

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
PECTINASES DE *Aspergillus niger* LB-02-SF OBTIDAS EM
BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO

PATRÍCIA POLETTO

Caxias do Sul, 2015

PATRÍCIA POLETTO

**PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
PECTINASES DE *Aspergillus niger* LB-02-SF OBTIDAS EM
BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do
Sul, visando à obtenção do grau de Doutor em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Zeni Andrade

Caxias do Sul, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

P765p Poletto, Patrícia, 1983-
Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger*
LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo / Patrícia Poletto. –
2015.
124 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira ; coorientadora:
Profª. Drª. Mara Zeni Andrade.

1. Enzimas. 2. Pectinases. 3. *Aspergillus niger*. 4. Suco de frutas –
Indústria. I. Título.

CDU 2.ed.: 577.15

Índice para o catálogo sistemático:

1. Enzimas	577.15
2. Pectinases	577.152.34
3. <i>Aspergillus niger</i>	582.282.123.4
4. Suco de frutas - Indústria	663.813

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

PATRÍCIA POLETTO

PRODUÇÃO, RECUPERAÇÃO E AVALIAÇÃO DE PECTINASES DE
Aspergillus niger LB-02-FS OBTIDAS EM BIORREATOR DE TAMBOR

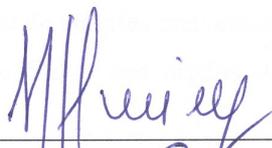
ROTATIVO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
visando à obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

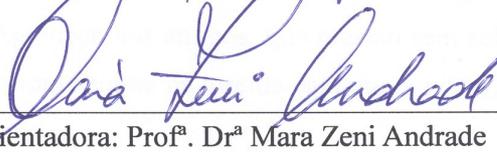
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Mara Zeni Andrade

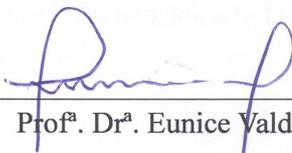
TESE APROVADA EM 10 DE ABRIL DE 2015.



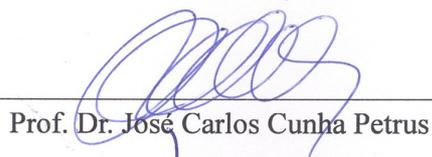
Orientador: Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira



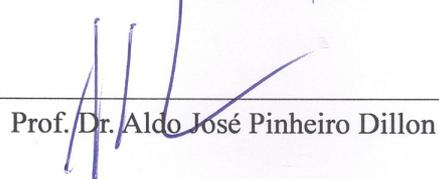
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Mara Zeni Andrade



Prof^ª. Dr^ª. Eunice Valduga



Prof. Dr. José Carlos Cunha Petrus



Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que apoiaram a realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Maurício Moura da Silveira, meu orientador, por todo o incentivo, paciência e ensinamentos. Tu és o tipo de professor que nos motiva a buscar mais e mais conhecimento, que nos faz pensar e acreditar que podemos ser melhor do que somos.

Agradeço à minha co-orientador, Prof. Mara Zeni Andrade, que me acolheu em seu laboratório e me ensinou que a pesquisa é um lindo caminho e, geralmente, sem volta. Obrigada por teu apoio durante todos esses anos entre mestrado e doutorado.

Aos professores da banca de acompanhamento Prof. Aldo José Pinheiro Dillon e ao Prof. Lademir Luiz Beal. Bem como aos membros da banca de avaliação Prof. Eunice Valduga e Prof. José Carlos Cunha Petrus.

Agradeço às bolsistas de iniciação científica que me ajudaram muito na realização das diversas análises para construção deste trabalho: Marina Ferrari Fabro, Maria Carolina de Oliveira Nunes, Caroline Borsóí, Jéssica Flores Cezar e Danuza da Rocha Renosto.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Bioprocesso, por todos os momentos de troca de conhecimento ou de simples conversas.

À Universidade de Caxias do Sul e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

Agradeço aos meus pais, que são meus exemplos de vida, que me cercaram de bom caráter e bons princípios. Agradeço aos amigos, que mesmo sem saber exatamente o que eu fazia no doutorado, estiveram sempre na torcida para que o reator, “que não é nuclear”, não explodisse durante os ensaios.

Enfim, só posso agradecer infinitamente a todos por essa conquista.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS E PECTINASES.....	3
2.2 APLICAÇÃO DAS PECTINASES NO PROCESSAMENTO DE SUCOS DE FRUTAS.....	5
2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PECTINASES	9
2.4 PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE PECTINASES	10
2.4.1 Cultivo em estado sólido	13
2.4.2 Biorreatores utilizados em cultivo em estado sólido	13
2.4.3 Efeito dos parâmetros operacionais	16
2.4.3.1 pH.....	16
2.4.3.2 Temperatura	16
2.4.3.3 Umidade	17
2.4.3.4 Aeração.....	18
2.4.3.5 Espessura do leito de meio.....	18
2.4.3.6 Agitação em biorreator de tambor rotativo.....	18
2.5 RECUPERAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS	19
2.5.1 Membranas de separação aplicadas na separação e concentração de produtos biotecnológicos	22
2.5.2 Concentração de enzimas por ultrafiltração	23
2.6 PREPARAÇÕES PECTINOLÍTICAS COMERCIAIS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 MICRORGANISMO	30
3.2 MEIO DE CONSERVAÇÃO E PROPAGAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	30
3.3 MEIO PARA CULTIVO SUBMERSO	30
3.4 MEIO PARA CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO	31
3.5 PREPARO DE INÓCULOS	31
3.6 ENSAIOS EM MEIO LÍQUIDO	31
3.7 ENSAIOS EM MEIO SÓLIDO.....	32
3.7.1 Cultivo em frascos	32
3.7.2 Cultivo em bandejas.....	32
3.7.3 Cultivo em biorreator de tambor rotativo	32
3.7.3.1 BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO: APARATO EXPERIMENTAL.....	33
3.7.3.2 CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO DO BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO NA PRODUÇÃO DE PECTINASES	34
3.8 PARÂMETROS CINÉTICOS E ESTEQUIOMÉTRICOS DO BIOPROCESSO	36

3.8.1	Determinação da velocidade de crescimento celular	36
3.8.2	Determinação dos fatores de conversão	36
3.8.3	Cálculo da biomassa em cultivo em estado sólido a partir do teor de N-acetilglicosamina.....	37
3.8.4	Demanda de oxigênio pelo cultivo.....	37
3.8.5	Determinação dos parâmetros de respiração	39
3.8.6	Estimativa da concentração celular a partir de parâmetros respiratórios..	39
3.9	EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS SOLÚVEIS DO MEIO SÓLIDO.....	40
3.10	CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO PECTINOLÍTICO	41
3.10.1	Pré-tratamento do caldo enzimático com carvão ativado	41
3.10.2	Microfiltração do caldo enzimático	42
3.10.3	Concentração do caldo enzimático por ultrafiltração	42
3.10.4	Análise de fluxo de permeado	44
3.11	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO PECTINOLÍTICO.....	44
3.11.1	Estabilidade do extrato enzimático a diferentes valores de pH	44
3.11.2	Temperatura e pH de reação.....	45
3.12	FORMULAÇÃO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS E ESTUDO DA CONSERVAÇÃO DA ATIVIDADE	45
3.12.1	Termoestabilidade das formulações enzimáticas	45
3.13	USO DAS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS NO TRATAMENTO DE SUCOS DE FRUTAS...	45
3.14	METODOLOGIA ANALÍTICA	47
3.14.1	Determinação do teor de N-acetilglicosamina	47
3.14.2	Determinação de açúcares redutores totais (ART)	47
3.14.3	Determinação de umidade e pH do meio	48
3.14.4	Determinação da atividade de pectinases totais	48
3.14.5	Determinação da atividade de exo-poligalacturonase.....	49
3.14.6	Determinação da atividade da pectina liase.....	49
3.14.7	Determinação da atividade da pectina metilesterase (PME)	49
3.14.8	Determinação da atividade de endo-glicanase.....	50
3.14.9	Determinação da atividade de β -glicosidase	50
3.14.10	Determinação da atividade de xilanase	50
3.14.11	Determinação da atividade de amilase	50
3.14.12	Determinação de proteínas.....	51
3.14.13	Determinação da clarificação dos sucos de frutas.....	51
3.14.14	Determinação da turbidez dos sucos de frutas	51
3.14.15	Determinação da viscosidade dos sucos de frutas	51
3.14.16	Determinação de polifenóis totais de frutas.....	51
3.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	52
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	ADAPTAÇÃO DE METODOLOGIA INDIRETA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE BIOMASSA DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i> LB-02-SF	54
4.1.1	Quantificação do teor de N-acetilglicosamina presente no micélio da linhagem <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF	54

4.1.2	Determinação do fator real de conversão de oxigênio em biomassa fúngica e do coeficiente de manutenção para o oxigênio e quantificação indireta da biomassa de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF	55
4.2	PRODUÇÃO DE PECTINASES POR CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO	57
4.2.1	Efeito da agitação do biorreator	57
4.2.1.1	Comparação de cultivos estático e agitado	57
4.2.1.2	Efeito de diferentes intervalos entre as agitações do biorreator	60
4.2.2	Efeito do controle de temperatura do biorreator	62
4.2.3	Efeito conjunto do fluxo de ar e do volume de ocupação do biorreator	65
4.3	RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS PRODUZIDAS EM CULTIVO EM ESTADO SÓLIDO	71
4.3.1	Extração de pectinases totais presente em meio sólido	71
4.3.2	Pré-tratamento do extrato enzimático com carvão ativado	75
4.3.3	Definição do protocolo de concentração do extrato pectinolítico	76
4.3.3.1	Influência dos protocolos de concentração no fluxo de permeado	76
4.3.3.2	Influência dos protocolos na concentração de pectinases e proteínas durante a ultrafiltração	79
4.3.4	Concentração do caldo enzimático para obtenção do extrato destinado à formulação	83
4.4	CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS PRODUZIDAS EM MEIO SÓLIDO	84
4.4.1	Estabilidade frente ao pH	84
4.4.2	Influência do pH e temperatura de reação sobre as enzimas pectinolíticas produzidas	85
4.5	DEFINIÇÃO DE FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA A SER APLICADA A SUCOS DE FRUTAS	86
4.6	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÕES ENZIMÁTICAS QUANTO AO TEMPO DE ESTOCAGEM	88
4.6.1	Avaliação da estabilidade de formulações enzimáticas quanto à temperatura	90
4.7	PROCESSAMENTO DE SUCO DE FRUTAS POR TRATAMENTO ENZIMÁTICO	92
4.7.1	Maceração de suco de uva	92
4.7.2	Despectinização de sucos de diferentes frutas	94
5.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	96
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXO 1 – Concentração celular em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo		113
ANEXO 2 – Atividade de pectinases totais em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo		118
ANEXO 3 – Concentração de substrato em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo		120
ANEXO 4 – Umidade do meio em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo		121

ANEXO 5 – Sistema de ultrafiltração	123
ANEXO 6 – Caracterização dos sucos de maçã, uva rosada e amora	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre biorreatores utilizados na produção de pectinases.....	16
Tabela 2 – Resultados de recuperação e purificação encontrados na literatura para concentração de pectinases por ultrafiltração.	24
Tabela 3 – Exemplos de valores encontrados na literatura para o fator real de conversão de oxigênio em biomassa fúngica e para o coeficiente de manutenção para o oxigênio em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em estado sólido.....	56
Tabela 4 – Resultados gerais de cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo, estático e agitado com diferentes volumes de ocupação pelo meio sólido.	58
Tabela 5 – Resultados gerais de cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com 70% de ocupação de volume pelo meio sólido, operado com diferentes intervalos entre cada agitação.	61
Tabela 6 – Resultados gerais de cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com volume de ocupação do reator em 30% sem agitação e 50% com agitação, com e sem controle de temperatura.	64
Tabela 7 – Resultados gerais de cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo sob diferentes fluxos específicos de ar, com volume de ocupação de 30%.	66
Tabela 8 – Resultados gerais de cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo sob diferentes fluxos específicos de ar, com volume de ocupação de 50%.	66
Tabela 9 – Máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,max}$) em cultivos de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo operados com fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e volumes de ocupação de 30 e 50%	70
Tabela 10 – Recuperação da atividade de pectinases totais em diferentes razões sólido/líquido na etapa de extração. Solvente, água pH 4; tempo de incubação, 60 minutos; temperatura, 20°C.	74
Tabela 11 – Efeito das diferentes concentrações de carvão ativado na atividade de pectinases totais e proteína.	75
Tabela 12 – Valores de fluxo de permeado e recuperação de fluxo obtidos durante a ultrafiltração do extrato pectinolítico produzido por <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF.	78
Tabela 13 – Síntese dos principais resultados encontrados para os diferentes protocolos aplicados na concentração de pectinases produzidas por <i>A. niger</i>	80
Tabela 14 - Análise das etapas de extração, purificação e concentração do extrato enzimático.....	83
Tabela 15 – Atividades enzimáticas presentes no extrato enzimático experimental e em diferentes preparações comerciais.	87

Tabela 16 – Características e dosagem das preparações enzimáticas empregadas em ensaios de maceração de uva.	92
Tabela 17 – Parâmetros analisados na etapa de maceração do processamento de suco de uvas tintas.	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura da parede celular de plantas	3
Figura 2 – Mecanismo de ação das enzimas pectinolíticas	5
Figura 3 – Despectinização de suco de maçã: hidrólise da pectina gera agregação de partículas e posterior precipitação (NCBE, 2000).....	6
Figura 4 – Fluxograma das etapas do processo de produção de enzimas (<i>upstream</i>).....	11
Figura 5 – Classificação dos biorreatores de acordo com as características do tipo de aeração e presença de agitação do sistem.....	14
Figura 6 – Fluxograma das etapas do processo de recuperação de enzimas (<i>downstream processing</i>).....	20
Figura 7 – Influência do glicerol na estrutura e na estabilidade das enzimas: hidratação preferencial em torno da superfície da enzima promove compactação e aumenta a estabilidade da estrutura. ...	27
Figura 8 – Fluxograma das etapas de produção, recuperação, concentração e avaliação das enzimas obtidas em biorreator de tambor rotativo realizadas neste trabalho.	29
Figura 9 – Biorreator de tambor rotativo utilizado na produção de pectinases.....	33
Figura 10 – Esquema do biorreator de tambor rotativo e os sistemas de controle.....	34
Figura 11 – Condições de tempo, temperatura e razão sólido/líquido na extração de pectinases produzidas por cultivo em estado sólido.	41
Figura 12 – Protocolos propostos para a etapa de concentração do extrato pectinolítico obtido por cultivo em estado sólido.....	41
Figura 13 – Cartucho filtrante de microfiltração e configuração do modo de operação da membrana de fibra oca.	42
Figura 14 – Cartucho filtrante de ultrafiltração e configuração do modo de operação da membrana em espiral	43
Figura 15 – Correlação entre o teor de N-acetilglicosamina e biomassa seca de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF cultivado em meio líquido.....	55
Figura 16 – Variação da velocidade específica de respiração com a velocidade específica de crescimento em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> em meio sólido.....	56
Figura 17 – Variação da concentração de biomassa de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF determinada pelo método de N-acetilglicosamina e demanda de oxigênio em cultivo em estado sólido.	57
Figura 18 – Variação da temperatura do meio de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF com o tempo em biorreator de tambor rotativo com volume de ocupação de 30% - estático e 50% - agitado.....	63
Figura 19 – Variação com o tempo das concentrações de biomassa fúngica, pectinases totais, umidade e temperatura e açúcares redutores totais em cultivo de <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e volumes de ocupação de 30% e 50%	69
Figura 20 – Efeito do tempo de extração sobre a atividade de pectinases totais e proteína.....	72
Figura 21 – Efeito da temperatura de extração na atividade de pectinases totais e proteína	73

Figura 22 – Fluxo de permeado nos ensaios de microfiltração e ultrafiltração.....	77
Figura 23 – Perfil do fator de concentração da atividade de pectinases totais e proteína com o aumento do fator de concentração volumétrico.	82
Figura 24 – Efeito do pH e do tempo de pré-incubação sobre a atividade em pectinases totais produzidas por <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF.	84
Figura 25 – Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de enzimas pectinolíticas produzidas por <i>Aspergillus niger</i> LB-02-SF.....	85
Figura 26 – Atividade relativa de pectinases totais das formulações armazenadas a 5°C durante 59 semanas	89
Figura 27 – Efeito da temperatura e do tempo de pré-incubação sobre as pectinases totais presentes no extrato enzimático concentrado.....	91
Figura 28 – Efeito do tratamento enzimático na preservação do teor de polifenóis totais, redução da turbidez e da viscosidade e aumento da clarificação de sucos de maçã, uva rosada e amora	95

RESUMO

No presente trabalho, a produção de pectinases por *Aspergillus niger* LB-02-SF em estado sólido foi estudada em biorreator de tambor rotativo em escala de bancada. Adicionalmente, a extração e a concentração do extrato enzimático foram avaliadas. Com o extrato concentrado por ultrafiltração, formulações com KCl e glicerol foram testadas quanto à conservação da atividade enzimática e à eficiência no tratamento de sucos de frutas. Com respeito à produção das pectinases em biorreator, os parâmetros de operação avaliados foram: a agitação, a temperatura do cultivo, o volume de ocupação (30, 50 e 70%) e o fluxo específico de ar (0,18, 0,36, 0,54, 0,72 e 0,90 LkgM – litros de ar por kg de meio por minuto). Ensaio sem e com agitação do biorreator (frequência de 1 rpm por 5 minutos, a cada 120 minutos) indicaram que, para o volume de ocupação de 30%, a agitação leva ao aumento do crescimento fúngico e à redução da produção de enzimas, enquanto que com 50% de ocupação, comportamento oposto foi observado. Com 70% de ocupação, não foi observada diferença significativa entre as atividades pectinolíticas obtidas com e sem agitação, sendo que, em ambos os casos, a produção foi prejudicada pela insuficiente aeração do meio. O intervalo entre os eventos de agitação foram avaliados para o volume de ocupação em 70%, não sendo observada diferença significativa na produção de pectinases nos intervalos de 120 minutos (condição padrão) e 90 minutos. Para um intervalo de 60 minutos, a atividade reduziu-se em aproximadamente 58%. Os cultivos com controle de temperatura em 34°C e sem controle indicaram que a produção enzimática foi favorecida com a elevação natural da temperatura do cultivo, um aspecto que pode estar relacionado a uma condição de estresse que levaria à maior produção enzimática. Fluxos específicos de ar entre 0,18 e 0,90 LkgM foram testados em ensaios com 30 e 50% de volume de ocupação do biorreator. Maior crescimento fúngico foi atingido quando o biorreator foi carregado com menor volume de ocupação. Com o fluxo intermediário de 0,54 LkgM, as maiores atividades enzimáticas para ambos os volumes de ocupação foram atingidas; porém, a ocupação de 50% do volume resultou na maior atividade pectinolítica, 178,2 U/g, com uma atividade de 133,4 U/g sendo medida com 30% de ocupação. No estudo sobre a extração de pectinases do meio sólido, com água pH 4, sob agitação de 200 rpm, foi observado que tempos entre 15 e 120 minutos apresentaram resultados similares. Os resultados atingidos apontam que para maior produção enzimática o biorreator deve ser operado com 50% de ocupação, fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e intervalos entre as agitações de 120 minutos. Temperaturas de extração de 20, 30 e 40°C não influenciaram na extração de proteínas, porém a atividade de pectinases foi reduzida em 40% a 40°C, possivelmente em razão da termoestabilidade da enzima. Entre as razões de extração sólido / líquido avaliadas, o valor de 1/10 foi a que resultou na maior atividade enzimática solubilizada, sendo recuperados 81% da atividade pectinolítica presente no meio. Nos ensaios de concentração, a ultrafiltração do extrato concentrado sem qualquer tratamento prévio resultou em recuperação de 59% das enzimas e em fluxo final de permeado da ordem de 11 L/m²/h. Por outro lado, o protocolo de operação que incluía o uso de carvão ativado e microfiltração, apresentou recuperação de enzimas de 74% e fluxo final de permeado de 24 L/m²/h, demonstrando a importância dos pré-tratamentos na ultrafiltração. Previamente à preparação das formulações enzimáticas, um volume de 30 L de extrato bruto foi concentrado 103 vezes por ultrafiltração, com recuperação enzimática de 69%, e um extrato com 663 U/mL foi obtido. Este extrato concentrado foi formulado com 20, 30, 40 e 50% (m/m) de glicerol e 2% (m/m) de KCl e avaliado, por 59 semanas, quanto à conservação da atividade a 5°C. Ao final do período de teste, a amostra controle (sem aditivos) teve queda de 25% da atividade além de apresentar contaminação microbiana, enquanto as formulações mantiveram a atividade em torno de 100% durante todo o experimento. A formulação com 50% de glicerol foi utilizada na maceração de uva bordô e na despectinização de sucos de maçã, uva rosada e amora, demonstrando comportamento similar aos encontrados com as preparações comerciais Novozym 33095 e Pectinex Ultra SP-L utilizadas como referência.

Palavras-chave: pectinases; cultivo em estado sólido; recuperação; concentração; formulação, tratamento de sucos de frutas

ABSTRACT

In the present work, the production of pectinases by *Aspergillus niger* LB-02-SF in solid-state cultivation was studied using a rotating drum bench bioreactor. Furthermore, extraction and concentration of enzymes by ultrafiltration were evaluated. Formulations with the concentrated extract, KCl and glycerol were assayed with respect to the maintenance of activity level and the efficiency in the treatment of fruit juices. With respect to the production of enzymes in bioreactor, the operational parameters evaluated were agitation, cultivation temperature, occupation volume (30, 50 and 70%) and specific air flow (0.18, 0.36, 0.54, 0.72 e 0.90 LkgM – liter of air per kilogram of medium per minute). Tests without and with agitation of the bioreactor (1 rpm per 5 minutes each 120 minutes) indicated that, with occupation volume of 30%, agitation leads to increasing fungal growth and decreasing enzyme production, whereas with 50% of occupation an opposite behavior was noticed. With 70% of occupation volume, no significant difference was observed among the pectinolytic activities achieved with and without agitation, the production being hindered in both cases by the insufficient aeration of medium. The interval between agitation events was evaluated for an occupation volume of 70% and no significant difference in enzyme production was observed for the intervals of 90 and 120 minutes (standard condition). For the interval of 60 minutes, the activity was reduced in approximately 58%. The cultivations with temperature control at 34°C and without control indicated that enzyme production was favored with the natural increase of medium temperature, an aspect that could be related to a stress condition that would lead to a higher enzyme production. Specific air flows between 0.18 and 0.90 LkgM were evaluated for 30 and 50% of bioreactor occupation volume. Larger fungal growth was observed when the bioreactor was loaded with the smallest occupation volume. With the intermediate flow of 0.54 LkgM, the highest enzyme activities were achieved for both occupation volumes; however, the occupation volume of 50% resulted the higher activity of 178.2 U/g, with an activity of 133.4 U/g being measured for 30% of occupation. The results achieved indicated that for a higher enzyme production, the bioreactor should be conducted with 50% of occupation volume, specific airflow of 0.54 LkgM and interval between the agitations of 120 minutes. In the study on the extraction of pectinases from the solid medium with water pH 4, under agitation, it was observed that extraction times from 15 to 120 minutes presented similar results. The extraction temperatures of 20, 30 and 40°C did not influence protein extraction, but pectinase activity was reduced in 40% at 40°C, possibly due to the low enzyme thermostability. Among the extraction ratios of solid/liquid assessed, the value 1/10 resulted in the highest enzyme activity solubilized, with recovery of 81% of the pectinolytic activity that was present in the medium. In the concentration tests, ultrafiltration of concentrated extract with no previous treatment resulted in 59% of enzyme activity recovery and in a final permeate flux of about 11 L/m²/h. On the other hand, the operation protocol that included the use of activated charcoal, microfiltration and ultrafiltration presented enzyme recovery of 74% and final permeate flux of 24 L/m²/h, results that demonstrate the importance of pre-treatments in this process. Previously to the preparation of enzyme formulations, a volume of 30 L of enzyme extract was 103-fold concentrated by ultrafiltration, with 69% of enzyme recovery, and a final 663-U/mL extract was obtained. This concentrated extract was formulated with 20, 30, 40 and 50% (w/w) of glycerol and 2% (w/w) of KCl and evaluated for 59 weeks with respect to the enzyme activity conservation at 5°C. At the end of the test period, the blank sample (with no additives) presented an activity decrease of 25% and also microbial contamination, whereas the formulations preserved 100% of the initial activity along the experiment. The 50%-glycerol formulation was used for Bordô grape maceration and for depectinization of apple, Rosé grape and blackberry juices, showing statistically similar results to those obtained with the commercial preparations Novozym 33095 and Pectinex Ultra SP-L used as reference. The results attained in this work pointed out to the possibility of scaling-up this process, from the enzyme production in solid-state cultivation to the achievement of an enzyme formulation that has shown potential to be used in the industry of fruit juice.

Keywords: pectinases; solid-state cultivation; recovery, concentration; formulation; fruit juices treatment.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas pectinolíticas, ou simplesmente pectinases, são empregadas em grandes quantidades em diversos segmentos industriais. Na indústria de alimentos, por exemplo, estas enzimas são utilizadas na maceração de polpas de frutas, na extração e clarificação de sucos e na indústria de vinhos. O Brasil, em especial o Rio Grande do Sul, possui alto potencial para produção de sucos de frutas e vinhos, setores que consomem grandes volumes de preparações pectinolíticas. Esse consumo tende a crescer a cada ano e, com isso, a demanda por enzimas pectinolíticas também vem crescendo, o que motiva a produção nacional dessas preparações.

As pectinases são produzidas principalmente por fungos filamentosos, como por exemplo, o *Aspergillus niger*. O cultivo submerso (CSm) é, ainda, o modo de operação mais utilizado na produção dessas enzimas, o que pode estar relacionado a dificuldade no escalonamento de biorreatores utilizados em cultivo em estado sólido (CES). Porém, há um grande interesse nesse tipo de cultivo, como indicado no crescente número de pesquisas nessa área (Thomas *et al.*, 2013). De um modo geral, esses estudos apontam como vantagens no CES, a produção das enzimas de forma mais concentrada, o design de reatores mais simples e o uso de substratos de baixo custo. Entre os diferentes tipos de biorreatores usados nos CES, os de tambor rotativo se destacam por promoverem a mistura do meio através da rotação do próprio tambor, permitindo a remoção de calor e uma maior difusão de oxigênio e gás carbônico.

As características do meio de cultivo e das biomoléculas de interesse tornam a recuperação desses produtos uma etapa complexa do processo, sendo tão ou mais desafiadora que o estudo e o desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há protocolos de aplicação geral. As enzimas podem ser recuperadas através de métodos que se baseiam em certas características como solubilidade, massa molar, carga elétrica, polaridade e afinidade por determinado composto. No entanto, a maior dificuldade nos processos de recuperação está em encontrar as melhores estratégias que garantam a preservação de todas as características do produto final necessárias à sua utilização. A manutenção da estabilidade e a permanência do nível desejado da atividade por longos períodos, por exemplo, são duas importantes características desejáveis para a obtenção de formulações enzimáticas de qualidade.

Após a produção das enzimas, o extrato enzimático é geralmente concentrado, sendo a tecnologia de separação por membranas, uma ferramenta eficiente para tal

procedimento. No caso dos processos de separação por membranas, como a ultrafiltração, por exemplo, esses se diferenciam de outros processos da engenharia bioquímica pelo fato de a separação estar relacionada com a diferença de tamanho ou carga das moléculas em solução. Dependendo do ponto de corte molecular da membrana, apenas solvente e impurezas menores passam através dos poros e as macromoléculas de interesse, neste caso, as enzimas, podem ser parcialmente purificadas, concentradas ou separadas. Além disso, os processos com membranas não necessitam de aditivos, podendo ser conduzidos em condições de baixa temperatura e pressão, significando baixo consumo de energia, e ainda facilmente combinados com outras técnicas de separação. Essas características permitem minimizar a degradação, desativação ou desnaturação dos produtos biológicos obtidos.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral desenvolver um processo de obtenção de extratos enzimáticos pectinolíticos concentrados – com produção das enzimas em biorreator de tambor rotativo com *Aspergillus niger* LB-02-SF e concentração por ultrafiltração –, visando à formulação de um produto enzimático para aplicação no tratamento de sucos de frutas. Para que o objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram previstos:

- avaliar o processo de produção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF em cultivo em estado sólido em biorreator de tambor rotativo, variando-se o período de agitação, a temperatura do cultivo, o volume de ocupação do reator e o fluxo específico de aeração do meio;
- definir as condições de extração da enzima a partir do meio sólido;
- estabelecer um protocolo para a concentração do extrato enzimático por ultrafiltração;
- caracterizar os extratos enzimáticos produzidos quanto à presença das diferentes enzimas pectinolíticas e outras enzimas despolimerizantes;
- definir uma formulação para a preparação enzimática e avaliar a sua estabilidade em função do tempo de estocagem;
- testar a formulação enzimática na maceração de uvas tintas e na clarificação de sucos de maçã, uva rosada e amora.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item serão apresentados os referenciais bibliográficos relacionados à produção de pectinases, abordando principalmente a produção por cultivo em estado sólido e a técnica de separação por membranas para obtenção de extratos concentrados.

2.1 Substâncias pécticas e pectinases

As substâncias pécticas compõem um grupo complexo de polissacarídeos ácidos encontrados na matriz celular entre a parede primária e a lamela média de vegetais (Gummadi & Panda, 2003), como ilustrado na Figura 1. A literatura descreve as substâncias pécticas apresentando como constituintes básicos, unidades de ácido galacturônico ligadas entre si por ligações α -1,4 (Sharma *et al.*, 2013; Jayani *et al.*, 2005). A porção linear da cadeia é conhecida como homogalacturonana e é parcialmente esterificada. A porção ramificada apresenta cadeias laterais formadas principalmente por açúcares como ramnose, galactose, arabinose e xilose (Yapo, 2011). As substâncias pécticas podem estar presentes nas células das plantas na forma de protopectina (insolúvel em água), ácido péctico (não apresenta grupos esterificados), ácido pectínico (apresenta de 0 a 75% de grupos esterificados) e pectina (apresenta um mínimo de 75% de grupos esterificados). Em frutas não maduras, por exemplo, a forma insolúvel da pectina (protopectina) está presente ligada a microfibrilas de celulose, conferindo rigidez à parede celular. Durante o amadurecimento, as enzimas presentes na própria fruta alteram a estrutura dessa pectina, resultando em uma molécula mais solúvel (Pedrolli *et al.*, 2009). A presença de substâncias pécticas na parede celular vegetal com diferentes características é a provável razão para a existência de diversas formas de enzimas pectinolíticas (Jayani *et al.*, 2005).

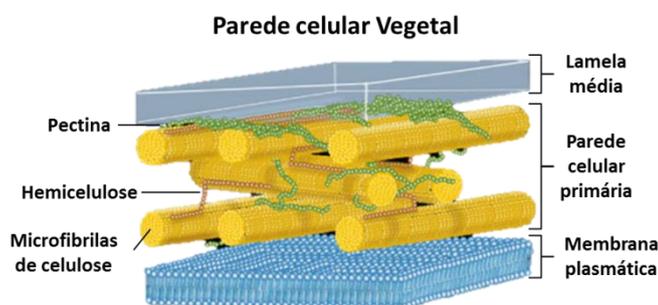


Figura 1 – Representação da estrutura da parede celular de plantas (Adaptado de Sigma – Aldrich, 2014).

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam substâncias pécicas. Essas enzimas podem ser divididas em dois grandes grupos, definidos pelo seu modo de ação e substrato de preferência, como mostra o Quadro 1 (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005). As enzimas despolimerizantes agem catalisando a quebra das ligações α -1,4 da cadeia principal do polissacarídeo pécico, enquanto a desmetoxilante desesterifica a pectina a ácido pécico por remoção dos resíduos metoxila.

Quadro 1 – Classificação e modo de ação das pectinases (Kashyap *et al.*, 2001; Jayani *et al.*, 2005).

Tipo de pectinase	E. C. no	Substrato	Modo de ação
1. Desmetoxilante			
a) Pectina metilesterase	3.1.1.11	Pectina	Catalisa a desesterificação dos grupos metoxila da pectina, produzindo ácido pécico e metanol.
2. Despolimerizantes			
(a) Hidrolases			
(i) Endo-Poligalacturonases	3.2.1.15	Ácido pécico	Hidrolisa aleatoriamente as ligações α -1,4 entre unidades de ácido poligalacturônico.
(ii) Exo-Poligalacturonases	3.2.1.67	Ácido pécico	Hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não-redutora.
(b) Liases			
(i) Endo-Pectatoliase	4.2.2.2	Ácido pécico	Rompe as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido pécico por trans-eliminação.
(ii) Exo-Pectatoliase	4.2.2.9	Ácido pécico	Rompe as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação, a partir de terminais não redutores.
(iii) Endo-Pectina liase	4.2.2.10	Pectina	Rompe as ligações glicosídicas entre resíduos de ácido galacturônicos por trans-eliminação.

E.C. no – número de código da enzima

A Figura 2 ilustra o mecanismo de ação de algumas das enzimas do complexo pectinolítico. A pectina metilesterase remove os grupos metoxila da cadeia principal altamente metoxilada, a qual esta representada pela letra 'a', reduzindo seu grau de esterificação. Isso possibilita que as poligalacturonases hidrolisem a cadeia de forma aleatória (endo-PG) ou a partir de seus terminais (exo-PG). Essas enzimas atuam somente em substrato de baixo grau de metoxilação representado pela letra 'b'. Já a pectina liase rompe as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação, sem interferência no grupo éster, o qual é responsável por aromas específicos dos sucos de frutas e pela liberação de metanol, que é tóxico (Yadav *et al.*, 2009). A pectina liase é a única pectinase capaz de atuar sem a ação das demais pectinases, independentemente do grau de esterificação da cadeia de pectina.

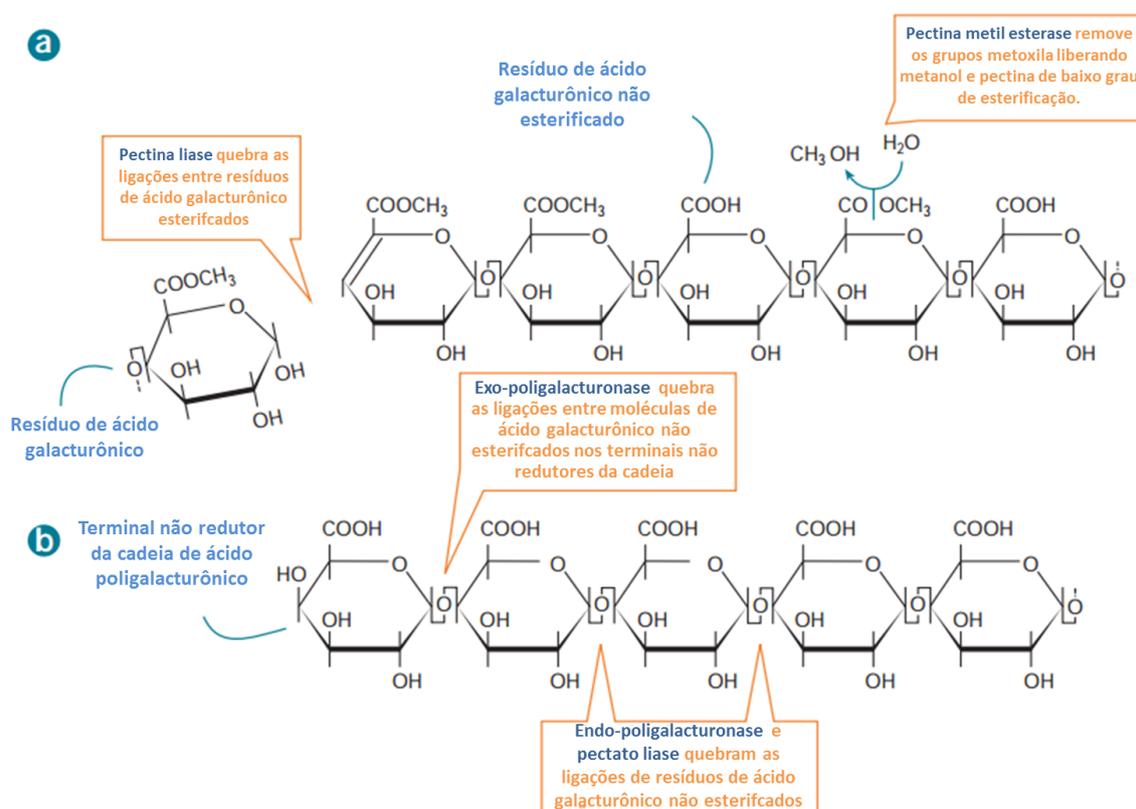


Figura 2 – Mecanismo de ação das enzimas pectinolíticas (NCBE, 2000).

2.2 Aplicação das pectinases no processamento de sucos de frutas

As pectinases possuem grande destaque na indústria de alimentos, atuando principalmente na maceração dos tecidos vegetais. Também são utilizadas em inúmeros

processamentos industriais, como na indústria têxtil, processamento do café, extração de óleo, tratamento de águas residuárias contendo material pectínico, extração e clarificação de sucos de frutas, sendo ainda aplicada na indústria do papel (Sharma *et al.*, 2013; Jayani *et al.*, 2005; Gummadi & Panda, 2003; Shanley *et al.*, 1993).

As substâncias pécicas são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência dos sucos de frutas, causando um considerável aumento na viscosidade, o que dificulta os processos de filtração e concentração (Alkorta *et al.*, 1997). A extração de sucos é feita, habitualmente, por prensagem mecânica que provoca o rompimento das paredes celulares das células do mesocarpo levando à liberação do suco. Frutas ricas em pectina geram sucos com alta viscosidade e turbidez, uma vez que resíduos de pectina e outros polissacarídeos são arrastados da parede (Lea, 1998), e podem formar agregados com proteína e polifenóis (Siebert *et al.*, 1996), contribuindo para a turbidez do produto.

