

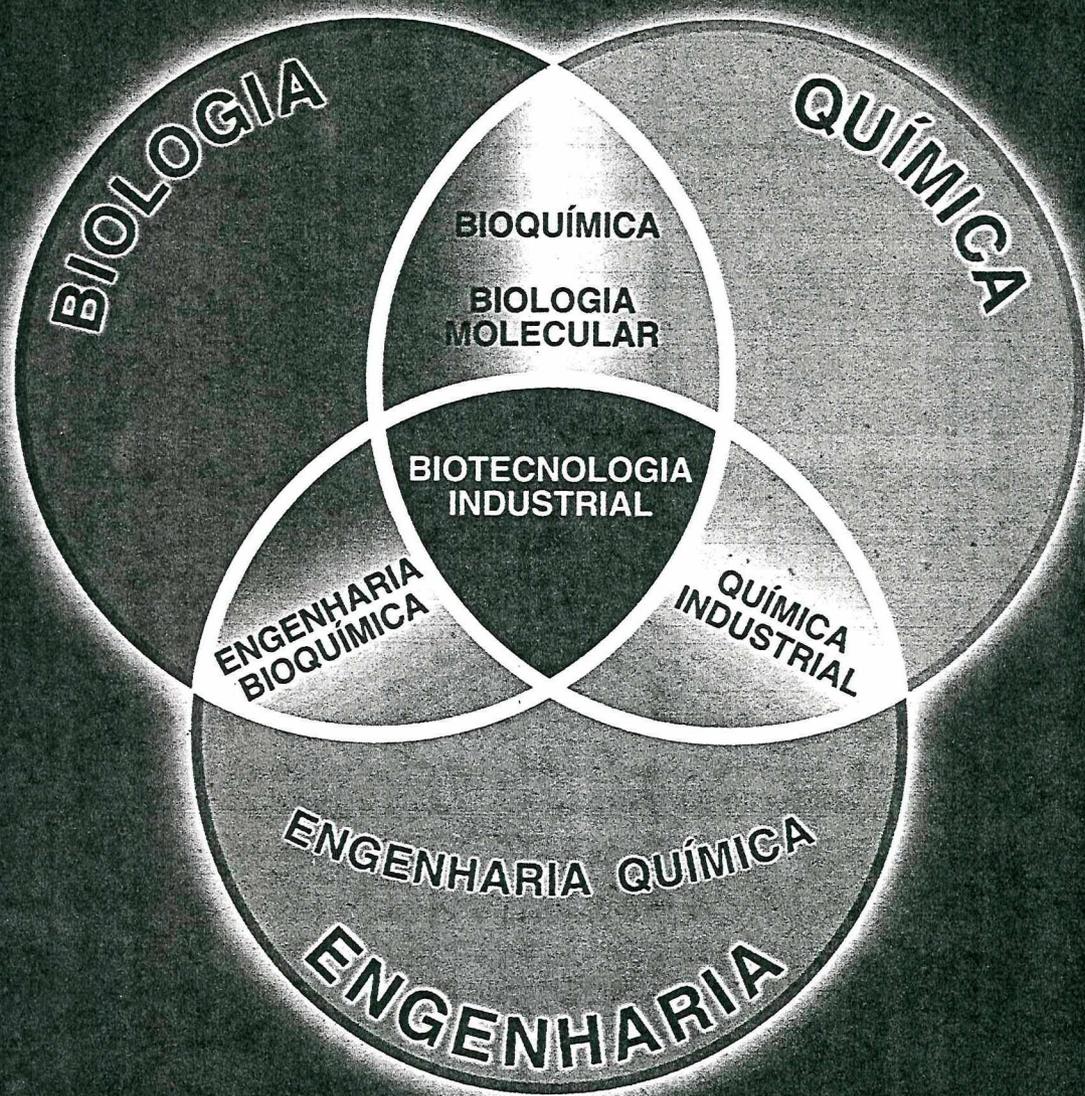
# BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

COORDENADORES:

WILLIBALDO SCHMIDELL  
URGEL DE ALMEIDA LIMA  
EUGÊNIO AQUARONE  
WALTER BORZANI

VOLUME 2

ENGENHARIA  
BIOQUÍMICA



EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA



Coordenadores:  
WILLIBALDO SCHMIDELL  
URGEL DE ALMEIDA LIMA  
EUGÊNIO AQUARONE  
WALTER BORZANI

# BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

VOLUME II

ENGENHARIA  
BIOQUÍMICA



EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA.

© 2001 *Urgel de Almeida Lima*  
*Eugênio Aquarone*  
*Walter Borzani*  
*Willibaldo Schmidell*

*1ª edição - 2001*

*É proibida a reprodução total ou parcial  
por quaisquer meios  
sem autorização escrita da editora*

*EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA.*  
*Rua Pedroso Alvarenga, 1245 - cj. 22*  
*04531-012 – São Paulo, SP – Brasil*  
*Fax: (0xx11)3079-2707*  
*e-mail: eblucher@uol.com.br*

*Impresso no Brasil      Printed in Brazil*



---



---

# AUTORES

---



---

**Adalberto Pessoa junior***Professor Doutor*

Universidade de São Paulo  
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
 Departamento de Tecnologia  
 Bioquímica-Farmacêutica  
 Av. Prof. Lineu Prestes, 580—Bloco 16  
 05508-900, São Paulo, SP, Brasil

**Aberto Colli Badino Jr.***Professor Adjunto I*

Universidade Federal de São Carlos  
 Departamento de Engenharia Química  
 Caixa Postal, 676  
 13565-905, São Carlos, SP, Brasil

**Antonio Bonomi***Pesquisador Coordenador*

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do  
 Estado de São Paulo S.A.  
 Divisão Química  
 Agrupamento de Biotecnologia  
 Caixa Postal, 1041  
 01064-970, São Paulo, SP, Brasil

**Beatriz Vahan Kilikian***Professora Associada*

Universidade de São Paulo  
 Escola Politécnica  
 Departamento de Engenharia Química  
 Caixa Postal, 61548  
 05424-970, São Paulo, SP, Brasil

**Deise Maria Fontana Capalbo***Pesquisadora*

Empresa de Pesquisa Agropecuária  
 Rodovia SP 340, km 127,5  
 Caixa Postal, 69  
 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil

**Haroldo Hiss***Pesquisador Científico*

Instituto Butantã  
 Av. Vital Brasil, 1500  
 05503-900, São Paulo, SP, Brasil

**Iracema de Oliveira Moraes***Professora Titulas*

Universidade de Guarulhos  
 Centro de Ciências Exatas e  
 Tecnológicas  
 Praça Teresa Cristina, 1  
 07033-979, Guarulhos, SP, Brasil

**João Carlos Monteiro de Carvalho***Professor Doutor*

Universidade de São Paulo  
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
 Departamento de Tecnologia  
 Bioquímica-Farmacêutica  
 Av. Prof. Lineu Prestes, 580—Bloco 16  
 05508-900, São Paulo, SP, Brasil

**José Geraldo da Cruz Pradella***Pesquisador*

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do  
 Estado de São Paulo S.A.  
 Divisão Química  
 Agrupamento de Biotecnologia  
 Caixa Postal, 1041  
 01064-970, São Paulo, SP, Brasil

**Josef Ernest Thiemann***Pesquisador Sênior*

Biobrás S.A.  
 Avenida C, 1413 — Distrito Industrial  
 Caixa Postal, 377  
 3904-004, Montes Claros, MG, Brasil

## 13

**FERMENTAÇÃO  
EM ESTADO SÓLIDO**

Vanildo Luiz Del Bianchi  
Iracema de Oliveira Moraes  
Deise Maria Fontana Capalbo

**13.1 – Introdução**

Quem nunca viu uma laranja coberta por uma camada verde ou negra de mofos? Um pão embolorado? Ou mesmo um sapato mofado após ter sido deixado em um lugar úmido? Pois bem, esses exemplos citados, que acontecem com frequência na natureza, ocorrem principalmente devido a determinadas condições ambientais e alimentação propícias ao crescimento desses microrganismos.

Porém, esse desenvolvimento microbiano indesejável pode ser, se houver um controle do processo, uma ferramenta potencialmente interessante na obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, biomassa microbiana, inóculos, além de alimentos, medicamentos, pigmentos, etc.

Essa forma de processo é denominada “fermentação em estado sólido”, “fermentação em substrato sólido”, “fermentação em meio semi-sólido” ou simplesmente “fermentação semi-sólida”. Como forma abreviada, pode ser utilizada também a sigla FSS (embora, menos frequentemente, alguns pesquisadores preferam usar as siglas FMS e FES).

Esse processo, comumente empregado em países do Oriente e do continente africano visando a elaboração de alimentos, vem ganhando adeptos em sua utilização, ano após ano, entre pesquisadores da Europa e do continente americano, devido a peculiaridades que serão enfocadas nas páginas seguintes.

Tomando por base a definição utilizada por DURANT *et al.*<sup>1</sup>, na qual também se enquadram algumas outras extraídas da literatura,<sup>2,3,4,5</sup> mas ressaltando que o substrato não tem de ser necessariamente insolúvel em água e, desta forma ser sólido, pois ocorrem exemplos em que o substrato líquido (solução de sacarose e de sais nutrientes ou melão) está umedecendo uma matriz sólida inerte (sabo de milho ou bagaço de cana),<sup>6,7,8</sup> a fermentação em estado sólido pode ser definida como “processos que referem-se a cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o con-

teúdo de líquido (substrato ou meio umidificante) ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida”.

Por essa definição, eliminam-se também algumas confusões criadas por determinados autores,<sup>9</sup> que colocam erroneamente os sistemas de filtro biológico aeróbico utilizados em processos de tratamento de águas residuárias e o sistema de fermentação acética para obtenção de vinagre, onde, em ambos os casos, há a percolação de nutrientes líquidos através de uma matriz sólida inerte e insolúvel, na qual estão imobilizados os microrganismos, como processos de fermentação em estado sólido.

O termo fermentação em superfície, às vezes utilizado para referir-se à cultura em substrato sólido, deve ser evitado, pois esta denominação diz respeito ao processo em que há o crescimento microbiano sobre a superfície líquida estática de um substrato, tal como a antiga forma de produção de vinagre em barris.

Outro erro que não deve ser cometido é confundir esse processo com a cultura em meio sólido ou semi-sólido utilizando agar, usualmente empregada em microbiologia para a seleção e manutenção de microrganismos.

Nesse capítulo serão descritos, de maneira sucinta, tópicos de interesse à compreensão desse processo, mais especificamente tipos de microrganismos, características dos substratos, formas de reatores e principais controles comumente utilizados, as vantagens e desvantagens inerentes ao sistema em relação ao processo submerso, além de exemplificar alguns casos relatados por pesquisadores em diversos artigos científicos.

Porém, dentre todos os assuntos analisados, o estudo sobre produção de cogumelos comestíveis, pela quantidade de material bibliográfico existente, mesmo empregando os meios em estado sólido para o crescimento e produção enzimática, não será examinado neste capítulo, pois merece uma atenção à parte.

No item “Referências bibliográficas” será apresentado um vasto número de títulos de artigos científicos utilizados neste capítulo, visando facilitar a procura de material bibliográfico para aqueles que quiserem iniciar uma pesquisa envolvendo esse processo.

## 13.2 – Histórico do processo da FSS

Pelos primeiros exemplos citados neste capítulo, pode-se concluir que a ocorrência da fermentação em estado sólido é, com certeza, mais antiga que o próprio homem, sendo, portanto, muito difícil precisar o início desta prática pela atividade humana. Sabe-se, contudo, que várias formas de alimentos utilizando esse processo microbiano fazem parte da dieta de diversos povos há muitos séculos.

São citados exemplos de alimentos que necessitavam, de alguma forma, da fermentação em estado sólido há milênios. Como, por exemplo, na China, a produção de molho de soja em 1.000 a.C. e a de “chiang” (similar ao “miso”) entre 2.500 e 500 a.C.,<sup>2,10</sup> os quais são obtidos a partir da modificação enzimática do meio utilizando-se o “koji”. O “koji” consiste numa massa umidificada de um

cereal cozido (na maior parte dos casos, arroz) na qual houve o crescimento de *Aspergillus oryzae* e a conseqüente produção de um complexo enzimático com atividade diastática.<sup>10,11</sup>

Uma das primeiras referências que se tem sobre o processo em meio sólido no Ocidente, além de uma citação da obtenção de queijo roquefort em 100 d.C.,<sup>2</sup> está associada, no início deste século, nos Estados Unidos, ao nome do pesquisador Takamine na produção de "mold bran", similar ao "Koji", que consiste basicamente no emprego do farelo de trigo no lugar do arroz e de outros fungos para a obtenção do complexo enzimático. Esse estudo visava substituir o malte na indústria de destilados.<sup>2,5,10</sup>

Segundo HESSELTINE,<sup>10</sup> UNDERKOFER *et al.*<sup>12,13</sup> continuou este trabalho de 1937 a 49, no objetivo de produzir álcool etílico a partir de milho. Utilizaram-se para esse processo fermentadores do tipo tambores rotativos, tambores estáticos ou simples bandejas, sendo estudadas as vantagens e desvantagens de cada um destes reatores.

