

08 a 11 de Outubro de 2018
Instituto Federal Fluminense
Búzios - RJ

ESTIMAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR NA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE CELULASES

Flaviane Mendonça Ambrozim¹ – flavianeambrozim@gmail.com

Wellington Betencurte da Silva¹ – wellingtonufes@gmail.com

Julio Cesar Sampaio Dutra¹ – juliosdutra@yahoo.com.br

Iara Rebouças Pinheiro¹ – iararp.ufes@gmail.com.br

¹ UFES, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – Alegre, ES, Brasil

Resumo. O conhecimento da cinética dos processos fermentativos é essencial para avaliar as condições operacionais e a possível ampliação de escala. Os modelos cinéticos descrevem o comportamento da concentração celular em relação às demais variáveis do ambiente, ao longo do tempo de cultivo. Uma vez que a quantificação direta da biomassa é complexa, faz-se a estimação dessa variável a partir de uma medida indireta. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi determinar os valores dos parâmetros e estimativa do crescimento celular de *Trichoderma harzianum* em fermentação sólida a partir da atividade enzimática FPase, que melhor ajustam o modelo ao conjunto de dados experimentais. A metodologia baseou-se na resolução por problemas inversos utilizando o método de programação quadrática sequencial. Os resultados obtidos para a concentração de biomassa foram considerados satisfatórios, sendo o valor máximo de 0,0247 g cel/gms alcançado com 24 horas de fermentação, próximo aos relatados na literatura.

Palavras-chave: *Trichoderma harzianum*, Celulases, Modelagem Matemática, Medida Indireta de Biomassa, Estimação de Parâmetros.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas celulolíticas são biocatalisadores extremamente visados por diversos segmentos da indústria, devido a sua atuação na molécula de celulose, polímero fibroso, resistente e insolúvel à água e principal constituinte da parede celular dos vegetais. A celulose é constituída por 3.500 a 10.000 unidades de glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, em que cada molécula de glicose se liga à outra com orientação de 180° (NELSON; COX, 2014; STICKLEN, 2008).

A produção de celulases por fermentação em estado sólido (FES) apresenta inúmeras vantagens em relação à fermentação submersa (FS), dentre as quais o baixo investimento, o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e o baixo consumo de água e, conseqüentemente, baixa geração de efluentes. No entanto, a natureza heterogênea do meio de cultivo nesse tipo de fermentação dificulta a quantificação direta das variáveis do processo, bem como seu controle e monitoramento.

Dentre as variáveis de interesse, tem-se a concentração de biomassa, que consiste de uma medida indispensável para a verificação das condições ótimas de fermentação, bem como uma possível ampliação de escala. Contudo, a medida direta dessa grandeza é complexa em processos de FES, devido à dificuldade de separar os microrganismos do substrato e à interferência que este pode causar nos ensaios químicos (VINIEGRA-GONZÁLEZ, 1997). Por isso, métodos indiretos relacionados aos componentes específicos de determinados microrganismos e às suas atividades metabólicas são frequentemente utilizados para estimar a biomassa, como medidas de ergosterol, glicosamina, enzimas e respiração celular (DALSENTER, 2005; RUTSATZ, 2006).

Diferentes métodos de estimação de parâmetros têm sido abordados na literatura para os processos de FES (GELMI, PÉREZ-CORREA, AGOSIN, 2002; RUTSATZ, 2006; SILVEIRA, MAZUTTI, SALAU, 2014).

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo realizar a estimação do crescimento microbiano a partir da modelagem de medidas indiretas de produção de gás carbônico e atividade enzimática em um processo de FES, bem como realizar a estimação dos parâmetros envolvidos nos modelos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fermentação

Os experimentos de FES foram realizados em reatores tipo colunas de Raimbault (RAIMBAULT e ALAZARD, 1980), as quais estavam conectadas a um sistema de aeração e em banho com temperatura de 30 °C durante 120 horas, conforme esquema da Figura 1.