Para minimizar esse problema, as enzimas pectinolíticas são usadas para despectinização dos sucos de frutas, como ilustrado na Figura 3, operação cujos detalhes foram mostrados por Kashyap *et al.* (2001) e Pinelo *et al.* (2010) conforme se segue. Os sucos são ricos em partículas insolúveis, constituídos por um núcleo proteico com carga superficial positiva envolvido por moléculas de pectina carregadas negativamente. Esta carga causa repulsão entre as moléculas de pectina. Ao adicionarem-se as pectinases ao suco, a pectina é degradada e parte do núcleo proteico carregado positivamente é exposto reduzindo a repulsão eletrostática entre as partículas em suspensão. Essas partículas se agregam formando grandes aglomerados que tendem a precipitar reduzindo a turbidez e facilitando as etapas posteriores do processamento do suco.

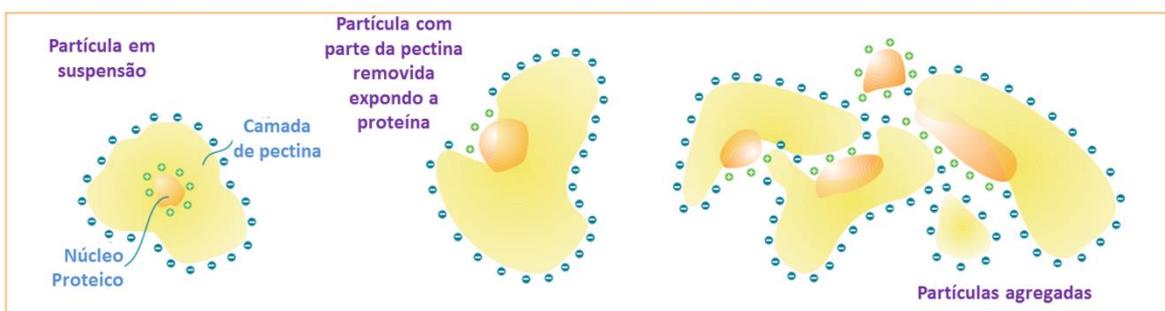


Figura 3 – Despectinização de suco de maçã: hidrólise da pectina gera agregação de partículas e posterior precipitação (NCBE, 2000).

As pectinases podem ser usadas em diferentes estágios da produção de sucos, como na maceração para a obtenção da polpa e na despectinização do suco. Na maceração, as

enzimas diminuem a viscosidade e facilitam a etapa de prensagem da polpa aumentando o rendimento. Na etapa de clarificação, as pectinases hidrolisam a pectina residual reduzindo a viscosidade e turbidez dos sucos (Grassin & Fauquemberg, 1996). O Quadro 2 mostra exemplos de aplicações de pectinases na maceração e na despectinização de diferentes sucos de frutas. No caso da obtenção de suco de uva, assim como na fabricação de vinho, a adição de pectinases é requerida em diferentes fases do processo. Durante o esmagamento das uvas, o uso de enzimas melhora as características visuais (cor e turbidez), devido à maior liberação de antocianinas para o suco, além de aumentar o rendimento de extração (Jayani *et al.*, 2005). Quando adicionadas ao vinho fermentado, as enzimas pécnicas promovem o aumento da velocidade de filtração e de clarificação devido à suspensão de partículas indesejadas.

Embora o uso das enzimas seja favorável ao rendimento dos sucos de frutas, diferentes tratamentos enzimáticos podem afetar significativamente o perfil sensorial do produto final, sendo necessário cuidado no momento da seleção das enzimas e dos parâmetros do tratamento (Laaksonen *et al.*, 2012). Outro fator importante no desempenho das enzimas são as características do substrato, já que a mesma variedade da fruta pode apresentar diferentes valores de acidez, pH e conteúdo de inibidores, gerando diferentes resultados (Zielinski *et al.*, 2014).

O Brasil, como grande produtor de sucos de frutas que é, contribui significativamente para o cenário mundial de consumo de enzimas pectinolíticas. No estado do Rio Grande do Sul, por exemplo, onde, segundo Ibravin (2015), a produção de suco de uva pronto para o consumo chegou a 33 milhões de litros em 2013, consomem-se grandes quantidades de enzimas pectinolíticas durante a operação de maceração, para aumentar o rendimento do produto, e na despectinização, para a obtenção de um produto com maior estabilidade durante a estocagem. Apenas como exercício, tendo como base a produção de suco de uva no Rio Grande do Sul em 2013, e considerando-se a dosagem mínima indicada pelos fornecedores, cerca de 3 g de enzima por 100 kg de fruta, é possível estimar que o consumo de enzimas pectinolíticas, apenas para este fim, tenha ultrapassado 1 tonelada.

Quadro 2 – Efeito do tratamento enzimático em sucos de frutas.

Tratamento	Resultados	Referências
Maceração	Suco de groselha foi obtido após a maceração da fruta com dez diferentes enzimas comerciais. Dosagem, tempo e temperatura de maceração, rendimento, turbidez, teor de antocianinas e polifenóis foram avaliados. Os melhores resultados foram conduzidos a 60°C por 30 minutos com dosagem de 0,18 mL de enzima por 100 g de substrato.	Landbo & Meyer (2004)
	Tempo, temperatura de reação e concentração de pectinases foram estudados na obtenção de suco de banana. Redução de viscosidade, aumento na clarificação e teor de polifenóis foram utilizados como resposta na otimização do processo.	Sagu <i>et al.</i> (2014)
	Pectinases comerciais foram testadas na maceração de maçã utilizando frutos em diferentes estágios de maturação. A extração de compostos fenólicos foi aumentada em maçãs verdes e maduras, porém, maçãs em estágio de senescência não apresentaram aumento no teor de polifenóis. Os autores sugerem que na maturação, as enzimas endógenas sejam capazes de solubilizar a pectina e demais componentes.	Zielinski <i>et al.</i> (2014)
Despectinização	A despectinização dos sucos de maçã e mirtilo com pectinases produzidas por <i>A. niger</i> em CES, promoveu redução de turbidez, redução de viscosidade e aumento na clarificação sem afetar o teor de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante dos sucos.	Sandri <i>et al.</i> (2013)
	Pectinases e xilanases produzidas por <i>A. awamori</i> em CES, utilizando bagaço de uva e cascas de laranja como substrato, foram utilizadas na redução de turbidez e viscosidade de suco de laranja.	Díaz <i>et al.</i> (2013)
	A extração de polifenóis de suco de uva por adição de pectinases foi favorecida quando o sistema foi mantido em temperaturas acima de 50°C.	Martino <i>et al.</i> (2013)
	Suco de limão foi tratado com pectinases para redução de viscosidade e turbidez promovendo aumento do fluxo de permeado durante a clarificação por ultrafiltração.	Maktouf <i>et al.</i> (2014)

A seguir, são listadas as vantagens da aplicação de pectinases na produção de sucos de frutas de acordo, conforme Whitehurst & Oort (2010), considerando-se diferentes aspectos:

- economia - as enzimas aumentam a produtividade global do processo, sendo o seu uso essencial para a redução do tempo de processo (clarificação, filtração,

concentração); como resultado, o suco se mantém estável por mais tempo sem a necessidade de adição de aditivos;

- qualidade - o processamento rápido dos sucos com o uso de enzimas diminui o risco de contaminação por microrganismos e reduz a oxidação, aumentando o tempo de prateleira do produto; as pectinases facilitam a extração de componentes como as antocianinas, aromas e polifenóis antioxidantes, conhecidos por seu efeito positivo na saúde humana, particularmente na prevenção de doenças do coração.

2.3 Microrganismos produtores de pectinases

Entre os diversos microrganismos produtores de pectinases podem ser citadas espécies bacterianas e fúngicas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Erwinia*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Penicillium* e *Fusarium*, entre outras. Porém, fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são os microrganismos mais comumente usados na produção dessas enzimas em larga escala (Kashyap *et al.*, 2001, Jayani *et al.*, 2005). Cada linhagem desses microrganismos pode melhor se adequar a um ou outro tipo de processo de produção, bem como produzir complexos enzimáticos diferentes.

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), de acordo com a Resolução RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006, regulamenta as enzimas e as preparações enzimáticas de origem microbiana permitidas na preparação de alimentos destinados ao consumo humano (Brasil, 2006). Entre os microrganismos permitidos, incluem-se: *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *P. simplicissium*, *R. oryzae*, *T. reesei*. Nos Estados Unidos da América (EUA), a grande maioria das preparações comerciais utilizadas no processamento de sucos de frutas é produzida por espécies de *Aspergillus*, principalmente o *A. niger* (Quadro 3), o qual apresenta a classificação GRAS (*generally recognized as safe*) do FDA (Food and Drugs Administration), o que permite o uso de seus metabólitos na produção de alimentos (FDA, 2002).

Quadro 3 – Exemplos de preparações pectinolíticas comerciais produzidas por linhagens de *Aspergillus*.

Enzima	Microrganismo	Empresa produtora/Referência
Pectinex Ultra SP-L	<i>Aspergillus aculeatus</i>	^a Novozymes (2015)
Pectinex Ultra Clear	<i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Aspergillus niger</i>	^b Novozymes (2015)
Pectinex Ultra Color	<i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Aspergillus niger</i>	^c Novozymes (2015)
Pectinex Ultra Mesh	<i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Aspergillus niger</i>	^d Novozymes (2015)
Novozym 33095	<i>Aspergillus aculeatus</i> <i>Aspergillus niger</i>	^c Novozymes (2015)
Rohapect 10L	<i>Aspergillus niger</i>	Röhm Enzyme (2015)
Rapidase Vino super L	<i>Aspergillus niger</i>	^a DSM (2015)
Rapidase Adex-D	<i>Aspergillus</i> sp	^b DSM (2015)

2.4 Processos de produção de pectinases

As pectinases microbianas podem ser produzidas por dois tipos de processos (Schmidell *et al.*, 2001):

- processo submerso (CSm), caracterizado pela presença de água livre;
- processo em estado sólido (CES), caracterizado pela ausência de água livre e um máximo de 80% de umidade no meio.

A Figura 4 mostra um fluxograma comum para ambos os processos, em que as etapas envolvidas são a utilização do microrganismo produtor, preparação e esterilização do meio de cultivo e o controle dos parâmetros do processo de produção.

Cada processo de produção (submerso ou estado sólido) apresenta vantagens e desvantagens com relação ao controle das condições de operação. No Quadro 4, é apresentado um resumo das principais diferenças entre os processos, segundo Mitchell *et al.* (2006), Hölker & Lenz (2005) e Prabhakar *et al.* (2005).

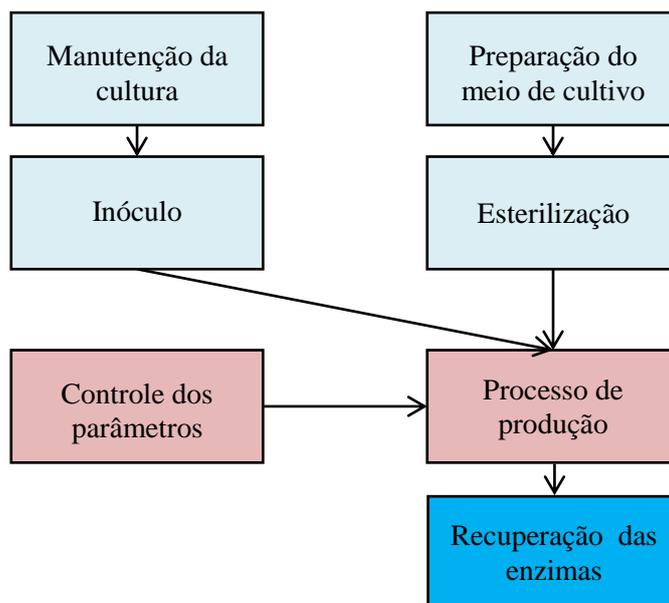


Figura 4 – Fluxograma das etapas do processo de produção de enzimas (*upstream*) (Adaptado de Lima *et al.*, 2001).

Quadro 4 – Diferenças entre o processo de cultivo em estado sólido e cultivo submerso.

Cultivo em estado sólido (CES)	Cultivo submerso (CSm)
Meio apresenta até 80% de umidade; as hifas são expostas ao ar podendo ser ressecadas	Meio é geralmente solubilizado em água; as hifas se mantêm hidratadas
Baixo risco de contaminação devido à baixa atividade de água	O risco de contaminação é maior
Espessura do meio dentro do reator é pequena (baixo volume de ocupação)	Geralmente o volume útil do reator é ocupado
Substrato sólido fornece nutrientes	Os nutrientes estão dissolvidos no meio líquido
O ₂ é livremente disponível na superfície da partícula	A disponibilidade de O ₂ pode ser controlada razoavelmente bem
Ocorrem gradientes de temperatura, pH e umidade ao longo do cultivo (difícil controle)	Os parâmetros pH e temperatura são geralmente controlados ao longo do cultivo
Movimento das partículas do substrato sólido pode causar impacto e danos severos ao microrganismo	Agitação dos biorreatores, geralmente proporciona ambiente de baixo cisalhamento
Problemas causados por inibição são baixos	Inibição por substrato e produto são mais frequentes

Adaptado de Mitchell *et al.* (2006), Hölker & Lenz (2005) e Prabhakar *et al.* (2005).

De um modo geral, o cultivo em estado sólido representa uma alternativa interessante para a produção de enzimas, porque os microrganismos produzem os metabólitos de forma concentrada, com alta estabilidade e baixa repressão catabólica (Hölker & Lenz, 2005). Além disso, alguns estudos apontam para a maior produtividade em CES que em CSm, devido ao menor tempo em que a enzima é produzida (Yoon *et al.*, 2014; Maldonado & Strasser de Saad, 1998; Taragano & Pilosof, 1999). A partir da produção enzimática mais concentrada, os custos operacionais do processo podem ser minimizados. Por exemplo, reatores com desenho e controles mais simples, além da baixa umidade no meio de cultivo tornam o processo mais econômico e com baixo risco de contaminação por bactérias. Porém, a grande quantidade de água presente no processo submerso, tem como vantagem a elevada condutividade térmica do meio aquoso, o que facilita a dispersão do calor, homogeneidade de temperatura, pH, concentração de nutrientes e produtos. Geralmente, o pH não é controlado em CES, já que a variação deste parâmetro no meio sólido é pequena durante o cultivo (Fontana *et al.*, 2005), procedendo-se, em geral, apenas o ajuste do pH inicial (Chutnamop *et al.*, 2008). Já em CSm, o pH é um parâmetro importante a ser controlado para garantir a produção elevada de pectinases como mostrado no trabalho de Meneghel *et al.* (2014). O aumento de viscosidade do meio de cultivo causado pelo crescimento celular é outro parâmetro a ser controlado e que influencia diretamente nas condições de mistura e na transferência de calor e massa (Meneghel *et al.*, 2014; Fontana *et al.*, 2009).

Uma grande diferença entre o CSm e CES está na capacidade de mistura. O CSm é geralmente perfeitamente misturado, ou seja, em qualquer parte do reator e em qualquer tempo, haverá a mesma concentração de microrganismo, nutrientes e metabólitos (Gervais & Molin, 2003). Em CES, apesar dos mecanismos de agitação presentes em alguns biorreatores, a homogeneização do meio nem sempre é eficiente apresentando regiões de maior e menor crescimento e produção. Além disso, sabe-se que o cada processo de cultivo é responsável por produzir enzimas com diferentes características (Minjares-Carranco *et al.* 1996). Diferentes enzimas podem ser produzidas em cada processo de cultivo pelo mesmo microrganismo, ou seja, enzimas produzidas em CES podem não ser produzidas em CSm e vice-versa (Maldonado & Strasser de Saad, 1998; Barrios-González, 2012).

Apesar das diferenças entre os dois processos de cultivo, como apontadas acima por diversos autores, o CES pode ser utilizado na produção de pectinases com as vantagens do emprego de resíduos da agroindústria como substrato e o uso de biorreatores de fácil

operação. Na verdade, os parâmetros envolvidos nesse tipo de processo e o comportamento do microrganismo ainda precisam ser esclarecidos para que o CES seja vantajoso do ponto de vista industrial.

2.4.1 Cultivo em estado sólido

O cultivo microbiano em estado sólido (CES) é caracterizado pela utilização da matriz sólida e pela ausência de água livre, onde a matriz atua como suporte e como fonte de nutrientes para o desenvolvimento do microrganismo (Singhania *et al.*, 2009). O CES é utilizado há muito tempo para produção de diversos alimentos e molhos como, koji, miso e shoyu. Atualmente, o CES é utilizado de forma economicamente viável para a produção de produtos de alto valor agregado como enzimas, ácidos orgânicos, pigmentos, polissacarídeos, compostos aromáticos, biopesticidas, etc. (Damásio *et al.*, 2011, Soccol *et al.*, 2003).

Como substrato ou suporte sólido, são utilizados diferentes resíduos da agroindústria. Entre os resíduos agroindustriais aplicáveis a cultivos sólidos, podem-se citar o bagaço de cana-de-açúcar, farelos de soja e trigo, cascas e polpa de frutas, entre outros. A pectina, por exemplo, que atua como fonte indutora para a produção de pectinases, pode ser fornecida utilizando bagaço de maçã e cascas de frutas cítricas como substrato (Castilhos *et al.*, 2000, Patil & Dayanand, 2006, Martínez-Trujillo *et al.*, 2011).

2.4.2 Biorreatores utilizados em cultivo em estado sólido

Em CES, podem ser utilizados biorreatores de diferentes escalas. Desde frasco a biorreatores de escala laboratorial, piloto e industrial com controles de temperatura, umidade, aeração, agitação e grandes capacidades de trabalho (toneladas) (Durand, 2003). Entre os biorreatores usados estão os de leito empacotado, tambor rotativo, leito fluidizado gás-sólido, além de outros biorreatores com diferentes modos de agitação (Michtell *et al.*, 2006). Esses biorreatores são classificados de acordo com o padrão de aeração e presença de agitação:

- biorreatores com aeração superficial e sem agitação;
- biorreatores com aeração forçada e sem agitação;
- biorreatores com aeração superficial e com agitação;
- biorreatores com aeração forçada e com agitação.

A Figura 5 ilustra a classificação dos tipos de biorreatores em função da presença de agitação do sistema e o tipo de aeração.

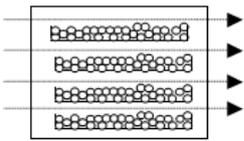
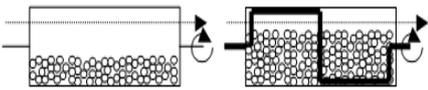
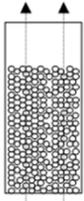
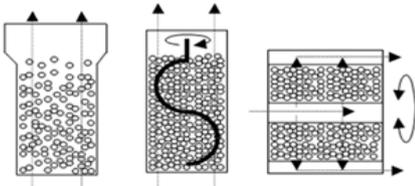
Agitação → ↓ Aeração	Sem agitação (ou muito infrequente)	Agitação contínua intermitente
Aeração superficial (o ar passa ao redor do leito)	GRUPO I  Bandeja	GRUPO III  Tambor rotativo Tambor agitado
Aeração forçada (o ar é soprado através do leito)	GRUPO II  Leito empacotado	GRUPO IV  Leito Leito Tambor fluidizado agitado de balanço

Figura 5 – Classificação dos biorreatores de acordo com as características do tipo de aeração e presença de agitação do sistema (Mitchell *et al.*, 2006).

A ampliação de escala ainda é um dos maiores desafios do CES, devido à dificuldade de controles de transferência de calor e massa. A transferência de oxigênio, por exemplo, é um dos parâmetros mais complexos, que afeta o controle de outros dois parâmetros: a temperatura e o conteúdo de água contido no meio sólido (Durand, 2003). O acúmulo de calor no meio sólido é uma das maiores dificuldades encontradas no CES, o que consequentemente limita a espessura do leito.

Em reatores do tipo bandeja, geralmente a quantidade de meio é limitada a uma altura de poucos centímetros, devido à dificuldade de remoção de calor que se dá em função da aeração superficial do leito (Khanahmadi *et al.*, 2006).

Já o biorreator de tambor rotativo apresenta como vantagem a agitação do meio com controles de tempo e velocidade que beneficiam o crescimento e a produção de enzimas (Thomas *et al.*, 2013, Bhargav *et al.*, 2008). De acordo com Mitchell *et al.* (2000),

em biorreatores de tambor rotativo ou agitado, quando empregado o sistema de agitação intermitente, o biorreator opera como uma bandeja durante o período estático e, durante os eventos de agitação, é possível homogeneizar a temperatura e melhorar as transferências de calor e massa. No trabalho de Reu *et al.* (1993), a temperatura do cultivo de *Rhizopus oligosporus* na produção de tempe (produto a base de soja) foi realizada por um sistema de controle de temperatura e fluxo de ar, velocidade, direção e tempo de rotação do biorreator. No sistema estático, a temperatura máxima atingida foi de 44°C, enquanto o cultivo agitado pode ser controlado em 34°C devido aos eventos de agitação associados aos controles citados acima. Isso levou a um aumento do tempo de cultivo, o que não era possível em sistema estático devido ao acúmulo de calor gerado, melhorando as características do produto.

Os reatores de leito empacotado usam aeração forçada através do leito estático. Esse tipo de biorreator oferece como vantagem a alta densidade de empacotamento (carga de substrato por volume do biorreator). Porém, o tamanho das partículas de substrato deve ser adequado para garantir a passagem de ar (Thomas *et al.*, 2013). O maior problema nesse tipo de reator é o acúmulo de calor, o que diminui a umidade do meio limitando o crescimento no interior do leito e reduzindo a formação de produto (Bhargav *et al.*, 2008). O aumento da umidade do ar e o uso de trocadores de calor são geralmente utilizados para solucionar esse problema.

A Tabela 1 apresenta trabalhos encontrados na literatura para a produção de pectinases utilizando biorreator de bandeja e de tambor rotativo. Diferentes condições de cultivo foram usadas na produção como: substrato, temperatura, umidade e fluxo de ar. Esses trabalhos apresentam resultados que sugerem a utilização de cada biorreator como uma alternativa promissora na produção de pectinases, porém, a comparação entre os valores de atividade enzimática de cada trabalho não é possível por não existir um método padrão adotado para a medida.

A influência dos diferentes parâmetros operacionais relacionados ao CES será apresentada a seguir.

Tabela 1 – Comparação entre biorreatores utilizados na produção de pectinases.

Tipo de biorreator	Condições operacionais				
	Bandeja	Tambor rotativo	Tambor horizontal	Tambor rotativo	Tambor horizontal
Massa de meio (g)	3	10	2000	1650	6000
Substrato	CL	BU-CL	CC	FT	BM
Temperatura (°C)	30 ^a	30 ^b	30 ^a	30 ^b	25 ^b
Umidade (%)	70	70	60	55	50
Agitação	Não	Intermitente	Sim	Intermitente	Intermitente
Aeração (L/min)	1,94x10 ⁻⁴	0,120	2	0,6	1
Pectinase (U/g)	56 ^c	8,77	265	107	-
Referência	Ruiz <i>et al.</i> (2012)	Díaz <i>et al.</i> (2011)	Rodríguez-Fernández <i>et al.</i> (2011)	Polidoro (2009)	Berovič & Ostroveršnik (1997)

Vol. Ocup. – volume de ocupação; CL – Casca de limão; BU – bagaço de uva; CL – casca de laranja; CC – casca de cítricos; FT – farelo de trigo; BM – bagaço de maçã. ^atemperatura controlada; ^b temperatura no início do cultivo; ^c valor estimado

2.4.3 Efeito dos parâmetros operacionais

Em CES, os parâmetros operacionais como pH, temperatura, umidade, suprimento de oxigênio, espessura do leito e frequência de agitação podem apresentar efeito significativo no crescimento celular e na formação do produto. Para esclarecimento, uma breve revisão foi realizada sobre a influência desses parâmetros no processo em estado sólido.

2.4.3.1 pH

Em CES, o pH é um parâmetro de difícil controle, sendo geralmente apenas ajustado no início do cultivo. Como vantagem, o pH apresenta uma variação pequena durante o CES na produção de poligalacturonases por *A. niger* e *A. oryzae* como mostrado nos trabalhos de Fontana *et al.* (2005) e Heerd *et al.* (2012), respectivamente. As mais altas atividades de pectinases são obtidas em pH ácido, na faixa de 3 a 5 (Fawole & Odunfa, 2003; Fontana *et al.*, 2005; Patil & Dayanand, 2006).

2.4.3.2 Temperatura

A temperatura e a transferência de calor do meio de cultivo são fatores que influenciam fortemente o crescimento do microrganismo e a produção enzimática (Bhargav *et al.*, 2008). Em alguns casos, o acúmulo de calor no meio, resulta em temperaturas altas o suficiente para causar a desnaturação do produto formado, podendo

exceder em até 20°C o valor ideal de incubação (Pandey, 2003). Segundo Hölker & Lenz (2005), devido ao acúmulo de calor gerado pelo metabolismo microbiano e à ausência de água livre no meio, o resfriamento do substrato se dá por evaporação. Para isso, o sistema necessita de alta intensidade de aeração. Ainda segundo os mesmos autores, a agitação pode ser outro meio de reduzir a temperatura do cultivo, porém muitos microrganismos podem ser sensíveis ao cisalhamento causado pelo movimento das partículas.

Meien *et al.* (2004), verificaram que gradientes de temperaturas são inevitáveis em biorreatores de grande escala. Porém, um controle razoável da temperatura do meio pode ser atingido manipulando a temperatura do ar de entrada saturado em umidade.

O acúmulo de calor no substrato sólido é responsável, também, por limitar a espessura do meio (Thomas *et al.*, 2013). Chen *et al.* (2005), verificaram que, para um meio de cultivo com espessura de 9 cm em biorreator de bandeja, ocorreu uma distribuição de temperatura com gradiente em torno de 3°C, apesar da aeração forçada. Os estudos em CES, principalmente para aumento de escala do processo, se direcionam na tentativa de encontrar medidas que assegurem a homogeneidade de temperatura do sistema e a remoção de calor de forma eficiente.

2.4.3.3 Umidade

Em CES, a baixa umidade do substrato limita o crescimento e o metabolismo do microrganismo (Bhargav *et al.*, 2008). Altos níveis de umidade resultam em redução da porosidade do substrato, o que impede a penetração do oxigênio (Pandey, 2003). No trabalho de Demir & Tari (2014), a máxima atividade pectinolítica foi obtida com o aumento da umidade inicial do meio de 40 para 62%. Os autores sugerem que ao aumentar-se a umidade do meio, realizada por adição de água destilada, as partículas de farelo de trigo incharam mais, aumentando a área de superfície. Além disso, o alto conteúdo de umidade, possivelmente, aumentou a solubilidade dos nutrientes encontrados na estrutura do substrato. A umidade pode aumentar com o tempo de cultivo, devido ao metabolismo do fungo, ou diminuir quando altos valores de fluxo de ar são empregados. O ideal é monitorar a umidade durante o cultivo e avaliar a faixa em que ocorre maior produção enzimática. Na literatura, por exemplo, são encontrados diferentes valores de umidade em que a produção de pectinases é realizada, variando na faixa de 40 a 80% (Castilhos *et al.*, 2000; Kalogeris *et al.*, 2003; Fontana *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005).

2.4.3.4 Aeração

Em CES, segundo Gervais & Molin (2003), a aeração tem duas funções essenciais: i) fornecer oxigênio para o metabolismo aeróbico microbiano e ii) remover CO₂, calor e vapor de água produzidos durante o período de cultivo. Rodríguez-Fernández *et al.* (2011), verificaram que a otimização do fluxo de ar empregado na produção de pectinases e xilanases por *A. niger*, em biorreator de tambor rotativo, tende a evitar o uso desnecessário de elevados fluxos de ar e diminuir o custo do processo. Os autores observaram que fluxos acima de 1,0 L de ar por kg de meio úmido por minuto não aumentaram a produção de enzimas. Kalogeris *et al.* (2003), observaram que para a produção de celulases e hemicelulases, em biorreator de tambor rotativo, o aumento do fluxo de 0,2 a 3 L de ar por kg de meio úmido por minuto favoreceu a produção de biomassa, bem como, de enzimas. Gasiorek (2008), também usando um biorreator de tambor rotativo, observou que a produção de ácido cítrico por *A. niger* foi reduzida em torno de 20% com o aumento de aeração de 0,2 para 0,6 L de ar por kg de meio úmido por minuto.

2.4.3.5 Espessura do leito de meio

A espessura do leito de meio em CES ainda é o maior limitante do processo, principalmente em reatores de maior escala. Em pequena escala, Figueroa-Montero *et al.* (2011), mostraram que o aumento da espessura do leito em poucos centímetros, de 1,5 para 2,5 cm em biorreator do tipo bandeja, provocou um aumento na temperatura do meio de 37 para 42°C no crescimento de *A. niger*. Hendges *et al.* (2011), usando um biorreator de coluna com 170 mm de espessura de meio e aeração forçada para produção de pectinases por *A. niger*, observaram que nenhuma das condições de aeração (1,4 a 8,5 L de ar por kg de meio úmido por minuto) testadas apresentou efeito positivo no controle de temperatura do meio, a qual atingiu 50°C. Ghildyal *et al.* (1993), observaram que os títulos enzimáticos obtidos em diferentes espessuras de meio apresentavam relação com o gradiente de temperatura. Esses trabalhos indicam que a quantidade de meio utilizada no biorreator se torna um fator limitante para remoção de calor do meio devido ao acúmulo gerado pelo metabolismo fúngico.

2.4.3.6 Agitação em biorreator de tambor rotativo

O biorreator de tambor rotativo tem como função a agitação do meio de cultivo para melhorar a transferência de massa e calor. Porém, existem alguns estudos que

apontam que agitações em intervalos curtos ou em frequências elevadas podem causar dano ao microrganismo.

Rodríguez-Jasso *et al.* (2013), usando biorreator de tambor rotativo para produção da enzima fucoidanase por *A. niger*, observaram que a agitação contínua aumentou a indução da enzima quando comparado ao sistema estático. Demir *et al.* (2014), verificaram que, ao aumentar a agitação de uma para três vezes por dia, a atividade de poligalacturonases também aumentou. Os autores acreditam que o maior número de eventos de agitação tenha sido capaz de remover o calor metabólico produzido e fornecer oxigênio ao meio de forma mais homogênea. Com isso, o microrganismo foi capaz de alcançar os nutrientes disponíveis em diferentes regiões do meio de cultivo devido ao movimento causado pela agitação. Gasiorek (2008) observou que em cultivo com agitação contínua a produção de biomassa e ácido cítrico foram superior e inferior, respectivamente, aos valores encontrados em cultivo com agitação intermitente. O autor demonstrou que o maior valor de biomassa indica que não ocorreram danos ao micélio, porém o meio de cultivo sofreu aglutinação com o tempo de cultivo.

Como observado pelos dados da literatura, os parâmetros de processo citados acima são importantes para o crescimento do microrganismo, bem como, para a síntese do produto. Provavelmente, esses parâmetros variam com o *design* do biorreator, com substrato, o microrganismo e o produto de interesse. Portanto, o estudo desses diferentes parâmetros se torna importante para a otimização da produção enzimática.

2.5 Recuperação, concentração e purificação de enzimas

As etapas de recuperação e concentração de enzimas pectinolíticas constituem uma importante parte do processo de produção. Nessas etapas, deve-se levar em consideração, além da viabilidade econômica e a escala de manufatura necessária à demanda do produto, a eficiência do processo em termos de rendimento e o fator de purificação desejado (Martin, 2006). O fluxograma mostrado na Figura 6 descreve as principais etapas presentes no processo de recuperação do produto após o cultivo. A recuperação da enzima produzida por CES, na maioria dos casos, exige que a enzima seja extraída desse meio por adição de solvente, e então, separada. Já em CSm, a solução enzimática é geralmente separada da biomassa por centrifugação. Caso a enzima seja produzida de forma intracelular, a etapa de ruptura das células deverá ser empregada. Segundo a empresa Noor Enzymes (2015), produtora de enzimas na Índia, após a solubilização da enzima do meio sólido, as etapas de

separação de insolúveis, separação de células, concentração e purificação, geralmente são aplicadas de igual forma em ambos os processos.

É importante ressaltar que as condições de extração empregadas na recuperação das enzimas produzidas por cultivo em estado sólido são o foco de muitos trabalhos encontrados na literatura (Singh *et al.*, 1999; Castilhos *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2007; Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012). Dependendo das condições de temperatura, solvente e razão entre massa de sólido e solvente, diferentes resultados são encontrados. O objetivo do estudo dessa etapa é obter um extrato com maior atividade possível, a fim de favorecer a etapa de concentração.

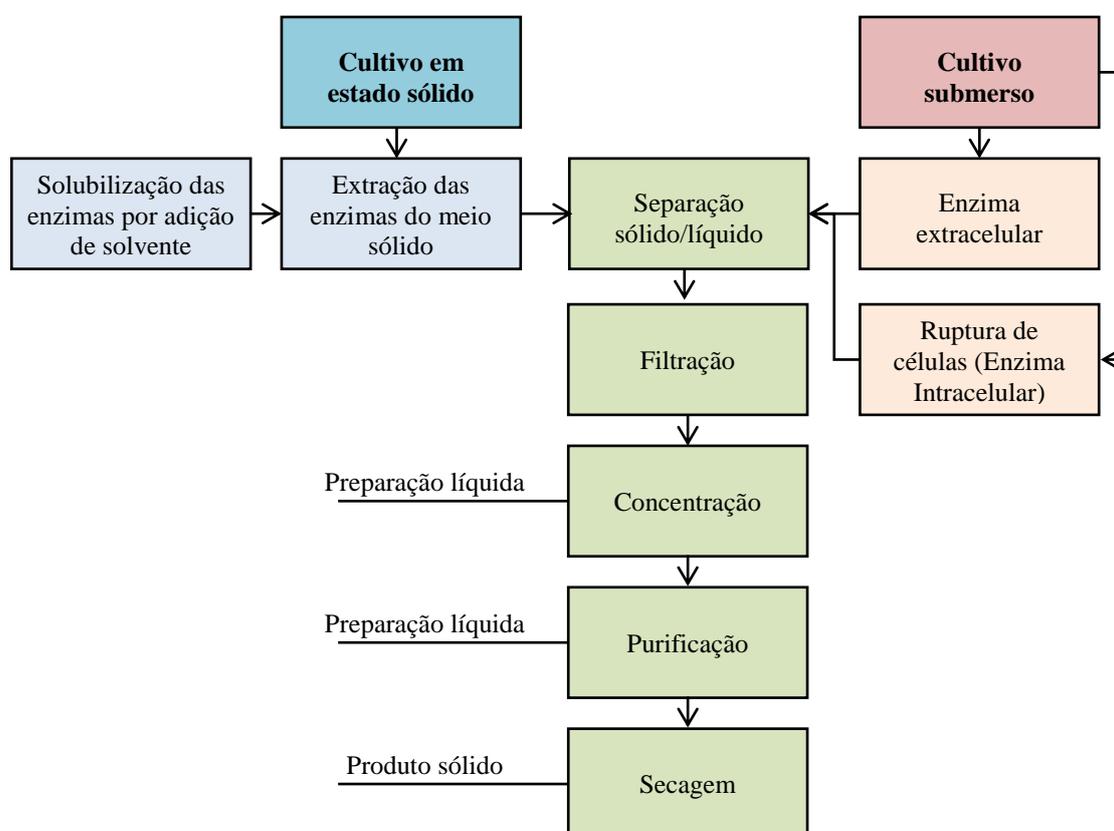


Figura 6 – Fluxograma das etapas do processo de recuperação de enzimas (*downstream processing*) (Adaptado de Lima *et al.*, (2001).

As operações unitárias, como a precipitação, extração em sistema de duas fases, cromatografia e separação com membranas empregadas na etapa de downstream, resultam em concentração e purificação do extrato enzimático (Ladisch *et al.*, 1989). O grau de concentração e purificação vai depender da técnica aplicada.

A precipitação foi uma das primeiras técnicas utilizadas para separação de enzimas devido à sua simplicidade e vem sendo aplicada há décadas. Diferentes métodos são usados para a precipitação de enzimas incluindo a precipitação pelo método de *salting-out* e com solventes orgânicos como etanol ou acetona (Pessoa Jr. & Kilikian, 2005).

Singh *et al.*, (1999), relatam a precipitação com sulfato de amônio e solventes orgânicos como métodos de concentração de poligalacturonases, porém com baixa recuperação da atividade, 30 e 50%, respectivamente, devido à desnaturação das enzimas. Nakkeeran *et al.* (2010), estudaram a precipitação de poligalacturonases por afinidade com alginato de sódio, alcançando recuperação de 61% e purificação de quatro vezes. Chen *et al.*, (2008), na separação de surfactina produzida em meio líquido, demonstraram a aplicabilidade do processo de *salting-out* associado à ultrafiltração com recuperação de 63% e pureza de 84% no produto final. O método de *salting-out* é comumente usado nos processos de recuperação de enzimas, embora requeira grandes quantidades de materiais químicos, o que contribui para a baixa pureza e perda da atividade específica da solução enzimática, quando contaminantes não são efetivamente removidos (Krstić *et al.*, 2007). Segundo Bon *et al.*, (2008), a precipitação é geralmente usada em pequena escala, pois quando o volume a ser processado é muito grande, o tempo de residência necessário é extremamente longo, especialmente no caso dos solventes orgânicos, o que resulta na inativação das enzimas.

O carvão ativado (Dey *et al.*, 2014) e o caolin (Silva *et al.*, 2007) foram relatados na literatura como meios de purificação de enzimas. Nesses trabalhos, foram usados 100 g/L de carvão ativado e 60 g/L de caolin, atingindo fatores de purificação de 35 e 8 vezes e recuperação da enzima de 70% e 59%, respectivamente. Maciel *et al.*, (2014) apresentaram como método de purificação para poligalacturonases o sistema aquoso bifásico formado por polietileno glicol e sais de fosfato. O sistema bifásico é formado pela incompatibilidade entre as soluções polimérica e de alta concentração salina, a qual por sua vez captura grandes quantidades de água enquanto as enzimas migram preferencialmente para a fase polimérica. Com este método, os autores conseguiram 74% de recuperação da enzima e fator de purificação de 8 vezes. A cromatografia é uma operação considerada de alta resolução na purificação de enzimas. No trabalho de Dinu *et al.*, (2007), a purificação de pectinases usando técnicas de cromatografia mostrou resultados acima de 40% de pureza para poligalacturonase. Também utilizando a técnica de cromatografia, Devi & Rao (1996) isolaram poligalacturonase produzidas por *A. carbonarius*, obtendo purificação de

684 vezes. Porém, sabe-se que as técnicas de cromatografias apresentam alto custo e, portanto são aplicadas na obtenção de produtos que requerem alta pureza.

A operação de separação com membranas, utilizada neste trabalho é discutida a seguir.

