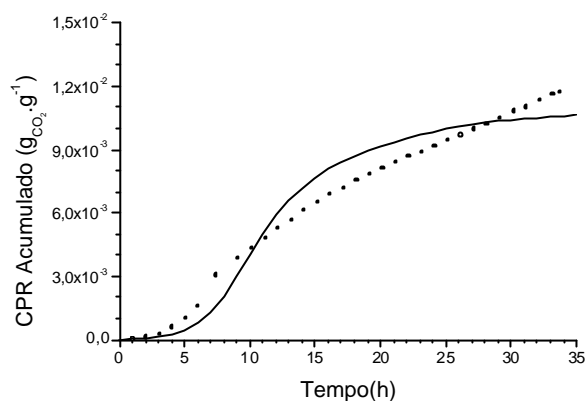


Figura 4.17: Predições do modelo com relação à produção de CO_2 .
° = Dados experimentais; Linhas = Predições do modelo.

A dificuldade em descrever satisfatoriamente a produção de CO_2 pode ser decorrência direta do ainda limitado poder de caracterização dos sistemas em CES. A descrição ofertada pelo modelo é bastante simples em comparação com a complexidade do processo.

Possíveis problemas difusionais, causados pela alteração da estrutura do RIFS durante o cultivo, poderiam levar à limitação de oxigênio no processo. Isto, juntamente com a composição complexa do meio de cultivo, implica em diferentes rotas metabólicas utilizadas pelo microrganismo, as quais não poderiam ser corretamente consideradas no modelo pelas próprias limitações analíticas ainda presentes nos estudos de processo de CES.

Com os parâmetros $Y_{\text{CO}_2/X}$ e m_{CO_2} , aqui obtidos para o modelo cinético, foi realizada a estimação indireta da biomassa, como comparação ao resultado apresentado anteriormente, quando esses parâmetros foram estimados diretamente a partir das medições experimentais de biomassa. A Figura 4.18 apresenta os resultados obtidos.

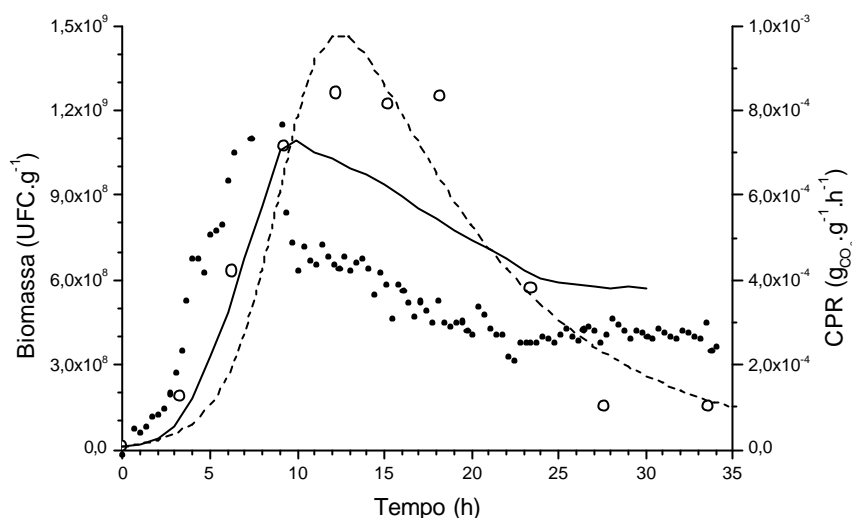


Figura 4.18: Estimação de biomassa através dos parâmetros $Y_{CO_2/X}$ e m_{CO_2} do modelo cinético.

○ = Medições de biomassa; ♦ = Medições de CPR.

Linha pontilhada = Biomassa predita pelo modelo cinético.

Linha contínua = Biomassa estimada através dos parâmetros $Y_{CO_2/X}$ e m_{CO_2} do modelo cinético.

De acordo com o procedimento utilizado para a estimação dos parâmetros $Y_{CO_2/X}$ e m_{CO_2} , a biomassa estimada deveria coincidir com aquela predita pelo modelo cinético. Entretanto, os resultados foram pouco satisfatórios, o que pode ser decorrência da já mencionada desvinculação do balanço de CO_2 em relação aos demais presentes no modelo. Além disso, o meio sólido contém várias fontes de carbono diferentes, cujo consumo gera CO_2 , mas apenas o teor de açúcares redutores foi monitorado.

Está claro, assim, que o modelo proposto pode ser aperfeiçoado. Além da necessidade de mais dados experimentais, o modelo ainda carece de relações estequiométricas para melhor descrever o sistema. As produções de acetato e CO_2 , conforme o modelo, ocorrem sem haver uma relação direta com o consumo de substrato.

O próprio substrato, que é complexo, constituído de polissacarídeos e seus derivados por hidrólise, é apresentado de forma bastante simplificada: açúcares redutores derivados de polissacarídeos presentes em excesso. A caracterização extremamente simplificada do

substrato, ou até a falta de caracterização, é comum nos modelos propostos para CES, o que nos remete a uma das desvantagens do CES em relação ao CSm: a dificuldade na quantificação de parâmetros importantes do cultivo (Mitchell e Lonsane, 1992; Pandey, 2003).

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

Apesar de os cultivos em estado sólido apresentarem, por definição, heterogeneidades, os testes de mistura realizados mostraram que o biorreator utilizado realiza uma homogeneização adequada para os propósitos do trabalho. Os poucos trabalhos encontrados na literatura que também utilizavam este tipo de biorreator adotaram igualmente a consideração de homogeneidade do leito.

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. A literatura carece do desenvolvimento de trabalhos que apontem componentes da biomassa bacteriana de fácil medição e que sejam adequados na estimativa indireta de biomassa.