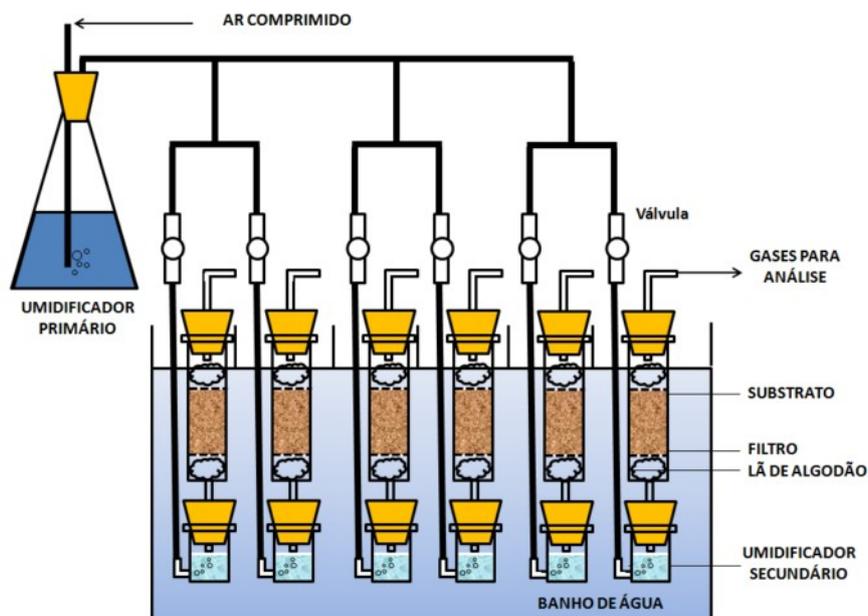


Figura 1 – Esquema do sistema de colunas de Raimbault.

Fonte: AFONSO (2012).

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentoso *Trichoderma harzianum* IOC-4127, obtido da Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/CCFF), localizada no Rio de Janeiro – RJ.

O meio sólido de fermentação era composto por 4 g, sendo 60% de bagaço de cana-de-açúcar (BC) e 40% de farelo de trigo (FT). O teor de umidade inicial no meio sólido foi de 60%, calculado em base úmida, atingido pelo uso da solução salina descrita por Urbánszki, Szakacs e Tengerdy, (2000).

As colunas e o meio de cultivo foram esterilizados em autoclave vertical (Phoenix Luferco AV-100) a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente, cerca de 0,1 g de inóculo foi adicionado ao meio de cultivo, o qual foi homogeneizado e transferido para as colunas.

2.2 Medição de CO₂

O sistema de medição era um circuito fechado, composto por uma bomba peristáltica responsável por circular o ar a partir do topo da coluna, seguindo pelo sistema de medição de CO₂ e retorna à coluna pela sua parte inferior. As medidas de CO₂ liberado foram realizadas com um medidor portátil (AZ-77535), registrando-se os valores a cada minuto, durante o período de 30 minutos, nos tempos de fermentação de 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

2.3 Extração de enzimas

A cada 24 horas, aproximadamente 1,0 g do sólido fermentado foi adicionado em erlenmeyers de 125 mL, juntamente com 10 mL de água destilada e 10 mL de tampão citrato de sódio (0,05 M e pH 4,8) mais uma gota de Tween 80. Os frascos foram submetidos à agitação de 180 rpm em mesa agitadora (SPLabor, 180/A) e temperatura ambiente por 60 minutos. Após o tempo de agitação, a mistura foi filtrada em gaze para remoção dos sólidos e o extrato enzimático foi centrifugado (Centrífuga Nova Instruments, NT 810) a 3500 rpm durante 30 minutos (SALOMÃO, 2017) e o sobrenadante utilizado nos ensaios de atividade enzimática.

2.4 Determinação da atividade enzimática FPase

Para determinar a atividade enzimática de FPase empregou-se tiras de papel filtro Whatman nº1, com dimensões de 1,0 x 6,0 cm, (aproximadamente 50 mg) como substrato e o teor de açúcares redutores foi determinado pelo método DNS (GHOSE, 1987).