2.5.1 Membranas de separação aplicadas na separação e concentração de produtos biotecnológicos

A operação de separação por membranas têm sido largamente usada na separação e purificação de produtos biotecnológicos por apresentar alta eficiência de separação e recuperação (Lütz *et al.*, 2006).

A microfiltração (MF) e a ultrafiltração (UF), por exemplo, são duas operações de separação com membranas utilizadas em diferentes aplicações, como por exemplo, na concentração de proteínas e de outros produtos microbianos, clarificação de soluções, esterilização devido à remoção de vírus e bactérias. No Quadro 5, estão descritas as condições de pressão aplicada e o tamanho de poro para cada tipo de membrana.

O processo de microfiltração (MF) combinado com ultrafiltração (UF) é capaz de solucionar muitos problemas de separação de materiais particulados e macromoléculas, apresentando ainda, as vantagens comuns às operações de separação por membranas como, o processo ser realizado em baixas temperaturas, sendo desnecessária a adição de produtos químicos, tornando-se competitiva com processos de precipitação e destilação (Scott, 1995).

Quadro 5 – Características dos processos de microfiltração e ultrafiltração.

Processos	Força Motriz	Tamanho de poro	Aplicações
Microfiltração	Pressão (0,1 – 2 bar)	0,1–10 µm	Remoção de microrganismos, clarificação
Ultrafiltração	Pressão (1 - 7 bar)	2–100 nm	Concentração de macromoléculas

Adaptado de Scott (1995)

A MF pode ser utilizada para remoção de polissacarídeos, sólidos suspensos, restos de células e outros materiais particulados e suspensos presentes na solução a ser tratada (Charcosset, 2006). A UF tem se mostrado uma ferramenta de separação promissora em muitos processos industriais sendo aplicada principalmente no fracionamento e concentração de substâncias, porém a purificação obtida por esta técnica é baixa, já que

todos os componentes que apresentarem massa molar acima do ponto de corte da membrana serão concentrados juntamente com o componente de interesse.

Apesar do amplo uso da UF, o seu potencial na área de biotecnologia tem muito a ser explorado, já que cada preparado biotecnológico, como, por exemplo, caldos fermentativos apresentam diferentes composições, o que pode gerar alterações importantes no comportamento do processo da UF (Datta *et al.*, 2009).

Outra questão amplamente estudada por diversos autores são as condições de operação objetivando minimizar a perda de fluxo e, portanto, reduzir o tempo de processo. A formação de *fouling*, que é causado pela adsorção ou deposição de matéria na membrana, é outro fator que pode prejudicar o desempenho da filtração (Hwang *et al.*, 2011), principalmente no caso de soluções provenientes de processos microbianos que são normalmente ricas em moléculas de diferentes tamanhos, como proteínas, carboidratos, sais e outros compostos metabólicos. Segundo Chan & Chen (2004), o *fouling* se caracteriza principalmente por provocar redução do fluxo de permeado e variação na taxa de rejeição. Neste caso, as condições do processo como, por exemplo, velocidade de escoamento, pressão e temperatura podem ser ajustadas, bem como o material da membrana ser selecionado visando à mínima perda de fluxo (Ulbricht, 2006). Wojciech *et al.* (2013), observaram que na MF de caldo fermentativo contendo amido e leveduras, foi possível minimizar a formação de *fouling* usando alta velocidade de escoamento (4,55 m/s) e baixa pressão transmembrana (0,35 bar). Wang *et al.* (2012) estudaram a UF de caldo fermentativo contendo ácido succínico com diferentes membranas e observaram que a característica do material da membrana e o tamanho de poro apresentam grande influência na variação de fluxo e na formação de *fouling*. Zhu & Chen (1993) concluíram em seu trabalho que membranas hidrofílicas produzem resultados mais satisfatórios na concentração de enzimas que os alcançados com membranas hidrofóbicas, já que nesta última a formação de *fouling* na superfície foi mais pronunciada.

2.5.2 Concentração de enzimas por ultrafiltração

A UF tem sido usada como uma importante ferramenta na concentração de enzimas com alta recuperação de atividade. Rodríguez-Fernández *et al.* (2013), utilizando membrana de 10 kDa e fator de concentração volumétrico de 5x, garantiram que 86% de fitases fossem recuperadas ao final do processo. Lemes *et al.* (2014) utilizaram a UF para concentração de β -galactosidase, atingindo um fator de concentração de atividade de 8x,

com a vantagem de reduzir o volume de trabalho para as etapas subsequentes de purificação. Takaç *et al.* (2000) estudaram a influência da velocidade de escoamento e da pressão na recuperação de proteases e na melhor condição atingiram 76% de recuperação com membrana de 10 kDa.

As enzimas componentes do complexo pectinolítico apresentam massa molar que podem variar de 5 a 60 kDa, o qual está dentro da escala de ponto de corte molecular de membranas de ultrafiltração; porém, poucos trabalhos descrevem a concentração de pectinases microbianas utilizando esse processo. A Tabela 2 mostra trabalhos em que a UF foi utilizada para a concentração de pectinases. A maioria desses estudos utiliza a UF apenas como operação de concentração para facilitar a etapa de purificação, que geralmente é realizada por técnicas de cromatografia ou precipitação. Dados sobre o comportamento da membrana (fluxo de permeado) durante a concentração ou o comportamento da atividade com o tempo de processo não são apresentados nesses trabalhos.

Tabela 2 – Resultados de recuperação e purificação encontrados na literatura para concentração de pectinases por ultrafiltração.

Cut-off molecular (kDa)	Recuperação (%)	Fator de purificação	Referência
-	95,0	-	Bohdziewicz & Bodzec (1994)
50	90,1	3,2	Spagna & Pifferi (1994)
-	43,5	0,7	Kumar & Palanivelu (1999)
30	91,0	-	Singh <i>et al.</i> (1999)
10	90,0	-	Dinu <i>et al.</i> (2007)
10	27,8	22,2	Silva <i>et al.</i> (2007)
10	79,2	5,3	Jacob <i>et al.</i> (2008)
50	76,0	5,1	Nakkeeran <i>et al.</i> (2008)
10	95,0	-	Zhang <i>et al.</i> (2009)
10	40,6	4,8	Yadav <i>et al.</i> (2013)

Singh *et al.* (1999) obtiveram concentração da atividade enzimática de 50 vezes com recuperação de 91% das enzimas a partir da produção de pectinases em estado sólido por *A. carbonarius*. Nakkeeran *et al.* (2008), utilizando o mesmo microrganismo, porém cultivado em meio líquido, descreveram a alta eliminação de carboidratos, sais e ácidos

com recuperação de 76% de poligalacturonase (PG) usando membrana de UF de 10 kDa. Os mesmos autores, em trabalho posterior, mostraram que pectinases concentradas pelo processo de UF mostraram-se mais eficientes no tratamento de sucos de maçã do que as enzimas concentradas pelo processo de precipitação com alginato de cálcio (Nakkeeran *et al.*, 2011). Os autores sugerem que isso se deve à concentração de todas as enzimas com tamanho molecular igual ou maior ao ponto de corte da membrana juntamente com as poligalacturonases, como por exemplo, proteases e amilases, o que favoreceu o tratamento dos sucos de frutas. Além disso, Nakkeeran *et al.* (2012) mostraram que o uso de sistemas de membranas para concentração de enzimas pectinolíticas apresenta um capital de investimento 47% menor que o uso de sistema de precipitação.

2.6 Preparações pectinolíticas comerciais

O grau de pureza das enzimas comerciais varia de produtos de baixa a altíssima pureza dependendo da aplicação, podendo ser purificadas até centenas de vezes. Algumas preparações enzimáticas consistem essencialmente do caldo enzimático concentrado e de aditivos que estabilizam a atividade da enzima (European Commission, 2002). Uma vez que a enzima foi concentrada e purificada na extensão desejada, o principal objetivo é conservar a atividade. A indústria produtora de enzimas geralmente recomenda as condições de estocagem a fim de garantir a conservação da atividade enzimática.

As preparações enzimáticas comerciais utilizadas no processamento de sucos e vinhos apresentam pureza baixíssima, justamente por se tratar de um *mix* enzimático composto pela combinação da atividade de duas ou mais pectinases, como as poligalacturonases, pectina liases e pectina esterases e, outras enzimas como celulasas, hemicelulasas, proteases e amilases que são produzidas pelo microrganismo durante o cultivo, dependendo das características do meio (Combo *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2013). Segundo Bhat, (2000), as pectinases, celulasas e hemicelulasas quando combinadas são coletivamente chamadas de enzimas de maceração e usadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais.

A preparação comercial *Endozym Active* (Pascal Biotech-AEB), por exemplo, utilizada na clarificação de mostos, inclui a combinação da ação de pectina liase, poligalacturonase, pectinaesterase, CMC celulase e β -glucosidade. As três primeiras têm como função a degradação da pectina, a CMC celulase tem por função liberar matéria corante, taninos e precursores aromáticos e, por fim, a β -glucosidade libera aromas dos

grupos que são altamente ligados aos açúcares (Endozym Active, 2011). O Quadro 6 apresenta exemplos da combinação de pectinases, celulases e hemicelulases e suas diferentes aplicações.

Quadro 6 – Exemplo de mistura de enzimas no tratamento de sucos e polpa de frutas.

Enzimas	Função	Aplicação
Enzimas de maceração (pectinases, celulases e hemicelulases)	Hidrólise da pectina solúvel e componentes da parede celular; redução da viscosidade e manutenção da textura dos sucos de frutas.	Aumento no rendimento da extração dos sucos, liberação de aromas.
Poligalacturonases, pectina liase e hemicelulase	Hidrólise completa da pectina e polissacarídeos.	Clarificação de sucos de frutas.
Poligalacturonase, pectina liase e pectina esterase	Redução de viscosidade e hidrólise dos tecidos vegetais da fruta.	Maior eficiência na etapa de prensagem e aumento na extração e cor.
Pectinases e celulases	Liberação de antioxidantes a partir das frutas e vegetais.	Aumento da estabilidade dos sucos. Liberação de antioxidantes.
Poligalacturonase e pectina liase com baixo conteúdo de pectina esterase e hemicelulase	Hidrólise da pectina e remoção de hidrocolóides das fibras de celulose	Produção de sucos de vegetais de alta turbidez e baixa viscosidade
Pectina esterase	Processamento de frutas.	Produção de ketchup e polpa de frutas

Adaptado de Bhat (2000)

Geralmente, as pectinases, são capazes de conservar a atividade por algumas semanas quando conservadas sob refrigeração, como mostrado por Gomes *et al.* (2011). Amostras de pectinases produzidas por *A. niger* foram submetidas à temperatura de 4°C e os resultados mostraram que a enzima manteve sua atividade inicial por até 40 dias de estocagem, sem adição de qualquer conservante. Porém, as preparações enzimáticas comerciais são formuladas com a adição de aditivos para garantir a estabilidade da atividade enzimática durante um longo período de estocagem. Nas preparações enzimáticas na forma líquida, o glicerol é o aditivo mais utilizado para conservação da atividade enzimática e para prevenção de crescimento microbiano (Ó’Fagáin, 2003; Placek *et al.*, 2005).

Segundo Iyer & Ananthanarayan (2008), a adição de polióis em soluções enzimáticas aquosas fortalece as interações hidrofóbicas entre resíduos não polares dos aminoácidos, levando ao aumento da rigidez da estrutura e a resistência à

termodesativação. Além disso, outro efeito positivo é a redução da atividade de água do meio que inibe o crescimento microbiano. Kumar & Venkatesu (2012) descreveram a estabilização da estrutura da enzima em função da exclusão preferencial do glicerol das proximidades da superfície da molécula, segundo um efeito chamado de solvatação. Com isso, ocorre a ligação de moléculas de água na superfície da enzima, chamada de hidratação preferencial (Figura 7). Ou seja, a incorporação do glicerol na solução aquosa de enzimas leva à competição entre a água e o glicerol pela enzima. Porém, a enzima tem preferência por ligações com as moléculas de água devido a maior afinidade. Assim, a molécula da enzima se mantém compactada devido à força de repulsão sobre a molécula de glicerol, impedindo sua desnaturação.

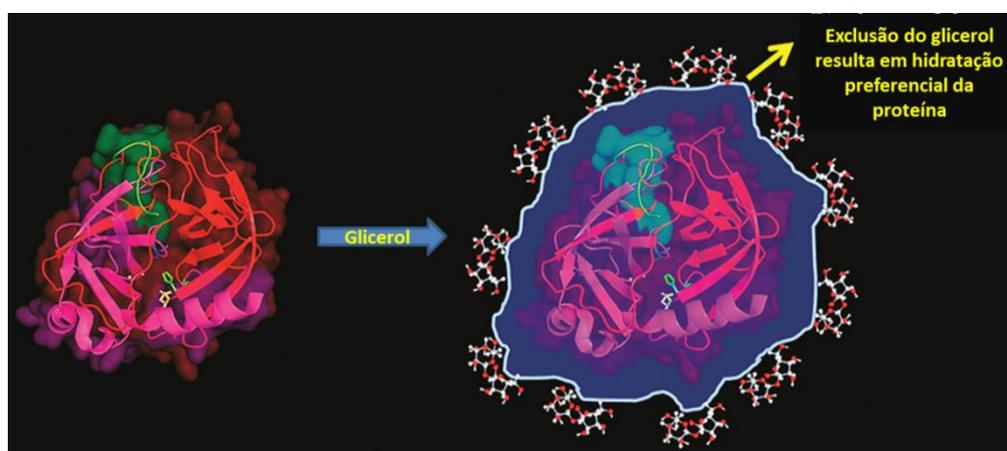


Figura 7 – Influência do glicerol na estrutura e na estabilidade das enzimas: hidratação preferencial em torno da superfície da enzima promove compactação e aumenta a estabilidade da estrutura (Kumar & Venkatesu, 2012).

No trabalho de Rodríguez-Fernández *et al.* (2013), a adição de 35% de glicerol ao caldo enzimático concentrado conservou 70% da atividade de fitases por 16 semanas quando mantidas a 4°C. Pectinases mantidas na mesma temperatura, porém por apenas oito semanas, conservaram 91% da atividade com a mesma concentração de glicerol (Rodríguez-Fernández, 2009).

Da mesma forma, a adição de sais, como o KCl em formulações enzimáticas, apresenta efeito de competição com as proteínas pela água do meio. Isto resulta em aumento nas forças de interação entre as regiões hidrofóbicas das moléculas de enzima, levando também à compressão da estrutura e tornando-a mais resistente a reações de desconformação (European Commission, 2002; Yancey, 2005; Iyer & Ananthanarayan, 2008). Plaza *et al.* (2008) observaram que a adição de cloreto de sódio e cloreto de cálcio

apresentaram resultados distintos na termoestabilidade de pectinametilesterase. O primeiro apresentou aumento na termoestabilidade em temperaturas acima de 60°C, enquanto o segundo não apresentou termo proteção na mesma temperatura.

A empresa Novozymes®, a maior fabricante mundial de enzimas, apresenta nas suas preparações pectinolíticas, como estabilizante, o glicerol e o cloreto de potássio, indicando, também, as temperaturas de estocagem entre 0 e 10°C. Conforme este fabricante, tempos prolongados de estocagem ou condições adversas de alta temperatura podem acarretar em perda de atividade do produto.

Entre os referenciais analisados, foi constatado que todas as etapas de obtenção do produto enzimático são importantes para maximizar o ganho de atividade. O estudo dos parâmetros do processo de produção e extração das enzimas possibilita que um extrato com maior atividade seja obtido, favorecendo a etapa de concentração. Além disso, o estudo da formulação da preparação enzimática permite a conservação da atividade por longos períodos de estocagem, garantindo a eficiência durante a aplicação no processamento de sucos de frutas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste item são apresentados os métodos referentes à produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* obtidas em biorreator de tambor rotativo. O fluxograma mostrado na Figura 8 apresenta as etapas referentes à realização deste trabalho.

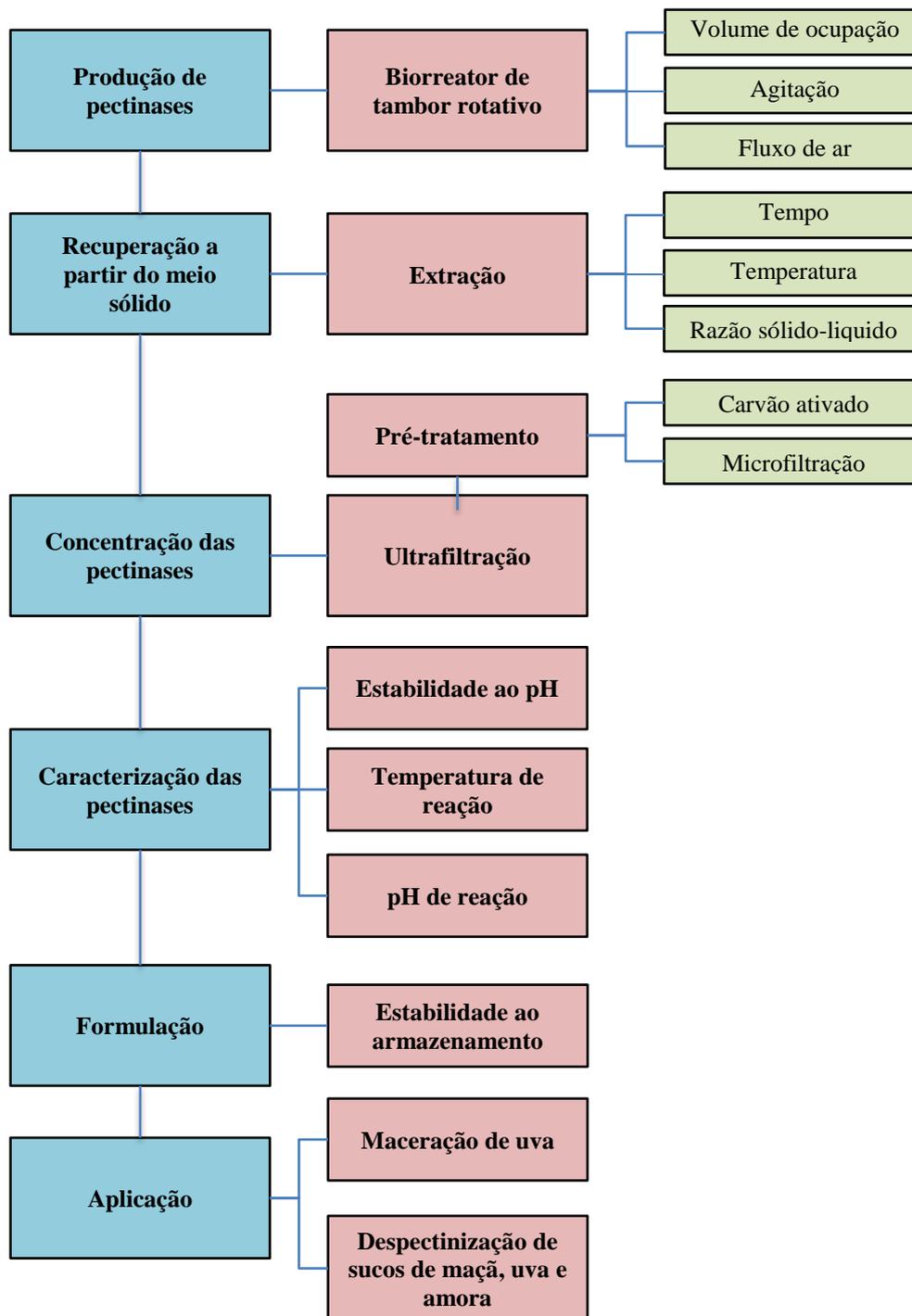


Figura 8 – Fluxograma das etapas de produção, recuperação, concentração e avaliação das enzimas obtidas em biorreator de tambor rotativo realizadas neste trabalho.

3.1 Microrganismo

Aspergillus niger LB-02-SF, linhagem isolada no trabalho de Sandri *et al.* (2013) e pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul, foi utilizada para a produção do complexo pectinolítico neste trabalho.

A cultura foi mantida a 4°C em meio glicerinado (Maiorano, 1982), sendo este meio também usado para a propagação da cultura.

3.2 Meio de conservação e propagação do microrganismo

O meio utilizado para conservação e propagação do microrganismo descrito por Maiorano (1982) apresenta a seguinte composição (g/L):

glicose	25,0
glicerina	25,0
extrato de levedura	5,0
agar-agar	20,0

A mistura foi esterilizada a 121°C por 15 minutos e então distribuída em placas de Petri previamente esterilizadas.

3.3 Meio para cultivo submerso

Para os cultivos submersos, foi utilizado o meio descrito por Malvessi (2000) (g/L):

glicose	22,0
peptona	13,0
extrato de levedura	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	10,0
MgSO ₄	0,5
KH ₂ PO ₄	2,5
FeSO ₄ .H ₂ O	6,3 x 10 ⁻⁵
ZnSO ₄	6,3 x 10 ⁻⁵
MnSO ₄	6,3 x 10 ⁻⁶

3.4 Meio para cultivo em estado sólido

O meio utilizado no cultivo sólido foi o descrito previamente por Fontana *et al.* (2005), com a seguinte composição (g):

farelo de trigo	36,6
pectina cítrica	6,0
glicose	10,0
solução salina	30,5

A formulação da solução salina foi composta por (g/L):

(NH ₄) ₂ SO ₄	4,0
MgSO ₄	1,0
KH ₂ PO ₄	2,0
FeSO ₄ .H ₂ O	6,3 x 10 ⁻⁴
ZnSO ₄	6,2 x 10 ⁻⁴
MnSO ₄	1,0 x 10 ⁻⁵

Para completar 100g de meio, água destilada e o volume adequado da suspensão de inóculo foram adicionados.

3.5 Preparo de inóculos

O microrganismo foi propagado em placas de Petri, mantidas a 30°C até completa esporulação. Após raspagem e suspensão em água, a concentração de esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. O meio de cultivo foi então inoculado com um volume de suspensão de esporos correspondente a 10⁷ esporos/100 gramas de meio sólido, e para os cultivos líquidos, 10⁵ esporos/mL de meio líquido (Fontana, 2004)

3.6 Ensaio em meio líquido

Frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 200 mL de meio de cultivo, previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos, foram inoculados com suspensão de esporos de *A. niger* em câmara de fluxo laminar e cobertos com uma fina camada de gaze. Os cultivos foram conduzidos a 28°C (Fontana, 2004), com agitação recíproca de 200 rpm, em agitador CERTOMAT U/H (B. BRAUN BIOTECH, Alemanha).

No término do cultivo (54h), as amostras foram centrifugadas a 5836 x g por 10 minutos em centrífuga SIGMA (modelo 4-15, Alemanha). As amostras foram lavadas, e em seguida, colocadas em estufa a 50°C até peso constante para posterior análise do teor de N-acetilglicosamina.

3.7 Ensaios em meio sólido

3.7.1 Cultivo em frascos

Frascos Bécher de 800 mL, contendo o meio sólido foram esterilizados a 121°C por 15 minutos e inoculados com suspensão de esporos de *A. niger* completando 100 g de meio em cada frasco. A homogeneização do meio de cultivo, após a inoculação, foi realizada por revolvimento manual do leito em recipiente aberto no interior da câmara de fluxo laminar esterilizada. Os frascos foram cobertos com uma fina camada de gaze esterilizada e mantidos em estufa a 30°C em atmosfera saturada em umidade por 96 horas.

Esse sistema de produção foi realizado para quantificação de biomassa pelos métodos de N-acetilglicosamina e demanda de oxigênio.

3.7.2 Cultivo em bandejas

O cultivo em estado sólido utilizando bandejas também foi realizado para produção do extrato enzimático a ser usado nos ensaios de concentração. Cada bandeja com 36 cm de comprimento, 23 cm de largura e 7 cm de altura, foi tratada assepticamente com solução de hipoclorito de sódio e preenchida com 1460 g de meio úmido na mesma composição descrita anteriormente. A espessura do leito de meio foi de 4 cm. Após a inoculação, as bandejas foram cobertas com uma fina camada de gaze esterilizada e mantidas em estufa a 30°C com atmosfera saturada em umidade por 96 horas.

3.7.3 Cultivo em biorreator de tambor rotativo

O meio sólido foi esterilizado nas condições descritas anteriormente e inoculado com a suspensão de esporos de *A. niger*. O meio sólido homogeneizado foi introduzido no biorreator, o qual é descrito a seguir, bem como as condições em que a produção de pectinases foi estudada no biorreator.

3.7.3.1 Biorreator de tambor rotativo: aparato experimental

Os cultivos em estado sólido para obtenção de pectinases foram realizados em biorreator de tambor rotativo, desenhado pela equipe do Laboratório de Bioprocessos e construído na Oficina de Vidros e Laboratório de Tecnologia e Pesquisa da UCS (Polidoro *et al.*, 2009, Polidoro, 2009). Este sistema (Figura 9) é constituído de um tubo cilíndrico de acrílico com 6 L (139 mm de diâmetro x 400 mm de comprimento), com tampas de nylon em suas extremidades, apoiado horizontalmente sobre um suporte provido de roletes, que permite a rotação do tambor em diferentes frequências e períodos. O sistema inclui, ainda, instrumentos acoplados para a medição de temperatura, fluxo de ar e fração de oxigênio nos gases efluentes, além de um dispositivo na tampa do reator para coleta asséptica de amostras, a qual foi realizada a cada 24 horas.

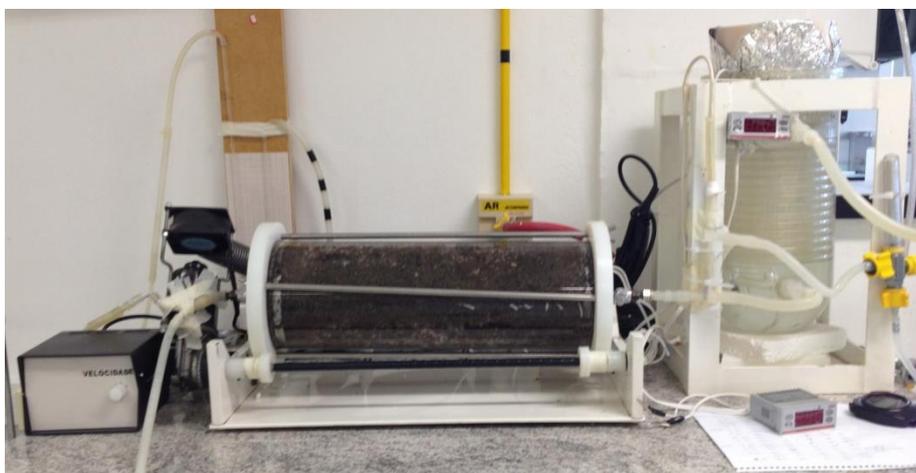


Figura 9 – Biorreator de tambor rotativo utilizado na produção de pectinases.

Na Figura 10, as setas indicam o sentido do fluxo gasoso. O ar comprimido (01) passa inicialmente por um filtro (02), em seguida por uma válvula estabilizadora de pressão (03), na sequência por um medidor de vazão tipo rotâmetro (04) para então ser umidificado por uma coluna de água recheada de anéis de Raschig de vidro (05). Após a umidificação, o ar é aquecido por uma serpentina imersa em banho termostatzado (06). A temperatura de entrada do ar no biorreator é medida por um termopar (06-1) conectado a um sistema de controle de temperatura (06-2). O ar injetado no interior do tambor rotativo (07) é distribuído por um difusor linear perpendicular ao eixo central do reator. Através de um termopar instalado nas chicanas do reator, é possível medir-se a temperatura do meio de cultivo. A temperatura externa do tambor rotativo é mantida constante pelo controlador (07-2) que recebe sinal do termopar (07-1) e aciona ora o ventilador aquecido (07-3), ora a

bomba (07-6). O acionamento do ventilador eleva a temperatura no interior da câmara isolada que envolve o tambor rotativo e a bomba alimenta o aspersor (07-4) com água contida no reservatório (07-5), reduzindo a temperatura da parede do tambor por condução. Uma válvula estabilizadora de pressão (08) na saída do sistema garante pressão positiva no interior do tambor rotativo, prevenindo contaminações. O gás efluente do sistema, após a passagem pela válvula estabilizadora de pressão, atravessa uma coluna de sílica (09) para remoção de umidade. Na sequência, o fluxo de gás atinge um eletrodo polarográfico conectado a um oxímetro (DIGIMED, Brasil) (10) que registra a fração molar de oxigênio no gás efluente do sistema. A agitação do biorreator é realizada por um motor de corrente contínua com velocidade de rotação variável.

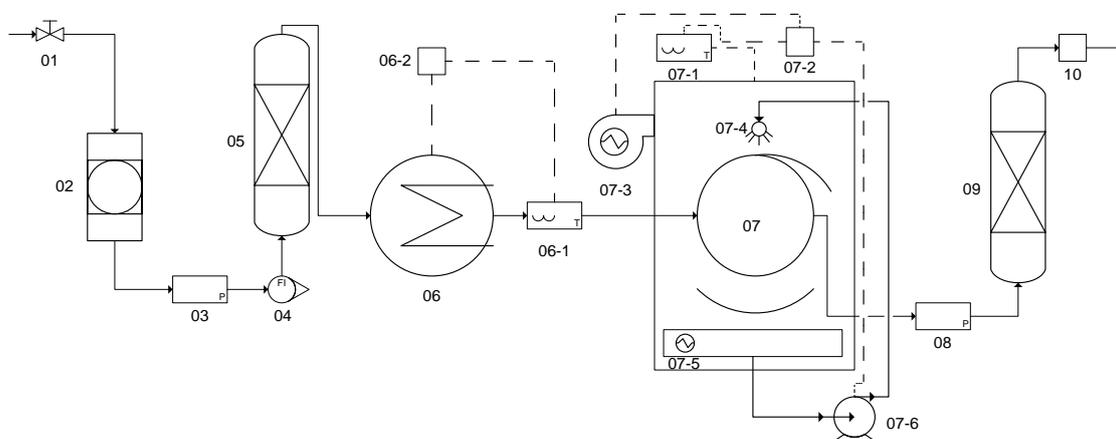


Figura 10 – Esquema do biorreator de tambor rotativo e os sistemas de controle. 01 – válvula reguladora de vazão de ar; 02 – filtro; 03 – válvula reguladora de pressão; 04 – fluxímetro; 05 – coluna de água; 06 – banho termostaticado; 06-1 – termopar; 06-2 – sistema de controle de temperatura do ar; 07 – biorreator de tambor rotativo; 07-1 – termopar dentro do biorreator; 07-2 – sistema de leitura da temperatura do meio de cultivo; 07-3 – ventilador aquecido; 07-4 – aspersor de água; 07-5 – reservatório de água; 07-6 - bomba de circulação de água; 08 - válvula reguladora de pressão; 09 – coluna de sílica; 10 – oxímetro.

3.7.3.2 Condições de operação do biorreator de tambor rotativo na produção de pectinases

As condições de operação do biorreator de tambor rotativo nos ensaios de produção de pectinases são descritas no Quadro 7.

Quadro 7 – Descrição das condições de operação do biorreator para cada ensaio realizado.

Ensaio	Condições de operação do biorreator
Biorreator sem agitação	0,54 LkgM volume de ocupação de 30, 50 e 70%
Biorreator com agitação	0,54 LkgM 30, 50 e 70% de volume de ocupação 1rpm por 5 minutos a cada 120 minutos
Intervalos entre as agitações do biorreator (a cada 120, 90 e 60 minutos)	0,54 LkgM 70% de volume de ocupação 1rpm por 5 minutos
Controle de temperatura do cultivo (34°C)	0,54 LkgM 30% de volume de ocupação sem agitação 50% de volume de ocupação com agitação (1rpm por 5 minutos a cada 120 minutos)
Fluxo específico de ar (0,18, 0,36, 0,54, 0,72 e 0,90 LkgM)	30 e 50% de volume de ocupação 1rpm por 5 minutos a cada 120 minutos

Ensaio sem e com agitação do biorreator (1 rpm por 5 minutos a cada 120 minutos) foram realizados com fluxo específico de ar de 0,54 litros de ar por quilograma de meio por minuto (LkgM). No decorrer do texto, a expressão LkgM foi adotada para simplificar a unidade de fluxo específico. Os cultivos foram realizados no biorreator utilizando massa de substrato úmido de 1100, 1800 e 2500 g correspondendo a uma ocupação média do volume útil do tambor rotativo de 30, 50 e 70%, respectivamente. Os intervalos entre as agitações de 60 e 90 minutos foram avaliados e comparados com o intervalo de 120 min para ensaios realizados na condição de 70% de volume de ocupação.

A intensidade de ar utilizada foi variada para os valores de fluxo específico de ar em 0,18, 0,36, 0,54, 0,72, e 0,90 LkgM. Para todos os ensaios acima, o reator foi aerado com ar úmido a 30°C nas primeiras 24 h e, após este período, controlado em 25°C. A temperatura externa na câmara termostatizada disposta sobre o biorreator foi mantida a 30°C.

Ensaio com controle de temperatura do meio de cultivo em torno de 34°C foi realizado usando um aspersor de água para resfriar a parede do biorreator. Água foi mantida em um reservatório com sistema de resfriamento. A temperatura do meio foi medida por termopares instalados no interior do biorreator posicionados a uma altura de 3 cm da base.

Os ensaios em biorreator foram realizados em duplicata para cada condição testada.

3.8 Parâmetros cinéticos e estequiométricos do bioprocesso

3.8.1 Determinação da velocidade de crescimento celular

As velocidades específicas de crescimento (μ_x) foram calculadas a partir dos valores de biomassa fúngica (X), determinadas pelo método de N-acetilglicosamina, e da derivada da curva desses valores, determinados durante o cultivo em frascos para amostras coletadas a cada 6 horas até 96 horas de cultivo, conforme a Equação 1 (Schmidell *et al.*, 2001):

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

Onde:

μ_x – velocidade específica de crescimento (h^{-1});

X – concentração de biomassa fúngica (mg/g);

t – tempo de cultivo.

Para o caso particular da determinação da máxima velocidade específica de crescimento ($\mu_{x,max}$) em cultivos em biorreator, fez a regressão linear do trecho correspondente à fase exponencial da curva $\ln X = f(t)$, sendo o coeficiente angular da reta obtida o próprio valor de $\mu_{x,max}$.

3.8.2 Determinação dos fatores de conversão

Os fatores de conversão, calculados conforme descrito por Schmidell *et al.* (2001), são descritos a seguir.

O fator de produção específica relaciona a atividade enzimática produzida pela biomassa conforme a Equação 2:

$$Y_{P/X} = \frac{P_{max}}{X_{max}} \quad (2)$$

Onde:

$Y_{P/X}$ – fator de produção específica (U/mg);

P_{max} – máxima atividade enzimática obtida no processo (U/g);

X_{max} – máxima concentração de biomassa fúngica obtida no processo (mg/g).

O fator de conversão de substrato em produto relaciona a produção de enzimas com o consumo de substrato conforme a Equação 3:

$$Y_{P/S} = \frac{P_{max}}{S_o - S_f} \quad (3)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em enzimas (U/mg);

P_{max} – máxima atividade enzimática obtida no processo (U/g);

S_o – concentração inicial de substrato (mg/g);

S_f – concentração de substrato no tempo de máxima atividade enzimática (mg/g).

O fator de conversão de substrato em biomassa fúngica relaciona a produção de biomassa com o consumo de substrato conforme a Equação 4:

$$Y_{X/S} = \frac{X_{max}}{S_o - S_f} \quad (4)$$

Onde:

$Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em biomassa fúngica (mg/mg);

S_f – concentração de substrato no tempo de máxima concentração celular (mg/g).

3.8.3 Cálculo da biomassa em cultivo em estado sólido a partir do teor de N-acetilglicosamina

A determinação da biomassa das amostras cultivadas em frascos foram submetidas à análise do teor de N-acetilglicosamina (NAG) (Aidoo *et al.*, 1981) e os valores foram divididos pela concentração de NAG obtida na parede celular do fungo cultivado em meio líquido. A Equação 5 foi utilizada para determinação da biomassa por grama de meio seco:

$$X = \frac{NAG_{CES}}{NAG_{CSbm}} \cdot R_h \quad (5)$$

Onde:

X – concentração de biomassa fúngica (mg/g meio seco);

NAG_{CES} e NAG_{Sbm} – concentrações de N-acetilglicosamina medidas nas amostra de cultivo sólido (mg Nag/mL) e submerso (mg Nag/mg biomassa)

R_h – razão líquido/sólido em que a hidrólise foi realizada (mL/g).

3.8.4 Demanda de oxigênio pelo cultivo

A determinação da demanda de oxigênio (OUR) pelo cultivo, descrita no trabalho de Polidoro (2009), foi realizada conforme Schmidel *et al.* (2001). Na execução da técnica, descrita por Fontana (2004), os frascos Bécher foram retirados da estufa de incubação e

imediatamente colocados em banho à mesma temperatura. Ao reator foi acoplada uma rolha à qual encontrava-se um tubo plástico através do qual os gases presentes no espaço vazio puderam ser circulados com o auxílio de uma bomba peristáltica, em circuito fechado, retornando ao reator. Em um ponto do circuito, foi colocado o eletrodo polarográfico do oxímetro, previamente calibrado nas condições de temperatura, pressão e umidade do ambiente. Assim, à medida que o oxigênio foi convertido em gás carbônico, devido à respiração do fungo, valores decrescentes de pressão parcial de oxigênio foram medidos. O fluxo de ar que entrou no sistema foi medido em L/h e convertido para mol/h conforme a Equação 6:

$$F_n = \frac{P \cdot F_v}{RT} \quad (6)$$

Onde:

F_n – vazão de ar em base molar (mol/h);

P – pressão parcial do sistema;

F_v – vazão volumétrica dos gases (L/h)

R – constante dos gases (0,082 atm L /mol K);

T – temperatura (K).

A partir da fração de oxigênio no ar (y_{O_2} no ar = 0,209), foi calculada a vazão molar de O_2 na entrada do sistema conforme a Equação 7:

$$F_{O_{2,e}} = F_n \cdot Y_{O_{2,e}} \quad (7)$$

Onde:

$F_{O_{2,e}}$ – Vazão em base molar de oxigênio na entrada do biorreator (mol/h);

F_n – vazão de ar em base molar (mol/h);

$y_{O_{2,e}}$ – fração molar de oxigênio no ar.