Neste trabalho, a estimativa de biomassa através da produção de CO_2 apresentou bons resultados nas primeiras horas do cultivo, mas a queda na contagem de microrganismos não foi acompanhada por similar queda na produção de CO_2 . De qualquer forma, é sempre

esperado que a estimação da biomassa através da atividade metabólica perca eficiência ao longo do tempo nos experimentos, quer pela natureza cumulativa do erro de estimação, quer por mudanças metabólicas do microrganismo, que não são corretamente detectadas quando se tem um único parâmetro mensurável.

Alguns trabalhos, em geral em CSm, já procuram utilizar um maior número de medições *on-line* simultaneamente para gerar uma estimativa melhor da biomassa. A obtenção de tais medições depende do desenvolvimento de sensores adequados, e a tecnologia disponível para CES ainda está aquém da utilizada em CSm.

O modelo cinético desenvolvido para representar o processo apresentou resultados satisfatórios, realizando boas predições das concentrações de biomassa, açúcares redutores e acetato no meio. A predição da produção de CO₂, por outro lado, não apresentou a mesma qualidade.

Porém, ficou claro que o modelo ainda pode ser bastante aprimorado, como pela obtenção de uma maior quantidade de dados experimentais. Além disso, o estabelecimento de relações estequiométricas no processo pode tornar o modelo mais parcimonioso, reduzindo o número de parâmetros a estimar.

Cabe ressaltar que, neste trabalho, procurou-se desenvolver o conhecimento ligado a alguns dos pontos que a literatura cita como desvantagens dos CES em relação aos CSm: a pouca caracterização de aspectos de engenharia do processo, dificuldade de medição de parâmetros do processo (biomassa, substrato, produtos), cinética de reações e modelagem matemática.

Por fim, os resultados deste trabalho podem servir como guias para o desenvolvimento de novos estudos que aprofundem mais o conhecimento dos aspectos de engenharia dos cultivos em estado sólido, para que estes atinjam o mesmo nível tecnológico já alcançado pelos cultivos submersos.

O trabalho apresentado nesta dissertação serve como um primeiro esforço no sentido de desenvolver modelos não-empíricos para o cultivo em estado sólido utilizando o resíduo industrial fibroso de soja para o crescimento de bactérias. Novos estudos são possíveis a partir deste trabalho.

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.

Na estimação de biomassa, sugere-se o desenvolvimento de novos métodos indiretos de estimação, através de componentes da biomassa, que sejam aplicáveis a bactérias. A literatura cita apenas exemplos para fungos (glicosamina e ergosterol).

Medições *on-line* de O_2 , com a precisão necessária, acopladas às medições atuais de CO_2 , podem permitir uma estimação de biomassa mais precisa e robusta que a obtida atualmente.

O modelo cinético desenvolvido seria bastante aprimorado se fosse possível estabelecer uma estequiometria do processo. A própria incorporação de um balanço de oxigênio ao modelo atual pode auxiliar nesse intuito.

Um número maior de experimentos utilizando este sistema, porém variando-se as condições de cultivo (temperatura, pH inicial, umidade relativa do ar, umidade inicial do leite) pode representar uma grande evolução no modelo atual, com a incorporação de balanços de massa (água) e energia.

Referências Bibliográficas

- ANDREWS, J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.10, p.707-723, 1968.
- ASENSI, V.; PARRA, F.; FIERER, J., VALLE, E.; BORDALLO, C.; RENDUELES, P.; GASCÓN, S.; CARTON, J.A.; MARADONA, J.A.; ARRIBAS, J.M. Bactericidal effect of ADP and Acetic Acid on *Bacillus subtilis*. **Current Microbiology**, v.34, p.61-66, 1997.
- AURIA, R.; MORALES, M.; VILLEGAS, E.; REVAH, S. Influence of mold growth on the pressure drop in aerated solid state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.41, p.1007-1013, 1993.
- BAJRACHARYA, R.; MUDGETT, R.E. Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, p.2219-2235, 1980.
- BECERRA, M.; GONZÁLEZ SISO, M.I. Yeast β -galactosidase in solid-state fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.39-44, 1996.
- BELLON-MAUREL V., ORLIAC O., CHRISTEN P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, v.38 p.881-896. 2003.
- BIAGIOLA, S.I.; SOLSONA, J.A.; MILOCCO, R.H. Two different approaches for biomass estimation in batch processes. **Latin American Applied Research**, v.31, p.107-113, 2001.
- BRENAN, K.; CAMPBELL, S.; PETZOLD, L. **Numerical solution of initial-value problems in differential-algebraic equations**. New York: Elsevier, 1989.
- CARRIZALES, V.; RODRÍGUEZ, H.; SARDIÑA, I. Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v.23, p.321-333, 1981.
- CARVALHO, H.H.; JONG, E.V. de (coords.); BELLÓ, R.M.; SOUZA, R.B. de; TERRA, M.F. **Alimentos: métodos físicos e químicos de análise**. Porto Alegre: Ed.Universidade/UFRGS, 2002.
- CHAPLIN, M.F. Monosaccharides. In: CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. (Eds.) **Carbohydrate Analysis**. Oxford: IRL Press, 1986.
- COONEY, C.L.; WANG, D.I.C.; MATELES, R.I. Measurement of heat evolution and correlation with oxygen consumption during microbial growth. **Biotechnology and Bioengineering**, v.11, p.269-281, 1968.
- DUBEY A.K., SURESH C., UMESH KUMAR S., KARANTH N.G. An enzyme-linked immunosorbent assay for the estimation of fungal biomass during solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50 p.299-302. 1998.