Assim, até a metade deste século, e sempre se referindo a esta parte do planeta, dominaram, para o caso de fermentação em estado sólido, as pesquisas em torno da produção de enzimas microbianas.

Porém, principalmente para agilizar a produção de penicilina, durante o período da Segunda Guerra Mundial, houve a opção de desenvolver os processos que envolviam a fermentação líquida em tanques profundos, negligenciando os processos em estado sólido.<sup>10,11</sup>

Dessa forma, as pesquisas voltaram-se quase que exclusivamente para o projeto de desenvolvimento de fermentadores para os processos em fase líquida, com muito poucos estudos empregando a fermentação em substrato sólido.

Apenas para exemplificar, há citações de experiências para produção de ácido cítrico em fermentação em estado sólido até 1936, retornando novamente o interesse nesses estudos somente em 1975.<sup>14</sup>

No Japão, contudo, o processo tradicional, que era realizado em bandejas de madeira ou bambu, onde os cereais, tais como arroz e trigo ou trigo e soja eram inoculados e fermentados com o "koji", foi sendo aperfeiçoado. Projetaram-se incubadoras automatizadas com inoculação, controle das condições ambientais, agitação controlada do meio e recuperação do produto final, utilizando-se também linhagens mutantes melhoradas.<sup>10</sup> Esses fatos conduziram o Japão à obtenção de uma tecnologia cada vez mais avançada, em termos de produção por fermentação em estado sólido.

Nos países do Ocidente, nos dias de hoje, diversos estudos estão sendo realizados utilizando-se substrato sólido, tanto na obtenção de bioprodutos como no desenvolvimento de reatores ou conhecimento do metabolismo e condições do processo. Porém, em níveis industriais, o processo submerso continua sendo o principal sistema de geração de produtos obtidos via fermentação, sendo insignificante o número de empresas que empregam a fermentação em estado sólido para estes fins.

### 13.3 – Microrganismos comumente utilizados

PANDEY<sup>15</sup> indica que os processos por fermentação em estado sólido podem utilizar tanto microrganismos em seu estado natural, como por exemplo nos casos de ensilagem ou compostagem,<sup>16</sup> como na forma de culturas puras individuais, em que se enquadram a maior parte das pesquisas nesta área, ou, mais raramente, na forma de culturas mistas.<sup>17</sup>

Devido aos baixos níveis de água no sistema, os fungos filamentosos têm recebido a maioria das atenções nas pesquisas, pois apresentam melhor capacidade de crescimento nestas condições.<sup>2</sup> Assim, um vasto campo de estudos tem se vislumbrado utilizando estes microrganismos.

Como exemplos, podem ser citados, dentre muitos outros, o uso de culturas de *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Penicillium* ou *Aspergillus* para obtenção de enriquecimento protéico e produção de enzimas, *Mucor* ou *Rhizopus* na produção de renina microbiana, *Penicillium* para a produção de penicilina e *Fusarium* ou *Giberella* para a obtenção de ácido giberélico.<sup>15</sup>

Porém, outros microrganismos têm obtido espaço nesse tipo de sistema, como a produção de esporos de *Bacillus thuringiensis*<sup>18</sup> para a produção de bioinseticidas, de  $\alpha$ -amilase por linhagens de *Bacillus*,<sup>19</sup> e de álcool por *Zymomonas mobilis* ou por leveduras tradicionais.<sup>20,21</sup>

Ou seja, como todo o processo fermentativo, a escolha do microrganismo adequado é uma peça chave no sucesso da produção desejada. Por exemplo, a  $\alpha$ -amilase pode ser produzida por, no mínimo, 28 tipos diferentes de culturas microbianas. Já a cultura de *Aspergillus niger* tem a capacidade de produzir nada menos do que 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato utilizado.<sup>15</sup>

Neste sentido, a fermentação em estado sólido tem se mostrado apta a realizar vários tipos de transformações, seja ela por fungos, leveduras ou bactérias, e o que irá determinar a escolha da linhagem mais apropriada, durante a fase de seleção de microrganismos, será o estudo detalhado do processo, visando obter o melhor meio de cultura e as melhores condições ambientais da fermentação, principalmente no que se refere à temperatura e à umidade do sistema.

### 13.4 – Substratos: características e composição

Ao iniciar este item, antes de tudo é necessário comentar que o termo fermentação em estado sólido remete à idéia de dois tipos de materiais insolúveis em água, sobre os quais os microrganismos irão crescer: quando o suporte sólido atua ele próprio como fonte de nutrientes e no caso em que os nutrientes são solúveis em água e os microrganismos estão aderidos a uma matriz sólida, inerte ou não, que irá absorver o meio de cultura líquido. A maioria dos processos revistos em literatura utilizam o princípio em que o suporte sólido atua também como fonte de nutrientes.

Em relação ao segundo caso existem, dentre outras, as citações da produção de esporos de *Aspergillus niger* em sabugo de milho umedecido com solução de sacarose para a formação de inóculo na produção de ácido cítrico,<sup>6</sup> do emprego de

uma solução de glicose e de nutrientes umedecendo bagaço de cana para a produção de ácido láctico,<sup>22</sup> de partículas de polpa de madeira fornecendo umidade e permitindo melhor ventilação em meio de arroz ou farelo de trigo para produção de enzimas<sup>23</sup> e a obtenção de álcool etílico em bagaço de cana umedecido com melão.<sup>7,8</sup>

É possível notar, pelos exemplos citados, que o substrato pode estar tanto na forma natural como na forma sintética, dependendo do processo que se deseja realizar, da facilidade de se obter determinadas matérias-primas ou dos resultados que se deseja conseguir. Bagaço de cana pode ser abundante em determinadas regiões, assim como o sabugo de milho ou a palha de arroz pode ser em outras.

Já para estudos de cinética das fermentações, cita-se o exemplo da utilização de partículas de argila<sup>24,25</sup> como matriz sólida inerte insolúvel, que não exercem influência sobre o consumo de substrato e facilitam a separação entre a massa microbiana e o meio de cultura.

Porém, de forma geral, os materiais utilizados são provenientes de matérias-primas, produtos e/ou resíduos agroindustriais, sendo que, logicamente, dependendo do produto que se deseja obter, estes últimos têm tido a preferência nas pesquisas, devido ao baixo ou nenhum valor comercial.

Pode-se também incorporar solução nutriente ao substrato sólido, visando adequá-lo melhor às condições nutricionais do microrganismo para a fermentação desejada. Como o estudo realizado para a produção de  $\alpha$ -galactosidase por *Aspergillus niger*,<sup>26</sup> no qual ao meio composto de farelo de trigo foram adicionados uréia (como fonte de nitrogênio), água de maceração de milho (como fonte de fatores de crescimento), farinha de soja ou farinha guar (como indutores da enzima) e ácido cítrico (que favorece a produção da enzima desejada). Ou, no caso de enriquecimento protéico, quando se introduz fontes de nitrogênio tais como amônia, uréia, triptona e caseína<sup>27</sup> ou soluções sintéticas como sulfato de amônia.

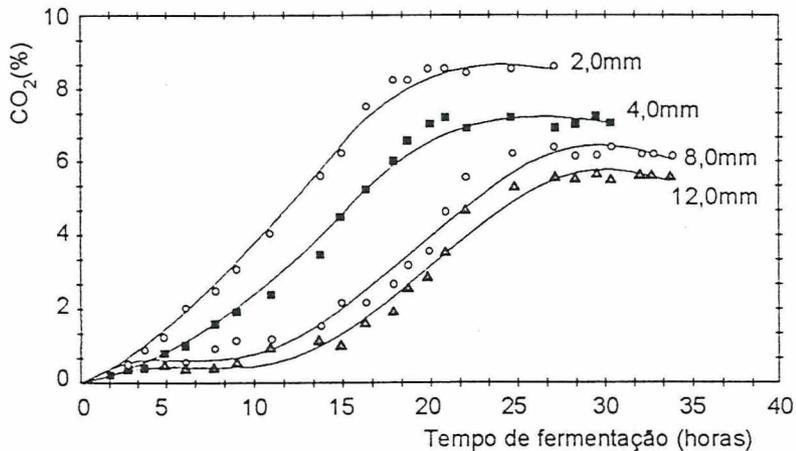
O substrato (ou a matriz sólida) deve ter algumas características que possibilitem o maior rendimento do processo. A principal peculiaridade é o alto grau de acessibilidade do microrganismo a todo o meio e, para tanto, de suas características mais importantes destacam-se a porosidade, o tamanho e o formato das partículas.

Em relação ao tamanho da partícula, um problema se apresenta: se, por um lado, quanto menor o tamanho maior a área superficial e, conseqüentemente, maior o grau de transformação, por outro lado o processo necessita ter uma granulometria própria visando permitir a circulação do ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos, os quais poderiam vir a prejudicar o rendimento do processo. Esse item é importante para a definição da altura do substrato e da granulometria do meio que deve ser empregada no processo.

Por exemplo, segundo estudo de PANDEY *et al.*,<sup>28</sup> partículas de farelo de trigo e farinha de milho (a uma proporção de 9:1) com diâmetros entre 425-500  $\mu\text{m}$  e 500-600  $\mu\text{m}$ , respectivamente, resultaram em uma maior produção de amiloglicosidase, embora tenha sido notado que partículas de diâmetro entre 180  $\mu\text{m}$  e 1,4 mm tenham apresentado rendimentos similares.

ECHEVARRIA *et al.*<sup>29</sup> obtiveram o melhor rendimento de enriquecimento proteico de *Aspergillus niger* utilizando partículas de cana-de-açúcar com 1,4 mm. Já BUDIATMAN; LONSANE<sup>30</sup> utilizaram resíduo fibroso do processamento de mandioca com diâmetro entre 3,0 e 5,0 mm para a produção de pectinase.

A Figura 13.1 apresenta a velocidade de fermentação, avaliada pela porcentagem de CO<sub>2</sub> produzida no decorrer do processo, em função do tamanho das partículas do meio sólido. Pode-se observar que, conforme diminui o tamanho das partículas, aumenta a quantidade de gás carbônico produzido, assim como diminui o tempo em que o processo atinge o máximo de produção de CO<sub>2</sub>.



**Figura 13.1** – Influência do tamanho das partículas na velocidade de fermentação de açúcar de beterraba por *Zymomonas mobilis* para a produção de etanol.<sup>20</sup>

Quanto à porosidade, a principal qualidade desta característica é a capacidade de absorção de água, que facilita o transporte de enzimas e metabólitos por entre o meio e os microrganismos.

Embora alguns autores cite como aspecto importante a simplicidade do meio de cultura utilizado no processo, em boa parte dos estudos o substrato necessita de um pré-tratamento para se adequar às condições necessárias ao crescimento e à produção de metabólitos pelos microrganismos. Assim, para facilitar a atuação dos microrganismos sobre o meio, podem ser empregados os processos de:

- esmagamento, quebra, moagem e peneiramento, visando adequar o meio à granulometria mais adequada do processo;
- suplementação de nutrientes e correção de pH, para suprir a falta de algum nutriente ou adequar às melhores condições de crescimento microbiano;
- hidrólise ácida ou alcalina de material celulósico, visando facilitar a atuação enzimática;
- embebição, para regular o teor de umidade inicial do processo;
- vaporização ou aquecimento, visando a gelatinização ou inchamento do substrato;<sup>6</sup>

- adição de agente seqüestrante, com o objetivo de retirar íons metálicos do meio, que podem diminuir o rendimento do processo;<sup>31</sup>
- processo de esterilização, que visa a diminuição ou eliminação de possíveis contaminações.

Nesse último caso, porém, além de ser uma etapa de consumo muito grande de energia, a esterilização pelo calor pode causar uma modificação nas características do substrato, tais como textura ou qualidade nutricional, que refletem na formação de uma massa compacta ou granular, um ressecamento da massa e, às vezes, uma adesão da massa à parede do fermentador. OSHIMA<sup>32</sup> cita a modificação da textura de diferentes meios após a esterilização.