O quociente respiratório para o cultivo foi considerado igual a 1, ou seja, para cada 1 mol de O_2 consumido foi produzido 1 mol de CO_2 . Com isso, considerou-se que a vazão de entrada no biorreator era igual à vazão de saída e determinou-se a vazão de saída em base molar de oxigênio conforme a Equação 8:

$$F_{O_{2,s}} = F_n \cdot Y_{O_{2,s}} \quad (8)$$

Onde:

$F_{O_{2,s}}$ – vazão em base molar de oxigênio na saída do biorreator (mol/h);

F_n – vazão de ar em base molar (mol/h);

$y_{O_{2,s}}$ – fração molar de oxigênio no ar de saída do biorreator.

A partir dos dados obtidos, calculou-se a demanda de oxigênio (OUR) pelo cultivo ao longo dos ensaios fermentativos conforme a Equação 9:

$$OUR = \frac{F_{O_{2,e}} - F_{O_{2,s}}}{M} \times 1000 \quad (9)$$

Onde:

OUR – demanda de oxigênio pelo cultivo (mmol/g/h);

$F_{O_{2,e}}$ – vazão em base molar de oxigênio na entrada do biorreator (mol/h);

$F_{O_{2,s}}$ – vazão em base molar de oxigênio na saída do biorreator (mol/h);

M – massa de meio seco no interior do biorreator (g).

3.8.5 Determinação dos parâmetros de respiração

O fator de conversão de oxigênio em células (Y_{GO}) e o coeficiente de manutenção celular para o oxigênio (m_o) foram determinados a partir do gráfico que relaciona a velocidade específica de respiração (QO_2) e a velocidade específica de crescimento (μ_x), sendo QO_2 a razão entre OUR e a biomassa medida por NAG (Equação 10) e μ_x corresponde a derivada dos valores de biomassa (Equação 1).

$$QO_2 = \frac{OUR}{X} \quad (10)$$

Onde:

OUR – demanda de oxigênio;

X – concentração de biomassa fúngica.

3.8.6 Estimativa da concentração celular a partir de parâmetros respiratórios

A estimativa das concentrações celulares obtidas em ensaios em biorreator de tambor rotativo foi realizada de maneira indireta a partir dos dados de balanço de oxigênio, conforme Nagai (1979) (Equação 11):

$$OUR = \frac{1}{Y_{GO}} \cdot \frac{dx}{dt} + m_o \cdot X \quad (11)$$

Onde:

OUR – demanda de O_2 pelo cultivo (mmol/g/h);

Y_{GO} – fator de conversão de oxigênio em células (g/mmol);
 dx/dt – velocidade instantânea de crescimento (g/g/h);
 m_o – coeficiente de manutenção celular para o oxigênio (mmol/g/h);
 X – concentração de biomassa fúngica (g/g).

A integração da Equação 12 leva a nova expressão, de acordo com o método proposto por Zambriskie & Humphrey (1978) e adaptado por Maiorano (1990).

$$X_n = \frac{Y_{GO} \left(\frac{\Delta t}{2} \right) (OUR_n + OUR_{n-1}) + \left[1 - m_o \cdot Y_{GO} \left(\frac{\Delta t}{2} \right) \right] X_{n-1}}{1 + m_o \cdot Y_{GO} \left(\frac{\Delta t}{2} \right)} \quad (12)$$

Onde:

X_n – concentração de biomassa fúngica no final do intervalo de tempo considerado (g/g);
 Y_{GO} – fator de conversão de oxigênio em células (g/mmol);
 Δt – intervalo de tempo entre duas medições (h);
 OUR_n – demanda de O_2 no final do intervalo de tempo considerado (mmol/g/h);
 OUR_{n-1} – demanda de O_2 no início do intervalo de tempo considerado (mmol/g/h);
 m_o – coeficiente de manutenção celular para o oxigênio (mmol/g/h);
 X_{n-1} – concentração de biomassa fúngica no início do intervalo de tempo considerado (g/g).

Na estimativa do crescimento, o primeiro valor da concentração celular foi considerado nulo.

3.9 Extração de compostos solúveis do meio sólido

A extração das enzimas do meio sólido foi realizada utilizando-se água, acidificada com ácido clorídrico até pH 4, como solvente. As seguintes condições de extração foram estudadas: tempo, temperatura e razão sólido/líquido (S/L). A Figura 11 ilustra as faixas de condições testadas. As razões S/L foram avaliadas em base seca utilizando sempre a mesma quantidade de solvente (30 mL) e variando a massa de meio. A extração das enzimas foi realizada pela suspensão do meio sólido no solvente, em frascos Erlenmeyer de 250 mL submetidos à agitação recíproca de 200 rpm em agitador B. BRAUN BIOTECH (modelo CERTOMAT U/H, Alemanha). As suspensões obtidas foram centrifugadas em centrífuga (SIGMA, modelo 4-15, Alemanha) a 5836 g por 10 minutos e o sobrenadante coletado foi mantido a 4°C para posterior análises.

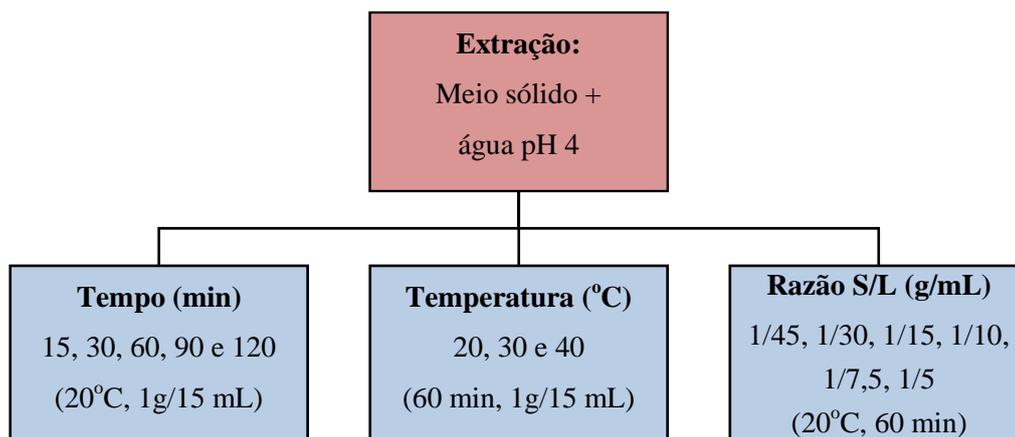


Figura 11 – Condições de tempo, temperatura e razão sólido/líquido na extração de pectinases produzidas por cultivo em estado sólido.

3.10 Concentração do extrato pectinolítico

Para a concentração do extrato pectinolítico produzido por *A. niger* em estado sólido por ultrafiltração, foram propostos três protocolos para avaliar a influência das etapas realizadas: pré-tratamento com carvão ativado (CA), microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF). A Figura 12 destaca as etapas realizadas em cada protocolo. As etapas são descritas a seguir.

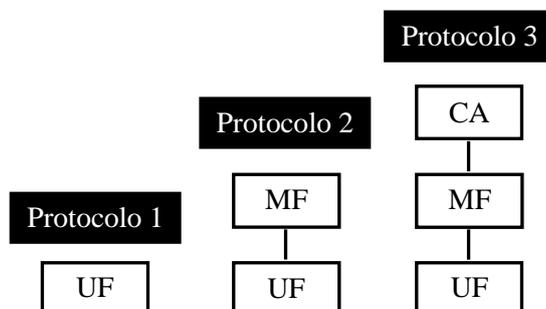


Figura 12 – Protocolos propostos para a etapa de concentração do extrato pectinolítico obtido por cultivo em estado sólido. CA – carvão ativado; MF – microfiltração e UF – ultrafiltração.

3.10.1 Pré-tratamento do caldo enzimático com carvão ativado

Carvão ativado em pó (ECIBRA, Brasil), com granulometria menor que 325 mesh, foi utilizado em diferentes concentrações para avaliar a eficiência na remoção de compostos de cor e possíveis sólidos suspensos. As concentrações de carvão ativado

utilizadas foram de 1, 5, 10, 20, 40 e 60 g/L. O extrato foi mantido em contato com o carvão por um período de 30 min sob agitação orbital de 100 rpm à temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$). Após, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado para posterior análise.

3.10.2 Microfiltração do caldo enzimático

O caldo enzimático, pré tratado ou não com o carvão ativado, foi submetido a microfiltração (MF) para remoção de materiais particulados. Para isso, foi utilizado um cartucho filtrante de membrana polimérica (poliimida) na configuração de fibras ocas (PAM Membranas, Brasil) com área permeante de $0,2\text{ m}^2$ e tamanho de poro de $0,4\text{ }\mu\text{m}$, operado em fluxo tangencial (Figura 13). A bomba de diafragma da marca Shurflo (México) foi utilizada para escoamento do caldo enzimático. Os experimentos de MF foram realizados à temperatura de 20°C e pressão de 1 bar com recirculação da corrente do concentrado para o tanque de alimentação.

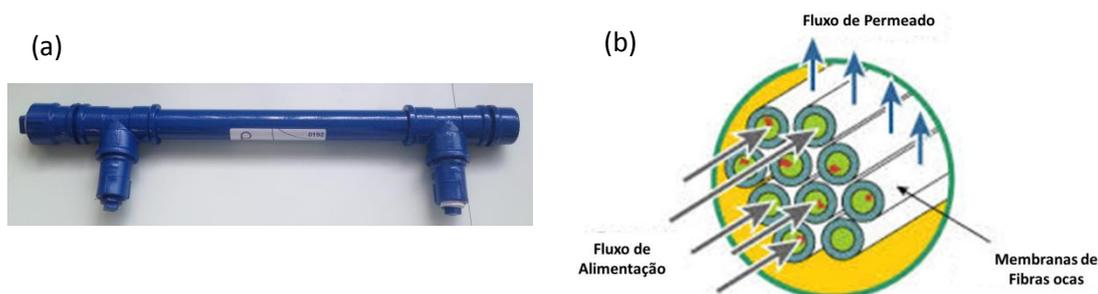


Figura 13 – Cartucho filtrante de microfiltração (a) e configuração do modo de operação da membrana de fibra oca (b).

3.10.3 Concentração do caldo enzimático por ultrafiltração

O processo de ultrafiltração (UF) para concentração do extrato enzimático foi realizado utilizando cartucho filtrante de módulo espiral de polietersulfona (MILLIPORE, EUA) com área de $0,1\text{ m}^2$ e ponto de corte molecular de 10 kDa (Figura 14). Os experimentos de UF foram realizados na faixa de temperatura de 20°C e pressão de trabalho de 2,5 bar com recirculação da corrente do concentrado para o tanque de alimentação utilizando a bomba de diafragma da marca Shurflo (México).

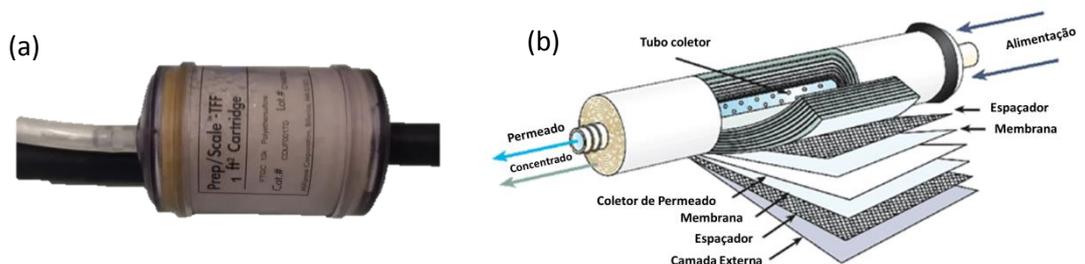


Figura 14 – Cartucho filtrante de ultrafiltração (a) e configuração do modo de operação da membrana em espiral (b).

As equações abaixo (Cheryan, 1998) foram utilizadas para descrever o grau de separação e concentração de soluções para o processo de UF.

O fator de concentração volumétrico (FCV) durante a concentração da solução enzimática foi determinado como a relação entre o volume da alimentação no início da operação e o volume do concentrado ao final do processo conforme a Equação 13:

$$FCV = \frac{V_f}{V_c} \quad (13)$$

O fator de concentração de atividade enzimática foi calculado dividindo o valor de atividade no concentrado pelo valor da atividade inicial conforme a Equação 14:

$$FC = \frac{A_c}{A_f} \quad (14)$$

A eficiência de recuperação foi calculada como a relação entre a atividade enzimática total do concentrado e a atividade enzimática no início da operação conforme a Equação 15:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{A_c \times V_c}{A_f \times V_f} \right) \quad (15)$$

Onde:

V_f – volume de alimentação (mL);

V_c – volume de concentrado (mL);

A_f – atividade no caldo de alimentação (U/mL);

A_c – atividade no caldo concentrado (U/mL).

A atividade específica (U/mg) no concentrado e no caldo bruto (Equação 16) foi calculada e utilizada para o cálculo do fator de purificação conforme a Equação (17):

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{Atividade enzimática}}{\text{Concentração de proteína}} \quad (16)$$

$$\text{Fator de purificação} = \frac{\text{Atividade específica no concentrado}}{\text{Atividade específica no caldo bruto}} \quad (17)$$

A limpeza química com NaOH (0,1M) a 45 °C por 1 hora foi realizada para ambas as membranas (MF e UF) para recuperação do fluxo.

3.10.4 Análise de fluxo de permeado

As membranas de MF e UF foram compactadas durante 3 horas nas pressões de 1,5 e 3 bar, respectivamente. Após, a pressão foi reduzida para a pressão de operação (2,5 bar) e o fluxo de água (J_{w1}) foi calculado conforme Equação 18:

$$J = \frac{V}{A \Delta t} \quad (18)$$

Onde:

J – fluxo de permeado (L/m²h);

V – volume de permeado (L);

A – área da membrana (m²);

Δt – tempo de permeação (h).

Após, a solução enzimática foi filtrada e o fluxo J_{SE} foi medido. Finalmente, a membrana foi enxaguada por 30 minutos em água corrente e o fluxo de água pura (J_{w2}) foi novamente medido. A razão entre J_{w2}/J_{w1} (Equação 19) representa o desempenho em termos de recuperação de fluxo após o enxágue (Meng *et al.*, 2014).

$$R_F = \frac{J_{w2}}{J_{w1}} \times 100 \quad (19)$$

3.11 Caracterização do extrato pectinolítico

3.11.1 Estabilidade do extrato enzimático a diferentes valores de pH

O extrato enzimático foi diluído em tampão acetato-fosfato (McIlvaine) com diferentes valores de pH entre 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e mantido sob refrigeração (7°C) por até 96 horas. Uma alíquota da amostra foi utilizada para análise de pectinases totais. O

resultado foi mostrado como atividade relativa em cada pH, calculada pelo valor da atividade de pectinases totais do extrato antes e após a incubação.

3.11.2 Temperatura e pH de reação

As atividades catalíticas das enzimas pectinases totais, exo-poligalacturonase, pectina liase, xilanase, celulasas e amilase foram medidas em diferentes temperaturas de reação (20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C), fixando as demais condições padronizadas para cada análise.

O pH de reação para as mesmas enzimas citadas acima, com exceção da xilanase foi avaliado para os valores de 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, utilizando tampão acetato-fosfato (McIlvaine), fixando as demais condições padronizadas para cada análise.

3.12 Formulação das preparações enzimáticas e estudo da conservação da atividade

Formulações com diferentes concentrações de glicerol (20, 30, 40 e 50% m/m) e 2% (m/m) de cloreto de potássio (KCl) foram preparadas e armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$).

Com uma frequência média de 15 dias, uma alíquota das amostras foi submetida à análise da atividade enzimática de pectinases totais para avaliar a conservação da atividade durante o período de 59 semanas.

3.12.1 Termoestabilidade das formulações enzimáticas

As formulações enzimáticas foram submetidas a ensaio de termoestabilidade, sendo mantidas sob as temperaturas de: 20, 30, 40, 50 e 60°C por até 180 minutos. As atividades relativas, após exposição das formulações a cada condição testada, foram comparadas com as atividades iniciais a fim de determinar-se o grau de termoestabilidade.

3.13 Uso das preparações enzimáticas no tratamento de sucos de frutas

A formulação enzimática com 50% de glicerol foi testada na etapa de maceração de uva bordô (*Vitis labrusca*) e clarificação de sucos de amora-preta (*Rubus* spp), uva rosada Isabel (*Vitis labrusca*) e suco de maçã Gala (*Malus domestica*). As frutas foram adquiridas no mercado local e higienizadas com água.

A dosagem de enzima foi determinada segundo a ficha técnica da enzima comercial Novozym 33095 e adotada como padrão para o extrato experimental. A dosagem indicada é de 100 mL para 1000 kg de fruta, ou 10 µL para 100 g de fruta. Através da análise de atividade de pectinases totais, sabe-se que estão presentes 2500 U em 1 mL de solução enzimática, portanto em 10 µL têm-se 25 U de enzima. As enzimas comerciais Novozym 33095 e Pectinex Ultra SP-L foram usadas nos mesmos ensaios para fins de comparação com a o extrato experimental.

Nos testes de maceração, 100 g de uvas foram acondicionadas em sacos plásticos e levemente esmagadas com auxílio de um rolo para facilitar a ação das enzimas. As frutas foram acondicionadas em uma banho termostatizado e a enzima adicionada no volume correspondente a 25 U de enzima para cada 100 g. A reação foi mantida a 45°C por 45 minutos. Após esse período, a enzima foi inativada submetendo as amostras a um banho de 100°C por 1 minuto (Zielinski *et al.*, 2014). As uvas foram prensadas manualmente e o suco obtido foi centrifugado a 5836 x g por 10 minutos para análises.

Na clarificação, após a higienização das frutas, o suco foi obtido com auxílio de um processador de alimentos. As amostras foram acondicionadas em tubos e a mesma dosagem citada acima foi adicionada, porém considerando 25 U de enzima para cada 100 g de suco. As amostras foram mantidas por 45 min a temperatura de 45°C no caso dos sucos de amora e uva rosada e 35°C no caso do suco de maçã. Após o tempo de incubação ser completado, as amostras foram aquecidas a 100°C por 60 segundos para inativação das enzimas e centrifugadas para realização das análises.

Os testes de maceração e clarificação foram realizados em triplicata.

Os sucos tratados com a formulação experimental foram comparados com as enzimas comerciais quanto ao aumento de clarificação (Equação 20), redução de viscosidade (Equação 21), redução de turbidez (Equação 22) e teor de polifenóis.

$$\text{Clarificação (\%)} = \frac{\text{IC do suco controle} - \text{IC do suco tratado}}{\text{IC do suco controle}} \times 100 \quad (20)$$

Onde:

IC – intensidade de cor medida em espectrofotômetro.

$$\text{Redução de turbidez (\%)} = \frac{\text{turbidez do suco controle} - \text{turbidez do suco tratado}}{\text{turbidez do suco controle}} \times 100 \quad (21)$$

$$\text{Redução de viscosidade (\%)} = \frac{\text{visc do suco controle} - \text{visc do suco tratado}}{\text{visc do suco controle}} \times 100 \quad (22)$$

3.14 Metodologia Analítica

3.14.1 Determinação do teor de N-acetilglicosamina

Para determinação do teor de N-acetilglicosamina (NAG) presente na parede celular do microrganismo foi utilizado o método descrito por Aidoo *et al.* (1981).

Primeiramente, as amostras sofreram hidrólise ácida. Para amostras de CSm foram utilizadas 0,1 g de biomassa seca em 1 mL de HCl concentrado e para CES foi utilizado 0,5 g de meio seco em 5 mL de HCl concentrado. As amostras foram mantidas em banho a 100°C por 2 horas. Após, as amostras foram centrifugadas e a 1 mL do sobrenadante foi adicionado 2 gotas de fenolftaleína (0,5% v/v) e então, tituladas com NaOH 3M. Após obter uma solução de cor rosada, a titulação reversa com KHSO₄ 1% foi realizada até a solução perder a cor sendo o volume completado para 25 mL.

Para determinação do teor de NAG, 1 mL da solução resultante da hidrólise foi misturado a 1 mL do reagente acetilacetona. A mistura foi mantida a 100°C por 20 minutos. Após resfriamento, 6 mL de etanol e 1 mL do reagente Erhlick foram adicionados à solução. A nova solução foi aquecida a 65°C por 10 minutos e os valores de absorvância foram medidos contra um branco, a 530 nm, em espectrofotômetro (PG Instruments, EUA).

O reagente acetilacetona foi preparado pela mistura de 1 mL de acetilacetona em 50 mL de solução de carbonato de sódio 0,5 M. O reagente Erhlick foi preparado dissolvendo 2,7 g de dimetilaminobenzaldeído em 100 mL de uma mistura 1:1 (v/v) de etanol e ácido clorídrico concentrados.

Os valores de NAG foram calculados a partir de uma curva de calibração com solução de NAG comercial variando de 0 a 0,5 mg/mL.

3.14.2 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

A concentração de substrato foi determinada pela medida de açúcares redutores totais em meio sólido descrito por Fontana (2004). Inicialmente, 0,7 g de meio úmido foi tratado com 10 mL de H₂SO₄ 1,5 M a 100°C por 30 minutos, afim de hidrolisar-se os carboidratos presentes na amostra. Após resfriamento, 3 gotas de fenolftaleína foram adicionadas e em seguida, a suspensão obtida foi neutralizada pela titulação com NaOH

4M e então tratadas com soluções de ferrocianeto de potássio (150 g/L) e sulfato cúprico (300 g/L) a fim de promover a desproteinização e clarificação. O material foi, então, filtrado e os açúcares redutores totais quantificados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). As concentrações de açúcares redutores presentes nas amostras foram determinados através de uma curva de calibração construída com soluções de glicose entre 100 e 1000 mg/L. A absorbância das amostras foram medidas em espectrofotômetro (PG Instrument, EUA) a 545 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicose por g de meio seco.

3.14.3 Determinação de umidade e pH do meio

Em tubos de ensaio, colocou-se 1 g da amostra, sendo os tubos postos em estufa, a 100°C, até peso constante. Após resfriadas em dessecador, as amostras foram pesadas e a umidade determinada.

Para a determinação do pH, foram utilizadas estas mesmas amostras, sendo adicionados a cada tubo 10 mL de água deionizada e após 10 minutos, os valores de pH foram medidos em pH-metro.

3.14.4 Determinação da atividade de pectinases totais

A atividade de pectinases totais foi determinada pela medida da redução de viscosidade de solução de pectina cítrica (CP KELCO S.A., Brasil) 0,5% (m/v) em viscosímetro Brookfield modelo LDV-II+, a 60 rpm e 30°C. A solução de pectina cítrica foi preparada pela dissolução de 0,5 g de pectina em 100 mL de tampão acetato-ácido acético 0,5 mol/L, pH 4.

Uma unidade de pectinases totais foi definida como a quantidade de enzima que causa a redução de 50% da viscosidade da solução, nas condições padrões, e expressa em unidades/grama de matéria seca (U/g) ou em U/mL.

Em alguns trabalhos encontrados na literatura (Fontana *et al.*, 2005, Heerd *et al.*, 2012), a atividade determinada por este método se refere à enzima endo-poligalacturonase (endo-PG). No presente trabalho, entretanto, optou-se por associar este método à atividade de pectinases totais, assim como feito por Maiorano (1990) e Sandri *et al.* (2011), visto que a redução de viscosidade de solução de pectina é resultado da atuação conjunta de algumas enzimas do complexo pectinolítico como pectina liase e endo-poligalacturonases.

3.14.5 Determinação da atividade de exo-poligalacturonase

A atividade de exo-poligalacturonase foi estimada pela quantificação de substâncias reductoras liberadas de solução de ácido poligalacturônico 0,25% (m/v) em tampão acetato 0,1 M pH 4, tendo ácido galacturônico como padrão pelo método de Somogyi (1952) já apresentado por Malvessi & Silveira (2004). As amostras foram medidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm e a atividade calculada através da curva de calibração construída com ácido galacturônico em concentrações entre 0 e 1 mg/mL. Uma unidade de exo-PG foi definida como a capacidade de liberar 1 umol de ácido galacturônico liberado por minuto por mL de extrato enzimático, nas condições da reação e expressa em unidades/grama de matéria seca (U/gms) ou U/mL.

3.14.6 Determinação da atividade da pectina liase

A determinação da atividade de pectina liase (PL) foi baseada no aumento da absorvância decorrente da formação de produtos urônicos 4,5 insaturados, conforme proposto por Albersheim (1966). O coeficiente de extinção molar dos produtos insaturados $\epsilon_{235} = 5550 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo de atividade $UA = (\Delta A / \epsilon_{235}) \cdot 10^6$ ($\mu\text{mol/mL/min}$), onde ΔA é a diferença de absorvância entre o controle e a amostra. A reação foi conduzida com 1 mL da enzima e 1 mL de pectina (0,5% m/v) previamente solubilizada em tampão citrato fosfato pH 5,5, incubadas em banho a temperatura de 40°C por 60 min. Após, 3,5 mL de ácido sulfúrico 0,5 M foram adicionados para paralisar a reação. O controle para cada amostra foi preparado com 1 mL da enzima, 3,5 mL de ácido sulfúrico e 1 mL de pectina nesta ordem, mantido sob as mesmas condições. As amostras foram medidas em espectrômetro em comprimento de onda de 235 nm.

3.14.7 Determinação da atividade da pectina metilesterase (PME)

A atividade de PME foi determinada por titulação dos grupos carboxílicos medida pela liberação de ácido, de acordo com o método descrito por Jen e Robinson (1984) e adaptado por Duvetter *et al.* (2005). Pectina cítrica a 0,35% (m/v) foi dissolvida em solução de NaCl 0,117 M e o pH ajustado em 4,5. A solução foi usada como substrato e a reação realizada à 30°C. Em 30 mL de solução de pectina cítrica foi adicionado 500 μL do extrato enzimático e a reação acompanhada por 30 minutos. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a capacidade da enzima de catalisar a desmetilação da pectina correspondente a 1 μmol de NaOH por minuto, sob as condições do ensaio.

3.14.8 Determinação da atividade de endo-glicanase

A atividade de endo-glicanase foi medida utilizando carboximetilcelulose (2% m/v) em tampão citrato 0,05 M pH 4,8 como substrato (Ghose, 1987). A mistura de reação (50 µl de enzima + 50 µl de substrato) foi incubada a 50°C por 30 minutos. Após, 300 µl do reagente ácido dinitro-salicílico (DNS) foram adicionados e as amostras fervidas por 5 minutos. A atividade foi assumida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

3.14.9. Determinação da atividade de β-glicosidase

A atividade de β-glicosidase foi medida usando salicina 1% (m/v) em tampão citrato 0,05 M pH 4,8 como substrato (Chahal, 1985). A mistura de reação (50 µl de enzima + 50 µl de substrato) foi incubada a 50°C por 30 minutos. Após, 300 µl do reagente DNS foi adicionado e as amostras fervidas por 5 minutos. A atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 umol de açúcar redutor por minuto (Miller, 1959).

3.14.10 Determinação da atividade de xilanase

A determinação da atividade de xilanase foi realizada segundo Bailey *et al.* (1992), tendo xilana 1% (m/v) em tampão citrato 0,05 M pH 4,8 como substrato. A mistura (10 µl de enzima + 90 µl de substrato) de reação foi incubada por 5 minutos a 50°C. Após, 300 µl do reagente DNS foi adicionado e as amostras fervidas por 5 minutos. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de xilose por minuto (Miller, 1959).

3.14.11 Determinação da atividade de amilase

A determinação de amilase foi realizada segundo Bansal *et al.* (2011), utilizando amido solúvel 1% (m/v) em tampão fosfato 0,2 M pH 6,4 como substrato. A mistura de reação (1 mL de enzima + 1 mL de substrato) foi incubada por 30 minutos a 30°C. Após, 300 µl do reagente DNS foi adicionado e as amostras fervidas por 5 minutos. Uma unidade de atividade de amilase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcares redutores por minuto (Miller, 1959).

3.14.12 Determinação de proteínas

Para a determinação quantitativa das proteínas, foi utilizado o método colorimétrico de Bradford (1976) em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores de proteína foram obtidos a partir da curva de calibração construída com soluções padrão de albumina de soro bovino (BSA) em diferentes concentrações.

3.14.13 Determinação da clarificação dos sucos de frutas

A clarificação dos sucos foi determinada por intensidade de cor medida em espectrofotômetro como proposto por Ranganna (1977) e descrito por Sandri (2010). Para o suco claro de maçã, a leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 440 e 520 nm contra água, correspondendo às cores amarela decorrente de oxidação de polifenóis e vermelha de antocianinas, respectivamente. Para os sucos escuros de uva bordô, uva rosada e amora, a leitura foi realizada nos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm correspondendo às cores amarela (taninos), vermelha (antocianinas) e violeta-azul (catequinas e antocianinas), respectivamente. A intensidade de cor (IC) para cada suco foi expressa como a soma das absorbâncias.

$$IC=A_{440}+ A_{520} \quad (23)$$

$$IC=A_{420}+ A_{520} +A_{620} \quad (24)$$

3.14.14 Determinação da turbidez dos sucos de frutas

A turbidez dos sucos tratados enzimaticamente foi medida em turbidímetro Digimed Modelo Dm TU com 12 mL de amostra à temperatura ambiente (± 24 °C).

3.14.15 Determinação da viscosidade dos sucos de frutas

A viscosidade dos sucos de frutas foi medida em viscosímetro Brookfield modelo LDV-II+, a 60 rpm utilizando 20 mL de amostra a 30°C.

3.14.16 Determinação de polifenóis totais de frutas

O teor de polifenóis totais foi determinado por método espectrofotométrico, com o uso do reagente comercial Folin-Ciocalteu de acordo com o método proposto por

Singleton & Rossi (1965). A 0,5 mL da amostra diluída (1:10), foram adicionados 2 mL da solução de carbonato de sódio 10% (m/v) e 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído dez vezes. A reação foi conduzida em banho termostático a 50°C por 5 minutos e a leitura das amostra realizada a 765 nm contra um branco de água.

O teor de polifenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (7 a 250 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100 mL de suco.

3.15 Análise estatística dos dados

Os testes estatísticos para os dados obtidos no trabalho foram realizados pela análise de variância (one-way ANOVA) e teste de Tukey com nível de confiança de 5% ($p < 0,05$) com auxílio do software OriginPro 8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados encontrados nesse trabalho, sendo abordadas a produção de pectinases por cultivo em estado sólido em biorreator de tambor rotativo, a definição de um protocolo para a recuperação e a concentração das enzimas por ultrafiltração, a formulação do extrato concentrado com aditivos a fim de conservar a atividade enzimática e a aplicação dessa formulação no tratamento de sucos de frutas.

A apresentação dos resultados se inicia com a adaptação do método indireto de quantificação de biomassa de *A. niger*, previamente descrito por Fontana (2004), para a linhagem LB-02-SF utilizada no presente trabalho.

Em seguida, a produção de pectinases em biorreator de tambor rotativo, sob diferentes condições de operação, é discutida na seguinte ordem:

- efeito da agitação
- efeito do volume de ocupação do reator;
- efeito da temperatura;
- efeito do fluxo de ar.

Na sequência, é discutida a recuperação e a concentração das pectinases produzidas por cultivo em estado sólido, avaliando-se os seguintes aspectos:

- condições de extração das enzimas do meio sólido;
- pré-tratamento do extrato enzimático com carvão ativado;
- pré-tratamento do extrato enzimático por microfiltração;
- concentração do extrato enzimático por ultrafiltração;
- avaliação da estabilidade frente ao pH;
- caracterização do extrato concentrado quanto ao pH e à temperatura de reação.

Após a concentração do extrato enzimático, o principal objetivo foi a conservação da atividade catalítica. Para tal, os seguintes pontos foram enfocados:

- influência da adição de glicerol e KCl ao extrato concentrado;
- estabilidade das formulações enzimáticas frente à temperatura.

Por fim, a formulação enzimática foi aplicada no processamento de sucos, incluindo-se no estudo:

- maceração de uva;
- clarificação de sucos de maçã, uva e amora.

4.1 Adaptação de metodologia indireta para a quantificação de biomassa de *Aspergillus niger* LB-02-SF

Fontana (2004) definiu as condições para a estimativa indireta da biomassa de *A. niger* T0005007-2, tendo como bases o teor de N-acetilglicosamina e os parâmetros respiratórios Y_{GO} , fator real de conversão de oxigênio em biomassa fúngica, e m_o , coeficiente de manutenção para o oxigênio, específicos para a linhagem utilizada. Neste item, são apresentados os resultados encontrados na adaptação desta metodologia para *A. niger* LB-02-SF.

4.1.1 Quantificação do teor de N-acetilglicosamina presente no micélio da linhagem *Aspergillus niger* LB-02-SF

Nesse trabalho, o método descrito por Aidoo *et al.* (1981) foi utilizado para determinação do teor de N-acetilglicosamina (NAG) no micélio fúngico. Fontana (2004) e Scotti *et al.* (2001), demonstraram que o teor de NAG apresenta valores constantes durante o cultivo fúngico, confirmando que a medida desta substância pode ser adequada para estimativa da biomassa.

Inicialmente, o teor de NAG foi determinado em amostras de micélio seco de *A. niger* LB-02-SF cultivado em meio líquido por 54 horas, sendo os valores obtidos correlacionados com a massa de biomassa seca do microrganismo. A correlação encontrada foi de 135 mg de NAG/g de biomassa seca, ou seja, em torno de 13,5% de glicosamina, conforme é mostrado na Figura 15. Conforme Johnston (1965), em estudo em que foi determinada a composição da parede celular de *A. niger*, o teor de glicosamina encontrado foi de 9,0 a 13,1% (m/m). Pinto (2008) determinou o teor de NAG para *A. fumigatus*, tendo encontrado valor próximo a 105 mg de NAG/g de biomassa seca.

Essa determinação foi utilizada de maneira indireta para estimar a biomassa produzida por cultivo em estado sólido como mostrado anteriormente pela Equação 5.

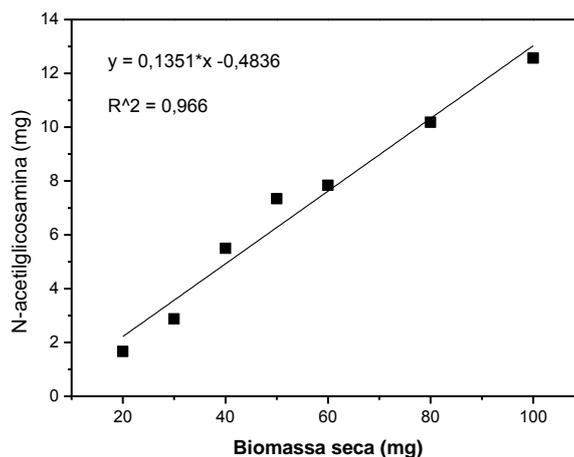


Figura 15 – Correlação entre o teor de N-acetilglicosamina (NAG) e biomassa seca de *Aspergillus niger* LB-02-SF cultivado em meio líquido.

4.1.2 Determinação do fator real de conversão de oxigênio em biomassa fúngica e do coeficiente de manutenção para o oxigênio e quantificação indireta da biomassa de *Aspergillus niger* LB-02-SF

Para determinar a biomassa fúngica a partir do balanço de oxigênio, primeiramente foi necessário encontrar os parâmetros respiratórios Y_{GO} e m_o . Com os valores de biomassa estimados a partir do teor de NAG de amostras de cultivos em estado sólido cultivados em frascos e as respectivas demandas de oxigênio (OUR), foi possível calcular as velocidades específicas de respiração (QO_2) (Equação 10). As velocidades específicas de crescimento (μ_x) para estes cultivos foram também determinadas e, através de um gráfico $QO_2 = f(\mu_x)$, determinaram-se os parâmetros Y_{GO} , correspondendo ao inverso do coeficiente angular da reta obtida, e m_o , que é o próprio coeficiente linear desta reta (Figura 16).

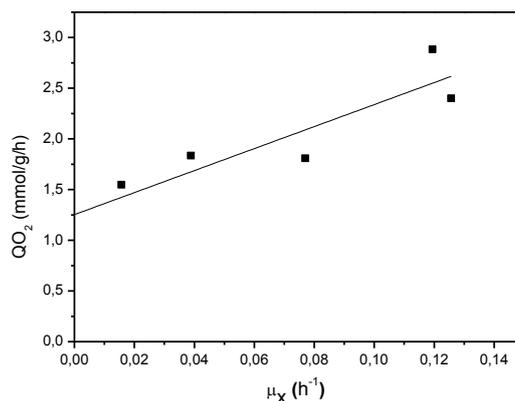


Figura 16 – Variação da velocidade específica de respiração (QO_2) com a velocidade específica de crescimento (μ_x) em cultivo de *Aspergillus niger* em meio sólido.

Na Tabela 3, os valores encontrados para Y_{GO} (0,092 g biomassa / mmol O_2) e m_o (1,25 mmol O_2 / g biomassa / h) são comparados aos apresentados em outros trabalhos para *A. niger* cultivado em estado sólido. Mitchell *et al.*, (2006) relatam a dificuldade na determinação de teores de células em CES, uma vez que é praticamente impossível remover a biomassa do meio devido à penetração do micélio fúngico no substrato sólido. Portanto diferentes métodos indiretos são utilizados na estimativa da concentração celular em CES, o que poderia estar relacionado aos diferentes parâmetros de respiração encontrados pelos diferentes autores.

Tabela 3 – Exemplos de valores encontrados na literatura para o fator real de conversão de oxigênio em biomassa fúngica (Y_{GO}) e para o coeficiente de manutenção para o oxigênio (m_o) em cultivo de *Aspergillus niger* em estado sólido.

Y_{GO} (g biomassa/ mmol O_2)	m_o (mmol O_2 / g biomassa/h)	Método de determinação	Referências
0,064	0,243	Ergosterol	Rodríguez-Fernández <i>et al.</i> (2013)
0,014	2,75	N-acetilglicosamina	Fontana <i>et al.</i> (2005)
0,15	0,50	Consumo de O_2 e produção de CO_2	Prado <i>et al.</i> (2005)
0,092	1,25	N-acetilglicosamina	Presente trabalho

Com os valores dos parâmetros conhecidos, foi possível estimar a biomassa produzida em biorreator de tambor rotativo, a partir da determinação de OUR por balanço

de oxigênio, utilizando-se a Equação 12. Na Figura 17, a curva de crescimento obtida por este método é comparada com aquela construída com o uso das determinações de NAG. Como pode ser observado, há uma boa correlação entre os valores medidos por ambos os métodos. Desta forma, os dados de biomassa discutidos ao longo do trabalho, foram obtidos a partir de medidas de OUR.