EDGAR, T.F.; HIMMELBLAU, D.M. **Optimization of Chemical Processes**. New York: McGraw-Hill, 1988.

EIHA, N.; KOMOTO, A.; MAENOSONO, S.; WAKANO, J.Y. ; YAMAMOTO, K.; YAMAGUCHI, Y. The mode transition of the bacterial colony. **Physica A**, v.313, p.609-624, 2002.

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

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

GHILDYAL, N.P.; LONSANE, B.K.; SREEKANTIAH, K.R.; SREENIVASA MURTHY, V. Economics of submerged and solid state fermentations for the production of amyloglucosidase. **Journal of Food Science and Technology**, v.22, p.171-176, 1985.

GIBSON, A.M.; HOCKING, A.D. Advances in the predictive modeling of fungal growth in food. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.353-358, 1997.

HARDIN, M.T., HOWES, T., MITCHELL, D.A. Mass transfer correlations for rotating drum bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v.97, p.89-101, 2002.

HECK, J.X. **Aproveitamento de um resíduo industrial fibroso de soja para o desenvolvimento de um processo de cultivo semi-sólido**. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 86p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

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**. Porto Alegre: UFRGS, 2005. 147p. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

HECK, J.X.; FLÔRES, S.H.; HERTZ, P.F.; AYUB, M.A.Z. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. **Process Biochemistry**, v.40, p.107-112, 2005.

HISIGER, S.; JOLICOEUR, M. A multiwavelength fluorescence probe: Is one probe capable for on-line monitoring of recombinant protein production and biomass activity? **Journal of Biotechnology**, v.117, p.325-336, 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos**. 3.ed. São Paulo: s.n., 1985. 553p.

KIM, J.H.; HOSOBUCHI, M.; KISHIMOTO, M.; SEKI, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H.; RYU, D. Cellulase production by a solid state culture system. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p.1445-1450, 1985.

KOMOTO, A.; HANAKI, K.-i.; MAENOSONO, S.; WAKANO, J.Y.; YAMAGUCHI, Y.; YAMAMOTO, K. Growth dynamics of *Bacillus circulans* colony. **Journal of Theoretical Biology**, v. 225, p.91-97, 2003.

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

LAUKEVICS, J.J.; APSITE, A.F.; VIESTURS, U.E.; TENGARDY, R.P. Solid substrate fermentation of wheat straw to fungal protein. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p.1465-1474, 1984.

LEKHA, P.K.; LONSANE, B.K. Biomass estimation in solid state fermentation. In: PANDEY A. **Solid State Fermentation** New Delhi: Wiley, 1994. p.38-43.

LONSANE, B.K.; RAMESH, M.V. Production of bacterial thermostable α -amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. **Applied Microbiology**, v.35, p.1-56, 1990.

LONSANE, B.K. Resurgence of interest in solid-state fermentation: Reasons and justification. In: PANDEY, A. **Solid state fermentation** New Delhi: Wiley, 1994. p.11-20.

LUEDEKING, R.; PIRET, E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation – batch process at controlled pH. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, v.1, n.4, p.393-412, 1959.

MADRID, R.; FELICE, C.J. Microbial biomass estimation. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.25, p. 97-112. 2005.

MATCHAM, S.E.; JORDAN, B.R.; WOOD, D.A. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.108-112, 1985.

MITCHELL, D.A.; DOELLE, H.W.; GREENFIELD, P.F. Suppression of penetrative hyphae of *Rhizopus oligosporus* by membrane filters in a model solid-state fermentation system. **Biotechnology Techniques**, v.3, p.45-50, 1989.

MITCHELL, D.A.; LONSANE, B.K. Definition, characteristics and potential. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. **Solid Substrate Cultivation** London: Elsevier. 1992. Cap. 1, p. 1-16.

MITCHELL, D.A. Microbial basis of processes. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. **Solid Substrate Cultivation** London: Elsevier, 1992a. Cap. 2, p.17-28.

MITCHELL, D.A. Biomass determination in solid-state cultivation. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. **Solid Substrate Cultivation** London: Elsevier. 1992b. Cap. 4, p.53-63.

MITCHELL, D.A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.68, p.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**, v.35, p.1211-1225, 2000b.
- MITCHELL, D.A.; MEIEN, O.F. von. Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the Zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, n.2, p.127-135, 2000.
- MITCHELL, D.A.; MEIEN, O.F. von; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.137-147, 2003.
- 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**, v.17, p.15-26, 2004.
- MUDGETT, R.E.; PARADIS, A.J. Solid-state fermentation of natural birch lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.7, p.150-154, 1985.
- NAGEL, F.-J.J.I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M.S.N.; RINZEMA, A. Temperature control in a continuously mixed biorreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.72, n.2, p.219-230, 2001.
- OLSSON, P.A.; LARSSON, L.; BAGO, B.; WALLANDER, H.; AARLE, I.M. van. Ergosterol and fatty acids for biomass estimation of mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.159, p.1–10, 2003.
- OOIJKAAS, L.P.; TRAMPER, J.; BUITELAAR, R.M. Biomass estimation of *Coniothyrium minutans* in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, p.480-486, 1998.
- PAAVILAINEN, S.; MÄKELÄ, M.; KORPELA, T. Proton and carbon inventory during the growth of an alkaliphilic *Bacillus* indicates that protons are independent from acid anions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, n.5, p.429-433, 1995.
- PAAVILAINEN, S.; OINONEN, S.; KORPELA, T. Catabolic pathways of glucose in *Bacillus circulans* var. *alcalophilus*. **Extremophiles**, v.3, p.269-276, 1999.
- PADMANABHAN, S.; RAMANA MURTHY, M.V.; LONSANE, B.K. Potential of *Aspergillus oryzae* CFTRI 1480 for producing proteinase in high titres by solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p.499-503, 1993.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation: An overview. In: PANDEY, A. **Solid state fermentation**. New Delhi: Wiley, 1994.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D.A. New developments in solid state fermentation: I - bioprocess and products. **Process Biochemistry**, v.35, p.1153-1169, 2000.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81-84, 2003.