A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio, nos quais foram adicionados o substrato enrolado e 1,5 mL do extrato enzimático, mantidos em banho-maria a 50 °C durante 60 minutos. Em seguida, 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado aos tubos de ensaio, que foram submetidos a banho de água fervente por 5 minutos, seguido de banho de gelo. O volume foi completado com água destilada até 10 mL, a mistura foi homogeneizada e sua absorbância lida em espectrofotômetro (Kasuki IL 227) com comprimento de onda ajustado em 540 nm (GHOSE, 1987).

Foram preparadas, ainda, as soluções de controle e para zerar o equipamento. Na primeira, realizou-se o mesmo procedimento, porém o extrato enzimático foi adicionado após decorrido o tempo da reação enzimática; para a segunda, substituiu-se o extrato enzimático por tampão citrato de sódio.

2.5 Modelos Cinéticos

A taxa de produção de CO₂ (CER) foi calculada pela Equação 1 e, a partir do coeficiente respiratório (CR) definido pela Equação 2, obteve-se a taxa de consumo de oxigênio (OUR).

$$CER = \frac{1}{M} \frac{PV}{RT} \left(\frac{dz_{CO_2}}{dt} \right) \quad (1)$$

$$RQ = \frac{CER}{OUR} \quad (2)$$

Em que M é a massa seca instantânea; P é a pressão, R é a constante universal dos gases; T é a temperatura e z_{CO_2} é a fração molar de CO₂.

Foram utilizados os modelos cinéticos de consumo de oxigênio e de formação de produtos, correspondentes às Equações 3 e 4, respectivamente, para estimar a biomassa ao longo da fermentação.

$$OUR = \frac{1}{Y_{X/O_2}} \frac{dX}{dt} + m_{O_2} X \quad (3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \frac{dX}{dt} + m_P X \quad (4)$$

Onde Y_{X/O_2} e $Y_{X/P}$ são os coeficientes de biomassa formada por O₂ consumido e produto formado, respectivamente; m_{O_2} e m_P são os coeficientes do consumo de O₂ e formação de produtos utilizados para a manutenção celular, respectivamente; X é a concentração microbiana.

2.5 Problema Inverso

O objetivo do problema inverso é prever, a partir de um efeito, a causa por trás de um fenômeno. Neste trabalho, foi utilizada a programação quadrática sequencial (conhecida como SQP), a qual é um dos métodos de otimização disponíveis na função *fmincon* do MATLAB.

A função objetivo, conforme a Equação 5, foi dada pela diferença das medidas experimentais de atividade enzimática FPase e com as soluções obtidas pelos modelos cinéticos.

$$FOBJ(p) = \sum_{i=1}^N [Z_{exp,i} - Y_{sim,i}(p)]^2 \quad (5)$$

Na resolução do problema, também foram consideradas as informações sequenciais da taxa de consumo de oxigênio. Na expressão da função *FOBJ*, o vetor p representa os parâmetros; $Y_{sim,i}(p)$ é a atividade enzimática estimada no tempo t_i , $Z_{exp,i}$ são as medidas experimentais da atividade enzimática no tempo t_i , e N o número total de medidas. Logo, a partir de uma estimativa inicial para a função objetivo, a minimização do *FOBJ* é almejada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os modelos cinéticos foram resolvidos de forma direta pelo *software* Matlab com a ferramenta *ode23s*, utilizando os valores iniciais de 0,1 g cel/gms para X e 1×10^{-5} U/gms para a atividade enzimática de FPase. No entanto, essas medidas não são precisas, portanto optou-se por realizar a estimação das condições iniciais do processo, pela qual se obteve os valores de 0,016 g cel/ gms, para a concentração celular e $5,491 \times 10^{-5}$ U/ gms para a atividade enzimática.