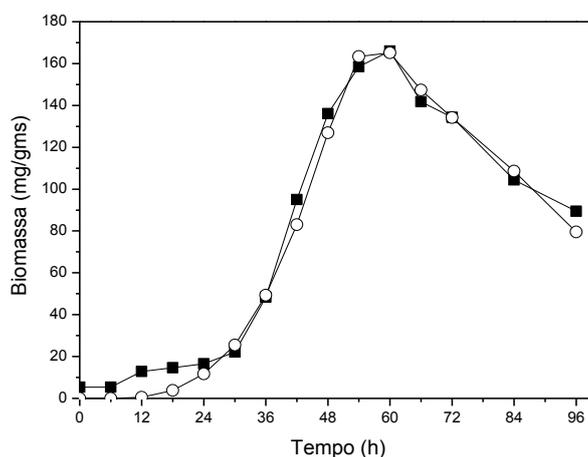


Figura 17 – Variação da concentração de biomassa de *Aspergillus niger* LB-02-SF determinada pelo método de N-acetilglicosamina (NAG) (■) e demanda de oxigênio (OUR) (○) em cultivo em estado sólido.

4.2 Produção de pectinases por cultivo em estado sólido

4.2.1 Efeito da agitação do biorreator

O efeito da agitação sobre a produção de pectinases foi inicialmente estudada e comparada em cultivos estáticos e sob agitação de 1 rpm por 5 minutos a cada 120 minutos com diferentes volumes de ocupação do reator (30, 50 e 70%). Em seguida, ensaios com o volume de ocupação de 70% foram realizados com os intervalos de agitação de 60 e 90 minutos e comparados com o intervalo de 120 min. Estes ensaios foram realizados com fluxo de ar constante de 0,54 LkgM. Os resultados são mostrados a seguir.

4.2.1.1 Comparação de cultivos estático e agitado

Os ensaios realizados com o biorreator de escala de bancada tiveram por objetivo avaliar o efeito da agitação sobre a produção de pectinases, especialmente com maiores

volumes de ocupação do reator. A Tabela 4 apresenta os resultados dos ensaios realizados para os volumes de ocupação de biorreator de 30, 50 e 70%.

Tabela 4 – Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo, estático e agitado com diferentes volumes de ocupação pelo meio sólido.

Vol. ocup.	Condição de operação do biorreator					
	Estático			Agitado		
	30%	50%	70%	30%	50%	70%
X_{\max} (mg/g)	147,9 ^{bc} ± 7,5	119,2 ^{cd} ± 4,1	117,3 ^d ± 5,2	227,0 ^a ± 6,4	173,0 ^b ± 5,4	136,3 ^{cd} ± 12,4
$t_{X,\max}$ (h)	72	96	76	96	72	96
PT (U/g)	170,8 ^a ± 0,7	110,3 ^{bc} ± 8,2	76,0 ^c ± 2,8	133,4 ^b ± 10,4	178,2 ^a ± 15,5	70,6 ^c ± 4,5
Umidade (%)	65,0 ^{ab} ± 2,1	61,8 ^{ab} ± 2,3	58,1 ^b ± 3,8	71,6 ^a ± 2,6	69,7 ^a ± 0,5	70,9 ^a ± 3,9
S_0 (mg/g)	486	439	495	462	423	406
S_{cons} (mg/g)	302	237	185	308	319	225
$Y_{P/X}$ (U/mg)	1,15 ^a ± 0,06	0,87 ^{ab} ± 0,03	0,65 ^{bc} ± 0,00	0,59 ^{bc} ± 0,08	1,06 ^a ± 0,12	0,52 ^c ± 0,08
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,56 ^{ab} ± 0,01	0,44 ^{bc} ± 0,03	0,41 ^c ± 0,01	0,44 ^{bc} ± 0,04	0,57 ^a ± 0,05	0,31 ^c ± 0,02
$Y_{X/S}$ (mg/mg)	0,49 ^c ± 0,02	0,50 ^c ± 0,01	0,63 ^{ab} ± 0,02	0,73 ^a ± 0,02	0,54 ^{bc} ± 0,02	0,60 ^{bc} ± 0,05

Vol. ocup. – volume de ocupação; X_{\max} – máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ – tempo em que ocorreu X_{\max} ; PT - pectinases totais em 96 h; S_0 – Concentração inicial de açúcares redutores totais; S_{cons} - açúcares redutores totais consumido em 96 horas; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células. Umidade inicial – 54%. Fluxo específico de ar – 0,54 LkgM. Letras diferentes (a-d) indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$) para ensaios em duplicata.

O biorreator utilizado no modo estático tende a se comportar como uma bandeja, sistema que é muito utilizado para a produção de enzimas (Brijwani *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2013; Ruíz *et al.*, 2012; Vaseghi *et al.*, 2013). Porém, as bandejas são limitadas a pequenas espessuras do leito de meio de cultivo, que funciona como barreira à difusão de gases (O_2 e CO_2) e de calor. Os resultados dos ensaios com o biorreator no modo estático mostraram exatamente este comportamento, com a atividade enzimática ao final do processo variando inversamente à espessura do meio de cultivo (Tabela 4). A biomassa apresentou valores na faixa de 117 a 148 mg/g entre os cultivos com diferentes volumes de ocupação. No sistema estático, acredita-se que as camadas inferiores de meio não contribuam para o crescimento celular, devido às limitações de transferência de massa e de calor. Da mesma forma, provavelmente pelo mesmo motivo, a produção de pectinases foi

superior quando a espessura do meio foi menor. Com o aumento do volume de ocupação de 30% para 50% e de 50% para 70% a atividade pectinolítica diminuiu em torno de 35% em ambas as comparações. Os ensaios com agitação intermitente (5 minutos a cada 120 minutos), por sua vez, apresentaram valores de biomassa e atividade completamente distintos dos ensaios sem agitação. As mais altas concentrações de biomassa foram encontradas na condição de 30% de ocupação, em torno de 227 mg/g, mostrando que, mesmo com a agitação proporcionada pelo reator, a espessura do meio se torna um fator limitante para o crescimento. Já a umidade do meio foi reduzida com o aumento do volume de ocupação ao operar-se o biorreator no modo estático. Houve aumento da umidade em todas as condições, no entanto, sem agitação do biorreator, o meio não foi capaz de absorver maiores quantidades de água, como observado no sistema agitado.

Algumas observações foram realizadas com relação à atividade enzimática de pectinases totais para os cultivos conduzidos em modo estático e agitado em cada volume de ocupação empregado.

a) 30% de ocupação – a atividade enzimática foi 28% maior com o sistema sem agitação, resultando em um fator de produção específica ($Y_{P/X}$) também superior; ou seja, apesar da menor concentração de biomassa obtida, a produtividade das células quando comparada à condição de agitação foi superior. Já o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foi superior na condição de agitação do biorreator, o que se deve à maior concentração celular, uma vez que o consumo de substrato foi similar em ambas condições de operação do biorreator. Os resultados indicam que a produção da enzima não está totalmente relacionada à concentração de biomassa, mas com fenômenos envolvidos no metabolismo do fungo como, por exemplo, a repressão catabólica e estresse.

b) 50% de ocupação – o sistema agitado apresentou aumento de 61% na atividade comparado ao sistema estático, para o qual o fluxo de ar pode ter sido insuficiente para atingir as camadas mais profundas do meio, diminuindo a produção enzimática. Já no sistema agitado, pode-se considerar, como primeira hipótese, que a homogeneização do meio proporcionou um ambiente mais adequado para a produção enzimática ou, como segunda possibilidade, que as condições empregadas teriam levado o microrganismo a uma situação de estresse – em termos de transferência de calor e/ou de massa – que, segundo Maldonado *et al.* (1998), contribui para o aumento da produção de enzimas. Nesse caso, a agitação favoreceu tanto o crescimento quanto a produção enzimática, bem como o consumo de substrato, gerando um valor superior para o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$).

c) 70% de ocupação – os ensaios não mostraram diferença nos valores encontrados para biomassa e atividade enzimática entre os modos de operação estático e agitado, indicando que apesar da agitação, a quantidade de meio pode ter dificultado a transferência de massa e calor mais significativamente. Observou-se também que, em biorreator agitado, as partículas tendem a se agregar em grandes blocos, o que certamente dificultou a colonização do meio.

As condições de 30% e 50% de volume de ocupação do biorreator operados no modo estático e agitado, respectivamente, nas quais as maiores atividades pectinolíticas foram obtidas, apresentaram resultados estatisticamente iguais quanto aos fatores de conversão $Y_{P/X}$, $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$. Porém se a atividade total for comparada (U), o volume de ocupação de 50% (1800 g) apresenta vantagem sobre o reator estático com volume de ocupação de 30% (1100 g), já que este valor é aumentado de 65565 U para 98473 U. A atividade no final do processo ganha um incremento em torno de 51% e o volume de extrato obtido também se torna maior. Demir & Tari (2014) encontraram resultado similar com aumento de 17,2% na atividade de poligalacturonase ao compararem os sistemas estático e agitado, sendo este aumento atribuído ao fato de a transferência de oxigênio ocorrer de forma mais homogênea como resultado da agitação. Por outro lado, Lagemaat & Pyle (2001) observaram que a produção de tanases por *Penicillium glabrum*, assim como a concentração de biomassa fúngica, foi maior em cultivo estático que em agitado, possivelmente devido a efeitos de cisalhamento do micélio causado pela agitação do sistema. No cultivo de *A. niger* LB-02-SF no biorreator de tambor rotativo em questão, no entanto, fica claro, que a agitação do meio favoreceu o processo.

4.2.1.2 Efeito de diferentes intervalos entre as agitações do biorreator

Com os resultados acima, foi possível confirmar que a agitação do biorreator favoreceu o aumento do volume de ocupação até 50%. Visto que a agitação pode ser uma alternativa para melhorar a transferência de oxigênio e calor durante o cultivo em estado sólido (Gasiorek, 2008) e visando à otimização do volume do biorreator, o ensaio com diferentes intervalos entre as agitações foi realizado com o volume de ocupação de 70%. Os ensaios foram realizados com os intervalos de 120, 90 e 60 minutos entre as agitações, mantendo-se a frequência e o tempo constantes (1 rpm/5 minutos).

Os cultivos realizados com intervalos entre as agitações de 90 e 120 minutos apresentaram comportamentos similares em termos de produção de pectinases totais

(70 U/g), enquanto que no intervalo de 60 minutos, esta atividade foi reduzida em torno de 42% (Tabela 5). Autores como Mitchell *et al.* (2006) e Thomas *et al.* (2013), além dos já citados Lagemaat & Pyle (2001), atribuem ao cisalhamento do micélio fúngico, decorrente da agitação mais intensa, a responsabilidade pela redução nos valores de crescimento e produção em bioprocessos com fungos filamentosos. O aumento do número de eventos de agitação, porém, parece ter provocado algum efeito na secreção do produto, já que a concentração de biomassa observada foi praticamente a mesma em todos os intervalos testados. Resultado similar foi encontrado por Gasiorek (2008), que observou que mesmo com agitação contínua, a concentração celular de *A. niger* foi superior à encontrada nos ensaios com agitação intermitente, sugerindo que a agitação continua não causou danos ao micélio.

Tabela 5 – Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com 70% de ocupação de volume pelo meio sólido, operado com diferentes intervalos entre cada agitação.

	Intervalo entre as agitações (minutos)		
	120	90	60
X_{max} (mg/g)	136,3 ^a ± 12,4	126,8 ^a ± 13,0	133,2 ^a ± 11,3
t_{X,max} (h)	96	96	96
PT (U/g)	70,6 ^a ± 4,5	69,0 ^a ± 8,1	29,8 ^b ± 1,2
T (°C)	43 ^a ± 1,4	46 ^a ± 1,4	41 ^a ± 1,4
Umidade (%)	70,7 ^a ± 3,3	63,9 ^a ± 4,1	62,6 ^a ± 1,4
S₀ (mg/g)	406	414	414
S_{cons} (mg/g)	225	208	124
Y_{P/X} (U/mg)	0,52 ^a ± 0,08	0,54 ^a ± 0,01	0,23 ^b ± 0,01
Y_{P/S} (U/mg)	0,31 ^a ± 0,02	0,33 ^a ± 0,03	0,24 ^a ± 0,01
Y_{X/S} (mg/mg)	0,60 ^b ± 0,05	0,61 ^b ± 0,06	1,06 ^a ± 0,09

X_{max} – máxima concentração de biomassa; t_{X,max} – tempo em que ocorreu X_{max}; PT – pectinases totais em 96 h; T - temperatura em 48 h de cultivo; S₀ – Concentração inicial de açúcares redutores totais; S_{cons} - açúcares redutores totais consumido em 96 horas; Y_{P/X} – fator de produção específica; Y_{P/S} – fator de conversão de substrato em produto; Y_{X/S} – fator de conversão de substrato em células. Umidade inicial – 54%. Fluxo específico de ar – 0,54 LkgM. Letras diferentes (a-b) indicam diferença significativa ao nível de 5% (p< 0,05) para ensaios em duplicata.

Apesar de a atividade ser semelhante nos ensaios com intervalos entre as agitações de 90 e 120 minutos, a umidade foi de 63,8% e 70,9%, respectivamente. O aumento do

número de eventos de agitação, em combinação com as variações de temperatura em cada condição testada, pode ter contribuído para a redução de umidade. Da mesma forma, a agitação a cada 60 minutos pode ter contribuído tanto para a redução da umidade quanto para a redução de temperatura. Além disso, o microrganismo se mostrou menos produtivo nessa condição, como pode ser constatado pelo menor valor de $Y_{P/X}$. Já, o valor de $Y_{X/S}$ foi superior devido ao consumo de substrato ter sido menor e o crescimento similar aos demais intervalos entre as agitações.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5, a questão central que se coloca é explicar a baixa atividade de pectinases totais atingida no ensaio com agitação em intervalos de 60 minutos. Neste ensaio, com o menor intervalo entre as agitações, o meio de cultivo sofreu maior exposição ao fluxo de ar, o que parece ter favorecido a produção de energia e, em decorrência, o crescimento. Situação semelhante, e ainda mais drástica, foi observada na presença de altos níveis de oxigênio dissolvido, durante a produção de endopoligalacturonase em cultivo submerso por *Kluyveromyces marxianus*, desde que, com 60% de saturação de oxigênio a produção desta enzima foi completamente ausente, sendo a diminuição da produção enzimática entendida pelos autores como decorrente de repressão pelo oxigênio (Cruz-Guerrero *et al.*, 1999).

4.2.2 Efeito do controle de temperatura do biorreator

Na sequência, foram realizados ensaios em biorreator de tambor rotativo nos quais se procurou exercer um controle mais efetivo sobre a temperatura do meio de cultivo sólido. Esta avaliação foi feita em cultivos com volume de ocupação do biorreator de 30%, sem agitação, e 50%, com agitação, condições que, até este ponto do estudo, resultaram nas maiores atividades de pectinases totais (item 4.2.1.1). Para o controle da temperatura, foi utilizado um aspersor de água para resfriar a superfície externa do reator. A remoção de calor neste sistema foi realizada por condução, com as regiões quentes do meio de cultivo entrando em contato com a parede fria do biorreator.

Os perfis de variação de temperatura dos cultivos estático e agitado, realizados com 30 e 50% de ocupação do reator, com e sem controle de temperatura, são ilustrados na Figura 18. Como mostrado nesta figura, na ausência de controle de temperatura, este parâmetro supera os 45°C, valor que poderia, em princípio, prejudicar o processo, tanto pelo fato de ser inadequado ao crescimento de *A. niger*, que se situa idealmente na faixa de 30 a 35°C (Palacios-Cabrera *et al.*, 2005; Gougouli & Koutsoumanis, 2010), quanto pela

sensível perda de atividade de pectinases observada nessa temperatura (Sandri, 2010). Segundo Mitchell *et al.* (2006), em cultivos em estado sólido, mesmo com o uso de fluxo de ar e camisa de resfriamento, a temperatura pode aumentar, em um período de poucas horas, de 10 a 20°C acima da temperatura desejada. No entanto, o sistema de arrefecimento utilizado, apesar de sua simplicidade, reduziu significativamente a temperatura do meio em comparação com a condição sem controle, embora tenha ficado evidente a dificuldade em manter-se este parâmetro estável devido à grande quantidade de calor metabólico gerado durante o cultivo.

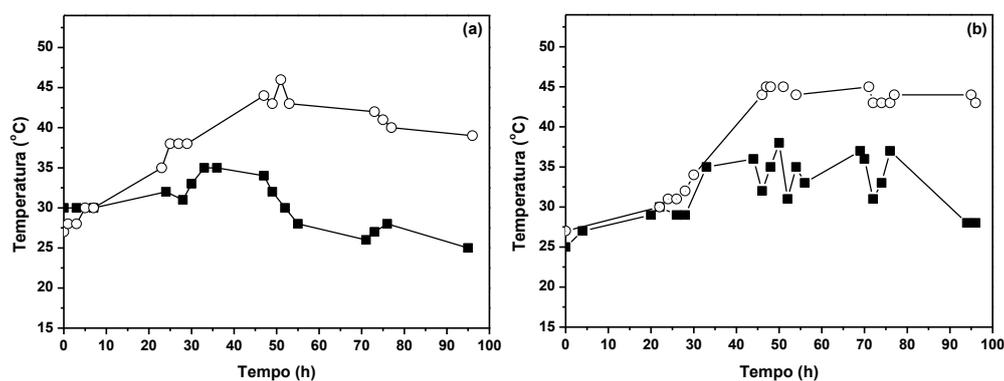


Figura 18 – Variação da temperatura do meio de cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF com o tempo em biorreator de tambor rotativo com volume de ocupação de 30% - estático (a) e 50% - agitado (b): cultivo com controle de temperatura (■); cultivo sem controle de temperatura (○).

Observou-se que para o menor volume de ocupação (30%), a temperatura, após subir até cerca de 35°C em aproximadamente 48 horas, foi mais facilmente controlada na sequência do cultivo. Nesta condição, como era esperado, determinou-se um crescimento celular maior quando a temperatura do cultivo foi controlada (Tabela 6). Porém, a atividade pectinolítica total sofreu um decréscimo de mais de 50%, sendo reduzida de 170,8 U/g para 84,4 U/g nos ensaios sem e com controle de temperatura, respectivamente. Já no ensaio com 50% de ocupação e mantendo a agitação padrão do sistema, o perfil de concentração celular foi similar, porém a atividade de pectinases totais novamente foi reduzida de 178,2 para 46,4 U/g nos cultivos sem e com controle de temperatura, respectivamente.

Tabela 6 – Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com volume de ocupação do reator em 30% sem agitação e 50% com agitação, com e sem controle de temperatura.

Vol. ocup.	30%		50%	
	Controle	Sem controle	Controle	Sem controle
X_{\max} (mg/g)	196,2 ^a ± 1,8	147,9 ^b ± 9,8	181,2 ^a ± 2,0	173,0 ^a ± 5,4
$t_{X,\max}$ (h)	72	72	76	72
PT (U/g)	84,4 ^b ± 3,5	170,8 ^a ± 0,7	46,4 ^b ± 8,1	178,2 ^a ± 15,5
Umidade (%)	60 ^a ± 1,6	65,4 ^a ± 2,1	63,9 ^a ± 0,6	69,9 ^a ± 0,5
S_0 (mg/g)	396	462	414	423
S_{cons} (mg/g)	215	302	230	319
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,43 ^b ± 0,00	1,15 ^a ± 0,06	0,25 ^b ± 0,04	1,06 ^a ± 0,12
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,39 ^b ± 0,00	0,56 ^a ± 0,01	0,20 ^b ± 0,03	0,57 ^a ± 0,05
$Y_{X/S}$ (mg/mg)	0,91 ^a ± 0,00	0,49 ^b ± 0,02	0,78 ^a ± 0,01	0,54 ^a ± 0,02

Vol. ocup. – volume de ocupação do reator; X_{\max} – máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ – tempo em que ocorreu X_{\max} ; PT – pectinases totais em 96 h; S_0 – Concentração inicial de açúcares redutores totais; S_{cons} – açúcares redutores totais consumidos em 96 h; $Y_{P/X}$ – fator de produção específica; $Y_{P/S}$ – fator de conversão de substrato em produto; $Y_{X/S}$ – fator de conversão de substrato em células. Umidade inicial – 54%. Letras diferentes (a-b) indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$) para ensaios em duplicata.

Os resultados obtidos nestes ensaios levantam a seguinte questão com respeito ao controle de temperatura: se o crescimento celular foi superior nesta condição, como no caso do ensaio não agitado com ocupação de 30%, ou se o crescimento foi similar, caso do cultivo agitado com ocupação de 50%, por que a atividade de pectinases foi significativamente inferior quando a temperatura foi controlada numa faixa mais favorável ao crescimento? Comportamento semelhante foi observado por Polidoro (2009), em cultivo de *A. niger* T0005/007-2 em tambor rotativo, tendo este autor sugerido que a produção de pectinases é favorecida quando o microrganismo se encontra sob efeito de estresse. Também em CES, Castro *et al.* (2015), verificaram que com a redução da atividade de água do meio, houve aumento na atividade de proteases. Os autores apontaram que a redução na atividade de água causou uma condição de estresse que levou a maior indução das enzimas. Para outro parâmetro essencial em bioprocessos, o pH, Malvessi & Silveira (2004), Fontana *et al.* (2009), Fontana & Silveira (2012) e Meneghel *et al.* (2014) também constataram que a produção de pectinases por *A. oryzae* em meio líquido foi praticamente nula em condição favorável ao crescimento (pH em torno de 4,0) e

intensificada quando o crescimento foi inviabilizado (pH em torno de 2,7). O conjunto destes trabalhos mostra, portanto, que a produção das pectinases se dá preferencialmente quando o microrganismo se encontra em ambiente inadequado ao crescimento. Ao analisar os resultados, seria possível se supor que a alta temperatura do meio tenha gerado uma condição de estresse – desfavorável ao crescimento – portanto levando a maior produção de enzimas.

Apesar do aumento da temperatura até 45°C, não houve queda de atividade durante o processo de produção da enzima, como será observado posteriormente na Figura 19-b, demonstrando que a enzima produzida apresenta alguma estabilidade a essa temperatura. Mohsen *et al.* (2009) e Hendges *et al.* (2011) relataram que pectinases produzidas por diferentes linhagens de *A. niger* mostraram ser completamente estáveis a 30°C; porém, as atividades foram reduzidas em aproximadamente 60% e 80%, respectivamente, quando expostas a 40°C por 60 minutos. Considerando os resultados de estabilidade à temperatura realizados para o extrato produzido neste trabalho (dados mostrados no item 4.6.1) e os resultados de Hendges *et al.* (2011) e Sandri (2010), teoricamente entre 40 e 50°C, a perda de atividade seria em torno de 35%. Esses dados indicam que a velocidade de produção das enzimas é maior que a velocidade de degradação durante o cultivo.

Os resultados destes ensaios mostraram, como descrito, que a natural elevação de temperatura durante o cultivo em meio sólido favorece a produção de pectinases por *A. niger* LB-02-SF. Esta constatação pode ser considerada como uma vantagem para a condução da produção destas enzimas em CES, visto que a temperatura é um parâmetro de difícil controle nesta modalidade de bioprocessamento.

4.2.3 Efeito conjunto do fluxo de ar e do volume de ocupação do biorreator

O fluxo de ar é um importante parâmetro para o cultivo em estado sólido, já que pode influenciar diretamente na transferência de calor e massa, na remoção de CO₂ e no controle de umidade do meio (Thomas *et al.*, 2013). Assim, a produção do complexo enzimático pectinolítico em biorreator de tambor rotativo foi avaliada sob diferentes condições de aeração, com volumes de ocupação do reator pelo meio de cultivo em 30% e 50%. Os resultados deste conjunto de ensaios são resumidos nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 – Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo sob diferentes fluxos específicos de ar, com volume de ocupação de 30%.

Fluxo (LkgM)	0,18	0,36	0,54	0,72	0,90
X_{\max} (mg/g)	170,9 ^b ± 14,6	187,6 ^{ab} ± 6,3	226,9 ^a ± 6,4	116,2 ^c ± 18,8	89,3 ^c ± 11,4
$t_{X,\max}$ (h)	72	96	76	76	72
PT (U/g)	77,25 ^c ± 8,7	129,0 ^{ab} ± 6,5	134,6 ^a ± 14,3	100,7 ^{bc} ± 5,1	124,8 ^{ab} ± 3,9
T (°C)	44 ^a ± 0,7	45 ^a ± 0	43 ^a ± 1,4	45 ^a ± 0	43 ^a ± 1,7
Umidade (%)	73,2 ^a ± 1,5	74,2 ^a ± 1,4	72,2 ^a ± 3,2	62,4 ^b ± 2,8	51,5 ^c ± 2,3
S_0 (mg/g)	465	465	462	517	418
S_{cons} (mg/g)	299	285	308	335	215
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,45 ^c ± 0,01	0,68 ^{bc} ± 0,01	0,59 ^{bc} ± 0,07	0,87 ^b ± 0,09	1,40 ^a ± 0,12
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,26 ^b ± 0,02	0,45 ^a ± 0,02	0,43 ^a ± 0,04	0,30 ^b ± 0,01	0,36 ^{ab} ± 0,01
$Y_{X/S}$ (mg/mg)	0,57 ^b ± 0,05	0,66 ^{ab} ± 0,02	0,73 ^a ± 0,02	0,34 ^c ± 0,05	0,25 ^c ± 0,03

X_{\max} - máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ - tempo em que ocorreu X_{\max} ; PT - pectinases totais em 96 h; T - temperatura em 48 h de cultivo; S_0 - Concentração inicial de açúcares redutores totais; S_{cons} - açúcares redutores totais consumido em 96 h; $Y_{P/X}$ - fator de produção específica; $Y_{P/S}$ - fator de conversão de substrato em produto; $Y_{X/S}$ - fator de conversão de substrato em células. Umidade inicial - 54%. Letras diferentes (a-c) indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$) para ensaios em duplicata.

Tabela 8 – Resultados gerais de cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo sob diferentes fluxos específicos de ar, com volume de ocupação de 50%.

Fluxo (LkgM)	0,18	0,36	0,54	0,72	0,90
X_{\max} (mg/g)	118,6 ^{ab} ± 4,6	128,0 ^{ab} ± 19,5	158,6 ^a ± 6,0	115,7 ^{ab} ± 7,8	86,3 ^b ± 13,4
$t_{X,\max}$ (h)	72	96	76	76	72
PT (U/g)	70,6 ^b ± 20,4	115,0 ^b ± 17,7	178,2 ^a ± 15,5	136,2 ^b ± 15,4	117,0 ^b ± 18,1
T (°C)	43 ^a ± 0,6	44 ^a ± 0	44 ^a ± 0,6	44 ^a ± 1,4	43 ^a ± 1,4
Umidade (%)	71,8 ^a ± 2,8	70,9 ^a ± 2,5	69,6 ^a ± 0,6	66,1 ^a ± 1,8	53,5 ^b ± 1,9
S_0 (mg/g)	375	439	423	367	360
S_{cons} (mg/g)	281	329	319	255	245
$Y_{P/X}$ (U/mg)	0,53 ^b ± 0,23	0,89 ^a ± 0,00	1,13 ^a ± 0,09	1,17 ^a ± 0,11	1,35 ^a ± 0,00
$Y_{P/S}$ (U/mg)	0,25 ^b ± 0,07	0,35 ^a ± 0,05	0,56 ^a ± 0,06	0,53 ^a ± 0,09	0,47 ^a ± 0,07
$Y_{X/S}$ (mg/mg)	0,49 ^a ± 0,08	0,39 ^a ± 0,06	0,49 ^a ± 0,01	0,49 ^a ± 0,02	0,35 ^a ± 0,05

X_{\max} - máxima concentração de biomassa; $t_{X,\max}$ - tempo em que ocorreu X_{\max} ; PT - pectinases totais em 96 h; T - temperatura em 48 h de cultivo; S_0 - Concentração inicial de açúcares redutores totais; S_{cons} - açúcares redutores totais consumido em 96 h; $Y_{P/X}$ - fator de produção específica; $Y_{P/S}$ - fator de conversão de substrato em produto; $Y_{X/S}$ - fator de conversão de substrato em células. Umidade inicial - 54%. Letras diferentes (a-b) indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$) para ensaios em duplicata.

Como mostrado, para ambos os volumes de ocupação testados, o crescimento microbiano foi incrementado pelo uso de fluxos específicos de ar crescentes entre 0,18 e 0,54 LkgM, enquanto fluxos de aeração mais altos levaram à redução da concentração de biomassa. Com 50% do volume do reator sendo ocupado pelo meio, foram atingidas concentrações de biomassa menores que as estimadas com 30% de ocupação para os fluxos específicos de ar até 0,54 LkgM.

Os teores de biomassa atingidos em cada um dos ensaios em discussão não estão relacionados à variação da temperatura do meio, já que os picos deste parâmetro foram muito semelhantes em todas as condições. Assim, é provável que a maior ocupação do biorreator tenha afetado negativamente a mistura, dificultando o suprimento de oxigênio ao cultivo, assim como a remoção de gás carbônico, e, por consequência, a colonização das regiões mais internas do meio.

Quando comparados os fluxos de ar para cada volume de ocupação com relação à atividade enzimática, foi observado que com 0,18 LkgM obtiveram-se valores significativamente inferiores aos atingidos com 0,54 LkgM, em que foram obtidas as maiores atividades, com redução de 42 e 60% da atividade com 30 e 50% de ocupação, respectivamente. Os fluxos mais altos de 0,72 e 0,90 LkgM, por sua vez, além da redução nos valores de biomassa e consumo de carboidratos, também constatados com 0,18 LkgM, apresentaram redução nos valores de umidade, mesmo com a temperatura sendo semelhante em todos os casos. Ao avaliarem-se os fatores de conversão $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$, pode-se observar que, para ambos os volumes de ocupação, este mesmo fluxo levou, novamente, menores valores. Esse resultado é importante, do ponto de vista operacional do reator, evidenciando-se que o fluxo específico de ar a ser utilizado deve ser superior a 0,18 LkgM.

Para o fluxo de 0,54 LkgM, foi verificado que as médias de atividade obtidas, em ambos os volumes de ocupação, foram significativamente diferentes, o que mostra que o uso deste fluxo, para o biorreator com 50% do seu volume ocupado, é vantajoso em termos da produção de pectinases.

Com relação à umidade, sabe-se que ocorre formação de água em função do metabolismo do fungo e que, se o fluxo de ar não for capaz de removê-la na mesma velocidade em que é formada, ocorre aumento no teor de umidade do meio com o tempo de cultivo (Stuart *et al.*, 1999). Assim, a água produzida pelo metabolismo do fungo somada ao fluxo de ar saturado em umidade que é introduzido no reator, garantiu que a umidade fosse aumentada com o tempo de cultivo (Fig. 17-c). A umidade também pode sofrer efeito da temperatura e do fluxo de ar aplicado. Como o perfil de temperatura foi

similar em todos os ensaios, atingindo um pico em torno de 44°C em 48 h de cultivo, pode-se considerar que os resultados decorreram do efeito do fluxo de ar sobre a umidade do meio. No caso, conforme é mostrado nas Tabelas 7 e 8, foi observado que o aumento no fluxo de ar para 0,90 LkgM promoveu redução da umidade em relação ao seu valor inicial (54%). Os teores finais de umidade foram similares em ambos os volumes de ocupação testados, em torno de 70% para os fluxos de 0,18 a 0,54 LkgM, 64% em 0,72 LkgM e 52% em 0,90 LkgM. Os valores de umidade mostraram que o aumento de fluxo de ar acarretou em perda de umidade do meio de cultivo. A condição de 0,90 LkgM manteve a umidade próxima do valor inicial (54%) durante todo o cultivo, sofrendo perda nos tempos finais finalizando em 52%, o que indica que esse fluxo tende a carregar a umidade do meio e assim, reduzir o crescimento celular e a produção enzimática. No entanto, os valores de $Y_{P/X}$ mostraram que a produção específica foi superior nos ensaios com esse fluxo de ar, ou seja, cada unidade de célula produziu mais enzimas que nas demais condições testadas.

Alguns autores apresentam resultados na produção de produtos biotecnológicos em biorreatores quando o fluxo de ar é variado. Rocky-Salimi & Hamidi-Esfahani (2010) verificaram que o aumento na taxa de aeração causou ressecamento do meio resultando na redução da produção de celulasas por *Trichoderma reesei*. O efeito do fluxo de ar na produção de celulasas e hemicelulasas foi estudado por Kalogeris *et al.* (2003), concluindo que a maior aeração testada (15 L de ar / minuto / kg de matéria seca) foi a que apresentou maior produção de biomassa e de enzimas. Se o valor de 0,54 LkgM usado neste trabalho for convertido em termos de matéria seca, o novo valor de aeração será de 1,8 L de ar / minuto / kg de matéria seca, o que está bem abaixo da aeração usada por Kalogeris *et al.* (2003). Já Gasiorek (2008) relata que houve perda de 20% na concentração de ácido cítrico produzido por *A. niger* quando a aeração foi aumentada de 0,2 para 0,4 LkgM. Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) observaram que existe um valor limite para o fluxo de ar em que a produção enzimática de pectinases e xilanases em CES não é mais favorecida. Neste trabalho, nas condições empregadas para a produção de pectinases, o fluxo específico de ar de 0,54 LkgM pode ser considerado como o mais favorável entre os estudados, já que acima ou abaixo desse valor ocorreu redução dos títulos de pectinases totais.

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a menor espessura do leito favoreceu o crescimento. Porém, com o aumento da espessura e o uso do fluxo específico de ar de 0,54 LkgM, a produção de pectinases aumentou de 134,6 para 178,2 U/g. Como discutido anteriormente, o aumento da espessura do leito, provavelmente dificulta as transferências de calor e massa, levando o microrganismo a uma possível condição de

estresse, em que a combinação de parâmetros como a temperatura e a limitação de oxigênio podem estar relacionados.

Para o fluxo específico de ar de 0,54 LkgM, com o qual foram obtidas as maiores atividades de pectinases, o comportamento cinético dos ensaios com ocupação de 30 e 50% é analisado com respeito ao crescimento celular e à produção de enzimas (Figura 19).

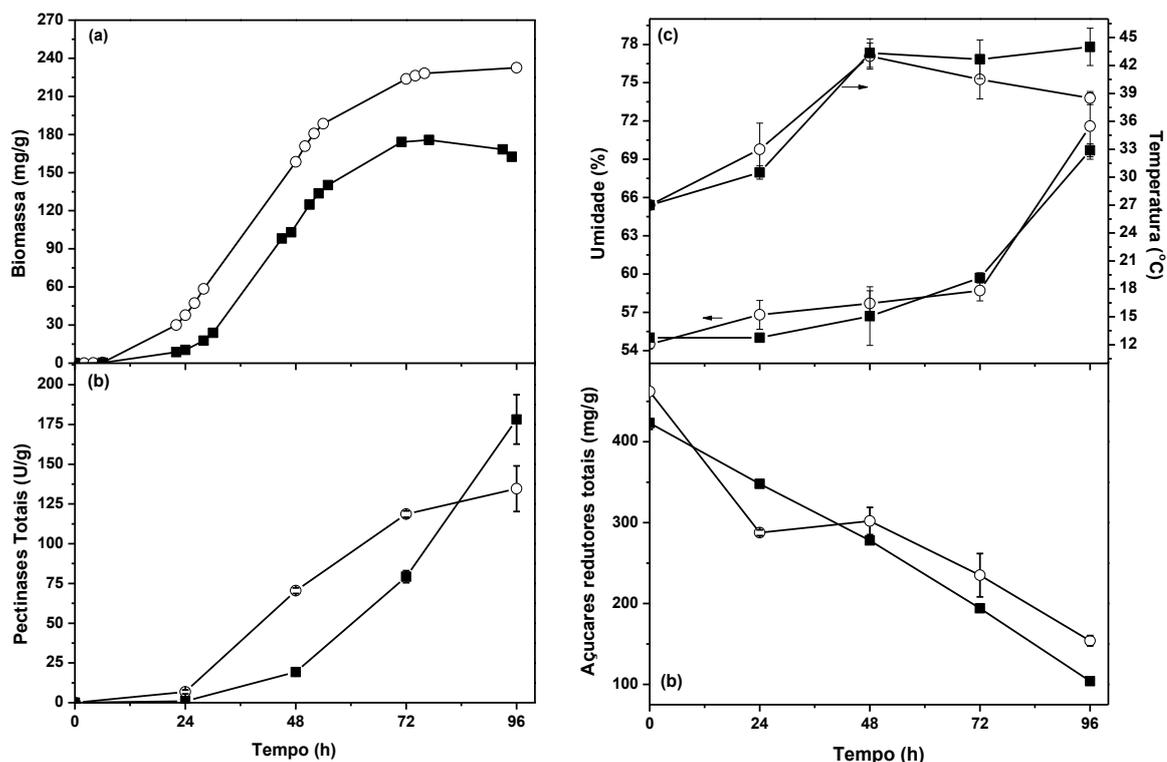


Figura 19 – Variação com o tempo das concentrações de biomassa fúngica (a), pectinases totais (b), umidade e temperatura (c) e (d) açúcares redutores totais em cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo com fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e volumes de ocupação de 30% (○) e 50% (■).

Na Figura 19-a, são mostrados os perfis cinéticos da formação de biomassa, nos ensaios realizados nas condições citadas, representadas pela média de dois ensaios com variação no desvio padrão de no máximo 12%. Como mostrado na figura, as curvas de crescimento assumem comportamento aproximadamente exponencial em torno das 24 horas, seguindo-se perfis com velocidades de crescimento constantes e, mais tarde decrescentes, até que as fases estacionárias sejam atingidas com cerca de 72 horas de processo. Apesar dos perfis cinéticos, as concentrações de biomassa e as velocidades de crescimento com a menor ocupação do reator foram sempre maiores. As máximas

velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,max}$) para os dois ensaios em discussão foram determinadas (Tabela 9), observando-se que os valores de $\mu_{x,max}$ diminuíram com o aumento do volume de ocupação, o que deixa evidente a limitação do crescimento nesta condição.

Tabela 9 – Máximas velocidades específicas de crescimento ($\mu_{x,max}$) em cultivos de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator de tambor rotativo operados com fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e volumes de ocupação de 30 e 50% .