Felizmente, alguns autores mostram que, a partir da adição de uma quantidade grande de inóculo que visa evitar ou abrandar o problema de contaminações, a não esterilização do meio não afeta a produtividade, como por exemplo na obtenção de penicilina<sup>33</sup> e de etanol.<sup>34</sup>

Diversas matérias-primas e, dentre estas, principalmente diversos tipos de resíduos agroindustriais, podem ser empregadas na fermentação em estado sólido. A escolha de cada meio, logicamente, irá depender do produto final que se deseja obter.

Pode-se exemplificar os seguintes materiais:

- celulose, hemicelulose e lignina oriundas de biomassa vegetal e/ou esterco de animais para a produção de compostos orgânicos,<sup>35,36</sup>
- farelo<sup>37,38</sup> e palha de trigo,<sup>3</sup> farinha e farelo de soja,<sup>39</sup> farinha, manipueira e resíduos sólidos do processamento da mandioca,<sup>30</sup> palha e quirera de arroz,<sup>40,41</sup> bagaço de cana<sup>42,43</sup> e melação para produção de enzimas;
- sorgo,<sup>7</sup> polpa de beterraba,<sup>20,21</sup> "grits" de milho,<sup>12</sup> bagaço de maçã, bagaço de uva, quirera de arroz, melação e cana-de-açúcar<sup>8</sup> para a produção de álcool;
- resíduos de banana, farinha,<sup>44</sup> manipueira e resíduos sólidos do processamento de mandioca, espiga de milho, bagaço de laranja,<sup>45</sup> cana-de-açúcar,<sup>29</sup> bagaço de cana, bagaço de maçã,<sup>17</sup> melação, vinhaça, farelo e palha de trigo,<sup>46</sup> grão-de-bico, beterraba, polpa de café,<sup>47</sup> polpa de batata-doce,<sup>1</sup> arroz cozido,<sup>40</sup> folha de "maple"<sup>36</sup> para a obtenção de enriquecimento protéico;
- bagaço de cana, água de maceração de milho, lactose, sacarose<sup>33</sup> e farelo de trigo<sup>48</sup> para a produção de antibióticos;
- grãos de milho,<sup>49</sup> alfafa e aveia,<sup>50</sup> grãos de sorgo, soja, trigo, amendoim, milho<sup>10</sup> e arroz<sup>10,51</sup> para a verificação de produção de toxinas;
- farelo de trigo,<sup>14</sup> beterraba, bagaço de cana e melação<sup>31,52</sup> para a produção de ácidos orgânicos;
- soja ("hamanatto", "tempeh", "miso", "natto", "shoyu"), pasta de amendoim ("ontjom"), peixe ("katsubushi") e mandioca ("gari", "kokonte", "lafun") para a elaboração de alimentos e condimentos orientais<sup>2,11,53</sup> e africanos;<sup>9</sup>

- sacarose, polpa de beterraba e grãos de argila,<sup>24,25</sup> farinha de mandioca e solução nutriente<sup>54</sup> para a determinação das cinéticas do processo.

Um problema que pode surgir quando da atividade em larga escala para a obtenção de um bioproduto por FSS é o descarte ou o aproveitamento do resíduo gerado.

Segundo ROUSSOS,<sup>55</sup> tem-se sugerido a utilização do resíduo na geração de biogás, de ração animal, disposição em aterro sanitário e de fabricação de chapas e papéis, sem, porém, haver uma pesquisa concreta da viabilidade de cada aplicação. Foi, então, realizado um estudo de ensilagem com o resíduo proveniente da produção de celulase por *Trichoderma harzianum* em meio de bagaço de cana, farelo de trigo e solução nutriente. O resíduo foi prensado e ajustado a uma umidade entre 33 e 45%. Após a adição de bactérias lácteas, soluções ácidas e melaço de cana, a massa foi colocada em sacos plásticos perfurados a 23-28°C. Depois de 6 meses, verificou-se que o resíduo mantinha as mesmas qualidades iniciais.

### 13.5 – reatores para a fermentação semi-sólida

Para iniciar a discussão sobre os tipos de reatores comumente empregados, é interessante analisar quais as formas de processo que são utilizadas para a realização de uma fermentação em estado sólido.

A forma empregada em praticamente todos os estudos revistos diz respeito ao processo em batelada no qual, basicamente, o meio é adicionado ao reator, ocorrendo então a inoculação do substrato e a incubação do mesmo por um determinado período de tempo.

A seguir, o produto obtido pode ser extraído por suspensão do meio com água, soluções-tampão ou solventes (como no caso de enzimas, ácidos, álcool,...) ou então, simplesmente, secado e armazenado (como para a produção de bioinseticidas ou proteína microbiana).

Porém, outros processos são citados na literatura.

Efetou-se uma fermentação semicontínua para a produção de ácido cítrico, em que há, por cinco vezes consecutivas no máximo, a extração do produto e a reintrodução do meio de cultura à matriz inerte e microrganismos para uma nova fermentação, permanecendo assim a matriz sólida junto com a massa microbiana durante 20 a 25 dias dentro do reator empregado.<sup>31</sup>

No caso da produção de ácido giberélico,<sup>14</sup> cita-se o processo em batelada alimentada, no qual há a adição de porções iguais de sacarose ao meio no terceiro, quarto e quinto dia de fermentação, visando diminuir o efeito inibidor ocasionado por este substrato à massa microbiana.

Nos anos 40, há uma citação de produção em escala industrial de enzimas fúngicas, por *Aspergillus oryzae*, por processo contínuo.<sup>56</sup> O método, baseado no sistema de bandejas, consistia na esterilização, resfriamento, alimentação e inoculação do substrato por meios mecânicos, fermentação e secagem através da passagem das bandejas, colocadas em uma espécie de estantes rolantes, por túneis aclimatados, finalizando com moagem e empacotamento mecânicos.

Um outro item que deve também ser analisado refere-se à escolha dos fermentadores e, neste caso, deve-se levar em conta os objetivos da fermentação,<sup>57</sup> a análise econômica dos custos iniciais e operacionais do processo,<sup>1,57</sup> a manipulação simplificada do sistema (carga/recarga, limpeza, manutenção)<sup>1</sup> e a possibilidade de monitoramento e controle de diversos parâmetros, se houver necessidade.<sup>1,57</sup>

Para a ampliação de escala do reator, deve-se verificar, primeiramente, em escala de laboratório, se os objetivos foram alcançados,<sup>57</sup> e observar parâmetros que, em pequena escala, não são compatíveis com a escala industrial (como os efeitos da espessura da camada, da compactação do substrato, da taxa de aeração e da dissipação de calor).<sup>1</sup>

Dos diferentes tipos de reatores encontrados na literatura, segue-se como exemplos de alguns dos mais comumente empregados:

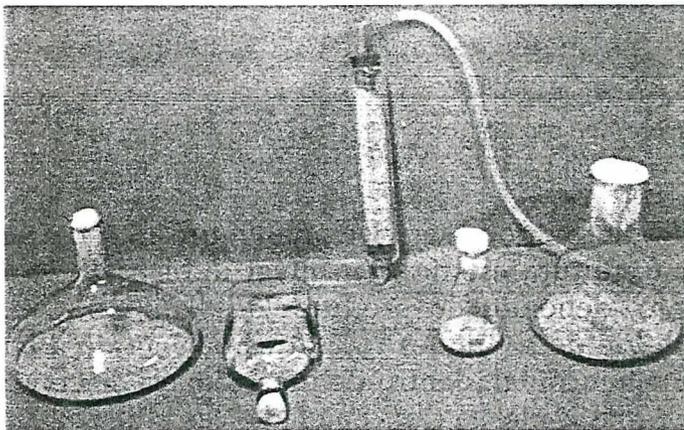
- Reatores de vidro: logicamente, por ser um processo ainda não muito difundido, quando se fala em fermentação em estado sólido deve-se pensar antes de tudo em pesquisas que são realizadas, em nível de laboratório, através deste método.

Assim, os primeiros reatores que devem ser citados são os de vidro, comumente utilizados em laboratório. Erlenmeyers são os primeiros a serem lembrados, devido à facilidade de manuseio durante as pesquisas.

Frascos de Fernbach<sup>58</sup> também são bastante utilizados, inclusive em nível industrial, para a produção de esporos, devido à ampla área superficial entre o substrato e a atmosfera que o mesmo fornece para o desenvolvimento dos microrganismos.

Garrafas de cultura também são muito empregadas pelos mesmos fatos expostos acima. Esses "reatores", embora excelentes para o início de uma pesquisa, deixam a desejar quando se pensa em uma ampliação de escala do processo.

Dessa forma, diversos tipos de reatores têm sido propostos para amenizar os problemas de aeração, troca de calor, umidade, entre outros.



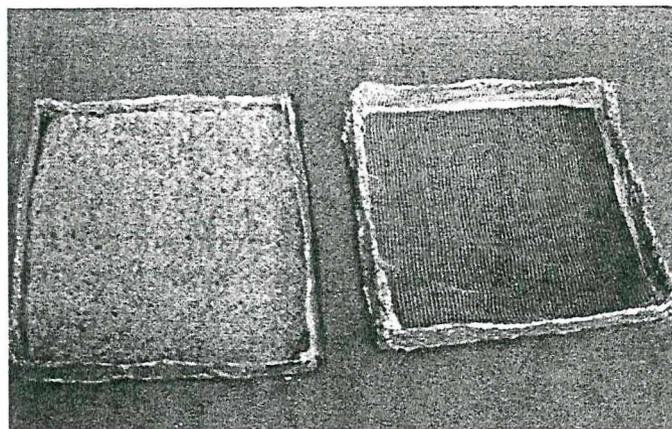
**Figura 13.2** – Reatores de vidro: pela ordem, frasco de Fernbach de 2500 mL, garrafa de cultura, tubular vertical, erlenmeyer de 250 mL, erlenmeyer de 2800 mL.

- Bandejas: as primeiras a surgirem foram as bandejas rasas. Construídas em estrutura de madeira,<sup>59</sup> bambu,<sup>2</sup> alumínio<sup>59</sup> ou outros materiais,<sup>6</sup> de diversos tamanhos (mas, com a altura do meio variando basicamente entre 2 a 7 cm<sup>2,9</sup>), elas podem possuir seu fundo intacto, o que significaria uma atuação muito parecida com a dos erlenmeyers, porém com uma área superficial de troca e uma capacidade de alocar meio de cultura muito maior. Podem também ter seu fundo substituído por uma tela perfurada, o que lhes confere uma maior eficiência na circulação de ar por todo o meio, e não somente na parte superior exposta ao ambiente.

Para a disposição das bandejas, deve-se ter um local apropriado para o desenvolvimento da fermentação. Podem ser utilizadas simplesmente salas com estantes, fazendo-se uso de ar natural ou aeração forçada (passando antes por umidificadores), desde que haja o controle de temperatura e umidade. As bandejas, perfuradas, por outro lado, podem ser também dispostas em estufas que possuam uma adaptação para a entrada de aeração forçada pelo fundo do equipamento.

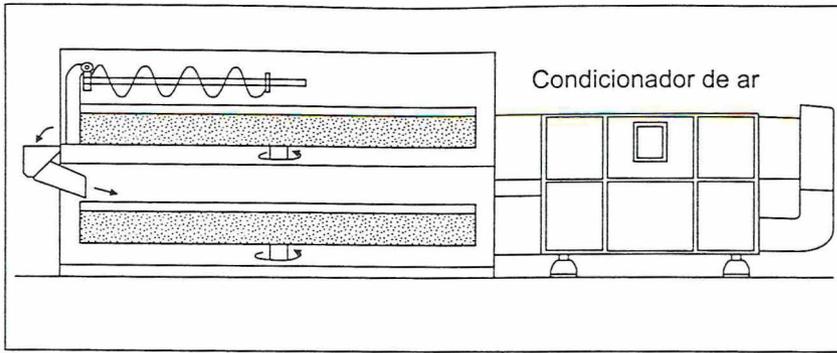
CANNEL; MOO-YOUNG<sup>2</sup> citam o exemplo de utilização de grandes bandejas (1,4 a 4,5m<sup>2</sup>) com fundo de tela, para a produção de "koji" em processo mecanizado, que são colocadas em câmaras de incubação tendo a temperatura ajustada pela passagem de ar por entre o substrato.

Nesses casos, o substrato é aspergido por uma solução de inóculo. Instalações desse tipo requerem um elevado número de trabalhadores, além de o número de bandejas manipuladas diariamente ser igualmente elevado.