Além disso, os parâmetros Y_{X/O_2} , $Y_{X/P}$, m_{O_2} e m_P presentes nos modelos cinéticos de consumo de oxigênio e formação de produtos foram estimados. Os valores destes parâmetros estimados e das condições iniciais estimadas, por meio do *software* Matlab usando a função *fmincon*. estão explícitos na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros estimados para os modelos cinéticos.

Parâmetro	Valor
Y_{X/O_2}	0,259 g cel/ mmol O_2
$Y_{X/P}$	$1,011 \times 10^{-5}$ g cel/ U
m_{O_2}	0,067 mmol O_2 / g cel · h
m_P	2,508 U/ gcel · h

Considerou-se que o coeficiente respiratório é igual a 1,0, o que significa que a taxa de oxigênio consumido utilizada pelos microrganismos para a respiração celular ao longo do cultivo é igual à taxa de gás carbônico produzida. Dessa maneira, pode-se assumir que $OUR = CER$, o que possibilita obter as medidas experimentais em relação ao O_2 .

Como resultados, tem-se a Figura 2, que apresenta a quantidade de biomassa fúngica estimada, em gramas de células por grama de massa seca (g cel/ gms) em função do tempo de fermentação.

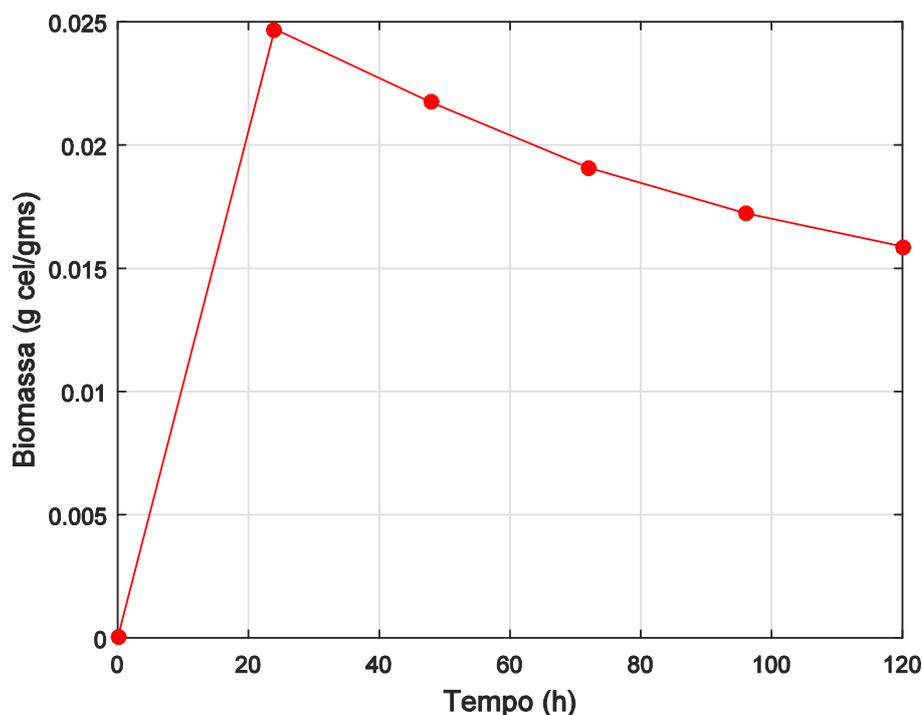


Figura 2 – Concentração estimada de células.

Observa-se que a concentração máxima de biomassa fúngica obtida foi de 0,0247 g cel/gms com 24 horas de fermentação e após esse tempo, verifica-se uma redução de biomassa até o final do cultivo. Isso ocorre porque no início do cultivo ocorre a fase de crescimento exponencial (log), em que os microrganismos utilizam a maior parte dos nutrientes disponíveis para se multiplicarem.

Arora *et al.* (2018) estimaram o crescimento microbiano de *Rhizopus oryzae* MTCC 1987 em farelo de trigo e torta de óleo de linhaça para a produção de fitase, a partir de ensaios de glicosamina, e obtiveram concentração máxima de células de 71 g/kgms.