	Volume de ocupação (%)	
	30	50
$\mu_{x,max}$ (h^{-1})	0,230	0,185

Quando volume de ocupação do reator utilizado foi de 30%, a formação de pectinases totais apresentou aumento pronunciado da atividade entre 24 e 72 horas, tendendo a estabilizar-se ao final de 96 horas (Figura 19-b). Já com 50% de ocupação pelo meio, a produção de pectinases se tornou superior em relação ao cultivo com 30% de ocupação apenas após 72 horas de processo. Além disso, o gráfico indica que o cultivo poderia ter sido mantido por mais horas para avaliar a continuidade da produção.

Os parâmetros de pH, temperatura e umidade não foram controlados durante o cultivo, apenas monitorados. Nesse trabalho, a curva de pH (não mostrada aqui) apresentou uma leve redução do valor inicial de 4,8 para 4,1 em 48 horas, período de intenso crescimento com possível formação de ácidos. Ao final do processo houve aumento do pH para 5,3 devido à liberação de amônia resultante da quebra de proteínas e da oxidação de aminoácidos durante a utilização das fontes de carbono na produção de pectinases por *A. niger* conforme descrito por Berovič & Ostroveršnik (1997) e Silva *et al.* (2005). A produção de pectinases por CES leva vantagem em relação à produção em CSm, por não exigir o controle desse parâmetro. Meneghel *et al.* (2014) mostraram claramente que a produção de pectinases por *A. oryzae* em CSm, sofre influência do pH do meio. Os autores comprovaram que, o cultivo, que se inicia em pH 4 para favorecer o crescimento, deve ser mantido em pH 2,7 para produção da enzima.

A variação de temperatura em todos os ensaios (volume de ocupação e aeração) apresentou perfis similares, com máxima ocorrendo na faixa de 42 a 44°C em torno de 48

horas de processo, não podendo ser relacionados com os menores títulos de atividade enzimática obtidos. A Figura 19-c mostra que após 24 h de cultivo, calor metabólico é liberado para o meio devido à acelerada velocidade de crescimento. É importante ressaltar que, apesar do aumento do fluxo específico de ar (0,18 a 0,90 LkgM), não houve redução no pico de temperatura do meio, o que indica que a velocidade de remoção de calor pelo ar foi menor que a velocidade de produção de calor. Com 50% de ocupação do reator, a temperatura se manteve em torno de 44°C até o final do cultivo. Na condição de 30% de ocupação, ocorreu redução de temperatura para 38°C após 72 h de cultivo. Essa redução pode ter sido devida à maior eficiência do fluxo de ar na remoção de calor nas últimas horas de cultivo quando o reator foi carregado com menor carga.

Um das preocupações com o aumento da espessura do meio sólido é a redução da capacidade do sistema em remover calor, o que leva ao incremento da temperatura e, possivelmente, à redução da formação de produto (Durand, 2003; Bhargav *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2011). No trabalho de Ghildyal *et al.* (1993), utilizando reator do tipo bandeja, foi mostrado que os títulos enzimáticos de amiloglucosidase produzidos por *A. niger* em diferentes espessuras do meio apresentavam relação com o gradiente de temperatura. Para o mesmo cultivo, amostras retiradas em diferentes profundidades do leito (40 - 240 mm) apresentavam diferentes temperaturas (32 – 50°C) e diferentes valores de atividade enzimática (8000 – 1000 U/g). Brijwani *et al.* (2011), além de encontrar resultados similares aos relatados por Ghildyal *et al.* (1993), na produção de enzimas celulolíticas, mostrou que ocorreu aumento de temperatura (48 para 52°C) com o aumento na carga de operação do reator de 50 para 100%. Para o biorreator de tambor rotativo de pequena escala utilizado no presente trabalho, entretanto, desconsiderou-se este gradiente, admitindo-se que a temperatura fosse praticamente homogênea ao longo da espessura do meio. Essa consideração foi realizada devido às características do meio de formação de pequenos grânulos sem ocorrer compactação do leito devido ao sistema de agitação do biorreator.

4.3 Recuperação e concentração de enzimas produzidas em cultivo em estado sólido

4.3.1 Extração de pectinases totais presente em meio sólido

Para recuperação das enzimas a partir do meio sólido, a extração das enzimas foi realizada por meio da solubilização das mesmas em água e posterior separação do extrato enzimático da massa sólida. Nessa etapa, tem-se como meta obter um extrato enzimático

com a maior recuperação possível da atividade enzimática. Nos testes apresentados a seguir, a atividade de pectinases totais (PT) e a concentração de proteínas foram utilizadas para avaliar os parâmetros estudados. Na avaliação de cada parâmetro, foram mantidas constantes as demais condições padronizadas: tempo de extração, 60 minutos; razão sólido/líquido, 1 g meio seco / 15 mL de solvente (água pH 4,0) (Fontana *et al.*, 2005); temperatura, 20°C.

O tempo de extração foi o primeiro parâmetro estudado. Neste grupo de ensaios, não foram observadas diferenças significativas quando o tempo de extração foi variado de 15 a 120 minutos (Figura 20). Em todas as condições testadas, os valores médios de atividade e proteína no extrato líquido ficaram em torno de 5,5 U/ml e 100 µg/L, respectivamente. Este resultado pode ser considerado interessante sob o ponto de vista de aplicação prática, já que em poucos minutos a etapa de extração pode ser concluída, favorecendo a produtividade.

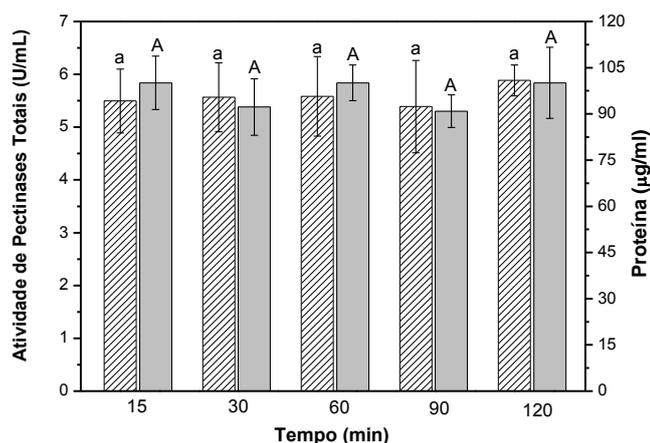


Figura 20 – Efeito do tempo de extração sobre a atividade de pectinases totais (coluna hachurada) e proteína (coluna sólida). Solvente água pH 4; temperatura de incubação, 20°C; razão de extração em base seca 1/15 (g/mL). Letras iguais indicam que não há diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$) para ensaios em duplicata.

O segundo parâmetro avaliado foi a temperatura de extração. A Figura 21 mostra que a concentração de proteína foi estatisticamente a mesma nas diferentes temperaturas testadas. Observou-se também que a 20 e 30°C, as atividades enzimáticas no extrato não apresentaram diferença significativa, enquanto a 40°C ocorreu uma redução de atividade recuperada superior a 40% em comparação à determinada a 20°C. Díaz *et al.* (2007), também utilizando a temperatura de 40°C na extração, observaram perda de 27% na

atividade de exo-PG em relação ao resultado observado à temperatura de 20°C. Os autores sugerem que, devido à maior temperatura, a saturação do solvente ocorra em razão da solubilização de outros compostos provenientes do meio de cultivo, tornando assim, a recuperação das enzimas menos eficiente. Outra hipótese que pode ser levada em conta tem relação com o fato de não ter sido constatada diferença significativa para as concentrações de proteína nos extratos obtidos com as diferentes temperaturas de extração. Poder-se-ia sugerir que, a 40°C, houve uma inativação parcial das enzimas devido à temperatura de incubação. Mohsen *et al.* (2009) e Hendges *et al.* (2011) relataram que pectinases produzidas por diferentes linhagens de *A. niger* apresentaram total estabilidade quando submetidas a temperaturas de 20 e 30°C por 60 minutos, mas que a exposição a 40°C, pelo mesmo tempo, resultou em redução de 60 e 80% da atividade enzimática, respectivamente.

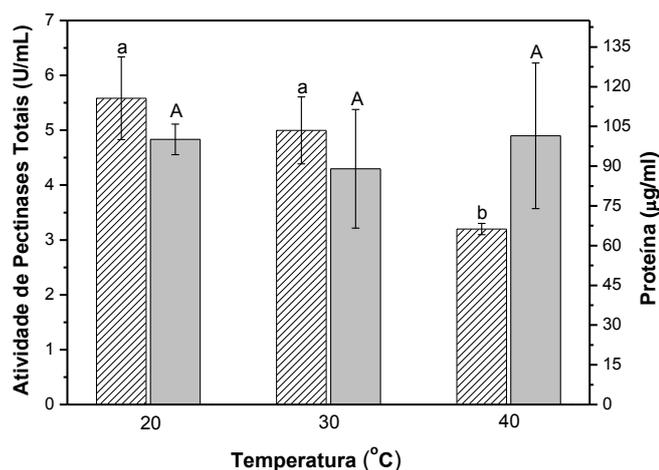


Figura 21 – Efeito da temperatura de extração na atividade de pectinases totais (coluna hachurada) e proteína (coluna sólida). Solvente água pH 4; tempo de incubação, 60 minutos; razão de extração em base seca 1/15 (g/mL). Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$) para ensaios em duplicata.

Uma vez determinadas as condições de tempo e temperatura de extração, a razão sólido/líquido (S/L) foi estudada. Para cada razão S/L testada, foi utilizada a mesma quantidade de solvente (30 mL) e variada a massa de meio para minimizar os efeitos da agitação. As razões S/L estudadas foram de 1/45 a 1/5 (g/mL em base seca) (Tabela 10).

Tabela 10 – Recuperação da atividade de pectinases totais em diferentes razões sólido/líquido na etapa de extração. Solvente, água pH 4; tempo de incubação, 60 minutos; temperatura, 20°C.

^A S/L (g/mL)	*Massa de meio úmido (g)	Atividade de PT recuperada (U/g de meio seco)	Atividade de PT solubilizada (U/ml solução)
1/45	1,93	132,6 ^a ± 2.3	2,9 ^c ± 0.05
1/30	2,56	130,2 ^a ± 20.1	4,3 ^c ± 0.7
1/15	3,85	114,3 ^a ± 14.3	7,6 ^b ± 1
1/10	7,70	108,3 ^a ± 10.8	10,8 ^a ± 1.0
1/7.5	11,5	55,7 ^b ± 3.2	7,4 ^b ± 0.5
1/5	15,4	22,2 ^b ± 2.3	4,4 ^c ± 0.5

^ARazão S/L é expressa em base seca, considerando a umidade do meio de cultivo em 74%; PT- pectinases totais. Letras diferentes indicam diferença significativa ao nível de 5% (p < 0,05) para ensaios em duplicata.

Os melhores resultados em termos de extração de atividade por grama de meio seco foram obtidos nas razões de 1/30 e 1/45. Já nas razões de 1/5 e 1/7,5, a atividade extraída reduziu-se significativamente, resultados que provavelmente se deveram a volumes insuficientes de solvente em relação às massas úmidas de meio utilizadas. Neste sentido, é importante frisar que os testes foram realizados com um meio contendo 74% de umidade, o que significa que aproximadamente 3,8 g de meio úmido equivaliam a 1 g de meio seco.

Quando a extração é avaliada levando-se em conta as unidades enzimáticas solubilizadas por mL de solvente, a razão que apresentou maior atividade enzimática foi 1/10. Embora a extração, em relação ao meio sólido, com S/L de 1/10 tenha sido 80% daquela obtida com 1/45, a primeira condição foi escolhida para a etapa seguinte do processo de recuperação. Para esta decisão, considerou-se que quanto maior fosse a atividade enzimática no extrato bruto, menor seria o volume a ser concentrado e o tempo necessário para atingir-se a atividade desejada no extrato concentrado. Da mesma forma, Rodríguez-Fernández *et al.* (2012), estudaram a extração de poligalacturonases de cultivo sólido e observaram que a razão S/L de 1/20 apresentou a maior atividade por volume de solvente. De acordo com esses autores, a concentração da atividade enzimática é o melhor critério para avaliar a etapa de extração, o que leva à redução no consumo de tempo e energia no processo de recuperação.

4.3.2 Pré-tratamento do extrato enzimático com carvão ativado

Com o objetivo de observar a possível remoção de pigmentos produzidos durante o processo fermentativo e de algumas proteínas, avaliou-se o tratamento do extrato enzimático bruto com carvão ativado.

Na Tabela 11, pode ser observado que com o aumento da concentração de carvão ativado (0 a 60 g/L), houve diminuição nos valores de absorvância e proteína. No presente estudo, mesmo com o aumento da concentração de carvão ativado, não houve variação significativa na atividade de pectinases totais. Porém, com a redução da concentração total de proteínas, a atividade específica e o fator de purificação aumentaram. Em trabalho recente, Dey *et al.* (2014), observaram alta purificação de poligalacturonases (38,4 x), porém apenas 69,8% de recuperação da atividade após o tratamento da solução pectinolítica com 10 g/ml de carvão ativado. Nakkeeran *et al.* (2010), utilizando 5 g/L de carvão ativado, mostraram que 83% de compostos corantes foram removidos sem perda significativa de atividade de PG. No trabalho de Silva *et al.* (2007), resultado similar foi encontrado com a utilização de caolin (40 g/L) no tratamento de extrato pectinolítico, com remoção de 71% da proteína total, porém com perda de atividade de 16%.

Tabela 11 – Efeito das diferentes concentrações de carvão ativado na atividade de pectinases totais e proteína.

Carvão ativado (g/L)	Abs. 630 nm	Proteína (mg/mL)	Atividade de PT (U/ml)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de purificação
0	0,259	0,241	13,9	57,0	-
1	0,117	0,195	14,0	71,8	1,25
5	0,072	0,197	15,5	77,9	1,36
10	0,062	0,190	15,2	80,7	1,41
20	0,043	0,206	13,9	67,5	1,18
40	0,039	0,161	13,7	85,1	1,49
60	0,024	0,167	14,7	88,0	1,54

Abs. – absorvância; PT – pectinases totais.

Analisando-se os resultados, a concentração de 5 g/L de carvão ativado, que permitiu que 72% da absorvância e 24% de proteína fossem removidos, foi a condição escolhida para tratar o caldo enzimático antes das etapas subsequentes envolvendo microfiltração e ultrafiltração. Outro motivo da escolha dessa concentração de carvão

ativado foi a maior facilidade para a remoção do produto presente no extrato líquido após o tratamento.

4.3.3 Definição do protocolo de concentração do extrato pectinolítico

Na etapa de concentração do extrato enzimático por ultrafiltração, três protocolos foram testados: protocolo 1, nenhum pré-tratamento antes da ultrafiltração (UF); protocolo 2, pré-tratamento por microfiltração (MF) antes da UF; protocolo 3, pré-tratamentos com carvão ativado (CA) e MF antes da UF. O volume de caldo utilizado em cada ensaio de concentração foi de 10 L com fator de concentração volumétrico de aproximadamente 20 vezes. A seguir, os resultados atingidos são discutidos.

4.3.3.1 Influência dos protocolos de concentração no fluxo de permeado

A redução do fluxo de permeado, observado na Figura 22, tanto para MF quanto para UF, é um comportamento típico dos processos de separação por membranas. Van den Berg & Smolders (1990) relatam que as causas para o declínio no fluxo em membranas de UF são os efeitos de polarização por concentração e o *fouling*. O resultado de ambos os fenômenos é a redução no gradiente de força para a filtração ou o aumento da resistência contra o transporte de permeado durante a filtração. Juang *et al.* (2008) observaram declínio no fluxo de permeado de caldo fermentativo de *Bacillus subtilis* e atribuíram este comportamento à adsorção de proteínas, polissacarídeos e peptídeos na parede dos poros.

Observando os resultados obtidos para MF nos protocolos 2 e 3, fica claro o efeito positivo do carvão ativado sobre o processo, com o fluxo de permeado sendo aumentado de 16 para 18 L/m²h e o tempo reduzido de 2,3 h para 1,8 h. Outro efeito positivo foi a remoção de proteínas, a qual aumentou de 9,3% para 11,8%.

A MF, em ambos os protocolos, foi capaz de reduzir a turbidez em torno de 97%. Essa turbidez pode estar relacionada com a presença de polissacarídeos e pigmentos que são extraídos do meio de cultivo juntamente com as enzimas e que poderiam interferir no processo de concentração como descrito por Singh *et al.* (1999). Nakkeeran *et al.* (2008), com o uso de MF (0,45 µm), eliminaram 45% de proteínas e 23% de carboidratos, porém a recuperação da atividade de pectinases foi de apenas 85% enquanto nesse trabalho a recuperação foi acima de 90%.

Os perfis de fluxo da UF nos protocolos 1, 2 e 3 são mostrados na Figura 22-b, em que se observa o efeito positivo dos pré-tratamentos com carvão ativado e/ou

microfiltração na melhora no fluxo de permeado. Os valores de fluxo nos tempos finais do processo, nos protocolos 2 e 3, aumentaram em torno de 2 vezes em relação ao valor de fluxo do protocolo 1. Isso indica que a MF prévia é uma etapa que beneficia o processo de UF, sendo capaz de eliminar partículas em suspensão garantindo maior fluxo e menor tempo de processo.

A retenção da enzima de interesse e de proteínas totais durante a UF foi maior que 99% em todos os protocolos, sendo também possível a remoção em torno de 95% de carboidratos. Nakkeeran *et al.* (2008) relataram rejeição de pectinases de 93% com membrana de 50 kDa. A membrana de 10 kDa parece ter sido apropriada para evitar perdas da enzima na corrente de permeado.

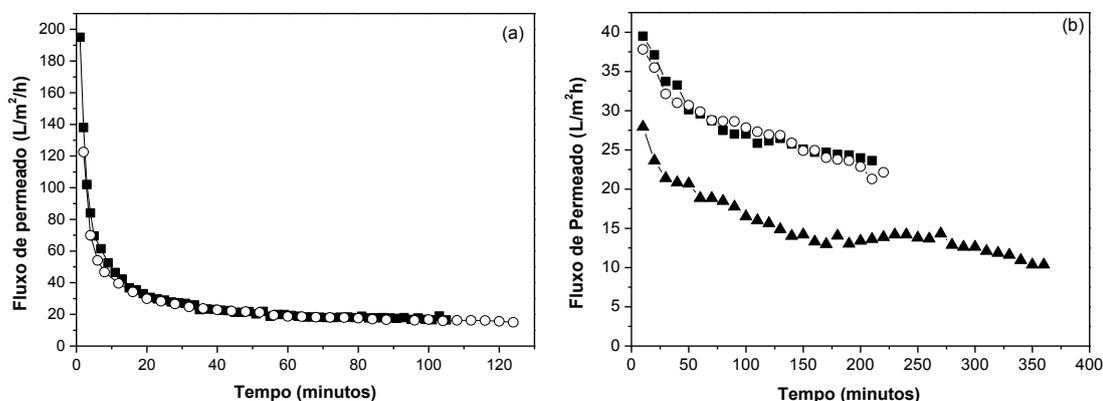


Figura 22 – Fluxo de permeado nos ensaios de microfiltração (a) e ultrafiltração (b): protocolos 1 (▲), 2 (○) e 3 (■).

A Tabela 12 apresenta os valores de fluxo para cada protocolo. O fluxo de água (J_{w1}) para a membrana limpa foi similar nos três protocolos, o que indica que a limpeza química realizada foi eficiente para recuperação total do fluxo.

Tabela 12 – Valores de fluxo de permeado e recuperação de fluxo obtidos durante a ultrafiltração do extrato pectinolítico produzido por *Aspergillus niger* LB-02-SF.

	J_{w1} (L/m ² h)	J_{SE} (L/m ² h)	J_{w2} (L/m ² h)	R_F (%)
Protocolo 1	102	11	28	27
Protocolo 2	102	22	55	54
Protocolo 3	109	24	62	57

J_{w1} – fluxo de água pura inicial; J_{SE} – fluxo de solução enzimática; J_{w2} – fluxo de água pura após o enxágue da membrana; R_F – recuperação de fluxo.

Durante a concentração do caldo, além da resistência oferecida pela membrana, fica claro que algum tipo de resistência é formada, o que diminuiu o fluxo. Entre os protocolos testados, podemos observar que os protocolos 2 e 3 apresentaram valores similares de fluxo de permeado durante a concentração da solução (J_{SE}) e após o enxague (J_{w2}), enquanto o protocolo 1 apresentou os menores valores, o que deve estar relacionado com a maior quantidade de moléculas presentes no extrato devido à MF não ter sido realizada.

O fluxo da membrana reduziu em torno de 78% quando comparados os valores de J_{w1} e J_{SE} para os protocolos 2 e 3, enquanto para o protocolo 1, a redução foi ainda maior, em torno de 89%. Muitos autores sugerem que durante a ultrafiltração de proteínas, ocorra adsorção dessas moléculas na superfície e no interior de poros diminuindo a permeabilidade da membrana (Ehsami *et al.* 1995; Rodríguez-Fernández *et al.* 2013; Shi *et al.* 2014). Chen *et al.* (2008), estudaram o declínio do fluxo durante a UF de caldo fermentativo de surfactina e sugeriram que quando o ponto de corte da membrana é menor ou similar ao tamanho da molécula de interesse, o fluxo é afetado principalmente por variações na superfície da membrana. Wang *et al.* (2012) mostraram que para uma mesma solução de alimentação (caldo fermentativo de ácido succínico) o fluxo de permeado variou dependendo do tamanho de poro e material da membrana. Nesse trabalho, os resultados indicam que para a mesma membrana, o comportamento do fluxo está relacionado com as características da solução de alimentação.

Os efeitos do pré-tratamento do caldo com a MF podem ser observados pelos maiores valores de recuperação do fluxo (R_F) obtidos nos protocolos 2 e 3. A R_F após o enxague da membrana foi de 27% no protocolo 1 e em torno de 55% nos protocolos 2 e 3. Essa menor recuperação de fluxo poderia estar relacionada com uma maior formação de *fouling* devido não ter ocorrido o pré-tratamento do extrato no protocolo 1. Shi *et al.* (2014)

descrevem que o *fouling*, é caracterizado como a matéria presente na solução de alimentação que deixa a fase líquida e se deposita na superfície ou no interior dos poros da membrana. Esses resultados sugerem que os protocolos 2 e 3 tornariam o *scale-up* de concentração da enzima mais atrativo devido ao maior fluxo de permeado e pela provável menor formação de *fouling*.

4.3.3.2 Influência dos protocolos na concentração de pectinases e proteínas durante a ultrafiltração

O efeito de cada protocolo na concentração do extrato pectinolítico é mostrado na Tabela 13, a qual apresenta a síntese dos principais resultados para cada etapa dos protocolos estudados.

Tabela 13 – Síntese dos principais resultados encontrados para os diferentes protocolos aplicados na concentração de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* LB-02-SF.

Protocolo 1									
Etapa	Volume (L)	PT (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de concentração de atividade	Fator de purificação	Fluxo (L/m²/h)	Tempo (h)
Extrato bruto	10	8,5	0,306	27,7	-	-	-	-	-
Ultrafiltração	0,540	93,5	2,54	36,8	59,0	11	1,32	11	6,5
Protocolo 2									
Etapa	Volume (L)	PT (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de concentração de atividade	Fator de purificação	Fluxo (L/m²/h)	Tempo (h)
Extrato bruto	10,55	6,04	0,289	20,9	-	-	-	-	-
Microfiltração	10,02	5,8	0,262	22,1	91,2	0,96	1,05	16	2,25
Ultrafiltração	0,440	107,6	2,29		74,3	17,8	2,24	22	3,5
Protocolo 3									
Etapa	Volume (L)	PT (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de concentração de atividade	Fator de purificação	Fluxo (L/m²/h)	Tempo (h)
Extrato bruto	10	8,5	0,306	27,7	-	-	-	-	-
Carvão ativado	10,3	8,09	0,322	25,1	100	1	0,90	-	2
Microfiltração	10,1	7,7	0,284	27,1	91,4	0,90	0,98	18	1,8
Ultrafiltração	0,409	152,8	2,14	71,4	73,5	18,0	2,57	24	3,4

A Figura 23 mostra o fator de concentração de atividade de pectinases totais e o fator de concentração de proteínas em função do fator de concentração volumétrico na etapa de concentração por UF. Observa-se que nos três protocolos, houve aumento linear do fator de concentração de atividade. Os protocolos 1 e 2 apresentaram comportamentos similares com aumento da atividade de 18,0 e 17,8 vezes ao final do processo, enquanto o protocolo 3 apresentou aumento de apenas 11 vezes. Já o fator de concentração de proteína foi similar nos três protocolos, atingindo aumento entre 7 e 8 vezes. Com esse resultado, fica claro que no protocolo 3 houve perda de atividade enzimática devido a algum tipo de desnaturação, já que o fator de concentração de proteína foi o mesmo nos três protocolos. No caso do protocolo 3, todo o conteúdo que foi extraído do meio sólido acabou sendo concentrado pela membrana. É possível sugerir que a perda de atividade possa estar relacionada com a presença de algum elemento que na forma concentrada possa causar algum efeito de inibição à enzima de interesse ou, ainda, segundo She *et al.* (2009), devido ao fato de o extrato apresentar maior concentração de compostos, os eventos de colisão entre as moléculas desses compostos e as das enzimas de interesse aumentam, provocando algum efeito de desnaturação enzimática.

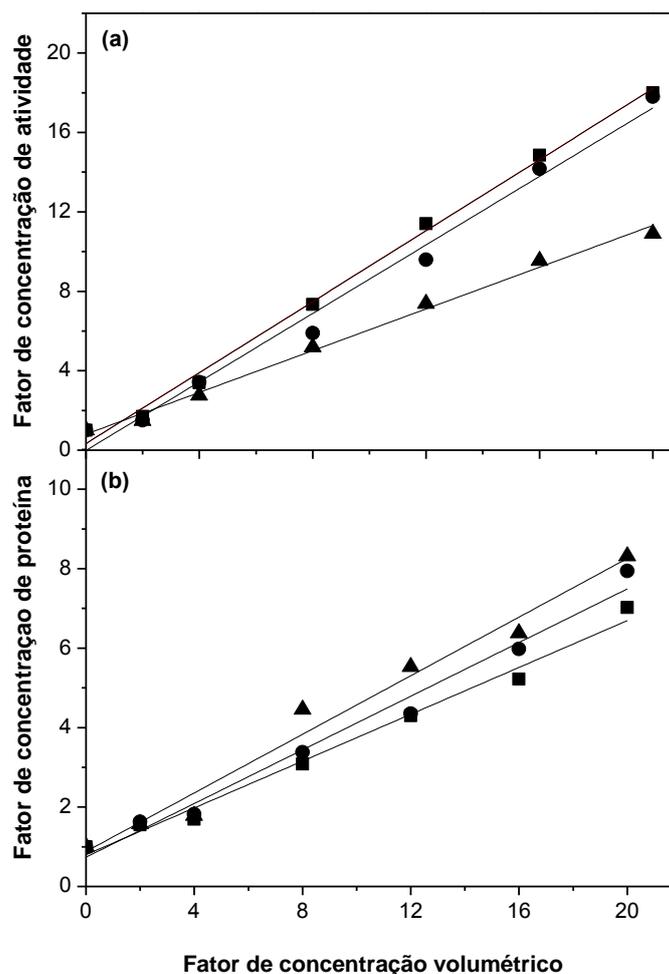


Figura 23 – Perfil do fator de concentração da atividade de pectinases totais (a) e proteína (b) com o aumento do fator de concentração volumétrico para os protocolos 1(▲), 2 (●) e 3 (■).

Através do balanço de massa para sólidos totais, não foram observadas perdas nas correntes de permeado e concentrado, o que indica que a perda de atividade enzimática poderia estar associada a uma provável desnaturação ao longo do processo. Resultado similar foi observado por Rodríguez-Fernández *et al.* (2013), em que fitases foram concentradas por UF com fator de concentração volumétrico de 5x e fator de concentração de atividade de 4,32x. Como a membrana apresentou 99,95% de rejeição e houve perda de 14% na recuperação da enzima, os autores indicam que a perda de atividade é função das forças de cisalhamento causadas pelo processo de concentração. Outros autores também observaram perdas na recuperação de atividade, a qual foi correlacionada com efeitos de

fouling, polarização por concentração e formação de camada gel (Hwang & Sz 2011; Powell & Timperman 2005; Golunski *et al.* 2011).

Em relação ao fator de purificação, o maior valor obtido foi de 2,57 vezes no protocolo 3. Na separação por membranas, o ponto de corte determina a separação das moléculas, ou seja, enzimas e proteínas que apresentem tamanho molecular maior que 10 kDa serão concentradas juntamente com as enzimas de interesse, o que resulta em um baixo grau de purificação. Porém, a pureza necessária ao extrato enzimático depende da aplicação visada para a enzima. No caso das enzimas pectinolíticas, não haveria, a princípio, necessidade de alto grau de pureza, quando usadas no tratamento de sucos de frutas, no qual a presença de outras enzimas (pectinases, celulasas, hemicelulasas, amilases) é benéfica ao tratamento.

4.3.4 Concentração do caldo enzimático para obtenção do extrato destinado à formulação

Nesta etapa do trabalho, o protocolo 3 foi executado devido ao maior fator de concentração de atividade. Na Tabela 14, os resultados de cada etapa do processo de concentração de pectinases totais são apresentados. Como observado, o percentual de recuperação foi menor (69,3) que no ensaio do protocolo 3 (73,5%) mostrado anteriormente. Isso poderia estar relacionado com o maior tempo de processo em que o extrato foi submetido (24 h) em função do maior volume (30 L). O fator de purificação obtido foi de 4,07, superior ao encontrado no ensaio anterior de 2,63 (protocolo 3).

Tabela 14 – Análise das etapas de extração, purificação e concentração do extrato enzimático.

Etapa	Volume (L)	PT (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de concentração de atividade	Fator de purificação
Extrato bruto	31,1	9,01	0,326	27,6	-	-	-
Carvão ativado	30,7	9,17	0,281	32,6	100	1,01	1,18
Microfiltração	30,3	8,7	0,217	40,1	94,1	0,96	1,45
Ultrafiltração	0,293	663	4,063	163	69,3	73,6	5,9

PT – pectinases totais

4.4 Caracterização das enzimas produzidas em meio sólido

4.4.1 Estabilidade frente ao pH

Previamente ao uso de uma preparação enzimática em formulações com aplicações práticas, a estabilidade das enzimas presentes frente a parâmetros essenciais como temperatura e pH deve ser avaliada. Com relação às pectinases totais produzidas por *A. niger* LB-02-SF, Sandri (2010) observaram que as pectinases desta linhagem apresentam estabilidade de cerca de 70% após 150 minutos de exposição à temperatura de 40°C; com respeito ao pH, entretanto, a estabilidade das mesmas enzimas não foi avaliada. Assim, o extrato enzimático bruto foi exposto a diferentes valores de pH, por até 100 h, a 5°C. Esta temperatura foi escolhida de acordo com a recomendação de fornecedores de preparações enzimáticas comerciais. Após este tempo, as atividades foram determinadas nas condições padronizadas de pH e temperatura previamente descritas neste trabalho.

A Figura 24 mostra os resultados destes testes em termos de atividade relativa em pectinases totais. Como já mostrado em outros trabalhos (Gummadi & Panda, 2003; Mohsen *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2011), as pectinases de *A. niger* LB-02-SF se mostraram mais estáveis na faixa de pH ácido. Os resultados estão de acordo com os acima citados, em que as enzimas mantidos em pH 4,0 apresentaram a maior estabilidade em 96 h de ensaio. Já para os pH 7,0 e 8,0, foram observados os menores valores de atividade relativa. O pH do extrato após a etapa de concentração por ultrafiltração foi de aproximadamente 4,5, sendo, portanto, um valor adequado para a posterior formulação.

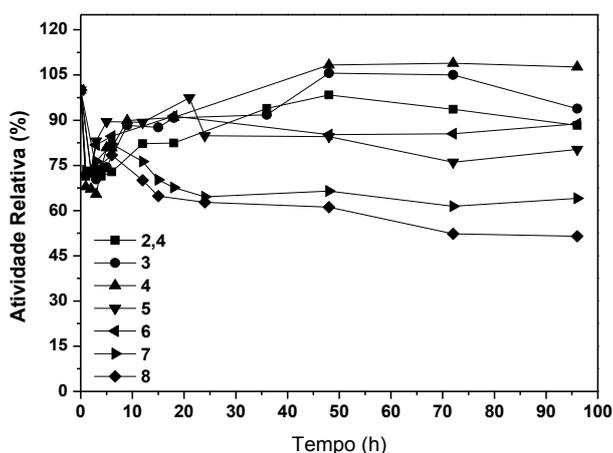


Figura 24 – Efeito do pH e do tempo de pré-incubação sobre a atividade em pectinases totais produzidas por *Aspergillus niger* LB-02-SF.

4.4.2. Influencia do pH e temperatura de reação sobre as enzimas pectinolíticas produzidas

A velocidade de uma reação enzimática é dependente das condições de pH e temperatura, entre outras. A determinação dos valores ideais para estes parâmetros é importante do ponto de vista econômico do processo, já que é possível usar a máxima eficiência da enzima durante a hidrólise enzimática. Para aplicação das pectinases em sucos de frutas, o ajuste dos parâmetros fica limitado apenas à temperatura, já que o pH do suco é natural e não deve ser alterado. Neste caso, a vantagem de utilizar a temperatura ótima durante o processo está no aumento da velocidade de conversão de substrato em produto (Iyer & Ananthanarayan, 2008). No caso do extrato enzimático bruto produzido neste trabalho, o pH e a temperatura de reação das enzimas pectinolíticas foram determinados e os resultados são ilustrados na Figura 25.

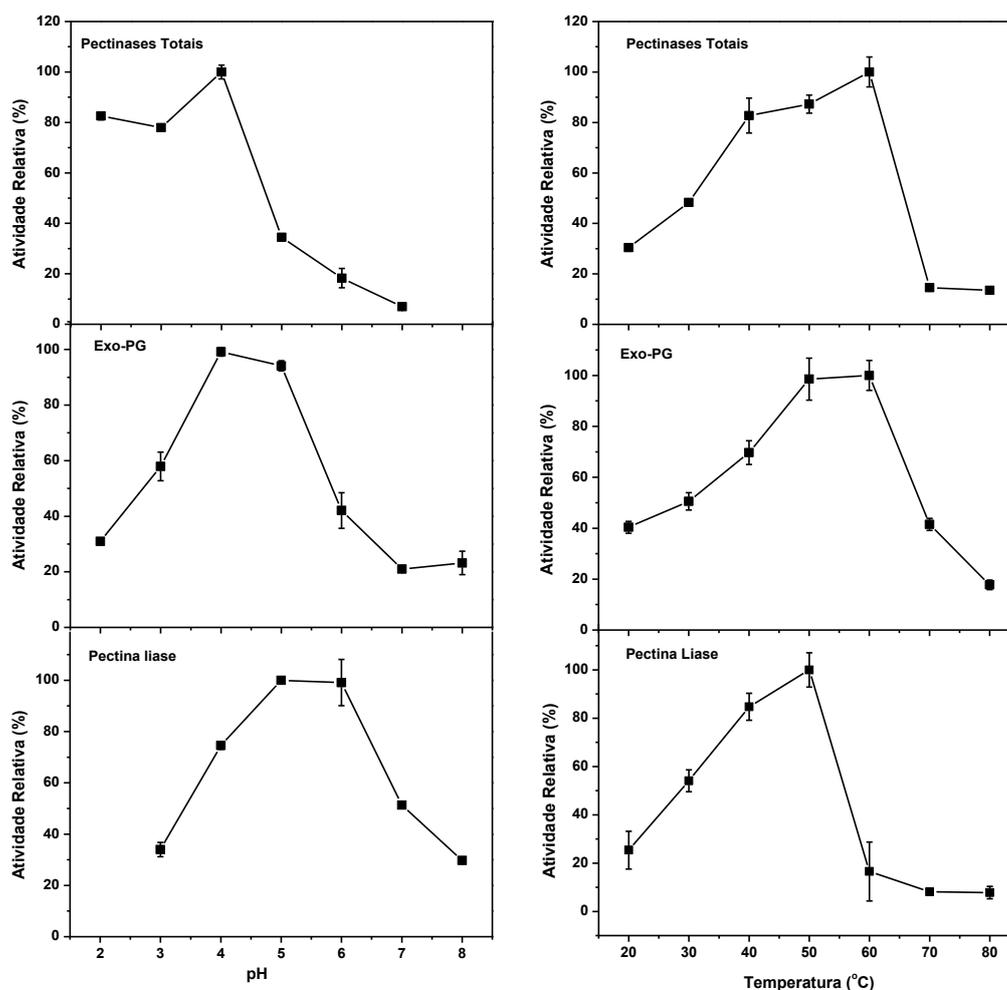


Figura 25 – Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de enzimas pectinolíticas produzidas por *Aspergillus niger* LB-02-SF.

A temperatura e pH de reação das pectinases (pectinases totais, exo-PG e pectina liase), de um modo geral, se encontram na faixa de 50 a 60°C e valores de pH 4,0 a 5,0, respectivamente. Esses valores estão de acordo com os citados acima para as enzimas comerciais, possibilitando a aplicação do extrato experimental no processamento de sucos de frutas, em que as etapas de maceração e clarificação de sucos são conduzidas temperaturas entre 30 e 60°C, conforme relatado por Bon *et al.* (2008).

Muitos estudos apresentam os valores de pH e temperatura ideais para enzimas comercialmente disponíveis. Gonzalez & Rosso (2011) determinaram o pH e a temperatura em que ocorre a maior atividade para as enzimas comerciais Pectinex 100 L Plus e Panzym Clears. Os autores verificaram que, para ambas as enzimas, o pH ideal foi 4,0 e a temperatura 45°C. Acima ou abaixo desses valores, a atividade enzimática diminuiu. Para Ortega *et al.* (2004), o pH ótimo das enzimas comerciais Rapidase C80 e Pectinase CCM foi de 4,0 e para Pectinex 3XL foi de 4,7 enquanto a temperatura de reação onde ocorreu maior atividade foi em torno de 50°C para todas as enzimas. Sandri *et al.* (2011), observaram que para as enzimas comerciais Pectinex Clear e Pectinex Be Color, a temperatura na qual ocorreu a maior atividade enzimática foi 40°C. A ficha técnica das enzimas comerciais usadas neste trabalho, Novozym 33095 e Pectinex Ultra SP-L, apresentam como pH ótimo de reação a faixa de 3,5 a 4,2 e temperatura ótima de 60°C. No trabalho de Sandri *et al.* (2014), o pH e temperatura de reação de endo e exo-PG produzidas por *A. fumigatus* em CSm foram determinados como 4,0 e 5,0 e 50 e 60°C, respectivamente. O que se observa é que as enzimas pectinolíticas fúngicas tem preferência por substratos na faixa de pH 4, que é a faixa do pH natural da grande maioria dos sucos de frutas.