PENA y LILLO, M.; PEREZ-CORREA, R.; AGOSIN, E.; LATRILLE, E. Indirect measurement of water content in an aseptic solid substrate cultivation pilot-scale bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.76, p.44–51, 2001.

PEÑALOZA, W.; DAVEY, C.L.; KELL, D.B.; HEDGER, J.N. Real time monitoring of the accretion of *Rhizopus oligosporus* biomass during the solid substrate tempeh fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p.248-259, 1991.

PETKOV, S.B.; DAVIS, R.A. On-line biomass estimation using a modified oxygen utilization rate. **Bioprocess Engineering**, v.15, p.43-45, 1996.

PIRT, S. J. **Principles of microbe and cell cultivation**. 2.ed. London: Blackwell, 1975.

PITT, R.E. A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental-conditions. **Journal of Food Protection**, v.56, n.2, p.139-146, 1993.

PRADO, F.C.; VANDERBERGHE, L.P.S.; LISBOA, C.; PACA, J.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Relation between citric acid production and respiration rate of *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. **Engineering in Life Science**, v.4, n.2, p. 179-186, 2004.

PRIEST, F. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriological Reviews**, v.41, n.3, p.711-753, 1977.

PRIOR, B.A.; PREEZ, J.C.; REIN, P.W. Environmental parameters. In: DOELLE, H.W.; MITCHELL, D.A.; ROLZ, C.E. **Solid Substrate Cultivation**. London: Elsevier, 1992. Cap. 5, p.53-63.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.127–135, 2003.

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

RAJAGOPALAN, S.; MODAK, J.M. Heat and mass transfer simulation studies for solid-state fermentation process. **Chemical Engineering Science**, v.49, n.13, p.2187-2193, 1994.

RAMESH, M.V.; LONSANE, B.K. Ability of a solid state fermentation technique to significantly minimize catabolic repression of α -amylase production by *Bacillus licheniformis* M27. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.591-593, 1991.

RAMSTACK, J.M.; LANCASTER, E.B.; BOTHAST, R.J. Gas chromatographic headspace analysis of solid substrate fermentations. **Process Biochemistry**, v.14, p.2-4, 1979.

RATKOWSKY, D. A.; OLLEY, J.; MCMEEKIN, T.A.; BALL, A. Relationship between temperature and the growth rate of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v.149, p.1-5, 1982.

RATKOWSKY, D. A.; LOWRY, R. K.; MCMEEKIN, T. A.; STOKES, A. N.; CHANDLER, R. E. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. **Journal of Bacteriology**, V.154, p.1222-1226, 1983.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p.284-289, 2001.

SANGSURASAK, P.; MITCHELL, D.A. Validation of a model describing two-dimensional heat transfer during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.60, p.739-749, 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, n.6, p.623-629, 1983.

SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LONSANE, B.K.; KRISHNAIAH, M.M.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. **Process Biochemistry**, v.27, p.97-107, 1992a.

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.

SCHUTYSER, M.A.I.; PADDING, J.T.; WEBER, F.J.; BRIELS, W.J.; RINZEMA, A.; BOOM, R. Discrete particle simulations predicting mixing behavior of solid substrate particles in a rotating drum fermenter. **Biotechnology and Bioengineering**, v.75, n.6, p.666-675, 2001.

SECCHI, A.R.; CARDOZO, N.S.M.; NETO, E.A.; FINKLER, T.F. An algorithm for automatic selection and estimation of model parameters. **International Symposium on Advanced Control of Chemical Process**. Gramado, Brazil. 2006.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v.34, p.851-855, 1999.

SMITH, R.M. **Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry**. Suffolk: Wiley, 1988.

SMITS, J.P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; van SONSBEK, 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 and Biotechnology**, v.46, p.489-496, 1996.

SMITS, J.P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; van SONSBEK, H.M.; HAGE, J.C.; KAYNAK, A.; KNOL, W. The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.20, p.50-57, 1998.

SMITS, J.P.; van SONSBEK, H.M.; TRAMPER, J.; KNOL, W.; GEELHOED, W.; PEETERS, M.; RINZEMA, A. Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. **Bioprocess Engineering**, v.20, p.391-404, 1999.

SODERSTROM, B.E. Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p.59-63, 1977.

SUGAMA, S.; OKAZAKI, N. Growth estimation of *Aspergillus oryzae* cultured on solid media. **Journal of Fermentation Technology**, v.57, n.5, p.408-412, 1979.

SZEWCZYK, K.W.; MYSZKA, L. The effect of temperature on the growth of *A. niger* in solid-state fermentation. **Bioprocess Engineering**, v.10 p.123-126, 1994.

TEREBIZNIK, M.R.; PILOSOFF, A.M.R. Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.215-219, 1999.

TOMASELLI SCOTTI C., 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**, v.7, p.1-5, 2001.

VALMASEDA, M.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T. Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* – lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.817-823, 1991.

WEBER, F.J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Quantitative recovery of fungal biomass grown on solid κ-carrageenan media. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.55–58, 1999.

WILLIAM, P.T.; ONWUDILI, J. Composition of products from the supercritical water gaseification of glucose: a model biomass compound. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.44, p.8739-8749, 2005.