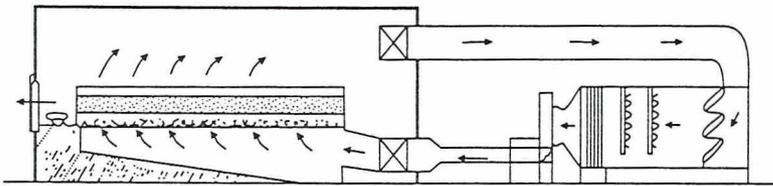
**Figura 13.3** – Reatores tipo bandeja: pela ordem, com meio de cultura e vazio com fundo perfurado.

- Tanques circulares: pode ser visto, na Figura 13.4, o exemplo de um equipamento em cultura estática, em nível industrial. TOYAMA<sup>60</sup> indica um equipamento, denominado produtor de "koji" automático estacionário, que consiste de dois tanques rotatórios de 7 m de diâmetro, dotados de um agitador helicoidal, dentro de uma câmara de condições controladas. Podem ser processados, a cada batelada, cerca de 2 a 3 toneladas de meio de cultura, com alimentação, esterilização, inoculação e retirada do produto realizados automaticamente.



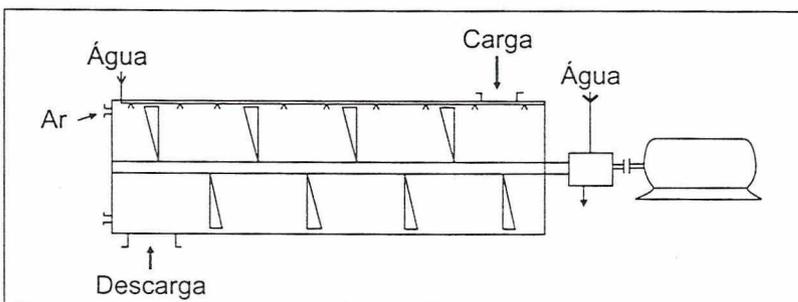
**Figura 13.4** – Tanques circulares<sup>5</sup>

- Esteira rolante: este sistema é uma variante do fermentador de bandejas. As etapas de inoculação e incubação do material esterilizado são realizadas em longas esteiras de fundo perfurado por onde circula ar úmido. De acordo com as necessidades de cada produto, pode ser realizada também uma agitação ocasional.<sup>5</sup>



**Figura 13.5** – Esteira rolante<sup>5</sup>

- Tubular horizontal: neste processo, também denominado tambor rotativo, o substrato é esterilizado e resfriado diretamente no tambor. A rotação do reator pode ser ocasionada tanto por um eixo central como pela movimentação de roletes sobre os quais o fermentador esteja montado. A rotação pode variar de 1 até 180 rpm.



**Figura 13.6** – Reator tubular horizontal com agitação interna<sup>5</sup>

A agitação do substrato pode ser realizada pela simples rotação do reator ou por agitador central contendo número variável de pás; neste segundo caso, o processo é denominado por fermentador tubular com agitação interna.

A aeração da massa é realizada pela passagem de ar esterilizado e umidificado através do reator, objetivando também o controle da temperatura interna.

Esse equipamento apresenta como dificuldades a serem suplantadas o custo relativamente elevado para o volume de material produzido, a manutenção da integridade do micélio devido à agitação do sistema, além das dificuldades de ampliação de escala do processo.<sup>5</sup>

Utilizou-se esse tipo de reator para a produção de ocratoxinas,<sup>61</sup> tendo 33 cm de diâmetro, quatro chicanas internas e uma rotação a uma velocidade de 1 a 40 rpm. Estabeleceu-se que, para permitir a formação das hifas, a fase inicial deveria ser realizada em processo estático. TOYAMA<sup>60</sup> citou, também, o exemplo de um tambor rotativo automático, em escala industrial, para a produção de "koji", em que todas as etapas do processo são realizadas automaticamente.

Em nível laboratorial, o tambor rotativo foi utilizado por NISHIO<sup>62</sup> (capacidade de dois litros) e SILMAN<sup>58</sup> (capacidade para 150 g de meio) para a produção de extrato enzimático a partir de *Aspergillus*.

- Tubular vertical: também denominado fermentador tipo coluna, tem sido o reator utilizado em pesquisas quando se deseja obter o controle do processo. Esses reatores podem ser construídos em vidro<sup>63</sup> ou aço inox,<sup>1</sup> com dimensões de 2 a 40 cm de diâmetro por 20 a 180 cm de altura<sup>1,44,62,63,64</sup>, permitindo uma capacidade entre 10 g e 8 kg<sup>33,54,63,64</sup> a cada batelada.

O controle da temperatura deve ser feito através da passagem de ar por entre o meio, embora alguns pesquisadores indiquem a existência de jaquetas em torno do reator.<sup>63</sup> Porém, devido à baixa condutividade térmica do material sólido utilizado, somente a utilização de jaquetas não é suficiente para controlar a temperatura interna do reator.

Dentro dessa categoria, encontra-se o reator *Zymotis*, projetado pela ORSTOM-França, que possui capacidade para receber 21 kg de meio.<sup>65</sup>

Esse tipo de reator apresenta, como vantagens, um espaço reduzido, a rapidez de carga e descarga e uma relação volume total/volume útil próximo a 1. Como desvantagens, a compactação da massa, a dificuldade de dissipação de calor e um grau de umidade da massa não uniforme ao longo do equipamento.<sup>5</sup>

Visando superar algumas das desvantagens apresentadas, se inclui também o denominado reator de leito fluidizado ar-sólido que, segundo pesquisadores,<sup>66</sup> fornece um melhor controle de temperatura, de umidade e maior homogeneidade do sistema.

- Sacos plásticos: na verificação de produção de tempeh,<sup>59</sup> de toxinas<sup>49</sup> e pesticidas,<sup>67</sup> foram utilizados sacos de polietileno autoclaváveis, com dimensões de 20,0 x 38,0 cm<sup>59</sup> e 30,5 x 61,0 cm.<sup>49</sup> Também utilizaram-se tubos plásticos de 10,0 cm de diâmetro.<sup>59</sup> Cita-se que é necessário perfurar os sacos após um certo período, para permitir a aeração do meio.<sup>49,59</sup>

### 13.6 – Controles do processo

Como em todo processo fermentativo, o controle de determinados parâmetros se faz necessário para a obtenção de produtos com características constantes e uniformes.

Em relação aos conhecimentos de engenharia bioquímica, importantes à compreensão desse item, RAMANA MURTHY *et al.*<sup>68</sup> apresentam uma resenha a respeito de transferência de massa, transferência de calor, cinética das reações, medidas experimentais de crescimento de biomassa e controle de temperatura e concentração de gases, além da influência do substrato e do biorreator no processo fermentativo.

O controle da umidade, da temperatura e do pH do meio, a velocidade e frequência de agitação, as condições de transferência de oxigênio e de nutrientes, as características do substrato, além das características e estimativa de crescimento e da automação do processo são os parâmetros mais freqüentemente analisados em diversos estudos revistos.

- Umidade: o teor de umidade do substrato é um dos principais parâmetros que influencia o sucesso de uma fermentação em estado sólido.

A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o grau de umidade que o substrato deverá ter no início e ao longo da fermentação.<sup>4,5</sup>

Um substrato apropriadamente umedecido deve ter um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de massa de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas devem existir canais que permitam a difusão de gases e a dissipação de calor.<sup>16</sup>

Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo de porosidade do substrato e irá resultar em uma menor difusão de oxigênio no interior do meio e conseqüente decréscimo de trocas gasosas, além de aumentar o risco de contaminação, principalmente a bacteriana.<sup>4</sup>

Para níveis de umidade menores que o necessitado, haverá maior dificuldade na difusão de nutrientes, resultando em um crescimento do microrganismo menor do que o possível e esperado e, conseqüentemente, com menor produção do produto desejado (lembrando que, a um teor de umidade abaixo de 12%, não há desenvolvimento microbiano).<sup>69</sup>

O teor de umidade na FSS pode variar entre 18 e 85%, sendo ele estipulado em função do poder de absorção do substrato. Como exemplo, pode-se citar o processo "koji" (cultura de fungos sobre arroz cozido) onde o substrato é moderadamente umedecido durante o cozimento pelo vapor (35 a 40% de água), e mantido úmido pela passagem de ar com 80 a 90% de umidade relativa, para o desenvolvimento de determinados fungos em sua superfície.

Para a produção de toxinas, é necessário apenas um teor de umidade entre 18 a 30%,<sup>61,63</sup> enquanto que para o crescimento de microrganismos, tendo a lignocelulose como substrato, os níveis variaram entre 70 a 80%. Quando o microrganismo utilizado é uma bactéria, a umidade costuma ser sempre superior a 60%.

A Figura 13.7 apresenta a taxa de produção de proteínas de *Aspergillus niger* de acordo com a umidade inicial do meio de cultura. Pode-se observar que, con-

forme há o aumento da umidade do meio de 35% para 55%, aumenta-se a produção de proteínas no processo, assim como diminui o tempo em que se dá a fase logarítmica e o ponto máximo de obtenção do bioproduto desejado.

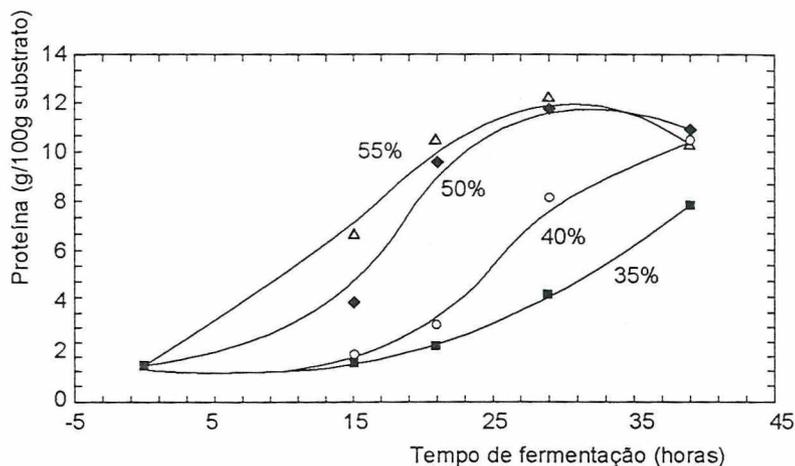


Figura 13.7 – Influência do teor de umidade no crescimento de *Aspergillus niger*.<sup>44</sup>

Durante a fermentação, haverá uma perda de umidade devido à evaporação e às atividades metabólicas microbianas. Essa perda poderá ser reposta ou evitada, pela adição de água esterilizada em intervalos constantes de tempo, pela manutenção da umidade atmosférica entre 90-97% de umidade relativa através de injeção contínua de ar úmido no fermentador ou com a instalação de umidificadores.<sup>4</sup>

- Atividade de água: este parâmetro fornece a quantidade de água não ligada viável à disposição dos microrganismos. Ela é definida como a razão entre a pressão de equilíbrio de vapor do substrato em relação à água pura, à mesma temperatura. A atividade de água ( $a_w$ ) influencia o desenvolvimento microbiano e os processos bioquímicos. Assim, cada microrganismo tem um nível de  $a_w$  mínimo para que possa efetuar suas atividades metabólicas. Em termos gerais, por exemplo, os fungos possuem uma  $a_w$  mínima de 0,7, enquanto que para as leveduras o valor situa-se em 0,8 e para as bactérias, 0,9.<sup>68</sup>

Em PANDEY,<sup>15</sup> são citados exemplos em que, durante uma fermentação em estado sólido para fungos filamentosos, altas atividades de água favorecem a esporulação, enquanto que para baixas atividades há o favorecimento de crescimento micelial ou germinação dos esporos. A atividade da água influencia a produção de aromas em queijos, sendo encontrado que o ponto ótimo de produção situa-se na faixa de  $a_w = 0,98$ . NARAHARA<sup>40</sup> cita que o desenvolvimento de *Aspergillus oryzae* em arroz cozido cessa a valores inferiores a  $a_w = 0,90$ . YANG,<sup>70</sup> para o enriquecimento protéico de resíduos de batata-doce com leveduras amilolíticas, indica valores de  $a_w = 0,98-0,99$ .

- Temperatura: devido às atividades metabólicas dos microrganismos e dependendo da altura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo.

Por exemplo, RATHBUN, SHULER<sup>71</sup> indicam um gradiente de 3°C a cada centímetro de meio em um reator, sem dissipação de calor, com uma camada de substrato de 6,5 cm de profundidade, para a produção de tempeh.