4.5 Definição de formulação enzimática a ser aplicada a sucos de frutas

A pureza necessária a um extrato enzimático depende da aplicação visada para a formulação desenvolvida. No caso das enzimas pectinolíticas a serem utilizadas na maceração e clarificação de sucos de frutas, não haveria, em princípio, necessidade de alto grau de pureza, sendo inclusive conhecido que a presença de enzimas de outros grupos (especialmente celulasas, hemicelulasas e amilases) favorece a ação da formulação.

O produto do processo de recuperação realizado neste trabalho foi uma solução concentrada contendo diferentes enzimas de interesse que servem como ponto de partida para a formulação do produto final. Assim, antes de desenvolver a formulação, as

atividades das diferentes enzimas foram dosadas e comparadas aos valores de atividade encontrados em preparações pectinolíticas comerciais de alta qualidade. Como mostrado na Tabela 15, os títulos de enzimas pectinolíticas no extrato concentrado experimental foram inferiores aos medidos nas preparações comerciais. Por outro lado, considerando-se os níveis de atividade das demais enzimas despolimerizantes, conclui-se que não haveria necessidade de adição dessas enzimas à formulação em desenvolvimento.

Tabela 15 – Atividades enzimáticas presentes no extrato enzimático experimental e em diferentes preparações comerciais.

Preparações enzimáticas	Pectinases (U/mL)				Amilase (U/mL)	Endo-glic (U/mL)	Xilanase (U/mL)	β-glic (U/mL)
	PT	Exo-PG	PME	PL				
Pectinex Ultra SP-L	1662	1302	122,0	736	54	204	2416	18,3
Pectinex Ultra Color	2274	1192	-	544	123	201	2362	-
Ultrazym AFPL	1406	1082	46,0	687	32	405	2382	18,0
Novozym 33095	2530	1844	-	780	166	168	2600	5,0
Zimopec FXY	2977	2230	-	787	30	165	2439	-
Extrato concentrado	663	1060	3,7	352	36	51,6	1224	18,0

PT – pectinases totais; Exo-PG – exo-poligalacturonase; PME – pectina metil esterase; PL – pectina liase; Endo-glicanase; β-glicosidade.

Os menores níveis de atividade encontrados no extrato concentrado comparados em relação aos produtos comerciais podem ser atribuídos a dois fatores: i) a atividade inicial no caldo bruto, que depende do microrganismo e das condições de cultivo; ii) a relação entre o volume de caldo a ser concentrado e o volume final de extrato concentrado, que depende do tamanho da unidade de filtração; ou seja, no caso do caldo enzimático produzido nesse trabalho, um volume maior deveria ser concentrado para atingir maior valor de atividade.

Ao analisarem-se os valores de atividade encontrados, observa-se que os títulos em exo-PG e pectina liase no extrato concentrado foram até 2 vezes menores que nas preparações comerciais, enquanto as pectinases totais apresentaram atividade até 4,5 vezes mais baixa. Por outro lado, a atividade de PME foi significativamente menor que nas preparações comerciais analisadas. Na metodologia de análise de pectinases totais, que se baseia na redução de viscosidade de uma solução de pectina, pode-se considerar que as

pectinases presentes no extrato atuem em conjunto. Porém, em pH 4, no qual a determinação da atividade de pectinases totais foi realizada, a pectina liase apresentou cerca de 70% da sua atividade máxima, como ilustrado anteriormente na Figura 25. Ainda, devido à baixa atividade de PME, as enzimas endo-PG e exo-PG poderiam estar sendo desfavorecidas, contribuindo pouco para a redução de viscosidade. Esses fatores poderiam explicar a menor proporção de pectinases totais no extrato concentrado, de acordo com o mecanismo de ação de cada enzima do complexo pectinolítico, corroborando os relatos de Kashyap *et al* (2001) e Jayani *et al.* (2005). Exo-PG hidrolisa apenas os terminais da cadeia de pectinas, enquanto a endo-PG atua de forma aleatória, contribuindo de forma significativa para a redução de viscosidade. Porém, a ação dessas enzimas é favorecida pela prévia desesterificação da cadeia de pectina devido à ação da enzima PME. As enzimas endo-PG e exo-PG atuam apenas em pectinas de baixo grau de metoxilação, por isso a presença da enzima PME no extrato se faz importante. Porém, a enzima PL é capaz de atuar em pectinas de baixo e alto grau de metoxilação e independe da presença de outras pectinases.

4.6 Avaliação da estabilidade de formulações enzimáticas quanto ao tempo de estocagem

Formulações com diferentes concentrações de glicerol (20, 30, 40 e 50 % m/m) e cloreto de potássio (2% m/m) foram produzidas com o objetivo de avaliar a estabilidade com o tempo de armazenamento (5°C). Os aditivos utilizados e a temperatura de armazenamento foram selecionados com base em fichas técnicas de preparações comerciais disponíveis no mercado (Novozymes®).

As amostras foram analisadas durante 59 semanas, tendo a atividade de pectinases totais como parâmetro de avaliação. A Figura 26 ilustra a variação com o tempo das atividades de pectinases totais na amostra controle e nas formulações contendo glicerol e KCl, expressas em termos de percentagem em relação aos valores medidos no início do teste.

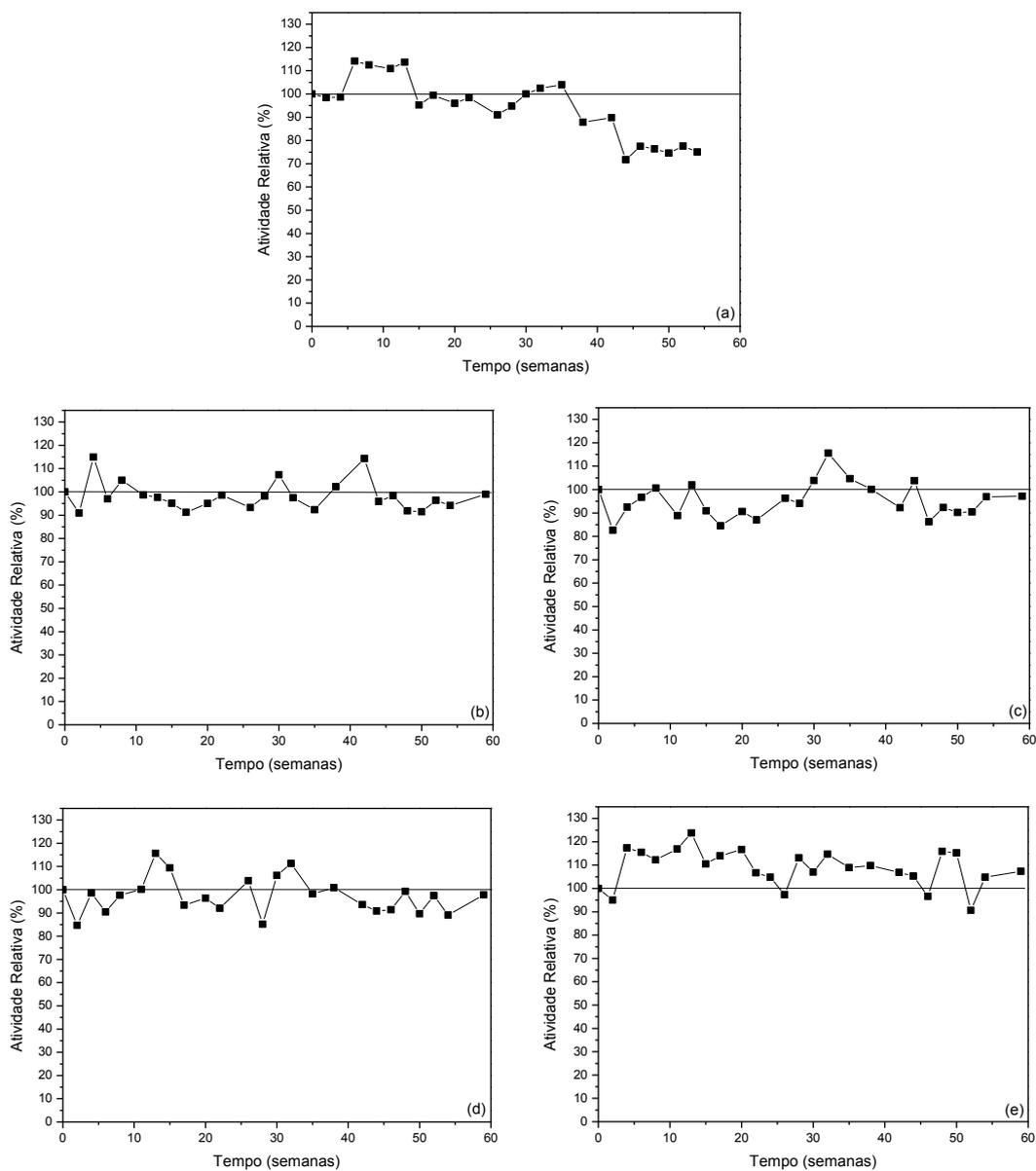


Figura 26 – Atividade relativa de pectinases totais das formulações armazenadas a 5°C durante 59 semanas: (a) amostra controle, (b) 20% de glicerol e (c) 30% de glicerol, (d) 40% de glicerol e (e) 50% de glicerol.

A amostra controle, sem adição de glicerol ou KCl, apresentou conservação da atividade até a 35ª semana. A partir da 38ª semana, esta atividade se reduziu para um valor em torno de 88% e, posteriormente, se manteve em torno de 75% até o encerramento do ensaio. Gomes *et al.* (2011) submeteram o extrato bruto pectinolítico produzido por *A. niger* à temperatura de 4°C, sem qualquer aditivo, e observaram que a atividade inicial de exo-poligalacturonase se manteve por apenas 40 dias, finalizando o ensaio em 70 dias com

apenas 20% de atividade residual. Na amostra controle, foi observada, ainda, a ocorrência de turvação e formação de precipitado, em razão de contaminação por microrganismos. As amostras com adição de glicerol, por outro lado, mantiveram a atividade por todo período do experimento, o que confirma a necessidade da utilização de aditivos para a conservação do extrato e inibição de crescimento microbiano.

As formulações com 20 a 40% de glicerol apresentaram comportamento similar, com atividades em torno de 100% do seu valor original durante as 59 semanas de análise. Já a formulação com 50% de glicerol apresentou incremento na atividade de aproximadamente 10% a partir da 4ª semana de armazenamento, mantendo esse incremento até o final do experimento. Segundo Rodríguez-Fernández *et al.* (2013), o mesmo aumento foi observado para formulação de fitases com 35% de glicerol. Os autores sugerem que um efeito de ativação da enzima ocorre devido à reorganização das cadeias de peptídeos e a estabilização das estruturas ternárias e quaternárias como resultado das forças criadas entre a enzima, o glicerol e a água.

Entre as concentrações de glicerol testadas, a concentração de 20% poderia ser utilizada na formulação, visto que além de reduzir o custo do aditivo empregado, a preparação enzimática seria menos diluída. Ou seja, o volume de armazenamento dentro da unidade de produção seria menor.

4.6.1. Avaliação da estabilidade de formulações enzimáticas quanto à temperatura

A termoestabilidade do extrato concentrado e das formulações foi avaliada nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C por até 180 minutos, tendo a atividade de pectinases totais como parâmetro. Sob essas condições, as amostras contendo diferentes concentrações de glicerol e a amostra controle apresentaram comportamento similar. A Figura 27 mostra as curvas de termoestabilidade para o extrato pectinolítico isento de aditivos e para as amostras com diferentes concentrações de glicerol e 2% de KCl. Os valores médios de atividade relativa para amostras com e sem glicerol foram de aproximadamente 100% a 30°C, 80% a 40°C, 52% a 50°C e 8% a 60°C, após 180 minutos de exposição prévia.

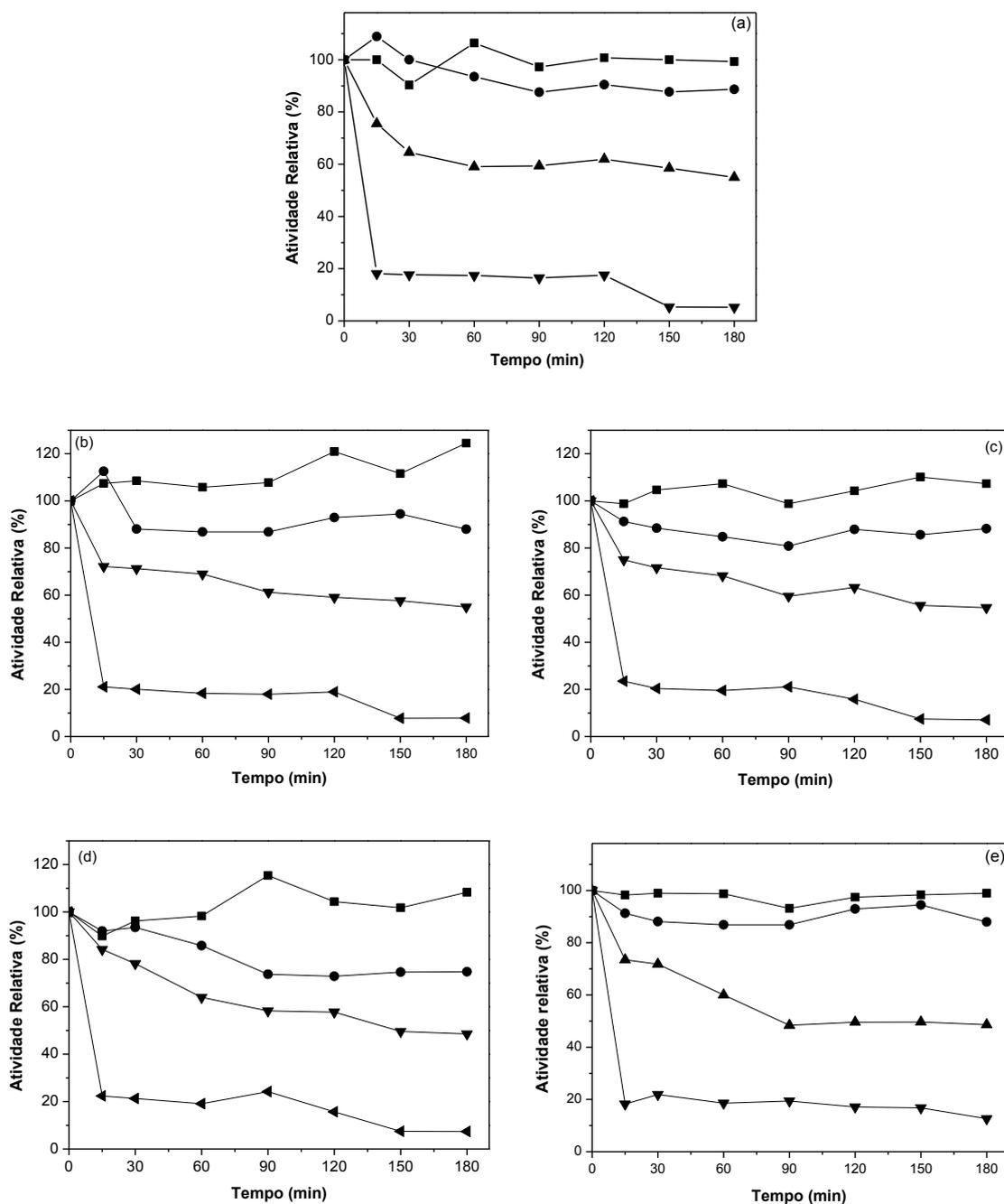


Figura 27 – Efeito da temperatura e do tempo de pré-incubação sobre as pectinases totais presentes no extrato enzimático concentrado (a), 20% de glicerol (b), 30% de glicerol (c), 40% de glicerol (d) e (e) 50% de glicerol nas temperaturas de 30°C (■), 40 °C (●), 50°C (▲) e 60 °C (▼).

A adição de glicerol e KCl ao extrato concentrado não promoveu aumento da termoestabilidade do extrato produzido. Por outro lado, foi observado que o extrato enzimático experimental apresenta estabilidade frente à temperatura superior às observadas

para as preparações comerciais. No caso, Pectinex Ultra SP-L e Novozym 33095, formulações usadas como referências neste trabalho, apresentaram 36 e 51% da atividade inicial após 60 minutos de exposição a 50°C, respectivamente. Nas mesmas condições, o extrato experimental apresentou 65% de atividade relativa. Ortega *et al.* (2004) também avaliou a termoestabilidade de enzimas comerciais e observaram, para as mesma condições (60 min a 50°C), que a preparação Pectinase CCM permaneceu com 57% da atividade inicial, enquanto as enzimas Rapidase C80 e Pectinex 3XL permaneceram com apenas 5 e 10%. Esses resultados são importantes do ponto de vista da aplicação do extrato experimental, já que as etapas do processamento de sucos de frutas, em que as enzimas são adicionadas, podem ser realizadas em temperaturas variadas entre 25 e 60°C (Sagu *et al.*, 2014; Zielinski *et al.*, 2014; Sandri *et al.*, 2013; Pinelo *et al.*, 2010).

4.7 Processamento de suco de frutas por tratamento enzimático

4.7.1 Maceração de suco de uva

O tratamento enzimático no processamento de sucos é uma prática comum. Na etapa de maceração de uvas, por exemplo, as frutas já esmagadas são aquecidas e a preparação enzimática é adicionada (Filho, 2010). As preparações comerciais Pectinex Ultra SP-L® e Novozym 33095 (Novozymes®) foram comparadas à formulação com 50% de glicerol e 2% de KCl, aqui referida como F50, na etapa de maceração do processamento de suco de uva bordô. A Tabela 16 contém informações sobre as preparações comerciais usadas como referência e, também, sobre a formulação experimental F50. A dosagem de cada preparação enzimática foi estipulada com base nos valores de atividade medidos, sendo adicionadas 25 unidades de pectinases para cada 100 g de uva.

Tabela 16 – Características e dosagem das preparações enzimáticas empregadas em ensaios de maceração de uva.

Enzima	PT ^a (U/mL)	Linhagem produtora	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Dosagem (µl/100 g)
F50 ^a	250	<i>A. niger</i>	4	50 – 60	100
Novozym 33095 ^b	2500	<i>A. aculeatus</i> <i>A. niger</i>	3,5 - 4,2	60	10
Pectinex Ultra SP-L ^b	1640	<i>A. aculeatus</i>	3,5 - 4,2	60	15

F50 – formulação experimental com 50% de glicerol; PT – atividade de pectinases totais; a – Dados obtidos em laboratório; b – dados fornecidos na ficha técnica do produto.

A influência das preparações enzimáticas nos parâmetros analisados para o suco de uva obtido é mostrada na Tabela 17. O uso de enzimas, de um modo geral, foi positivo com respeito à redução da viscosidade e da turbidez e ao aumento da clarificação do suco, em comparação com os resultados obtidos com a amostra controle (sem a adição de enzimas).

Redução de viscosidade em torno de 45% foi obtida em relação ao suco controle para todas as preparações enzimáticas testadas. A redução da viscosidade atingida com o tratamento enzimático possibilita maior eficiência em etapas posteriores do processamento, como a filtração por membranas, por exemplo, já que a formação de *fouling* é reduzida e o fluxo de permeado aumentado, como mostrado nos trabalhos de Echavarría *et al.* (2011), Machado *et al.* (2012) e Maktouf *et al.* (2014).

O teor de polifenóis totais encontrado nos sucos tratados com as enzimas comerciais foi reduzido em torno de 20% quando comparado ao suco controle. Já com a formulação experimental F50, não foi constatada diferença significativa no teor de polifenóis em relação ao suco controle. Sandri *et al.* (2013) obtiveram resultados similares utilizando extrato pectinolítico não formulado, produzido pela mesma linhagem de *A. niger* usada neste trabalho, tendo observado teor de polifenóis superior ao obtido pelo produto comercial Pectinex Be Color na clarificação de suco de mirtilo. O resultado obtido com a enzima F50 para o teor de polifenóis totais é muito importante, já que essas substâncias apresentam efeitos de proteção à saúde humana contra diversas doenças devido à presença de compostos antioxidantes (Oszmiański *et al.*, 2011).

Tabela 17 – Parâmetros analisados na etapa de maceração do processamento de suco de uvas tintas.

Enzima	Rendimento (%)	Redução de Viscosidade (%)	Aumento de Clarificação (%)	Redução de Turbidez (%)	Polifenóis Totais (%)
^A N33095	79,1 ± 1,3 ^a	46,4 ± 0,14 ^a	47,8 ± 0 ^a	64,4 ± 2,1 ^{ab}	77,1 ± 88 ^b
^B Pectinex	77,3 ± 0,3 ^b	44,9 ± 0,07 ^a	19,7 ± 0,02 ^b	68,8 ± 4,6 ^a	81,3 ± 310 ^b
F50	74,2 ± 0,3 ^b	42,0 ± 0,01 ^a	27,8 ± 0,02 ^b	53,3 ± 3,4 ^b	110,0 ± 358 ^a

A – Novozym 33095; B – Pectinex Ultra SP-L. F50 – formulação experimental com 50% de glicerol. Dados da amostra controle: rendimento (75,5%), viscosidade (3,43 cp), absorvância (0,403), turbidez (139,3 NTU) e teor de polifenóis (84,3 EAG/100 mL). Os valores correspondem à média de três ensaios. Letras diferentes (a-b) indicam diferença significativa ao nível de 5% (p < 0,05).

4.7.2 Despectinização de sucos de diferentes frutas

Sucos concentrados de diversas frutas são empregados em diferentes produtos da indústria de alimentos. A despectinização de sucos se faz necessária para garantir a estabilidade e a qualidade do produto durante o armazenamento. Para os ensaios de despectinização, os sucos de maçã, uva rosada e amora foram utilizados. A dosagem de enzima adicionada seguiu a mesma proporção descrita na Tabela 16, considerando 100 g de suco.

Como observado na Figura 28, a adição do extrato experimental F50 aos três sucos em teste apresentou efeitos estatisticamente semelhantes aos encontrados nos ensaios com as enzimas comerciais para a turbidez, a viscosidade e a clarificação. De acordo com Pinelo *et al.* (2010), a clarificação dos sucos tratados enzimaticamente se deve ao efeito das pectinases sobre as substâncias pécicas as quais são degradadas em pequenas frações que tendem a se aglomerar e precipitar.

A despectinização do suco de maçã com a preparação experimental apresentou em torno de 80% de redução de turbidez, 45% de redução de viscosidade e 80% de aumento na clarificação. A despectinização do suco de uva rosada mostrou resultados numericamente similares ao do suco de maçã, não apresentando diferença significativa em relação às preparações comerciais de referência. Sandri *et al.* (2013) avaliaram o efeito da enzima comercial Pectinex Clear na clarificação de suco de maçã a 40°C por 60 minutos e obtiveram 40% de redução de viscosidade, 80% de redução de turbidez e aumento de 70% na clarificação.

O suco de amora apresentou cerca de 40% de redução de viscosidade e 50% de redução de turbidez; porém, não foi possível detectar aumento na clarificação. Wang *et al.* (2009) avaliaram a maceração de amoras a 45°C por 2 horas com diversas enzimas comerciais, entre elas Pectinex SP-L também utilizada nesse trabalho. Os autores observaram redução de turbidez de 59% e aumento de clarificação de 28%. Apesar de as enzimas terem sido usadas em etapas diferentes, esses dados evidenciam o bom desempenho da preparação experimental.

O conteúdo de polifenóis totais nos sucos foi avaliado para a amostra controle e após o tratamento enzimático. Como observado, o uso da formulação F50 não afetou significativamente o nível de polifenóis totais quando comparado com as enzimas comerciais.

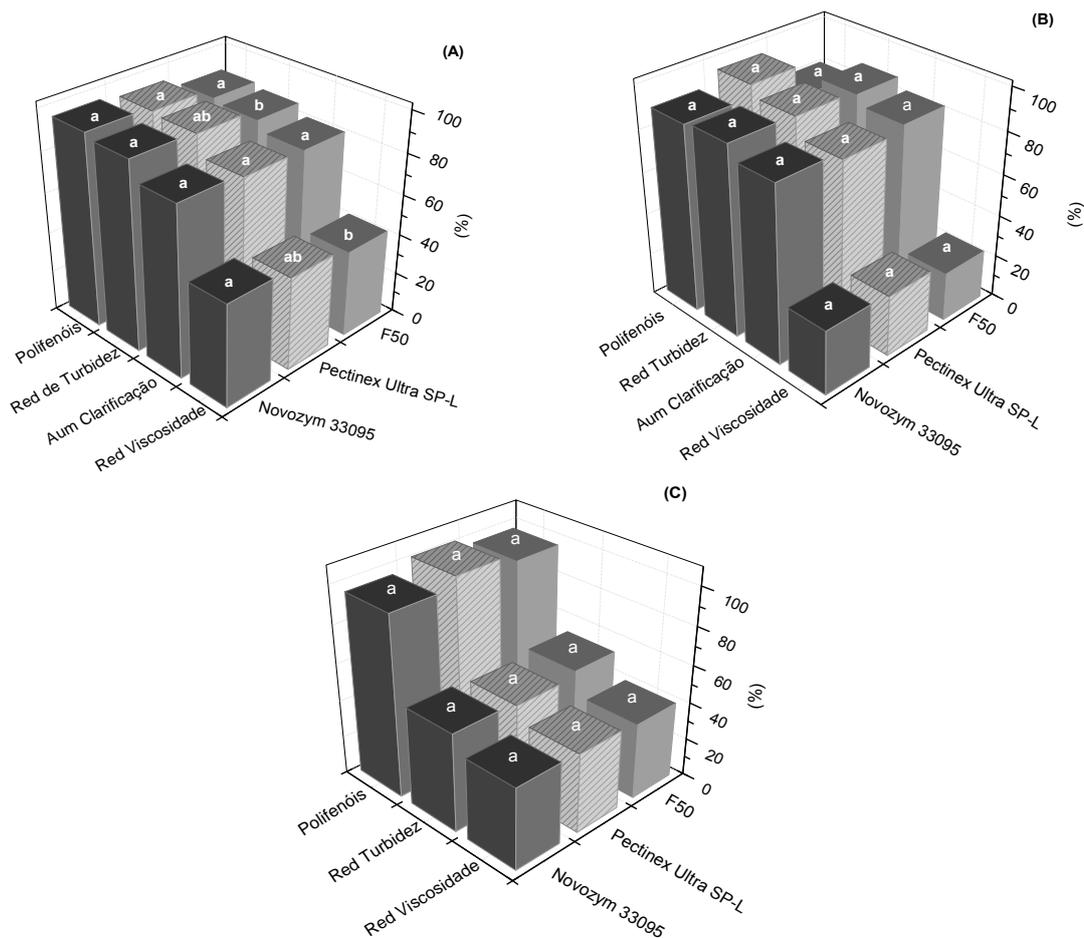


Figura 28 – Efeito do tratamento enzimático na preservação do teor de polifenóis totais, redução da turbidez e da viscosidade e aumento da clarificação de sucos de maçã (A), uva rosada (B) e amora (C). Preparações enzimáticas comerciais (Novozym 33095 e Pectinex Ultra SP-L) e F50 - formulação experimental com 50% de glicerol. Dados da amostra controle são mostrados no Anexo 5. Letras diferentes (a-b) indicam diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$). Os valores correspondem à média de três ensaios.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os estudos desenvolvidos neste trabalho propiciaram um delineamento do processo de produção de extrato enzimático pectinolítico concentrado – incluindo a formação das enzimas em meio sólido por *A. niger* LB-02-SF, em biorreator de tambor rotativo, e a sua concentração em sistema de ultrafiltração – a ser aplicado na formulação de um produto enzimático utilizado na obtenção de sucos de frutas clarificados. Os resultados alcançados em escala de bancada podem ser úteis para um possível escalonamento do processo até os níveis de planta piloto e industrial.

Analisando-se os resultados de uma forma mais específica, as conclusões listadas a seguir foram formuladas.

- Os resultados encontrados em ensaios estático e agitado, com 30 e 50% do volume de ocupação do biorreator, mostraram que a agitação proporcionada pelo sistema favorece a produção de pectinases e o crescimento fúngico quando uma maior massa de meio é utilizada. Com 70% de ocupação do volume do reator, tanto a produção quanto o crescimento são prejudicados, provavelmente em razão da insuficiente aeração do meio.
- A redução do intervalo entre eventos de agitação de 120 para 60 minutos, com 70% de ocupação do reator, resulta em crescimento celular semelhante, mas em menor produção enzimática, sugerindo a ocorrência de repressão da formação de pectinases pelo oxigênio.
- O controle da temperatura do meio em níveis favoráveis ao crescimento fúngico leva à redução de produção de enzimas, com efeito contrário sendo observado quando se permite a elevação natural da temperatura do cultivo.
- De um modo geral, os dados indicam que, até certo ponto, condições de estresse para o microrganismo são as mais indicadas para a produção. No caso, uma combinação de alta temperatura do cultivo (45°C) e valores intermediários do volume de ocupação do biorreator (50%) e do fluxo específico de ar (0,54 LkgM) resulta na melhor condição de formação de pectinases.
- Com respeito à extração de pectinases do meio sólido, o uso de razão sólido / líquido (água pH 4,0) de 1/10, temperatura de 20°C e tempo de 15 minutos, sob agitação, permite a recuperação de 81% da atividade enzimática. Maiores volumes de solvente levam a maior recuperação, mas o extrato enzimático obtido torna-se excessivamente diluído, o que levaria a um maior tempo no processo de

concentração por ultrafiltração, além da geração de um maior volume efluente na corrente de permeado.

- Pré-tratamentos do extrato bruto com carvão ativado e microfiltração promovem remoção de proteínas e turbidez em torno de 10 e 97%, respectivamente, favorecendo a ultrafiltração, com aumento na recuperação da atividade de 59 para 74% e redução do tempo de concentração de 6,5 para 3,5 h em comparação ao extrato sem pré-tratamento.
- A caracterização do extrato enzimático concentrado com relação às enzimas presentes (pectinases, celulases, hemicelulases e amilases) e ao pH (4) e à temperatura ideais de reação (50 a 60°C) indicam que esta preparação atende aos requisitos necessários para aplicação no processamento de sucos de frutas.
- Quanto às formulações enzimáticas, todas as concentrações de glicerol testadas (20 a 50% m/m), se mostram capazes de conservar a atividade pectinolítica por períodos superiores a um ano. Na ausência de conservantes, ocorre perda de atividade e contaminação microbiana. Entre as concentrações testadas, a formulação com 20% de glicerol seria suficiente para a conservação da preparação enzimática sob refrigeração, levando a redução do custo do produto e do volume de armazenamento devido à menor diluição.
- Quando comparada a preparações comerciais de alta qualidade, em procedimentos de maceração e clarificação, visando à obtenção de sucos de diferentes frutas, a formulação experimental com 50% m/m de glicerol e 2% m/m de KCl apresenta resultados similares com respeito a parâmetros como redução de turbidez e viscosidade, aumento da clarificação e teor de polifenóis totais, indicando claramente o seu potencial para aplicação em processos industriais.

Como perspectivas para continuidade da pesquisa, sugere-se o aprofundamento dos estudos com respeito à produção de pectinases com a ampliação da escala do biorreator de tambor rotativo. Sabe-se que a ampliação de escala de biorreatores de cultivo em estado sólido apresenta grandes desafios relacionados às condições de transferência de massa e calor, devido à grande espessura do leito de meio. Adicionalmente, novas geometrias do reator poderiam ser testadas.

Com relação à recuperação das enzimas, são apontadas como perspectivas o estudo de aspectos como:

- uso de extrações sucessivas e a utilização de colunas de extração com o objetivo de aumentar a atividade do extrato bruto;
- determinação do tamanho molecular das enzimas presentes nos extratos por eletroforese para determinar o ponto de corte molecular ideal da membrana de ultrafiltração;
- otimização das condições de utilização do sistema de ultrafiltração quanto a parâmetros como pressão de operação e velocidade do fluxo transmembrana;
- avaliação da reutilização do volume de permeado proveniente da etapa de ultrafiltração na extração das enzimas do cultivo em estado sólido.

No estudo da formulação, aspectos como a utilização de tampões na conservação da atividade, concentrações menores de glicerol e a presença de sais como aditivos poderiam ser avaliadas.

Adicionalmente, outras frutas podem ser avaliadas nas etapas de maceração e clarificação em tempo e temperaturas diferentes das utilizadas nesse trabalho, para estabelecer as melhores condições de aplicação da formulação enzimática desenvolvida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidoo, K.E.; Hendry, R.; Wood, B.J. (1981). Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 12: 6-9.
- Albersheim, P. (1966). Pectin lyase from fungi. **Methods Enzymol.** 8: 628-631.
- Alkorta, I.; garbisu, C.; Llama, M.J.; Serra, J.L. (1997). Industrial applications of pectic enzymes: review. **Process Biochem.** 33: 21-28.
- Bailey, M.J.; Biely, P.; Poutanen, K. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.** 23: 257-270.
- Bansal, N.; Tewari, R.; Gupta, J.K.; Soni, R.; Soni, S.K. (2011). A novel strain of *Aspergillus niger* producing a cocktail of hydrolytic depolymerising enzymes for the production of second generation biofuels. **BioResource.** 6: 552-569.
- Barrios-González, J. (2012). Solid-State fermentation: Physiology of soli medium, its molecular basis and applications. **Process Biochem.** 47: 175-185.
- Berovič, M.; Ostroveršnik, H. (1997). Production of *Aspergillus niger* pectolytic enzymes by soli state bioprocessing of apple pomace. **J. Biotechnol.** 53: 47-53.
- Bhargav, S.; Panda, B.P.; Ali, M.; Javed, S. (2008). Solid-state fermentation: an overview. **Chem. Biochem. Eng. Q.** 22: 49-70.
- Bhat, M.K. (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.** 18: 355-383.
- Bohdziewicz, J.; Bodzek, M. (1994). Ultrafiltration preparation of pectinolytic enzymes from citric acid fermentation broth. **Process Biochem.** 29: 99-107.
- Bon, E.P.S.; Pereira Jr., N.; Gottschalk, L.M.F.; Sá-Pereira, P.; Roseiro, J.C.; Ferrara, M.A. (2008). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** Rio de Janeiro: Editora Interciência, 506 p.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 205, de 14 de novembro de 2006. Aprova o regulamento técnico sobre enzimas e preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano. **Disponível (online)** <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/97817a8045a964aa9d5a9fa9166895f7/Resolucao+RDC+n+205+de+14+de+novembro+de+2006.pdf?MOD=AJPERES> (15 de janeiro de 2015).
- Brijwani, K.; Oberoi, H.S.; Vadlani, P.V. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochem.** 45: 120-128.

- Brijwani, K.; Vadlani, P.V.; Hohn, K.L.; Maier, D.E. (2011). Experimental and theoretical analysis of a novel deep-bed solid-state bioreactor for cellulolytic production. **Biochem. Eng. J.** 58-59: 110-123.
- Castilhos L.R.; Medronho, R.A.; Alves, T.L.M. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.** 71: 45-50.
- Castro, A.M.; Castilho, L.R.; Freire, D. (2015). Performance of a fixed-bed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration for the production of hydrolases by *Aspergillus awamori*. **Biochem. Eng. J.** 93: 303-308.
- Chahal, D.S. (1985). Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 74: 135-159.
- Chan, R.; Chen, V. (2004). Characterization of protein fouling on membranes: opportunities and challenges. **J. Membr. Sci.** 242: 169-188.
- Charcosset, C. (2006). Membrane processes in biotechnology: an overview. **Biotechnol. Adv.** 24: 482-492.
- Chen, H-L.; Chen, Y-S.; Juang R-S. (2008). Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting-out and membrane filtration process. **Sep. Purif. Technol.** 59: 244-252.
- Chen, H-Z.; Xu, J.; Li, Z-H. (2005). Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. **Biochem. Eng. J.** 23: 117-122.
- Cheryan, M. (1998). **Ultrafiltration and microfiltration**: handbook. 2.ed. Boca Raton, E.U.A.: CRC Press, 527 p.
- Chutmanop, J.; Chuichulcherm, S.; Chisti, Y.; Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in soli-state fermentation using agroindustrial substrates. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 83: 1012-1018.
- Combo, A.M.M.; Aguedo, M.; Goffin, D.; Wathelet, B. (2012). Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations: Review. **Food Bioprod. Process.** 90: 588-596.
- Cruz-Guerrero, A.; Bárzana, E.; García-Garibay, M.; Gómez-Ruiz, L. (1999). Dissolved oxygen threshold for the repression of endo-polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochem.** 34: 621-624.
- Damáσιο, A.R.L.; Maller, A.; Silva, T.M.; Jorge, J.A.; Terenzi, H.F.; Polizeli, M.L.T.M. (2011). Biotechnological potential of alternative carbon source for production of pectinases by *Rhizopus microspores* var. *rhizopodiformis*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 54: 141-148.
- Datta, D.; Bhattacharjee, S.; Nath, A.; Das, R.; Bhattacharjee, C.; Datta,S. (2009). Separation of ovalbumin from chicken egg white using twostage ultrafiltration technique. **Sep. Pur. Technol.** 66: 353-361.