Obras Consultadas

CHATTAWAY, T.; DEMAIN, A. L.; STEPHANOPOULOS, G. Use of various measurements for biomass estimation. **Biotechnology Progress**, v.8, n.1, p.81-84, 1992.

FURASTÉ, P.A. **Normas técnicas para o trabalho científico**: Explicação das Normas da ABNT. 13.ed. Porto Alegre: s.n., 2005.

HESELTIME, C.W. Solid substrate fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v.14, p.517-532, 1972.

HESELTIME, C.W. Solid-state fermentation.1. **Process Biochemistry**, v.12, n.6, p.24-27, 1977.

HESELTIME, C.W. Solid-state fermentation.2. **Process Biochemistry**, v.12, n.9, p.29-32, 1977.

LEIB, T.; PEREIRA, C.J.; VILLADSEN, J. Bioreactors: a chemical engineering perspective. **Chemical Engineering Science**, v.56, p.5485-5497, 2001.

STRYER, L. **Bioquímica**. Tradução de MOREIRA, A.J.M.S.; CAMPOS, J.P.; MACEDO, L.F.; MOTTA, P.A.; ELIAS, P.R.P. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

Apêndice A - Problemas enfrentados durante os experimentos

Durante a execução dos experimentos, houve vários problemas com o aparato experimental, que dificultaram o desenvolvimento do trabalho. Alguns deles, juntamente com uma breve discussão sobre suas conseqüências, serão apresentados aqui.

O compressor responsável pelo fornecimento de ar para o biorreator tem funcionamento intermitente, ou seja, trabalha para gerar uma determinada pressão de ar na linha e pára, sendo novamente acionado quando a pressão cai abaixo de determinado nível. Como o aparato experimental não contava com válvulas reguladoras de pressão, apenas válvulas simples e rotâmetros, ocorriam leves variações na pressão e, conseqüentemente, na vazão de ar no biorreator. Como efeito, nos gráficos da porcentagem de CO₂ no ar de saída, medida pelo CG, observa-se um perfil em forma de serrate, com periodicidade, inclusive. Entretanto, a amplitude das variações provocadas por este fenômeno é pequena, como observado na Figura A.1.

O biorreator utilizado impedia a instalação de sensores de temperatura em contato direto com o leito, para monitorar a temperatura do meio de cultura ao longo do cultivo. As pás de agitação não deixam nenhum espaço entre suas trajetórias, e apenas 3 mm para a parede do cilindro.

Através de um teste de submersão do corpo do biorreator, percebeu-se que ele possui pontos de vazamento de ar. O principal é no eixo, mas pode vazar ar também pelas escotilhas e pela tampa do biorreator. A grande preocupação neste caso é que os pontos de vazamento se tornem pontos de entrada de microrganismos contaminantes.

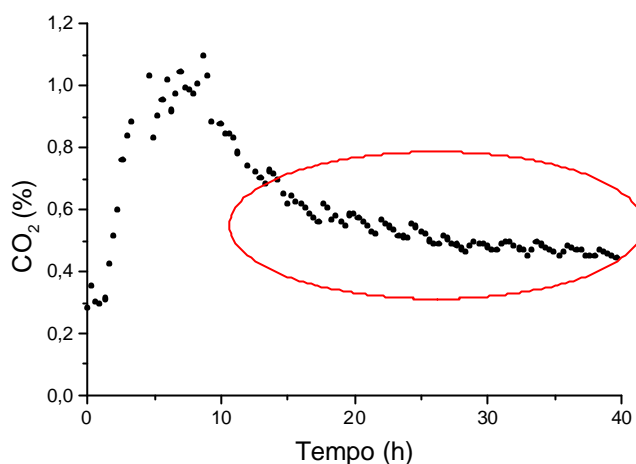


Figura A.1: Curva de porcentagem de CO₂ no ar de saída do biorreator apresentando efeito da variação da vazão de ar.

De fato, a despeito das afirmações de vários autores sobre a menor possibilidade de contaminação em CES, vários experimentos foram perdidos devido ao desenvolvimento de microrganismos estranhos.

As operações de amostragem do biorreator ofereciam uma boa oportunidade para a entrada de contaminantes, já que era necessário abrir uma escotilha do biorreator e introduzir uma colher para coleta da amostra. Por mais que se utilizasse material esterilizado, e o procedimento fosse feito junto à chama, a possibilidade de contaminação era alta, pois não era possível realizar a amostragem numa capela de fluxo.

O próprio teste de Gram, comumente utilizado para identificar contaminantes em meio de cultivo, não é muito adequado quando se trata de CES, exatamente pela grande quantidade de sólidos que dificultam a visualização ao microscópio. A forma que foi mais utilizada para detectar a presença de contaminantes foi a observação das colônias formadas nas placas de contagem.

A saída de ar do biorreator consistia de um pequeno orifício com aproximadamente 7 mm de diâmetro. Por várias vezes, verificou-se que a fibra acabava entrando neste orifício e causando seu entupimento. Isto ocorria principalmente nas primeiras horas do cultivo, quando

a fibra ainda tinha maior capacidade de retenção de água e consistência. Para desentupir a saída de ar podia ser necessário abrir o sistema, o que possibilitava novamente a entrada de contaminantes.

O Campus do Vale da UFRGS também sofre eventuais quedas de energia, que, muitas vezes, acabam encerrando experimentos precocemente.

Na etapa final do trabalho, o motor do biorreator começou a apresentar problemas. Por vezes, não respondia ao acionamento, rodava em velocidade lenta ou até mesmo parava sozinho. Isto acabou impedindo que mais experimentos pudessem ser realizados.