Como a temperatura afeta diretamente a germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação dos microrganismos e a formação de produto, o calor produzido deverá ser imediatamente dissipado, para que o aumento da temperatura não prejudique a fermentação desejada.

Isso pode ser efetuado com a introdução de ar comprimido através do meio de cultura, com o controle da temperatura da sala ou do equipamento onde ocorre a fermentação, ou pelo sistema de camisas em torno do fermentador com circulação de água refrigerante.<sup>4</sup>

No processo de compostagem, que utiliza grandes leiras de difícil oxigenação interna, a temperatura interior chega a atingir níveis de 60 a 70°C.<sup>57</sup>

Já em um exemplo de produção de etanol, a temperatura ótima situou-se na faixa de 35°C, sendo que foi observada a produção de sorbitol a temperaturas pouco maiores (39°C) e a formação de levana a temperaturas mais baixas (25°C).<sup>21</sup>

A Figura 13.8 apresenta a taxa de produção de proteínas de *Aspergillus niger* em relação à temperatura empregada no processo. Pode-se observar que, embora a temperatura de 40°C tenha apresentado um menor tempo em que ocorre a fase logarítmica, o processo à temperatura de 35°C obteve os maiores valores de produção protéica. Observa-se também que a temperatura de 45°C apresentou uma perda sensível na eficiência do processo.

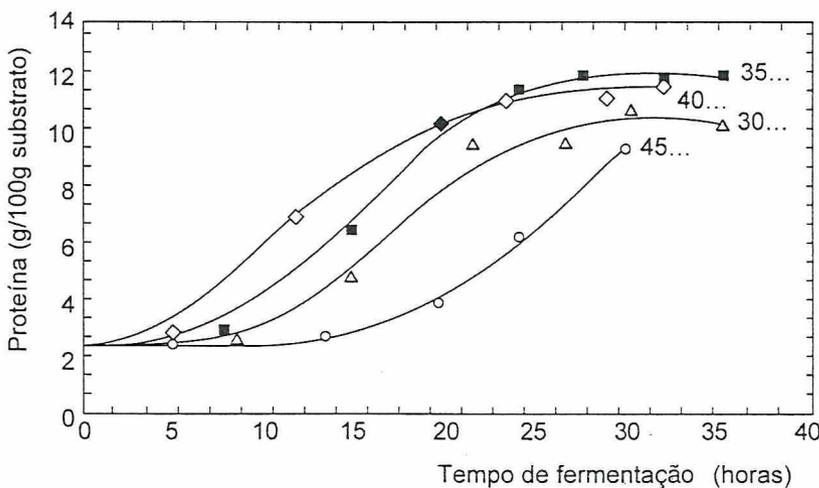


Figura 13.8 – Influência da temperatura no crescimento de *Aspergillus niger*.<sup>44</sup>

Quanto ao controle de temperatura, NARAHARA<sup>40</sup> reporta que para a produção de enzimas proteolíticas utilizando-se *Aspergillus oryzae* em arroz cozido, a

temperatura ideal situa-se na faixa de 30°C, sendo que, visando o crescimento do microrganismo, a temperatura deve ser mantida a 38°C.

- pH: o controle do pH durante a fermentação em estado sólido, embora este seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e à consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do potencial hidrogeniônico, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato.<sup>4</sup>
- Aeração: para um bom rendimento e uma rápida fermentação em substrato sólido, é necessário o uso de uma grande área superficial do meio de cultura, no qual o microrganismo pode se desenvolver em contato com o ar. Na maior parte dos processos, tanto em nível laboratorial como em nível industrial, a oxigenação do meio é realizada pela introdução de ar esterilizado sob pressão no equipamento de fermentação.

Dependendo do valor da taxa de aeração introduzida, pode ser ocasionada uma perda de umidade devido à exaustão do ar, provocando uma secagem não desejada do substrato. Assim sendo, torna-se sempre necessário, nesses casos, a presença de umidificadores de ar antes da introdução do mesmo ao reator.

Há diferentes maneiras para se obter uma melhor movimentação do ar por entre o substrato, permitindo assim uma melhor transferência de oxigênio, quer seja pela utilização de material poroso medianamente granulado ou fibroso, pelo uso de pequena espessura da camada de substrato, pela utilização de bandejas perfuradas ou reatores com fundo composto por uma tela de arame, pela agitação do substrato ou ainda pela introdução de ar forçado estéril dentro do reator.<sup>4</sup>

Essa quantidade de ar estéril a ser introduzida no processo fermentativo vai depender da natureza dos microrganismos, da quantidade de calor metabólico a ser dissipada do processo, da espessura da camada de substrato, da quantidade de CO<sub>2</sub> e outros metabólitos voláteis a serem eliminados e da necessidade de oxigênio para a síntese dos produtos.<sup>4</sup>

Em comparação com a fermentação submersa, esta necessita de quatro a cinco vezes mais oxigênio que a fermentação em estado sólido.<sup>5</sup>

Para se avaliar a taxa de consumo de oxigênio e de formação de outros gases, pode-se utilizar tanto um analisador de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, assim como um cromatógrafo a gás, capazes de analisar os gases existentes na atmosfera do reator.<sup>62,72</sup>

- Agitação: o emprego da agitação em um processo em estado sólido pode vir a fornecer uma melhor homogeneização quanto à distribuição dos inóculos e do umidificante, impedir a formação de agregados e favorecer tanto a transferência gasosa pela exposição de partículas de substrato à atmosfera do fermentador como a troca de calor dentro do meio.<sup>4</sup> A agitação, porém, devido à fragmentação mecânica do micélio, pode interferir na formação dos esporos e no desenvolvimento natural do microrganismo.<sup>58</sup> Pode causar também a compactação do meio e a danificação das hifas.<sup>5</sup>
- Estimativa e característica de crescimento: a seqüência de crescimento microbiano em meio de cultura, em condições ótimas, envolve a germinação

nas primeiras horas, seguida de um aumento gradual de temperatura devido ao início das atividades metabólicas, uma taxa crescente das atividades metabólicas, a fase estacionária e de declínio. A duração de cada etapa vai depender das condições de fermentação, do microrganismo empregado e do produto que se deseja obter.<sup>4</sup>

O fungo filamentososo tem a capacidade de penetrar nos espaços inter e intragranulares por meios mecânicos ou enzimáticos, com a firme fixação das hifas na superfície do substrato e posterior intensa ramificação e penetração na parede celular do substrato pela atuação de enzimas extracelulares produzidas e excretadas pelos microrganismos.

Alguns estudos têm sido realizados visando determinar as cinéticas de crescimento do microrganismo, de consumo de substrato e de geração do produto. Contudo, é muito difícil estimar diretamente a biomassa microbiana no processo em estado sólido,<sup>69</sup> assim como separar, em muitos casos, o micélio do substrato.

Dessa forma, são utilizados métodos indiretos, tais como extração alcalina da proteína micelial do complexo celulose-fungo; estimativa da quantidade de ATP ou glicosamina<sup>24,25,62</sup> do microrganismo; estimativa da quantidade de proteínas por infravermelho<sup>1</sup>; determinação da atividade da lacase extracelular; determinação contínua da quantidade de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> presentes na atmosfera do fermentador por analisadores de gases,<sup>1,23,24,40,72,73,74</sup> ou por absorção do CO<sub>2</sub> em NaOH.<sup>54</sup>

- Extração de produtos: existem poucas informações disponíveis em literatura relacionadas a estudos de extração de produtos obtidos por FSS. Por exemplo, para extração de enzimas extracelulares, em geral, apenas é citada a utilização de um diluente, como água corrente, água destilada, solução diluída de sais ou solução-tampão.

RAMAKRISHNA *et al.*<sup>75</sup> realizaram uma pesquisa visando recuperar amiloglucosidase, produzida por *Aspergillus niger* em meio de farelo de trigo, farinha de milho e solução nutriente, utilizando os métodos de percolação e recuperação em sistemas multiestágios em contracorrente. Concluíram, por esse estudo, que:

a) para a percolação, o rendimento da extração é o mesmo, tanto utilizando a proporção 1:10 como 1:100 entre meio e diluente. Nesse caso, o rendimento máximo de extração foi de 80 a 82%.

b) A recuperação com agitação é cerca de 8% maior em relação ao processo estático. Ainda assim, tende a restar 17% da enzima produzida retida na matriz sólida.

c) a utilização de solução de sais, na faixa de 0,5% a 5%, não afetou a taxa de extração.

d) o sistema utilizando cinco estágios, com o diluente circulando continuamente por entre eles, mostrou-se mais vantajoso, devido ao fato de o extrato enzimático obtido estar mais concentrado, eliminando, por vezes, a necessidade de concentração que poderia interferir na atividade enzimática.

### 13.7 – Vantagens e desvantagens

O processo em estado sólido apresenta as seguintes vantagens operacionais em relação ao processo submerso:

- apresenta uma aceleração na taxa de reação devido ao direto contato entre o substrato e o microrganismo;<sup>21</sup>
- pode eliminar etapas de pré-tratamento do substrato, como no caso da produção de etanol, no qual não há a necessidade do processo de extração do caldo de cana;<sup>21</sup>
- vários estudos apontam que o substrato utilizado é relativamente simples, necessitando, em muitos casos, somente de adição de água ou uma pequena correção do meio com a introdução de fontes de nitrogênio e de outros nutrientes minerais;<sup>2,9,11,76</sup>
- devido à menor quantidade de água empregada, o volume do reator deve ser sempre bem menor que a operação similar em processo submerso, o que irá reduzir os custos de operação e de capital investido assim como o espaço ocupado necessário ao processo;<sup>2,7,9,11,21,76</sup>
- essa baixa quantidade de água empregada também deve reduzir os custos de capital investido e de energia consumida na recuperação do produto, como no caso da produção de álcool;<sup>2,21</sup>
- a utilização de agitação contínua raramente é necessária, podendo ser empregada, ocasionalmente, apenas uma leve mistura do substrato;<sup>2</sup>
- a aeração, natural ou forçada, é facilmente acessível aos microrganismos, devido aos interstícios existentes entre as partículas do substrato;<sup>2,9,76</sup>
- os baixos teores de umidade empregados, somados à alta concentração de inóculo incorporado ao meio, reduzem, ou muitas vezes até eliminam, o problema de contaminação por outros microrganismos indesejáveis;<sup>2,7,33,34,76</sup>
- as condições de crescimento empregadas são, em geral, similares às condições naturais de crescimento dos fungos filamentosos, o que possibilita, em muitos casos, maiores rendimentos na obtenção de produtos de utilização industrial;<sup>76</sup>
- também esse fato permite o estudo de casos que somente ocorrem em condições semelhantes à fermentação em estado sólido, como a produção de toxinas por determinados fungos filamentosos em grãos;<sup>76</sup>
- o produto final encontra-se mais concentrado, o que permite, em alguns casos, como na produção de bioinseticidas ou ração animal,<sup>50</sup> o processo direto de secagem e embalagem do produto final obtido, ou mesmo a utilização direta, como para alguns alimentos orientais;<sup>2,76</sup>
- quando for necessária a recuperação do material obtido, a concentração do mesmo facilita esta etapa, pois permite a utilização de menores quantidades de solventes empregados para extrair o produto;<sup>76</sup>
- há uma menor produção de resíduos líquidos a serem tratados ou dispostos, o que reduz também os custos de capital investido e de operação da

planta de tratamento construída, além de resultar em uma redução nos problemas ambientais originados pelo processo;<sup>2,7,76</sup>

- assim como o processo submerso, a fermentação em estado sólido pode ser realizada de modo contínuo, semicontínuo ou em batelada, e os equipamentos empregados em laboratório, planta-piloto ou em escala industrial por este sistema não são mais complexos em comparação com aqueles utilizados na fermentação tradicional;
- sendo necessária uma área de estocagem do produto semiprocessado ou final, esta deverá ser bem menor que a similar em processo submerso;<sup>2</sup>
- em diversos casos, obteve-se um rendimento do processo maior que em comparação à fermentação submersa.<sup>76</sup>

Contudo, o processo apresenta também as seguintes limitações, que devem ser conhecidas para futuros estudos visando uma possível resolução destes problemas:

- dependendo das características do meio e do tipo de reator empregado, pode haver dificuldade em dissipar tanto o calor produzido como os gases gerados durante o processo, o que irá conduzir, para o primeiro caso, a uma elevação da temperatura em pontos localizados, e, no cômputo geral, resultará em quedas sensíveis no rendimento;<sup>2</sup>
- devido à heterogeneidade do substrato, dissipação de calor e gases gerados, manipulação do meio e do produto final e do monitoramento e controle do processo, poderá haver dificuldades intrínsecas quando se desejar realizar a ampliação de escala do sistema;
- se for necessário o emprego da agitação do meio em fermentação, a energia despendida deverá ser bem maior que em processo submerso;<sup>11,76</sup>
- embora estejam sendo realizados estudos para a suplantação desses problemas, ainda há uma dificuldade no acompanhamento e controle de parâmetros operacionais, tais como pH, temperatura, umidade, aeração e crescimento de microrganismos;<sup>2,5,9,76</sup>
- para evitar a esterilização do meio e visando obter o máximo de rendimento, há a necessidade de incorporar uma grande quantidade de inóculo ao substrato e posterior homogeneização do sistema;<sup>3,11</sup>
- assim como, para alguns estudos, somente essa forma de processo pode ser utilizada, para outros casos, principalmente quando há o envolvimento de bactérias, a exclusividade cabe ao processo submerso;
- da mesma forma que a fermentação tradicional, há a necessidade do pré-tratamento dos substratos, e, em alguns casos, mais custoso, adequá-los à fermentação desejada;<sup>76</sup>
- há uma dificuldade de coleta de amostras representativas durante o processo, devido à não homogeneidade da massa em fermentação;<sup>5</sup>
- de acordo com o processo, pode haver a necessidade de um controle mais rigoroso das condições ambientais nos locais de acesso à fermentação, principalmente quando houver a produção de esporos de fungos filamentosos, visando preservar a saúde das pessoas envolvidas com o sistema;

- embora seja um fato que vários estudos têm sido realizados, notando-se um crescente interesse nessa área por pesquisadores do Ocidente, ainda há uma reduzida oferta de publicações técnicas<sup>2</sup> e de exemplos concretos que possam ser observados e vivenciados.