Trametes hirsuta foi cultivado em silagem de milho e madeira de pinho por Steudler e Bley (2015). O crescimento celular desse microrganismo foi estimado em relação à produção de gás carbônico e a concentração máxima obtida encontra-se próxima de 0,05 g/ gms.

A Figura 3 mostra a comparação entre os dados obtidos experimentalmente para a atividade enzimática de FPase e os dados simulados pelo modelo, em função do tempo de fermentação.

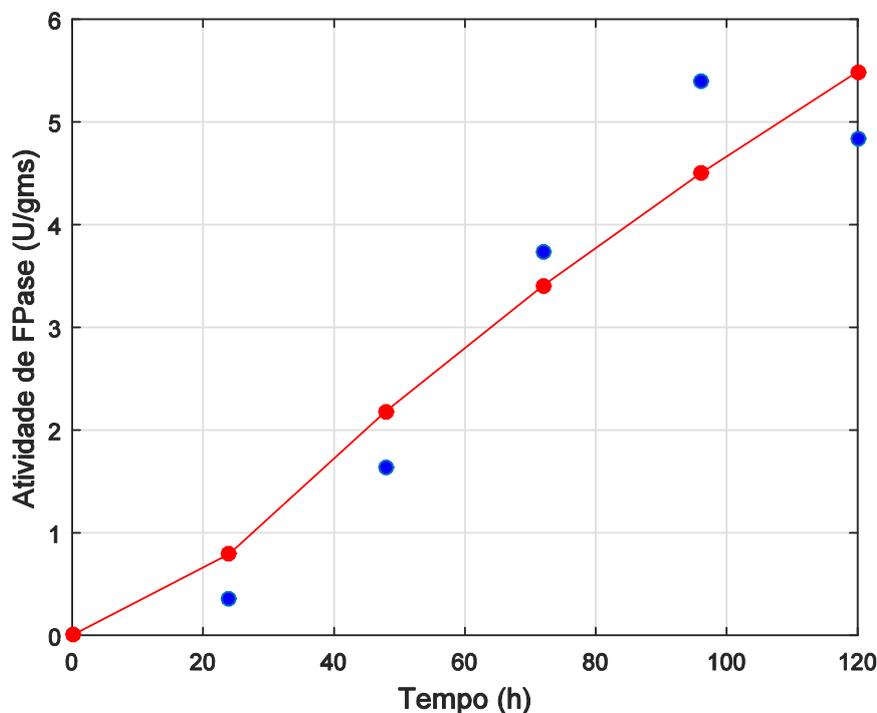


Figura 3 – Comparação entre os pontos experimentais (●) e preditos (●) para a atividade enzimática de FPase.

Verifica-se que os valores simulados representam suficientemente bem os pontos experimentais até 72 horas de fermentação. A partir de 96 horas, tem-se a atividade máxima seguida de redução característica, todavia os pontos simulados se mostraram discrepantes em relação aos pontos experimentais. É possível que o modelo empregado represente bem os pontos de aumento de atividade enzimática, mas não represente suficientemente bem quando essa atividade é reduzida, após um certo tempo de fermentação.

A otimização foi realizada pela minimização da função objetivo, que corresponde à diferença entre os pontos simulados e os pontos experimentais. Para ilustrar o comportamento dessa função, traçou-se o gráfico contendo os valores da função objetivo para cada iteração. A Figura 4 apresenta esse gráfico.