O termo-higrômetro utilizado também apresentou problemas no funcionamento. Primeiramente, tais medidores já costumam perder precisão nas condições de alta umidade relativa do ar utilizadas nos experimentos. Além disso, nesta situação de ar saturado, pode ocorrer condensação de água no sensor. De fato, estas condições às quais ele foi exposto durante os cultivos parecem ter afetado o aparelho, o qual, aparentemente, perdia a calibração após algumas horas de medição, marcando valores de temperatura e umidade relativa sabidamente incorretos. Em outras oportunidades, o aparelho simplesmente acusava erro de medição, e, por fim, perdeu a estabilidade das medições, que variavam continuamente, sem estabilizar em um valor.

O controle de umidade relativa no ar de entrada do biorreator, que fora planejado, acabou não funcionando. Embora fosse possível ajustar a umidade relativa do ar por meio de soluções saturadas de sais, o pequeno trecho (aproximadamente 20 cm) de mangueira de ar fora da estufa era suficiente para reduzir um pouco a temperatura do ar. Esta pequena redução na temperatura era suficiente para causar um aumento significativo na umidade relativa do ar.

A própria análise de contagem de colônias em placas mostrou peculiaridades no caso do *Bacillus circulans* BL53. A bactéria apresentou crescimento muito rápido no meio PCA, com suas colônias aumentando de tamanho rapidamente, chegando ao ponto de se juntarem,

dificultando a contagem (Figura A.2). Por este motivo era necessário realizar a contagem das colônias já com apenas 12 horas de incubação.

Há trabalhos na literatura tratando deste crescimento das colônias de *Bacillus circulans* (Eiha et al, 2002; Komoto et al, 2003). As colônias desta bactéria são capazes de migrar sobre o meio de cultura, e inclusive formar subcolônias. Komoto et al (2003) concluíram que o aumento da quantidade de ágar no meio de cultura reduz esta capacidade, pois o ágar cria uma rede que impede o deslocamento das células.

Com esta informação, decidiu-se aumentar a quantidade de ágar adicionada aos meios de cultura utilizados neste trabalho.

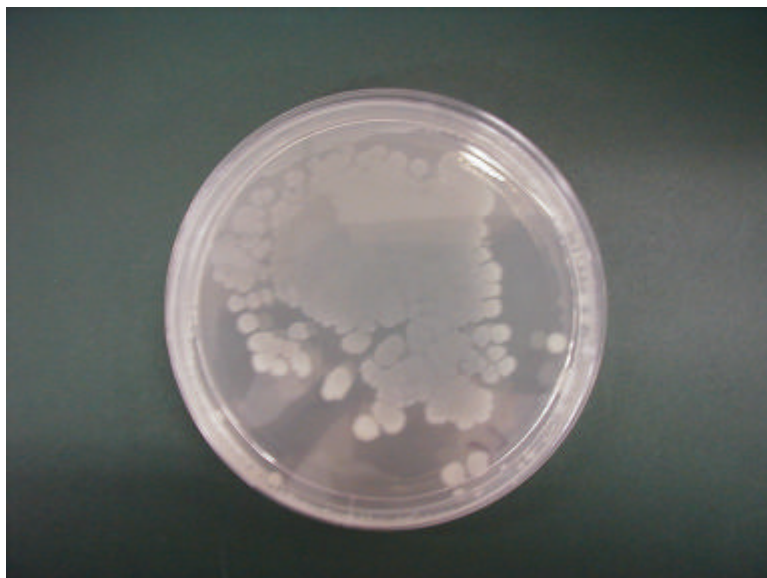


Figura A.2: Aspecto de colônias colabadas de *Bacillus circulans* BL53.

Anexo I – Algoritmo SELEST

A seguir são descritos em detalhe os passos do algoritmo SELEST, utilizado na estimação e no cálculo de desvios-padrão dos parâmetros. Adaptado de Secchi et al. (2006), com autorização.

Partindo-se de um sistema dinâmico:

$$\begin{aligned} F(t, x, \dot{x}, u; \mathbf{q}) &= 0 \quad ; \quad x(t_0; \mathbf{q}) = x_0(\mathbf{q}) \\ y &= H(x, u; \mathbf{q}) \end{aligned} \quad (\text{I.1})$$

onde $x, \dot{x} \in \mathfrak{R}^{n_x}$ são as variáveis de estado e suas derivadas em relação à variável independente, $t; u \in \mathfrak{R}^{n_u}$ são as entradas do sistema (variáveis cujo valor é controlado à parte do sistema considerado, p.ex., temperatura); $y \in \mathfrak{R}^{n_y}$ são as saídas medidas e $\mathbf{q} \in \mathfrak{R}^{n_p}$ são os parâmetros do modelo.

1) Avaliam-se os valores médios de y e u para cada experimento com r repetições:

$$\bar{y} = \frac{1}{r} \sum_{k=1}^r y_k \in \mathfrak{R}^{n_y \cdot N} \quad (\text{I.2})$$

$$\bar{u} = \frac{1}{r} \sum_{k=1}^r u_k \in \mathfrak{R}^{n_u \cdot N} \quad (\text{I.3})$$

E a matriz de covariância experimental normalizada ($V_y \in \mathfrak{R}^{n_y \cdot N \times n_y \cdot N}$):

$$V_y = \frac{(y - \bar{y} \cdot \mathbf{1}_{1,r})(y - \bar{y} \cdot \mathbf{1}_{1,r})^T}{r-1} \otimes^{-1} \bar{y} \bar{y}^T \quad (\text{I.4})$$

onde \otimes^{-1} significa divisão elemento-por-elemento, $\mathbf{1}_{1,r}$ é um vetor-coluna de “uns”, e $y \in \mathfrak{R}^{n_y \cdot N \times r}$.