### 13.8 – Exemplos de casos

Este item é dedicado à apresentação de alguns estudos referentes à exploração da fermentação em estado sólido para a obtenção de bioprodutos por diversos autores, publicados nos mais importantes periódicos da área de biotecnologia e bioprocessos. Não se trata de esgotar o tema, e sim de dar subsídios para quem quiser começar a utilizar esse processo em suas pesquisas.

#### PRODUÇÃO DE ÁLCOOL ETÍLICO

Foram três as principais linhagens de microrganismos estudadas na produção de álcool etílico via FSS: a tradicional *Saccharomyces cerevisiae*<sup>7,8,12,34</sup> e *Schwanniomyces castelli*,<sup>64,77</sup> dentre as leveduras, e a bactéria *Zymomonas mobilis*.<sup>20,21</sup> O emprego de cada uma delas dependeu principalmente do substrato a ser utilizado: no caso de *Saccharomyces* e *Zymomonas*, o meio de cultura deve ser composto basicamente por açúcares (cana-de-açúcar,<sup>8</sup> beterraba,<sup>20,21</sup> sorgo,<sup>7</sup> vagem de alfarroba<sup>34</sup>) ou amido pré-sacarificado (milho e cevada<sup>12</sup>); já para *Schwanniomyces castelli*, pode ser utilizado amido diretamente,<sup>7,8</sup> uma vez que estes microrganismos apresentam enzimas com capacidade amilolítica. No caso, os autores utilizaram amido solúvel embebido em bagaço de cana. O teor de umidade do meio, nos diferentes estudos, variou de 70,0 a 77,3%, a temperatura de 25 a 35°C e o pH de 4,0 a 5,7. O etanol pôde ser obtido em um período entre 16 a 30 horas, a partir de inóculos variando de  $1,0 \times 10^7$  a  $7,5 \times 10^8$  células/g meio. Utilizaram-se partículas de tamanho desde 0,5 a 5,0 mm, sendo que a eficiência de conversão a etanol situou-se na faixa de 80 a 95%.

#### PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

a) Ácido láctico: a produção pode ser obtida a partir de *Rhizopus oryzae*, dentre os fungos<sup>78</sup> e pelas bactérias *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*.<sup>22</sup> Utilizaram-se, como meio de cultura, soluções de glicose e de carbonato de cálcio embebendo partículas de bagaço de cana de tamanho entre 0,8 a 2,0 mm ou torta de filtro (resíduo da indústria de álcool) simplesmente. Em uma comparação com o processo em meio líquido, SOCCOL *et al.*<sup>78</sup> apontaram um rendimento na faixa de 77% para ambas as fermentações.

b) Ácido giberélico: esta produção foi realizada utilizando-se linhagens de *Gibberella fujikuroi* em meio de cultivo composto basicamente de farelo de trigo, amido solúvel e solução de nutrientes minerais, com o teor de umidade sendo estabelecido a partir da proporção de duas partes de meio sólido para uma de líquido. Manteve-se a temperatura a 28°C e a produção efetuou-se por um período de 6 a 7 dias, utilizando-se os processos de fermentação em estado sólido, tanto em batelada como em batelada alimentada.<sup>14</sup>

c) Ácido cítrico: o microrganismo utilizado para esta produção foi, em todos os estudos, *Aspergillus niger*.<sup>6,31,52,79,80</sup> Os meios de cultura podem ser melaço (junto com a adição de solução de nutrientes à base de nitrogênio, fósforo e potássio) em bagaço de cana,<sup>31,52</sup> torta de filtro do processamento de cana-de-açúcar,<sup>80</sup> bagaço de maçã<sup>79</sup> ou sacarose,<sup>52</sup> com o teor de açúcar variando de 8,5 a 14,0%. A temperatura situou-se na faixa de 28 a 30°C, com o meio tendo um teor de umidade em torno de 65 a 88%, e valores de pH entre 5,5 e 5,8. Inoculando-se com uma suspensão de  $2,0 \times 10^6$  esporos/g meio, após 4 a 6 dias, obteve-se uma conversão de 80%. A adição de metanol<sup>52,79</sup> e/ou hexacianoferrato<sup>31,80</sup> (agente seqüestrante) ao substrato aumentou o rendimento do processo.

## PRODUÇÃO DE ENZIMAS

a) Fitase: para a redução de níveis de ácido fítico em farinha de semente de colza e de canola (subprodutos do processamento de óleo a partir destas matérias-primas), utilizou-se uma cultura de *Aspergillus carbonarius* em meio composto por farinha de canola e fosfato inorgânico.<sup>81</sup> O período de fermentação foi de 72 horas, a um teor de umidade de 53-60%.<sup>82</sup> A adição de oleato de sódio (1%) e Tween-80 ao meio aumentou a produtividade do processo.<sup>83</sup>

b)  $\alpha$ -amilase: para a produção desta enzima termoestável, utilizaram-se diversas linhagens de *Bacillus*, como *Bacillus coagulans*,<sup>21</sup> *Bacillus megaterium*,<sup>84</sup> *Bacillus licheniformis*<sup>85</sup> e *Bacillus sp.*,<sup>86</sup> em meio de farelo de trigo,<sup>21</sup> com partículas de diâmetro entre 0,4 e 0,8 cm, pH inicial 7,0 a 40°C.<sup>84</sup> Foi mostrado que a atividade enzimática é reduzida em até 85% caso o teor de umidade inicial do meio varie de 65% a 95%. LONSANE; RAMESH<sup>19</sup> mostram um resumo desta produção em FSS por bactérias. Já por fungos, verificou-se a produção por *Rhizopus oryzae* em meio à base de mandioca.<sup>87</sup>

c) Pectinase: foram empregadas culturas de *Aspergillus sp.*,<sup>30</sup> *Aspergillus carbonarius*<sup>88</sup> e *Aspergillus niger*<sup>43</sup> em meio de resíduo fibroso de processamento de mandioca,<sup>30</sup> farelo de trigo e sais,<sup>88</sup> pectina mais sacarose, glicose ou ácido galacturônico embebidos em suporte de bagaço de cana.<sup>43</sup> Um dos meios consistiu de partículas de tamanho entre 3-5 mm,<sup>30</sup> a uma umidade de 70%,<sup>30,43</sup> e a 30°C.<sup>88</sup> Foi constatado que, em termos de atividade enzimática, a fermentação em estado sólido foi onze vezes superior à fermentação submersa.<sup>43</sup>

d) Celulases: Foi observada a atividade celulolítica de extratos enzimáticos obtidos a partir de *Trichoderma reesei*,<sup>3</sup> *Trichoderma viride*,<sup>42,89</sup> *Penicillium citrinum*,<sup>41</sup> *Penicillium chrysogenum* e *Fusarium oxysporum*,<sup>42</sup> tendo como substrato palha de trigo,<sup>3</sup> bagaço de cana seco ao sol,<sup>42</sup> cascas de arroz<sup>41</sup> e fibra de coco.<sup>89</sup> Foram utilizadas, como condições do processo, um pH inicial de 5,8 a um teor de umidade de 80% e temperatura de 25°C<sup>42</sup> e 30°C,<sup>3</sup> durante um período de 7-14 dias.<sup>41,42,89</sup> Observou-se, também, que a produção em meio sólido foi três vezes superior à submersa.<sup>42</sup>

e) Enzimas proteolíticas: verificou-se a produção de enzimas proteolíticas a partir de *Bacillus amyloliquefaciens*,<sup>90</sup> *Aspergillus awamori*,<sup>39</sup> e *Aspergillus oryzae*,<sup>40,91</sup> à temperatura de 30°C<sup>40,90</sup> e 37°C,<sup>37</sup> pH inicial de 7,9<sup>39</sup> e um teor de umidade de 35%,<sup>40</sup> utilizando arroz cozido,<sup>40</sup> farelo de trigo<sup>91</sup> e farinha de soja.<sup>39</sup>

f) amiloglicosidase: estudou-se a produção por *Rhizopus oryzae*,<sup>87</sup> *Aspergillus oryzae*,<sup>23</sup> e *Aspergillus niger*,<sup>15,28,37,38,92</sup> em meio à base de farinha de mandioca,<sup>87</sup> farelo de trigo<sup>28,38,75,92</sup> e farelo de arroz.<sup>15</sup> Empregou-se, como condições de cultivo, uma temperatura entre 28 e 30°C,<sup>15,23,38,92</sup> a valores iniciais de umidade de 55% e pH 4,7.<sup>92</sup> Mostrou-se que a produtividade em meio sólido foi 32 vezes superior à produção em meio líquido.<sup>87</sup>

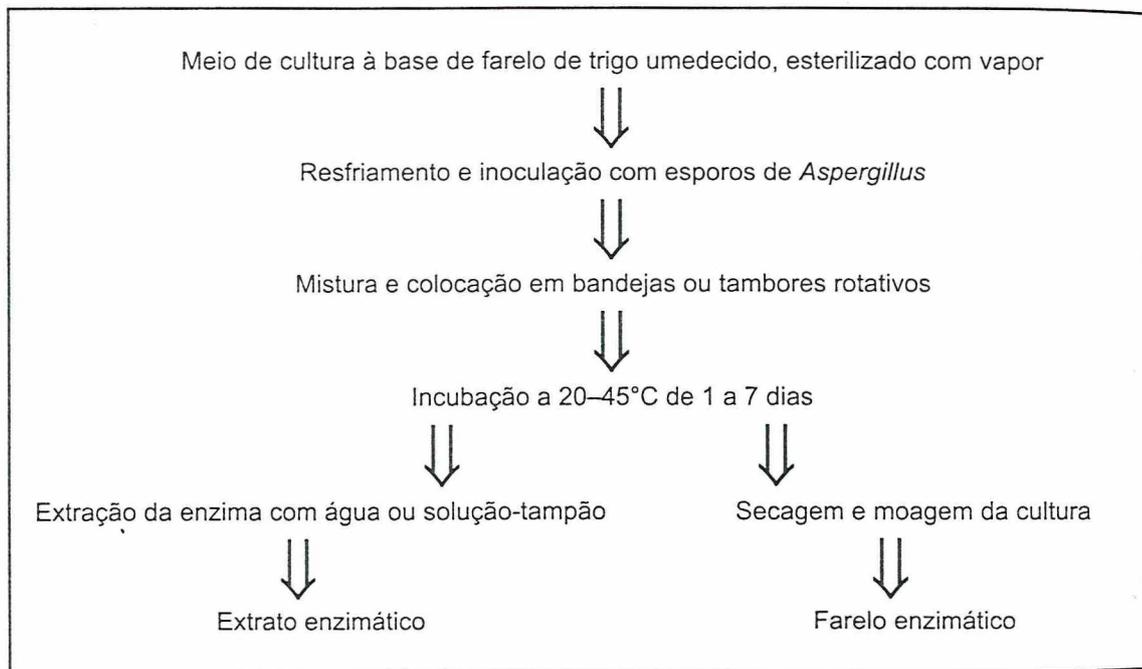


Figura 13.9 – Uma seqüência típica de um processo de produção de enzimas pelo método de cultura sólida.<sup>57</sup>