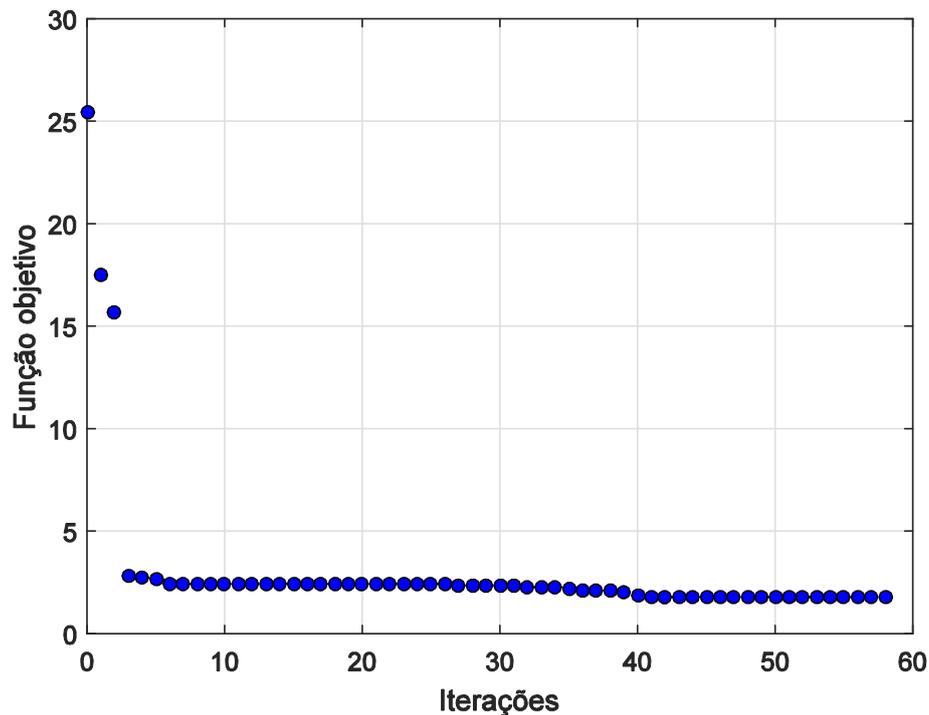


Figura 4 – Variação da função objetivo com o decorrer das iterações.

Observa-se que a redução mais significativa da função objetivo ocorre após as quatro primeiras iterações, o que evidencia a alta velocidade com que a função objetivo é minimizada.

3. CONCLUSÃO

Baseando-se nas análises apresentadas, pode-se concluir que foi possível realizar a estimativa do crescimento microbiano no cultivo sólido de *T. harzianum* para a produção de celulasas a partir de medidas indiretas da respiração celular e da atividade enzimática. Bem como, a estimação de parâmetros é uma ferramenta muito útil em fermentações em larga escala por promover de modo rápido e eficaz a otimização do processo. No entanto estes métodos de otimização para atingiro ótimo, é requerido um esforço computacional considerável. Por isso, uma métodos Bayesianos seriam uma boa alternativa para a tarefa de estimação de parâmetros, pois são consideradas ferramentas robustas e rápidas, tornando possível o monitoramento online do processo.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. C. **Produção de celulasas por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 119 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo – Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 2012.
- ARORA, S. *et al.* Oxygen uptake rate as a tool for on-line estimation of cell biomass and bed temperature in a novel solid-state fermentation bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlim. 2018.
- DALSENTER, F. D. H. DA. Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido. 2005.

- 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
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, 1987
- RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology and Biotechnology**.v. 9, p.199–209. 1980.
- RUTSATZ, M. D. **Cultivo em estado sólido : modelagem e quantificação de biomassa em biorreator cilíndrico horizontal agitado**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. 2006.
- SALOMÃO, G. S. B. **Análise da produção de celulasas por fungos utilizando bagaço de cana como substrato**. 82f. Dissertação (Mestrado em Energia) - Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus-ES, 2017.
- SILVEIRA, C. L. da; MAZUTTI, M. A.; SALAU, N. P. G. Modelling the microbial growth and temperature profile in a fixed-bed bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 2014.
- STEUDLER, S.; BLEY, T. Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin. 2015.
- STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature Review Genetics**, v. 9, 2008.
- URBÁNSZKI K, SZAKACS G, TENGERDY RP. Standardization of the filter paper activity assay for solid substrate fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 22. 2000.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. In: ROUSSOS, S.; LONSANE, B. K.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. (editors). **Advances in solid state fermentation**. Kluwer Academic: Dordrecht, 1997.