2) Calcula-se a matriz de sensibilidade normalizada das saídas do sistema em relação aos parâmetros, $S \in \mathfrak{R}^{n_y \cdot N \times n_p}$, utilizando uma estimativa inicial dos parâmetros do modelo, θ_0 :

$$S = [S_1^T \ S_2^T \ \dots \ S_N^T]^T \quad (\text{I.5})$$

onde $S_j = (\hat{\Delta} \hat{y}_j)^{-1} \hat{S}_j \Delta \mathbf{q}_o \in \mathfrak{R}^{ny \cdot np}$, $\Delta(\cdot)$ é a matriz diagonal de um vetor, $\hat{y}_j \in \mathfrak{R}^{ny}$ é a predição do modelo para o j -ésimo ponto experimental, utilizando a média dos valores das entradas \bar{u}_j :

$$\begin{aligned} F(t_j, x, \dot{x}, \bar{u}_j; \mathbf{q}_o) &= 0 \quad , \quad x(0) = \bar{x}_o \\ \hat{y}_j &= H(x, \bar{u}_j; \mathbf{q}_o) \end{aligned} \quad (\text{I.6})$$

e \hat{S}_j é a matriz de sensibilidade normalizada das saídas do sistema em relação aos parâmetros avaliada no j -ésimo ponto:

$$\hat{S}_j = \frac{\partial H}{\partial x} W_x + \frac{\partial H}{\partial \mathbf{q}} \quad (\text{I.7})$$

A matriz de sensibilidade dos estados em relação aos parâmetros, $W_x = \frac{\partial x}{\partial \mathbf{q}}$, é obtida resolvendo-se o seguinte problema de valor inicial para processos dinâmicos:

$$\frac{\partial F}{\partial \dot{x}} \dot{W}_x + \frac{\partial F}{\partial x} W_x + \frac{\partial F}{\partial \mathbf{q}} = 0 \quad , \quad W_x(0) = \frac{\partial x_o}{\partial \mathbf{q}} \quad (\text{I.8})$$

ou o sistema linear:

$$W_x = - \left(\frac{\partial F}{\partial x} \right)^{-1} \frac{\partial F}{\partial \mathbf{q}} \quad (\text{I.9})$$

para processos estacionários.

3) Toma-se $m = \min \{np, ny \cdot N\}$ e procede-se a decomposição em valores singulares da S ponderada pelo desvio-padrão das medições, $\mathbf{s}_i = \sqrt{(V_y)_{i,i}}$:

$$(\Delta \mathbf{s})^{-1} \cdot S = U \cdot \Sigma \cdot V^T \quad (\text{I.10})$$

ou, de forma similar, procede-se a decomposição em valores característicos da matriz de informação de Fisher:

$$F = S^T \cdot (\Delta V_y)^{-1} \cdot S = V \cdot \Lambda \cdot V^T \quad ; \quad \Lambda = \Sigma^T \cdot \Sigma \quad (\text{I.11})$$

onde ΔV_y é a matriz diagonal composta pelos elementos da diagonal de V_y . Então, determina-se o efeito de cada parâmetro nas saídas utilizando os primeiros m componentes

principais (primeiros m vetores coluna da matriz V , designados por $V_m \in \Re^{np \times m}$) e a medida de magnitude E :

$$E = \frac{|V_m| \cdot \mathbf{1}}{\sum_{j=1}^m \mathbf{1}_j} \in \Re^{np} \quad (\text{I.12})$$

onde $|V_m|$ é a matriz dos valores absolutos de V_m , e $\mathbf{1}$ são os primeiros m maiores valores característicos em \mathbf{L} .

4) Seleciona-se o parâmetro de maior efeito $p_1 = \{\mathbf{q}_k \mid E_k = \max_j E_j\}$, ajusta-se o número de parâmetros selecionados para $n = 1$ e o vetor-índice dos parâmetros $\Omega_n = \{k\}$, representando o vetor-índice dos melhores parâmetros possíveis de estimar com os dados disponíveis (em ordem decrescente).

5) Calcular matriz de informação de Fisher reduzida, F_n , em relação aos parâmetros selecionados p e as matrizes de covariância dos parâmetros, V_p , e da predição, $V_{\hat{y}}$:

$$F_n = S_{\Omega}^T (\hat{\Delta} V_y)^{-1} S_{\Omega} \in \Re^{n_y \times n} \quad (\text{I.13})$$

$$V_p = F_n^{-1} \quad (\text{I.14})$$

$$V_{\hat{y}} = S_{\Omega} V_p S_{\Omega}^T \quad (\text{I.15})$$

onde S_W é a sub-matriz de S contendo apenas as colunas Ω_n . Além disso, calcula-se os coeficientes de correlação destas matrizes de covariância, \mathbf{r}_p e $\mathbf{r}_{\hat{y}}$, e o condicionamento κ da F_p :

$$\mathbf{r}_p = V_p \otimes^{-1} \sqrt{\hat{\Delta} V_p \hat{\Delta} V_p^T}, \quad \bar{\mathbf{r}}_p = \|\mathbf{r}_p - I_n\|_{\infty} \quad (\text{I.16})$$

$$\mathbf{r}_{\hat{y}} = V_{\hat{y}} \otimes^{-1} \sqrt{\hat{\Delta} V_{\hat{y}} \hat{\Delta} V_{\hat{y}}^T}, \quad \bar{\mathbf{r}}_{\hat{y}} = \|\mathbf{r}_{\hat{y}} - I_{n_y}\|_{\infty} \quad (\text{I.17})$$

$$\mathbf{k} = \|F_n\| \cdot \|V_p\| \quad (\text{I.18})$$

onde I_n é a matriz identidade de tamanho n , e $\|\cdot\|_\infty$ designa o maior elemento de valor absoluto de uma matriz. Com esta definição de norma, \bar{r}_p é a maior correlação entre os parâmetros.