## PRODUÇÃO DE TOXINAS

Observou-se que diferentes espécies de *Fusarium* são potenciais produtores de toxinas, tais como a fusarina C,<sup>93</sup> a fumonisina,<sup>49</sup> deoxinivalenol e 3-acetildeoxinivalenol,<sup>51</sup> tendo como substrato arroz<sup>51</sup> ou milho.<sup>49</sup> Da mesma forma, *Aspergillus* produzem aflatoxina e ocratoxina, principalmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus ocraceus*.<sup>10,50,61,94,95</sup> Os estudos foram conduzidos em uma faixa de temperatura entre 25 a 29°C, teor de umidade entre 18 a 31%, utilizando-se como meio sólido forragens de alfafa e aveia,<sup>10,50,94</sup> grãos de sorgo, soja, trigo, amendoim, milho e arroz.<sup>10,50,95</sup>

## PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS

a) Penicilina: a utilização de *Penicillium chrysogenum*, em meio de bagaço de cana umidificado com solução nutriente à base de glicose, lactose e água de maceração de milho, obteve maior produtividade volumétrica e maior rendimento em menor período de fermentação, quando comparado com o processo submerso. Para tanto, foi introduzido no processo um inóculo com  $5,0 \times 10^6$  esporos por grama de meio, à temperatura de 26°C, pH inicial de 5,5 e um teor de umidade inicial de 70 a 73%, durante um período de 46 horas.<sup>33</sup>

b) Iturina: para a produção deste antibiótico antifúngico por *Bacillus subtilis*, utilizou-se farelo de trigo, verificando-se que a produção em meio sólido foi de cinco a seis vezes maior que a similar em meio líquido.<sup>48</sup>

## PRODUÇÃO DE BIOPESTICIDAS

a) Foram produzidos esporos do fungo entomopatogênico *Beauveria brongniartii* em grãos de milho pré-tratados, alcançando um rendimento de  $4,8 \times 10^8$  conídios por grama de grãos;<sup>67</sup>

b) Estudou-se a atuação do farelo fúngico, obtido a partir da fermentação de *Stilbella aciculosa* em farelo de trigo, contra *Rhizoctonia solani*;<sup>96</sup>

c) Esporos de *Coniothyrium minitans*, inibidor da germinação de *Sclerotinia sclerotiorum*, foram produzidos em diferentes tipos de substratos, alcançando um rendimento na faixa de  $1,9$  a  $9,3 \times 10^8$  esporos por grama de meio de cultura;<sup>97</sup>

d) Verificou-se a produção de esporos de *Bacillus thuringiensis* a partir de resíduos de indústria de processamento de mandioca, alcançando um alto rendimento no processo, bem superior à cultura submersa.<sup>18</sup>

## PRODUÇÃO DE ESPOROS

Efetuuou-se a obtenção de esporos de *Trichoderma harzianum* (potencial gerador de celulasas, biopesticidas, antibióticos, compostos flavorizantes e proteína microbiana) em suporte inerte (bagaço de cana) e substrato composto por farinha de mandioca e solução nutriente, a 29°C, com um teor de umidade de 75%, durante um período de 6 dias a uma taxa de aeração de 300 litros de ar por quilograma de meio por hora. A partir de um inóculo de  $3,0 \times 10^7$  esporos/g meio, foram gerados até  $5,0 \times 10^{10}$  esporos/g de meio, 5 vezes mais que a produção em meio agar.<sup>98</sup>

## ENRIQUECIMENTO PROTÉICO

Visando obter um enriquecimento protéico microbiano, foram estudadas as linhagens de *Aspergillus niger*,<sup>29,44,45,47</sup> *Trichoderma reesei*,<sup>1,46</sup> *Rhizopus sp.*,<sup>45</sup> *Rhizopus oligosporus*,<sup>99</sup> *Aspergillus oryzae*,<sup>40</sup> *Saccharomyces diastaticus* e *Saccharomyces sp.*<sup>70</sup> Os meios empregados foram cana-de-açúcar e nutrientes,<sup>29</sup> polpa de batata-doce,<sup>1,70</sup> arroz cozido,<sup>40</sup> farinha de mandioca e solução salina,<sup>44</sup> "grits" de milho,<sup>99</sup> polpa de café,<sup>47</sup> bagaço de laranja,<sup>45</sup> palha de trigo e solução nutriente,<sup>45</sup> com uma concentração inicial de  $2$  a  $5 \times 10^7$  esporos por grama de meio.<sup>29,44</sup>

Verificou-se que as variáveis do processo observadas foram as mais diversificadas dentre todas as aplicações da fermentação em estado sólido revistas. Como exemplos, os estudos foram conduzidos a um pH inicial de 2,5,<sup>1</sup> 3,5,<sup>47</sup> 3,8,<sup>1</sup> 3,5-4,3,<sup>45</sup> 4,2,<sup>29</sup> 4,5<sup>70</sup> e 5,0,<sup>46</sup> a teores de umidade de 40%,<sup>40</sup> 50-55%,<sup>44</sup> 60%,<sup>99</sup> 65%,<sup>70</sup> 69%,<sup>29</sup> 70%<sup>45,46</sup> e 80%,<sup>47</sup> temperaturas de 28°C,<sup>1</sup> 29°C,<sup>46</sup> 30°C,<sup>45,70</sup> 33-36°C,<sup>29</sup> 35°C,<sup>44,47</sup> 37°C,<sup>99</sup> e 38°C,<sup>40</sup> com taxas de aeração de 4,3<sup>29</sup> e 8,0<sup>47</sup> litros por quilograma de meio por minuto.

Também foram realizados estudos a partir de resíduos agrícolas celulósicos (palha de centeio<sup>(35)</sup>, folha de "maple"<sup>(36)</sup>), com pré-tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e

$\text{NH}_4\text{OH}$ ,<sup>35</sup> ou  $\text{NaOH}$ <sup>36</sup> a 121°C para hidrólise do material. Após essa etapa, adicionou-se solução salina e inoculou-se com *Candida utilis*, *Aerobasidium pululans*, *Trichoderma viride*<sup>35</sup> e *Chaetomium cellulolyticum*,<sup>36</sup> a um teor de umidade de 75%-78% e temperatura ambiente<sup>35</sup> ou a 37°C.<sup>36</sup>

## ALIMENTOS ORIENTAIS

Como exemplo, foi estudada a produção de tempeh, um tradicional alimento da Indonésia, a partir de *Rhizopus oligosporus*<sup>100</sup> e *Rhizopus sp.*,<sup>59</sup> em meio à base de trigo<sup>100</sup> ou soja,<sup>59</sup> a 31°C por 20-24 horas.<sup>59,100</sup> Por esse processo, o sabor desagradável da soja torna-se mais aceitável, o alimento é mais facilmente digerível devido à ação das enzimas lipolíticas, proteolíticas e amilolíticas produzidas, além de aumentar os níveis de niacina e riboflavina ao longo da fermentação.<sup>100</sup>

## Referências bibliográficas

- (1) DURAND, A., DE LA BROISE, D., BLACHÈRE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. *Journal of Biotechnology*, v. 8, p.59-66, 1988.
- (2) CANNEL, E., MOO-YOUNG, M. Solid-state fermentation systems. *Process Biochemistry*, v. 15, p.2-7, 1980.
- (3) CHAHAL, D.S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, p.205-10, 1985.
- (4) LONSANE, B.K., GHILDYAL, N.P., RAMAKRISHNA, S.V. Engineering aspects of pectolytic solid state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 7, p.258-65, 1985.
- (5) THIEMANN, J.E. Produção de enzimas por fermentação em substrato semi-sólido com especial referência às celulasas. In: SEMINÁRIO DE "HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS", 2, 1985, Maringá. *Anais...* Maringá, 1985. p.107-31.
- (6) CAHN, F.J. Citric acid fermentation on solid materials. *Industrial and Engineering chemistry*, v. 27, p.201-4, 1935.
- (7) KARGI, F., CURME, J.A., SHEEHAN, J.J. Solid-state fermentation of sweet sorghum to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, p.34-40, 1985.
- (8) KIRBY, K.D., MARDON, C.J. Production of fuel ethanol by solid-phase fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 22, p.2425-27, 1980.
- (9) AIDOO, K.E., HENDRY, R., WOOD, J.B. Solid substrate fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, v. 28, p.201-37, 1982.
- (10) HESSELTINE, C.W. Solid state fermentation - Part 1. *Process Biochemistry*, v. 12, n.6, p.24-7, 1977.

- (11) RALPH, B.J. Solid substrate fermentations. **Food Technology in Australia**, v. 28, p.247-51, 1976.
- (12) UNDERKOFER, L.A., SEVERSON, G.M., GOERING, K.J. Saccharification of grain mashes for alcoholic fermentation. **Ind. Eng. Chem.**, v. 38, p.980-85, 1946.
- (13) UNDERKOFER, L.A., SEVERSON, G.M., GOERING, K.J., CHRISTENSEN, L.M. Commercial Production and use of mold bran. **Cereal Chemistry**, v. 24, p.1-22, 1947.
- (14) KUMAR, P.K.R., LONSANE, B.K. Potential of fed-batch culture in solid state fermentation for production of gibberellic acid. **Biotechnology Letters**, v. 9, 179-82, 1987.
- (15) PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p.109-17, 1992.
- (16) TENDERGY, R.P. Solid state fermentation. **Trends in Biotechnology**, v.3, n.4, p.96-9, 1985.
- (17) BHALLA, T.C., JOSHI, M. Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p.116-7, 1994.
- (18) MORAES, I.O., CAPALBO, D.M.F., ARRUDA, R.O.M., DEL BIANCHI, V.L. Biotechnology in Food Production: the Case of *Bacillus thuringiensis* Production Using Cassava Liquid Waste as a Fermentation Substrate. In: WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 9, 1995, Budapeste. **Proceedings...** Budapeste, 1995.
- (19) LONSANE, B.K., RAMESH, M.V. Production of bacterial thermostable alpha-amylase by solid-state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production and starch hydrolysis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 35, p.1-56, 1990.
- (20) AMIN, G. Conversion of sugar-beet particles to ethanol by the bacterium *Zymomonas mobilis* in solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 14, p.499-504, 1992.
- (21) AMIN, G., ALLAH, A.M.K. By-products formed during direct conversion of sugar beets to ethanol by *Zymomonas mobilis* in conventional submerged and solid-state fermentations. **Biotechnology Letters**, v. 14, p.1187-92, 1992.
- (22) XAVIER, S., LONSANE, B.K. Sugar-cane pressmud as a novel and inexpensive substrate for production of lactic acid in a solid-state fermentation system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p.291-5, 1994.
- (23) SATO, K., NAGATANI, M., SATO, S. A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. **J. Ferment. Technol.**, v. 60, p.607-10, 1982.
- (24) DESGRANGES, C., GEORGES, M., VERGOIGNAN, C., DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation. II. On-line measurements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.206-9, 1991.
- (25) DESGRANGES, C., VERGOIGNAN, C., GEORGES, M., DURAND, A. Biomass estimation in solid state fermentation. I. Manual biochemical methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.200-5, 1991.
- (26) SRINIVAS, M.R.S., CHAND, N., LONSANE, B.K. Use of Plackett-Burman design for rapid screening of several nitrogen sources, growth/product promoters, minerals and enzyme inducers for the production of alpha-galactosidase by *Aspergillus niger* MRSS 234 in solid state fermentation system. **Bioprocess Engineering**, v. 10, p.139-44, 1994.
- (27) ELIAS, A., LEZCANO, O. Effect of the N source and some growth factors in the yeast population established during Saccharina production. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 27, p.269-74, 1993.
- (28) PANDEY, A. Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 37, p.169-72, 1991.