6) Mantendo os demais parâmetros com a estimativa inicial θ_o , obtém-se novo vetor estimativa \hat{p}_n para os parâmetros p através de estimação por mínimos quadrados (ou máxima verossimilhança). Também se calculam os resíduos normalizados, \mathbf{x} ; o índice de degradação da preditabilidade, \mathbf{y}_n , e o índice de degradação por correlação de parâmetros \mathbf{h}_n .

$$\mathbf{x} = \frac{1}{r} \sum_{k=1}^r [y_k - \hat{y}_k(\hat{p}_n)] \otimes^{-1} y_k \in \Re^{ny \times N} \quad (\text{I.19})$$

$$\mathbf{y}_n = \bar{r}_{\hat{y}} + \|\mathbf{x}\|_\infty \quad (\text{I.20})$$

$$\mathbf{h}_n = \bar{r}_p + \mathbf{d}_{1,n} \quad (\text{I.21})$$

onde $\mathbf{d}_{i,j}$ é a função delta de Kronecker. A adição de $\mathbf{d}_{1,n}$ na Equação I.21 é necessária para impedir uma parada prematura no passo 7 quando $n = 2$.

7) Aplicam-se os seguintes critérios de parada, definindo a máxima correlação dos parâmetros permitida, \mathbf{r}_{max} :

7.a) Se $n > 1$ e ((($\mathbf{y}_{n-1} < 1$ ou ($\mathbf{h}_{n-1} < \mathbf{r}_{max}$ e $\mathbf{h}_n > \mathbf{r}_{max}$)) e $\mathbf{y}_{n-1} < \mathbf{y}_n$) ou $\mathbf{k}^1 < \mathbf{e}$), então Ω_{n-1} é o vetor-índice da solução e \hat{p}_{n-1} é o vetor de parâmetros estimados correspondente, terminando-se o algoritmo. \mathbf{e} é a precisão computacional da máquina.

7.b) Se $n = np$, então Ω_{n-1} é o vetor-índice da solução e \hat{p}_{n-1} é o vetor de parâmetros estimados correspondente, terminando-se o algoritmo.

8) Se $n < m$, então se calcula a medida de independência linear d_j para cada parâmetro em relação aos anteriormente selecionados:

$$d_j = \sin \left[\cos^{-1} \left(\frac{s_j^T V_\Omega s_j}{\|s_j\| \cdot \|V_\Omega s_j\|} \right) \right] \quad \forall j \notin \Omega_n \quad (\text{I.22})$$

onde $V_{\Omega} = S_{\Omega} (S_{\Omega}^T S_{\Omega})^{-1} S_{\Omega}^T$. Caso contrário, i.e., $n \geq m$, calcula-se a medida de independência linear $d_{q,j}$ para cada parâmetro restante em relação a todos os possíveis $(m-1)$ -tuplos Ω_q dos parâmetros previamente selecionados, para

$$1 \leq q \leq \frac{n!}{(m-1)!(n-m+1)!}, \quad (\text{I.23})$$

onde $\Omega_q \subset \Omega_n$ e $|\Omega_q| = m-1$, utilizando a Equação I.24:

$$d_{q,j} = \sin \left[\cos^{-1} \left(\frac{s_j^T V_{\Omega_q} s_j}{\|s_j\| \cdot \|V_{\Omega_q} s_j\|} \right) \right] \quad \forall j \notin \Omega_n \quad (\text{I.24})$$

onde $V_{\Omega_q} = S_{\Omega_q} (S_{\Omega_q}^T S_{\Omega_q})^{-1} S_{\Omega_q}^T$. Determina-se, então, o pior valor, que é a menor independência linear: $d_j = \min_q d_{q,j}$.

9) Calcula-se o índice de identificabilidade I_j para cada parâmetro θ_j remanescente:

$$I_j = E_j \cdot d_j \quad \forall j \notin \Omega_n. \quad (\text{I.25})$$

Seleciona-se o próximo melhor parâmetro $p_{n+1} = \{\theta_k \mid I_k = \max_j I_j\}$, ajusta-se o número de parâmetros selecionados para $n = n + 1$, o vetor-índice para $\Omega_n = \{\Omega_{n-1}, k\}$, e retorna-se ao passo 5.

É ainda possível adicionar os seguintes diagnósticos nas condições de parada do passo 7, avaliadas no estágio $(n-1)$ (7.a) ou n (7.b):

Se $\bar{r}_{\hat{y}} \geq r_{\max}$ e $\bar{r}_p < r_{\max}$, então as saídas estão muito correlacionadas devido a possível alta correlação nas entradas;

Se $\bar{r}_{\hat{y}} \geq r_{\max}$ e $\bar{r}_p \geq r_{\max}$, então as saídas estão muito correlacionadas devido à alta correlação dos parâmetros;

Se $\bar{r}_p \geq r_{\max}$ então os parâmetros estão muito correlacionados.

A constante r_{max} do algoritmo é um limite superior para o grau de correlação dos parâmetros. Este limite é muito mais fácil de determinar do que um limite para o índice de identificabilidade I_j , cujo valor depende mais de experimentos do que de valores estatísticos.

Ao final do algoritmo, o desvio-padrão (\mathbf{s}) da estimativa de cada parâmetro n selecionado pode ser obtido a partir dos valores da diagonal principal da matriz \mathbf{r}_p , calculada no passo 5:

$$\mathbf{s}_n = \sqrt{(\mathbf{r}_p)_{\Omega_n, \Omega_n}} \quad (\text{I.26})$$