- (29) ECHEVARRIA, J., RODRIGUEZ-LEON, J.A., ESPINOSA, M.E., DELGADO, G. Optimization of solid state fermentation of sugar cane by *Aspergillus niger* considering particles size effect. *Acta Biotechnologica*, v. 11, p.15-22, 1991.
- (30) BUDIATMAN, S., LONSANE, B.K. Cassava fibrous waste residue: a substitute to wheat bran in Solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, v. 9, p.597-600, 1987.
- (31) GARG, K., SHARMA, C.B. Repeated batch production of citric acid from sugarcane molasses using recycled solid-state surface culture of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, v. 13, p.913-6, 1991.
- (32) OSHIMA, K., CHURCH, M.B. Industrial mold enzymes. *Industrial and Engineering Chemistry*, v. 15, n.1, p.67-70, 1923.
- (33) BARRIOS-GONZÁLEZ, J., TOMASINI, A., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., LÓPEZ, L. Penicillin production by solid state fermentation. *Biotechnology Letters*, v. 10, p.793-98, 1988.
- (34) ROUKAS, T. Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 41, p.296-301, 1994.
- (35) HAN, Y.W., ANDERSON, A.W. Semisolid fermentation of ryegrass straw. *Appl. Microbiol.*, v. 30, p.930-4, 1975.
- (36) PAMMENT, N., ROBINSON, C.W., HILTON, J., MOO-YOUNG, M. Solid-state cultivation of *Chaetomium cellulolyticum* on alkali-pretreated sawdust. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 20, p.1735-44, 1978.
- (37) GHILDYAL, N.P., GOWTHAMAN, M.K., KARANTH, N.G., RAO, K.S.M.S.R. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, p.253-7, 1994.
- (38) JALEEL, S.A., SRIKANTA, S., KARANTH, N.G. Production of fungal amyloglucosidase by solid state fermentation influence of some parameters. *Journal of Microbial Biotechnology*, v. 7, n.2, p.1-8, 1992.
- (39) DEL BIANCHI, V.L. *Produção de enzimas proteolíticas ácidas por fermentação fúngica em meio sólido*. Campinas, 1990. 96p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas.
- (40) NARAHARA, H., KOYAMA, Y., YOSHIDA, T., PICHANGKURA, S., UEDA, R., TAGUCHI, H. Growth and enzyme production in a solid state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.*, v. 60, p.311-9, 1982.
- (41) KUHAD, R.C., SINGH, A. Enhanced production of cellulases by *Penicillium citrinum* in solid state fermentation of cellulosic residue. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 9, p.100-1, 1993.
- (42) SHARMA, D.K., NIWAS, S., BEHERA, B.K. Solid state fermentation of bagasse for the production of cellulase enzyme from cellulolytic fungi and extent of simultaneous production of reducing sugars in the fermenter. *Journal of Microbial Biotechnology*, v. 6, p.7-14, 1991.
- (43) SOLIS-PEREIRA, S., FAVELA-TORRES, E., VINIEGRA-GONZALEZ, G., GUTIERREZ-ROJAS, M. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 39, p.36-41, 1993.
- (44) RAIMBAULD, M., ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 9, p.199-209, 1980.

- (45) MENEZES, T.J.B., SALVA, T.J.G., BALDINI, V.L., PAPINI, R.S., SALES, A.M. Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, v. 24, n.10, p.167-71, 1989.
- (46) LAUKEVICS, J.J., APSITE, A.F., VIESTURS, U.E., TANDERGY, R.P. Solid state fermentation of wheat straw to fungal protein. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, p.1465-74, 1984.
- (47) PEÑALOZA, W., MOLINA, M.R., BRENES, R.G., BRESSANI, R. Solid-state fermentation: an alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 49, p.388-93, 1985.
- (48) OHNO, A., ANO, T., SHODA, M. Production of antifungal antibiotic, iturin in a solid state fermentation by *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran as a substrate. *Biotechnology Letters*, v. 14, p.817-22, 1992.
- (49) NELSON, P.E., JUBA, J.H., ROSS, P.F., RICE, L.G. Fumonišín production by *Fusarium* species on solid substrates. *Journal of AOAC-International*, v. 77, p.522-5, 1994.
- (50) HESSELTINE, C.W. Solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 14, p.517-32, 1972.
- (51) ALTPETER, F., POSSELT, U.K. Production of high quantities of 3-acetyldeoxynivalenol and deoxynivalenol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 41, p.384-7, 1994.
- (52) LAKSHMINARAYANA, K., CHAUDHARY, K., ETHIRAJ, S., TAURO, P. A solid state fermentation method for citric acid production using sugar cane bagasse. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 17, p.291-3, 1975.
- (53) HESSELTINE, C.W. A millenium of fungi, food and fermentation. *Mycologia*, v. 57, p.148-97, 1965.
- (54) CARRIZALES, V., RODRÍGUEZ, H., SARDIÑA, I. Determination of the specific growth of molds on semi-solid cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 23, p.321-33, 1981.
- (55) ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., GEOFFROY, F., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., LONSANE, B.K. Potential of ensiling for efficient management of spent residue from solid state fermentation system. *Biotechnology Techniques*, v. 6, p.87-90, 1992.
- (56) JEFFREYS, G.A. Mold Enzymes Produced by continuous tray method. *Food Industries*, v. 20, n.1, p.82-4, 1948.
- (57) CANNEL, E., MOO-YOUNG, M. Solid-state fermentation systems. *Process Biochemistry*, v. 15, p.24-8, 1980.
- (58) SILMAN, R.W. Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 23, p.411-20, 1980.
- (59) MARTINELLI FILHO, A., HESSELTINE, C.W. Tempeh fermentation: package and tray fermentations. *Food Technology*, v. 78, n.5, p.167-70, 1964.
- (60) TOYAMA, N. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride cellulase*. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, n.6, p.207-19, 1976.
- (61) LINDERFELSER, L.A., CIEGLER, A. Solid substrate fermentor for ochratoxin A production. *Applied Microbiology*, v. 29, p.323-27, 1975.
- (62) NISHIO, N., TAI, K., NAGAI, S. Hidrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 8, p.263-70, 1979.
- (63) SILMAN, R.W., CONWAY, H.F., ANDERSON, R.A., BAGLEY, E.B. Production of aflatoxin in corn by a large-scale solid-substrate fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 21, p.1799-808, 1979.

(64) ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., LONSANE, B.K. Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system. *Micol. Neotrop. Apl.*, v. 4, p.83-9, 1991.

(65) 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 castelli* in a solid state fermentation system. *Process Biochemistry*, v. 27, n.10, p.97-107, 1992.

(66) CROOKE, P.S., HONG, K., MALANEY, G.W., TANNER, R.D. Solid and semi-solid state bioreactors: static, rotating and fluidized bed fermentors. *Journal of the Biomass Energy Society of China*, v. 10, n.1-2, p.1-17, 1991.

(67) VYAS, R.V., YADAV, D.N., PATEL, R.J. Mass production of entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* on solid substrates. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 29, p.795-7, 1991.

(68) RAMANA MURTHY, M.V., KARANTH, N.G., RAGHAVA RAO, K.S.M.S. Biochemical Engineering Aspects of solid-state fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, v. 38, p.99-146, 1993.

(69) MOO-YOUNG, M.A., MOREIRA, R., TENDERGY, R.P. Principles of solid-substrate fermentation. In: SMITH, S.E., BERRY, D.R., VRISTIUNSEN, B. *The filamentous fungi*. Londres 1983. p.117-44.

(70) YANG, S.S. Protein enrichment of sweet potato residue with amyolytic yeasts by solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, p.886-90, 1988.

(71) RATHBUN, B.L., SHULER, M.L. Heat and mass transfer effects in static solid-substrate fermentations: design of fermentation chambers. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, p.929-38, 1983.

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

(73) BACA, M.T., ESTEBAN, E., ALMENDROS, G., SANCHEZ-RAYA, A.J. Changes in the gas phase of compost during solid-state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 44, p.5-8, 1993.

(74) SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., TREJO-HERNANDEZ, M.R., LONSANE, B.K., NAVARRO, J.M., ROUSSOS, S., DUFOUR, D., RAIMBAULT, M. On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, v. 29, p.13-24, 1994.

(75) RAMAKRISHNA, S.V., SUSEELA, T., GHILDYAL, N.P., JALEEL, S.A., PREMA, P., LONSANE, B.K., AHMED, S.Y. Recovery of amyloglucosidase from moldy bran. *Indian Journal of Technology*, v. 20, p.476-80, 1982.

(76) HESSELTINE, C.W. Solid state fermentation - Part 2. *Process Biochemistry*, v. 12, n.9, p.29-32, 1977.

(77) SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., LONSANE, B.K., NAVARRO, J.M., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M. Potencial of using a single fermenter for biomass build-up, starch hydrolysis, and ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 36, p.1-10, 1992.

(78) SOCCOL, C.R., MARIN, B., RAIMBAULT, M., LEBEAULT, J.M. Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 41, p.286-90, 1994.

(79) HANG, Y.D., WOODAMS, E.E. Effect of substrate moisture on fungal production of citric acid in a solid state fermentation system. *Biotechnology Letters*, v. 9, 183-86, 1987.

- (80) SHANKARANAND, V.S., LONSANE, B.K. Sugarcane-pressmud as a novel substrate for production of citric acid by solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p.377-80, 1993.
- (81) AL-ASHEH, S., DUVNJAK, Z. The effect of phosphate concentration on phytase production and the reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid-state fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p.25-30, 1995.
- (82) AL-ASHEH, S., DUVNJAK, Z. Phytase production and decrease of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p.228-31, 1995.
- (83) AL-ASHEH, S., DUVNJAK, Z. The effect of surfactants on the phytase production and the reduction of the phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid state fermentation process. **Biotechnology Letters**, v. 16, p.183-8, 1994.
- (84) RAMESH, M.V., LONSANE, B.K. Solid state fermentation for production of alpha-amylase by *Bacillus megaterium* 16M. **Biotechnology Letters**, v. 9, p.323-8, 1987.
- (85) RAMESH, M.V., LONSANE, B.K. Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in a solid-state fermentation system. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, p.501-5, 1990.
- (86) RAMESH, M.V., LONSANE, B.K. A novel bacterial thermostable alpha-amylase system produced under solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 9, p.501-4, 1987.
- (87) SOCCOL, C.R., ILOKI, I., MARIN, B., RAIMBAULT, M. Comparative production of alpha-amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid state fermentations. **Journal of Food Science and Technology-Mysore**, v. 31, p.320-3, 1994.
- (88) GHILDYAL, N.P., RAMAKRISHNA, S.V., DEVI, P.N., LONSANE, B.K., ASHTANA, H.N. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. **J.Food Sci. Technol.**, v. 18, p.248-51, 1981.
- (89) MUNISWARAN, P.K.A., CHARYULU, N.C.L.N. Solid state fermentation of coconut coir pith for cellulase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p.436-40, 1994.
- (90) GEORGE, S., RAJU, V., KRISHNAN, M.R.V., SUBRAMANIAN, T.V., JAYARAMAN, K. Production of protease by *Bacillus Amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. **Process Biochemistry**, v. 30, p.457-62, 1995.
- (91) MURTHY, M.V.R., LONSANE, B.K., PADMANABHAN, S. 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.
- (92) PANDEY, A., RADHAKRISHNAN, S. The production of glucoamylase by *Aspergillus niger* NCIM 1245. **Process Biochemistry**, v. 28, p.305-9, 1993.
- (93) GOLINSKI, P., CHELKOWSKI, J. Biosynthesis of fusarin C by *Fusarium* species. **Microbiologie**, v. 10, p.55-9, 1992.
- (94) HESSELTINE, C.W. Laboratory studies on the formation of aflatoxin in forages. **Mycologia**, v. 60, p.304-12, 1968.
- (95) HESSELTINE, C.W., SHOTWELL, O.L., ELLIS, J.J., STUBBLEFIELD, R.D. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Bacteriological Reviews**, v. 30, p.795-805, 1966.
- (96) LEWIS, J.A., PAPAIVIZAS, G.C. *Stilbella aciculosa*: a potential biocontrol fungus against *Rhizoctonia solani*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, p.3-11, 1993.

(97) MCQUILKEN, M.P., WHIPPS, J.M. Production, survival and evaluation of solid-substrate inocula of *Coniothyrium minutans* against *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 101, p.101-10, 1995.

(98) ROUSSOS, S., OLMOS, A., RAIMBAULT, M., SAUCEDO-CASTAÑEDA, G., LONSANE, B.K. Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology Techniques**, v. 5, p.415-20, 1991.

(99) RYOO, D., MURPHY, V.G., KARIM, M.N., TENDERGY, R.P. Evaporative temperature and moisture control in a rocking reactor for solid substrate fermentation. **Biotechnology Techniques**, v. 5, 19-24, 1991.

(100) WANG, H.L., HESSELTINE, C.W. Wheat tempeh. **Cereal Chemistry**, v. 43, p.563-70, 1969.