- Demir, H.; Tari, C. (2014). Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. **Ind. Crops Prod.** 54: 302-309.
- Devi, N.A.; Rao, A.G.A. (1996). Fractionation, purification and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. **Enz. Microb. Technol.** 18: 59-65.
- Dey T.B., Adak, S., Bhattacharya, P. Banerjee, R. (2014). Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. **LWT – Food Sci. Technol.** 59: 591-595.
- Díaz, A.B.; Alvarado, O.; Ory, I.; Caro, I.; Blandino, A. (2013). Valorization of grape pomace and orange peels: Improved production of hydrolytic enzymes for the clarification of orange juice. **Food Bioprod. Process.** 91: 580–586.
- Díaz, A.B.; Bolívar, J.; Ory, I.; Caro, I.; Blandino, A. (2011). Applicability of enzymatic extracts obtained by solid state fermentation on grape pomace and orange peels mixtures in must clarification. **LWT- Food Sci. Technol.** 44: 840-846.
- Díaz, A.B.; Caro, I.; Ory, I.; Blandino, A. (2007). Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolytic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. **Enz. Microb. Technol.** 41: 302-306.
- Dinu, D.; Nechifor, M.T.; Stoian, G.; Costache, M. Dinischiotu, A. (2007). Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. **J. Biotechnol.** 131: 128-137.
- ^bDSM. **Disponível (online)** <http://www.centerchem.com/Products/category/apple-and-pear-processing/> (05 de fevereiro de 2015).
- ^aDSM. **Disponível (online)** <http://www.oenobrand.com/files/PDF/Rapidase/Liquid-Enzymes/Rapidase-Vino-Super-L-Product-Data-Sheet-EN.pdf> (05 de fevereiro de 2015).
- Durand, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 113-125.
- Duvetter, T.; Loey, A.V.; Smout, C.; Verlent, I.; Nguyen, L.B.; Hendrickx, M. (2005). *Aspergillus aculeatus* methylsterase: study of the inactivation by temperature and pressure and the inhibition by pectin methylsterase inhibitor. **Enz. Microb. Technol.** 36: 385-390.
- Echavarría, A.P.; Torras, C.; Pagán, J.; Ibarz, A. (2011). Fruit juice processing and membrane technology application. **Food Eng. Rev.** 3:136-158.
- Ehsani N.; Nyström M.; Ojamo H.; Siika-aho, M. (1996). Separation of enzymes produced by *Trichoderma reesei* with hydrophobic ultrafiltration membranes. **Process Biochem.** 31: 253-263.
- Endozym Active. **Disponível (online)** <http://www.aeb-group.com/or4/or?uid=aeb.main.index&oid=196032> (02 de fevereiro de 2011).

- European Comission. (2002). **Final Report: Collection of Information on Enzymes.** Austria.
- Fawole, O.B.; Odunfa, S.A. (2003). Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **Int. Biodeterior Biodegr.** 52: 223-227.
- FDA, Food and Drug Administration. (2002). GRAS Notices. **Disponível (online)** http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&id=89&sort=GRN_No&order=DESC &startrow=1&type=basic&search=pectinase. (15 de janeiro de 2015).
- Figuroa-Montero, A.; Esparza-Isunza, T.; Saucedo-Castañeda, G.; Huerta-Ochoa, S.; Gutiérrez-Rojas, M.; Favela-Torres, E. (2011). Improvement of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 86: 1321-1321.
- Filho, W. G.V. **Bebidas não alcoólicas: ciência e tecnologia.** São Paulo: E. Blücher, 2010. 385 p.
- Fontana, R.C. (2004). Estudo da produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido. **Dissertação de Mestrado.** Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul.
- Fontana, R.C.; Polidoro, T.A.; Silveira, M.M. (2009). Comparison of stirred tank and air-lift bioreactors in the production of poligalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresour. Technol.** 100: 4493-4498.
- Fontana, R.C.; Silveira, M.M. (2012). Influence of pectin, glucose and pH on the production of endo- and exo-polygalacturonase activities by *Aspergillus oryzae* in liquid medium. **Braz. J. Chem. Eng.** 29: 683-690.
- Fontana, R.C.; Salvador, S.; Silveira, M.M. (2005). Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 32: 371-377.
- Gasiorek, E. (2008). Effect of operating conditions on biomass growth during citric acid production by solid-state fermentation. **Chem. Pap.** 62: 141-146.
- Gervais, P.; Molin, P. (2003). The role of water in soli-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 85-101.
- Ghildyal, N.P.; Ramakrishna, M.; Lonsane, B.K.; Karanth, N.G.; Krishnaiah, M. (1993). Temperature variations and amyloglucosidase levels at different bed depths in a solid state fermentation system. **Chem. Eng. J.** 51:B17-B23.
- Ghose, T.K. (1987). Measurement of cellulose activities. **Pure Appl. Chem.**59: 257-268.
- Golunski, S.; Astolfi, V.; Carniel, N.; Oliveira, D.; Di Luccio, M.; Mazutti, M.A.; Treichel, H. (2011). Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. **Sep. Pur. Technol.** 78: 261-265.

- Gomes, J.Z.; Cence, K.; Toniazzo, G.; Treichel, H.; Valduga, E. (2011). Evaluation of production and characterization of polygalacturonases by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food Bioprod. Process.** 89: 281-287.
- Gonzales, S.L.; Rosso, N.D. (2011). Determination of pectin methylesterase activity in commercial pectinases and study of the inactivation kinetics through two potentiometric procedures. **Ciênc. Tecnol. Alim.** 31: 412-417.
- Grassin, C.; Fauquembergue, P. (1996). Application of pectinases in beverages. **Progress Biotechnol.** 14: 453-462.
- Gougouli, M.; Koutsoumanis, K.P. (2010). Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. **Int. J. Food Microbiol.** 140: 254-262.
- Gummadi, S.N.; Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochem.** 38: 987-996.
- Heerd, D.; Yegin, S.; Tari, C.; Fernandez-Lahore, M. (2012). Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* ssp. In solid-state fermentation: A comparative study. **Food Bioprod. Process.** 90: 102-110.
- Hendges, D.H.; Montanari, Q.; Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2011). Production and characterization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* in solid-state fermentation in double-surface bioreactor. **Brazilian Arch. Biol. Technol.** 54: 253-258.
- Hölker, U.; Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Curr. Opin. Microbiol.** 8: 301-306.
- Hwang, K-J.; Sz, P-Y. (2011). Membrane fouling mechanism and concentration effect in cross-flow microfiltration of BSA/dextran mixtures. **Chem. Eng. J.** 166: 669-677.
- Ibravin. Avaliação Setorial 2013. Disponível (online) <http://www.ibravin.org.br/public/upload/statistics/1384784021.pdf> (09 de fevereiro de 2015).
- Iyer, P.V.; Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochem.** 43: 1019-1032.
- Jacob, N.; Poorna, A.A.; Prema, P. (2008). Purification and partial characterization of poligalacturonase from *Streptomyces lydicus*. **Bioresour. Technol.** 99: 6697-6701.
- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochem.** 40: 2931-2944.
- Jen, J. J.; Robinson, M. L. P. (1984). Pectolict enzymes in sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **J. Food Sci.** 49: 1085-1087.
- Johnston, I.R. (1965). The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. **Biochem. J.** 96: 651-658.

- Juang, R.; Chen, H.; Chen, Y. (2008). Membrane fouling and resistance analysis in dead-end ultrafiltration of *Bacillus subtilis* fermentation broths. **Sep. Pur. Technol.** 63: 531-538.
- Kalogeris, E.; Iniotaki, F.; Topakas, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B.J. (2003). Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. **Bioresour. Technol.** 86: 207-213.
- Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.** 77:215-227.
- Khanahmadi, M.; Roostaazad, R.; Mitchell, D.A.; Miranzadeb, M'; Bozorgmehri, R.; Safekordi, A. (2006). Bed moisture estimation by monitoring of air stream temperature rise in packed-bed solid-state fermentation. **Chem. Eng. Sci.** 61: 5654-5663.
- Krstić, D.M.; Antov, M.G.; Peričin, D.M.; Höflinger, W.; Tekić, M.N. (2007). The possibility for improvement of ceramic membrane ultrafiltration of an enzyme solution. **Biochem. Eng. J.** 33:10-15.
- Kumar, A.; Venkatesu, P. (2012). Overview of the stability of α -chymotrypsin in different solvent media. **Chem. Rev.** 112: 4283-4307.
- Kumar, R. (2009). Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability. **Arch. Biochem. Biophys.** 491: 1-6.
- Kumar, S.S.; Palanivelu, P. (1999). Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 15: 643-646.
- Kwon, Y-J.; Wang, F.; Liu, C-Z. (2011). Deep-bed solid state fermentation of sweet sorghum stalk to ethanol by thermotolerant *Issatchenkia orientalis* IPE 100. **Bioresour. Technol.** 102: 11262-11265.
- Laaksonen, O.; Sandell, M.; Nordlund, E.; Heiniö, R.L.; Malinen, H.L.; Jaakkola, M.; Kallio, H. (2012). The effect of enzymatic treatment on blackcurrant (*Ribes nigrum*) juice flavor and its stability. **Food Chem.** 130: 31-41.
- Ladisich, M.R.; Willson, R.C.; Painton, C-d.; Builder, S.E. (1989). **Protein purification from molecular mechanism to large-scale process**, American Chemical Society, Washington, DC, USA.
- Lagemaat, J. van.; Pyle, D.L. (2001). Solid-state fermentation and bioremediation: development of a continuous process for the production of fungal tannase. **Chem. Eng. J.** 84: 115-123.
- Landbo, A.-K.; Meyer, A.S. (2004). Effects of different enzymatic maceration treatments on enhancement anthocyanins and other phenolic in black currant juice. **Innov. Food Sci Emerg. Technol.** 5: 503-513.
- Lea, A. G. H. (1998). Enzymes in production of beverages and fruit juices. In: **Enzymes in Food Processing**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 223-249.

- Lemes, A.C.; Machado, J.R.; Brites, M.L.; Di Luccio, M.; Kalil, S.J. (2014). Design strategies for integrated β -galactosidase purification processes. **Chem. Eng. Technol.** 37: 1805-1812.
- Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schimidell, W. (2001). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo. Editora Edgard Blucher Ltda., v.3. 593 p.
- Lütz, S.; Rao, N.N.; Wandrey, C. (2006). Membranes in Biotechnology. Review. **Chem. Eng. Technol.** 12: 1404-1415.
- Machado, R.M.D.; Haneda, R.N.; Trevisan, B.P.; Fontes, S.R. (2012). Effect of enzymatic treatment on the cross-flow microfiltration of açai pulp: Analysis of the fouling and recovery of phytochemical. **J. Food Eng.** 113: 442-452.
- Maciel, M.H.C.; Ottoni, C.A.; Herculano, P.N.; Porto, T.S.; Porto, A.L.F.; Santos, C.; Lima, N.; Moreira, K.A.; Souza-Motta, C. (2014). Purification of polygalacturonase produced by *Aspergillus niger* using an aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilib.** 371: 125-130.
- Maiorano, A.E. (1982). Influência da concentração de inóculo e da temperatura na produção de enzimas amilolíticas por cultivo de *Aspergillus niger* em meio semi-sólido. **Dissertação de Mestrado**. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, SP.
- Maiorano, A.E. (1990). Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. **Tese de doutorado**. Instituto de Pesquisas Tecnológicas. São Paulo.
- Maktouf, S.; Neifar, M.; Drira, S.J.; Baklouti, S.; Fendri, M.; Châabouni, S.E. (2014). Lemon juice clarification using fungal pectinolytic enzymes coupled to membrane ultrafiltration. **Food Bioprod. Process.** 92: 14-19.
- Maldonado, M.C.; Saad, A.M.S. (1998). Production of pectinesterase and poligalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and soli-state systems. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 20: 34-38.
- Malvessi, E. (2000). Estudo de produção de poligalacturonases por *Aspergillus oryzae* em processo submerso. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul.
- Malvessi, E.; Silveira, MM. (2004). Influence of médium composition and pH on the production of poligalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 47: 693-702.
- Martin, N. (2006). Isolamento de Linhagens Fúngicas Termofílicas Produtoras de Pectinases Termoestáveis: Produção, Caracterização e Purificação Parcial da Poligalacturonase. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual Paulista. Rio Claro.
- Martínez-Trujillo, A.; Arrenguin-Rangel, L.; García-Rivero, M.; Aguilar-Osorio, G. (2011). Use of fruit residues for pectinases production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. **Let. Appl. Microbiol.** 53: 202-209.

- Martino, K.G.; Paul, M.S.; Pegg, R.B.; Kerr, W.L. (2013). Effect of time-temperature conditions and clarification on the total phenolics and antioxidant constituents of muscadine grape juice. **LWT - Food Sci. Technol.** 53: 327-330.
- Meien, O.F.; Luz Jr., L.F.L.; Mitchell, D.A.; Pérez-Correa, J.R.; Agosin, E.; Fernández-Fernández, M.; Arcas, J.A. (2004). Control strategies for intermittently mixed, forcefully aerated solid-state fermentation bioreactors based on the analysis of a distributed parameter model. **Chem. Eng. Sci.** 59: 4493-4504.
- Meneghel, L.; Reis, G.P.; Reginatto, C.; Malvessi, E.; Silveira, M.M. (2014). Assessment of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. **Process Biochem.** 49: 1800-1807.
- Meng, H.; Cheng, Q.; Li, C. (2014). Polyacrylonitrile-based zwitterionic ultrafiltration membrane with improved anti-fouling capacity. **Appl. Surf. Sci.** 303: 399-405.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, **Anal. Chem.** 31: 426-428.
- Minjares-Carranco, A.; Trejo-Aguilar, B.A.; Aguilar, G.; Viniegra-González, G. (1996). Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. **Enz. Microb. Technol.** 21: 25-31.
- Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Stuart, D.M.; Pandey, A. (2000). New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochem.** 35: 1211-1225.
- Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Berovic, M. (2006). **Solid-state fermentation bioreactors. Fundamentals of design and operation.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mohsen, S.M.; Bazaraa, W.A.; Doukani, K. (2009). Purification and characterization of *Aspergillus niger* U-86 polygalacturonase and its use in clarification of pomegranate and grape juices. In: 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture. **Anais.** p 805-817. Egito, 2009.
- Nagai, S. (1979). Mass and energy balances for microbial growth kinetics. **Adv. Biochem. Eng.** 11: 49-83.
- Nakkeeran, E. Subramanian, R., Umesh Kumar, S. (2008). Improving specific activity of *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase using polymeric membranes. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 151: 233-243.
- Nakkeeran, E.; Gowthaman, M.K.; Umesh-Kumar, S.; Subramanian, R. (2012). Techno-economic analysis of processes for *aspergillus carbonarius* polygalacturonase production. **J. Biosci. Bioeng.** 113: 634-640.
- Nakkeeran, E.; Subramanian, R.; Umesh-Kumar, S. (2010). Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of *Aspergillus carbonarius*. **J. Biosci. Bioeng.** 109: 101-106.

Nakkeeran, E.; Umesh-Kumar, S.; Subramanian, R. (2011). *Aspergillus carbonarius* polygalacturonases purified by integrated membrane process and affinity precipitation for apple juice production. **Bioresour. Technol.** 102: 3293:3297.

NCBE, National Center of Biotechnology Education. (2000). Enzymes in fruit juice production. **Disponível (online)** <http://www.ncbe.reading.ac.uk/ncbe/protocols/inajam/pdf/jam01.pdf> (07 de outubro de 2014).

Noor Enzymes. Downstream Processing. **Disponível (online)** <http://www.enzyme-india.com/downstream.html> (09 de fevereiro de 2015).

^aNovozymes. **Disponível (online)** <http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/Pectinex%20Ultra%20SPL%20PDS.pdf> (05 de fevereiro de 2015).

^bNovozymes. **Disponível (online)** http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.sinerji-as.com%2Ffiles%2F3c45b7b2-4e2a-4e16-abd7-c89acd7bab6c.pdf&ei=KJLTVKfZCbb_sATnw4K4Aw&usg=AFQjCNGK8oKzhM-cIVEzBaoITdvJu9aezw (05 de fevereiro de 2015).

^cNovozymes. **Disponível (online)** <http://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CDkQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.sinerji-as.com%2Ffiles%2F24bbade8-c753-4827-8888-5b441b1a1d2d.pdf&ei=3ZPTVIywL7XASL7oHgDw&usg=AFQjCNF7Qu8fTu8PPK0UHgMU8Cxnrci83g> (05 de fevereiro de 2015).

^dNovozymes. **Disponível (online)** <http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/Pectinex%20Ultra%20Mash%20PDS.pdf> (05 de fevereiro de 2015).

^eNovozymes. **Disponível (online)** <http://www.process.gr/pdf/NZ33095PDSen.pdf> (05 de fevereiro de 2015).

Ó'Fágáin C. (2003). Enzyme stabilization – recent experimental progress. Review. **Enz. Microbiol. Technol.** 33: 137-149.

Ortega, N.; Diego, S.; Perez-Mateos, M; Busto, M.D. (2004). Kinetic properties and thermal behavior of polygalacturonase used in fruit juice clarification. **Food Chem.** 88: 209-217.

Oszmiański, J.; Wojdyło, A.; Kolniak, J. (2011). Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. **Food Chem.** 127: 623-631.

Palacios-Cabrera, H.; Taniwaki, M.H.; Hashimoto, J.M.; Menezes, H.C. (2005). Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. **Braz. J. Microbiol.** 36: 24-28.

Pandey, A. (2003). Solid-State fermentation. **Biochem. Eng. J.** 13: 81-84.

- Patil, S.R.; Dayanand, A. (2006). Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Bioresour. Technol.** 97: 2340–2344.
- Pedrolli, D.B.; Monteiro, A.C.; Gomes, E.; Carmona, E.C. (2009). Pectin and Pectinases: Production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **Open Biotechnol. J.** 3: 9-18.
- Pessoa Jr, A. Kilikian, B.V. (2005). **Purificação de produtos biotecnológicos.** Manole. São Paulo.
- Pinelo, M.; Zeuner, B., Meyer, A. (2010). Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. **Food Bioprod. Process.** 88: 259-265.
- Pinto, M.H. (2008). Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos da agroindústria. **Dissertação de Mestrado.** Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande.
- Placek, V.; Vacek, K.; Kás, J.; Demnerova, K.; Zidkova, J.; Sajdok, J. (2005). Application of ionizing radiation for the satabilisation of *Trichoderma viride* cellulases. **Czech J. Food Sci.** 23: 111-115.
- Plaza, L.; Duvetter, T.; Van der Plancken, I.; Meersman, F.; Loey, A.V.; Hendrickx, M. (2008). Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectinmehtylesterase. **Food Chem.** 111: 912-920.
- Polidoro, T.A. (2009). Desenvolvimento de biorreator de tambor rotativo em escala de bancada. **Dissertação de Mestrado.** Universidade de Caxias do sul. Caxias do Sul.
- Polidoro, T.A.; Silveira, M. M.; Gelain, L. (2009). **Dispositivo de tambor rotativo.** Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, MU8901075-2.
- Powell, M.J.; Timperman, A.T. (2005). Quantitative analysis of protein recovery from dilute, large volume samples by tangential flow ultrafiltration. **J. Membr. Sci.** 252: 227-236.
- Prabhakar, A.; Krishnaiah, K.; Janaun, J.; Bono, A. (2005). An overview of engineering aspects of solid state fermentation. Review Article. **Malaysian J. Microbiol.** 12: 10-16.
- Prado, F.C.; Vandenberghe, L.P.S.; Soccol, C.R. (2005). Relation between citric acid production by soli-state fermentation from cassava bagasse and respiration of *Aspergillus niger* LPB 21 in semi-pilot scale. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 48: 29-36.
- Ranganna, S. (1977). **Manual of analysis of fruit and vegetable products.** New Delhi: McGraw-Hill, p. 634.
- Reu, J.C.; Zwieterinh, M.H.; Rombouts, F.M.; Nout, M.J.R. (1993). Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. **App. Microbiol. Biotechnol.** 40: 261-265.

- Rocky-Salimi, K.; Hamidi-Esfahani, Z. (2010). Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. **Food Bioprod. Process.** 88: 61-66.
- Rodríguez-Fernández, D.E.; (2009). Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Rodríguez-Fernández, D.E.; León, J.A.R.; Carvalho, J.C.; Karp, S.G.; Parada, J.L.; Soccol, C.R. (2012). Process development to recover pectinases produced by solid-state fermentation. **Bioprocess. Biotechnol.** 2: 2-7.
- Rodríguez-Fernández, D.E.; Parada, J.L.; Medeiros, A.B.P.; Carvalho, J.C.; Lacerda, L.G.; Rodríguez-Léon, J.A.; Soccol, C.R. (2013). Concentration by ultrafiltration and stabilization of phytase produced by solid-state fermentation. **Process Biochem.** 48:374-379.
- Rodríguez-Fernández, D.E.; Rodríguez-Leon, J.A.; Carvalho, J.C.; Sturm, W.; Soccol, C.R. (2011). The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresour. Technol.** 102: 10657-10662.
- Rodríguez-Jasso, R.M.; Mussato, S.I.; Sepúlveda, L.; Agrasar, A.T.; Pastrana, L.; Aguilar, C.N.; Teixeira, J.A. (2013). Fungal fucooidanase production by solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor using algal biomass as substrate. **Food Bioprod. Process.** 91: 587-594.
- Röhm. **Disponível (online)** http://www.amazongroup.com.br/site/produtos/rohapect_10L.pdf (05 de fevereiro de 2015).
- Ruíz, H.A.; Rodríguez-Jasso, R.M.; Rodríguez R.; Contreras-Esquivel, J.C.; Aguilar, C.N. (2012). Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. **Biochem. Eng. J.** 60: 90-95.
- Sagu, S.T.; Nso, E.J.; Karmakar, S.; De, S. (2014). Optimisation of low temperature extraction of banana juice using commercial pectinase. **Food Chem.** 151: 182-190.
- Sandri, I.G. (2010). Enzimas pectinolíticas; seleção de linhagens fúngicas produtoras, caracterização e aplicação em processo da indústria de alimentos, **Tese de Doutorado.** Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul.
- Sandri, I.G.; Fontana, R.C.; Barfknecht, D.M.; Silveira, M.M. (2011). Clarification of fruit juices by fungal pectinases, **LWT – Food Sci. Technol.** 44: 2217-2222.
- Sandri, I.G., Lorenzoni, C.M.T., Fontana, R.C., Silveira, M.M. (2013). Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice, **LWT – Food Sci. Technol.** 51: 459-475.
- Sandri, I.G.; Fontana, R.C., Silveira, M.M. (2014). Influence of pH and temperature on the production of poligalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. **LWT – Food Sci. Technol.** 61: 430-436.

- Schmidell, W.; Lima, V. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (2001). **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blucher Ltda. Vol. 2. 593 p.
- Scott, K. **Handbook of industrial membranes**. 1.ed. Oxford: Elsevier Advanced Technology, USA, 1995.
- Scotti, C.T.; Vergoignan, C.; Feron, G.; Durand, A. (2001). Glucosamine measurements as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grow in solid state cultivations conditions. **Biochem. Eng. J.** 7: 1-5.
- Shanley, N.A.; van den Broek, L.A.M.; Voragen, A.G.J.; Coughlan, M.P. (1993). Isolation and characterization of an endopolygalacturonase from *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Biotechnol.** 28:179-197.
- Sharma, N.; Rathore, M.; Sharma, M. (2012). Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Rev. Environm. Sci. Biotechnol.** 12: 45-60.
- She, Q.; Tang, C. Y.; Wang, Y-N.; Zhang, Z. (2009). The role of hydrodynamic conditions and solution chemistry on protein fouling during ultrafiltration. **Desalination** 249: 1079-1087.
- Shi, X.; Tal, G.; Hankins, N.P.; Gitis, V. (2014). Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review, **J. Water Process. Eng.** 1: 121-138.
- Siebert, K.J.; Troukhanova, N.V.; Lynn, P.Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. **J. Agric.Food Chem.** 44: 80-85.
- Sigma – Aldrich. Enzymes for Alternative Energy Research. **Disponível (online)** www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/enzymes-for-aer.html#pectinas_pectolyase_pectinesterase (07 de outubro de 2014).
- Silva, D. Martins, E.S., Leite, R.S.R., Silva, R. Ferreira, V., Gomes, E. (2007). Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid- state fermentation. **Process Biochem.** 42: 1237-1243.
- Silva, D. Martins, Tokuioshi, K.; Martins, E.S.; Silva, R.; Gomes, E. (2005). Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochem.** 40: 2885-2889.
- Singh, S. A.; Ramakrishna, M.; Rao, A.G. A. (1999). Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. **Process Biochem.** 35: 411- 417.
- Singhania, R.R.; Patel, A.K.; Soccol, C.R.; Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 44:13-18.
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A.Jr. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Vitic.** 16: 144-158.
- Soccol, C.; Vandenberghe, L.P.S. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochem. Eng. J.** 13: 205-218.

- Somogy, M.Z. (1988). Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** 95: 267-272.
- Spagna G.; Pifferi, P.G. (1994). The purification of a commercial pectinlyase from *Aspergillus niger*. **Food Chem.** 50: 343-349.
- Stuart, D.M.; Mitchell, D.A.; Johns, M.R.; Litster, J.D. (1999). Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors: Operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. **Biotechnol. Bioeng.** 63: 383-391.
- Takaç, S.; Elmas, S.; Çalik, P.; Özdamar, T. (2000). Separation of the protease enzymes of *Bacillus licheniformis* from the fermentation medium by crossflow ultrafiltration. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 75: 491-499.
- Taragano, V.M.; Pilosof, A.M.R. (1999). Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in soli-state and submerged fermentation. **Enz. Microb. Technol.** 25: 411-419.
- Thomas, L.; Larroche, C.; Pandey, A. (2013). Current developments in soli-state fermentation. **Biochem. Eng. J.** 81: 146-161.
- Ulbricht, M. (2006). Advanced functional polymer membranes, **Polymer**, 47: 2217–2262.
- Van den Berg, G.B.; Smolders, C.A. (1990). Flux decline in ultrafiltration processes. **Desalination** 77: 101-133.
- Vaseghi, Z.; Najafpour, G.D.; Mohseni, S.; Mahjoub, S. (2013). Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: solid state fermentation in a tray bioreactor. **Int. J. Food Sci. Technol.** 48: 283-289.
- Wang, C.; Li, Q.; Tang, H.; Yan, D.; Zhou, W.; Xing, J.; Wan, Y. (2012). Membrane fouling mechanism in ultrafiltration of succinic acid fermentation broth. **Bioresour. Technol.** 116: 366-371.
- Wang, W-D.; Xu, S-Y.; Jin, M-K. (2009). Effects of different maceration enzymes on yield, clarity and anthocyanin and other polyphenol contents in blackberry juice. **Int. J. Food Sci. Technol.** 44: 2342-2349.
- Whitehurst, R.J.; Oort, M. V. (2010). **Enzymes in Food Technology**. 2nd edition. p. 245. John Wiley & Sons. New Delphi.
- Wojciech, B.; Celińska, E.; Dembczyński, R.; Szymanowska, D.; Nowacka, M.; Jesionowski, T.; Grajek, W. (2013). Cross-flow microfiltration of fermentation broth containing native corn starch. **J. Membr. Sci.** 427: 118-128.
- Yadav, S.; Dubey, A.K.; Anand, G.; Yadav, D. (2013). Purification and characterization of pectin lyase secreted by *Aspergillus flavus* MTCC 10938. **Appl. Biochem. Microbiol.** 49: 400-405.
- Yadav, S.; Yadav, P.K.; Yadav, D.; Yadav, K.D.S. (2009). Pectin lyase: a review. **Process. Biochem.** 44: 1-10.

- Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and others stress. **J. Exp. Biol.** 208: 2819-2830.
- Yapo, B.M. (2011). Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins-A new hypothetical model. Review. **Carbohydr. Polym.** 86: 373-385.
- Yonn, L.W.; Ang, T.N.; Ngoh, G.C.; Chua, A.S.M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulose production. **Biomass Bioenergy** 67: 319-338.
- Zabriskie, D.W.; Humphrey, D.W. (1978). Real-time estimation of aerobic batch fermentation biomass concentration by component balancing. **AIChE J.** 24: 138-146.
- Zhang, C.; Li, Z.; Peng, X.; Jia, Y.; Zhang, H.; Bai, Z. (2009). Separation, purification and characterization of three endo-polygalacturonases from a newly isolated *Penicillium oxalicum*. **Chinese J. Process Eng.** 9: 244-249.
- Zhu, B-h.; Chen, P. (1993). The industrial application of ultrafiltration membranes. **Desalination** 90: 119-126.
- Zielinski, A.A.F.; Alberti, A.; Braga, C.M.; Silva, K.M.; Canteri, M.H.G.; Mafra, L.I.; Granato, D.; Nogueira, A.; Wosiacki, G. (2014). Effect of mash maceration and ripening stage of apples on phenolic compounds and antioxidant power of cloudy juices: A study using chemometrics. **LWT - Food Sci. Technol.** 57: 223-229.

ANEXO 1 – Concentração celular em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo

Tabela 1 – Concentrações de biomassa medidas durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator sem agitação (estático), fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e diferentes volumes de ocupação.

Volume de ocupação					
30%		50%		70%	
Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)
0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
21	23,7 ± 0,0	22	25,27 ± 4,1	22	19,7 ± 4,5
24	26,0 ± 12,2	24	30,8 ± 5,2	24	31,8 ± 6,4
26	45,2 ± 5,4	28	39,5 ± 0,0	28	39,2 ± 6,6
30	73,0 ± 5,0	30	47,4 ± 3,8	30	89,3 ± 0,5
42	105,4 ± 9,8	46	77,9 ± 15,7	46	93,6 ± 1,8
48	128,2 ± 1,7	48	80,9 ± 15,2	48	93,6 ± 1,8
52	135,2 ± 4,0	54	89,6 ± 11,5	52	99,9 ± 3,3
54	138,5 ± 6,8	70	105,8 ± 10,6	55	100,5 ± 0,0
70	144,3 ± 2,1	72	107,1 ± 9,6	70	115,8 ± 5,4
72	147,8 ± 7,7	78	117,8 ± 0,0	72	116,7 ± 5,6
76	142,5 ± 4,6	94	117,8 ± 4,9	76	117,3 ± 5,3
78	150,5 ± 2,7	96	119,2 ± 4,1	78	116,4 ± 5,0
94	141,7 ± 2,8			94	109,2 ± 1,0
96	126,4 ± 7,0			96	109,4 ± 0,8

Tabela 2 – Concentrações de biomassa medidas durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 70%, fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e diferentes intervalos entre as agitações.

Intervalos entre as agitações (minutos)					
120		90		60	
Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)
0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
22	21,6 ± 0,0	18	12,7 ± 0,0	22	8,0 ± 3,2
24	35,9 ± 10,1	24	23,1 ± 10,2	24	9,5 ± 3,7
30	40,4 ± 8,8	28	47,5 ± 0,0	28	11,9 ± 5,1
42	66,1 ± 12,1	46	76,5 ± 7,1	30	50,0 ± 4,4
44	80,0 ± 0,0	48	86,4 ± 11,2	48	53,9 ± 3,9
48	101,3 ± 14,6	66	96,4 ± 8,7	52	69,0 ± 2,2
50	105,6 ± 15,4	70	115,7 ± 0,2	55	79,3 ± 6,6
66	117,9 ± 3,2	72	118,1 ± 2,2	70	114,1 ± 19,0
72	118,3 ± 0,0	76	119,8 ± 3,0	72	116,3 ± 18,7
76	130,6 ± 17,4	94	117,8 ± 0,0	76	124,5 ± 12,2
96	136,4 ± 12,5	96	126,9 ± 13,7	78	125,8 ± 10,1
				94	131,5 ± 10,0
				96	132,3 ± 11,5

Tabela 3 – Concentrações de biomassa medidas durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 30% sem agitação e 50% com agitação, fluxo específico de ar de 0,54 LkgM com controle de temperatura em torno de 34°C.

Volume de ocupação			
30%		50%	
Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)
0	0	0	0 ± 0,0
24	35,0	22	8,6 ± 2,8
28	49,2	26	13,6 ± 0,6
30	59,2	28	16,8 ± 2,2
47	151,0	33	27,0 ± 3,7
49	161,3	46	69,7 ± 8,4
52	175,2	48	79,7 ± 7,9
55	187,4	50	90,7 ± 5,5
71	196,2	54	112,2 ± 10,5
73	190,9	70	176,3 ± 9,5
76	184,3	72	179,8 ± 8,4
96	138,0	76	182,6 ± 4,2
		94	166 ± 10,6
		96	162,0 ± 8,4

Tabela 4 – Concentrações de biomassa medidas durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 30%, intervalo entre as agitações de 120 minutos e diferentes valores de fluxo específico de ar.

Fluxo específico de ar (LkgM)									
0,18		0,36		0,54		0,72		0,90	
Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)
0	0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
22	4,3 ± 0,5	22	5,3 ± 0,7	22,0	22,3 ± 0,8	24	19,6 ± 11,6	22	11,9 ± 3,6
24	5,2 ± 0,0	24	23,3 ± 10,7	24,0	36,8 ± 14,1	26	24,6 ± 15,1	24	13,7 v 4,1
28	9,2 ± 2,4	28	41,0 ± 3,2	26,0	46,1 ± 16,7	28	31,2 ± 17,5	26	15,6 ± 4,0
30	12,6 ± 8,7	30	51,9 ± 0,0	28,0	57,1 ± 18,3	30	38,8 ± 19,7	28	18,1 ± 3,9
48	51,5 ± 17,9	32	62,4 ± 4,7	30,0	82,2 ± 0,0	48	94,3 ± 16,3	30	21,2 ± 5,1
50	62,6 ± 13,0	46	100,5 ± 9,4	46,0	158,3 ± 0,0	50	125,1 ± 0,0	46	55,2 ± 23,0
54	92,8 ± 9,9	48	123,8 ± 16,3	48,0	154,7 ± 21,9	52	103,8 ± 16,9	48	56,6 ± 8,0
72	119,0 ± 8,9	50	133,3 ± 13,4	50,0	166,6 ± 17,7	54	108,2 ± 17,3	50	58,1 ± 4,2
74	122,4 ± 11,3	54	148,6 ± 8,3	52,0	176,4 ± 10,9	56	138,7 ± 0,0	52	69,2 ± 23,1
76	127,2 ± 14,1	56	158,3 ± 0,0	54,0	183,9 ± 12,1	72	126,3 ± 12,7	54	73,2 ± 21,7
78	132,2 ± 17,6	70	171,9 ± 0,0	70,0	234,5 ± 0,0	74	126,6 ± 11,1	70	82,8 ± 12,6
94	159,6 ± 13,4	72	177,0 6,7	72,0	218,4 ± 25,1	76	127,1 ± 19,0	72	89,3 ± 11,4
96	170,9 ± 16,3	74	178,0 ± 7,6	74	220,8 ± 16,0	78	127,2 ± 17,1	76	87,6 ± 7,9
		76	178,1 ± 8,3	76	227,0 ± 6,4	80	126,3 ± 14,8	78	82,9 ± 10,7
		78	178,3 ± 8,6	78	223,8 ± 0,0	96	116,2 ± 18,8	94	85,0 ± 15,6
		96	187,6 ± 6,3	96	222,7 ± 17,			96	84,9 ± 17,6

Tabela 5 – Concentrações de biomassa medidas durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 50%, intervalo entre as agitações de 120 minutos e diferentes valores de fluxo específico de ar.

Fluxo específico de ar (LkgM)									
0,18		0,36		0,54		0,72		0,90	
Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)	Tempo (h)	Biomassa (mg/g)
0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0	0	0,0 ± 0,0
24	10,2 ± 6,1	22	18,2 ± 6,7	22,0	32,2 ± 3,2	22	25,3 ± 4,1	4	0,0 ± 0,0
28	17,3 v 10,3	26	23,6 v 12,0	24,0	39,8 ± 2,3	24	30,8 ± 5,1	22	8,6 ± 2,8
30	23,4 ± 12,6	28	31,0 ± 10,9	28,0	54,2 ± 0,0	28	39,5 ± 0,0	26	13,6 ± 0,6
45	95,7 ± 1,5	46	65,9 ± 20,7	30,0	60,5 ± 0,8	30	47,4 ± 3,8	28	16,8 ± 2,2
47	100,5 ± 8,8	48	68,2 ± 19,3	46,0	84,3 ± 4,7	46	77,9 ± 15,7	33	27,0 ± 3,7
51	121,8 ± 12,9	70	104,4 ± 11,2	48,0	81,6 ± 1,5	48	80,9 ± 15,1	46	69,8 ± 8,4
53	130,4 ± 8,8	74	121,4 ± 3,1	54,0	85,3 ± 1,5	54	89,6 ± 11,5	48	79,7 ± 7,9
55	136,7 ± 11,7	76	121,0 ± 4,0	70,0	83,9 ± 1,3	70	105,8 ± 10,6	50	90,8 ± 5,6
71	169,9 ± 5,9	96	112,7 ± 8,1	72,0	86,3 ± 13,4	72	107,1 ± 9,6	54	112,3 ± 10,5
77	158,6 ± 6,0			78,0	84,3 ± 8,4	78	117,8 ± 0,0	70	176,3 ± 9,5
93	154,2 ± 8,9			93,0	79,4 ± 1,4	94	117,8 ± 4,9	72	179,8 ± 8,4
96	152,6 ± 6,0					96	119,2 ± 4,1	76	182,7 ± 4,2
								94	166,0 ± 10,5
								96	162,0 ± 8,3

ANEXO 2 – Atividade de pectinases totais em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo

Tabela 1 – Valores de atividade de pectinases totais medidos durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator sem agitação (estático), fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e diferentes volumes de ocupação.

Vol. Ocup. (%)	30	50	70
Tempo (h)	Atividade de pectinases totais (U/g)		
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
24	1,8 ± 0,5	4,4 ± 0,4	2,25 ± 0,7
48	83,4 ± 2,7	90,9 ± 1,5	38,8 ± 1,9
72	118,8 ± 18,3	122,8 ± 17,2	99,4 ± 13,0
96	170,8 ± 0,7	119,2 ± 4,1	70,6 ± 4,5

Tabela 2 – Valores de atividade de pectinases totais medidos durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 70%, fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e diferentes intervalos entre as agitações.

Intervalo entre as agitações (minutos)	120	90	60
Tempo (h)	Atividade de pectinases totais (U/g)		
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
24	2,3 ± 0,6	1,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0
48	24,3 ± 6,8	14,8 ± 11,7	5,3 ± 2,5
72	67,2 ± 3,1	70,0 ± 18,7	11,6 ± 1,0
96	70,6 ± 4,6	69,0 ± 8,1	29,8 ± 1,2

Tabela 3 – Valores de atividade de pectinases totais medidos durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 30%, intervalo entre as agitações de 120 minutos e diferentes valores de fluxo específico de ar.

Fluxo de ar (LkgM)	0,18	0,36	0,54	0,72	0,90
Tempo (h)	Atividade de pectinases totais (U/g)				
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
24	1,1 ± 0,5	4,85 ± 0,9	6,8 ± 1,3	2,4 ± 0,7	2,3 ± 0,2
48	21,5 ± 1,1	53,3 ± 9,1	70,5 ± 1,7	44,4 ± 5,5	57,5 ± 1,7
72	56,2 ± 16,7	87,7 ± 11,9	118,6 ± 2,0	97,2 ± 4,9	104,1 ± 8,3
96	77,2 ± 8,7	129,0 ± 6,5	134,6 ± 14,3	100,7 ± 5,0	124,1 ± 3,9

Tabela 4 – Valores de atividade de pectinases totais medidos durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 50%, intervalo entre as agitações de 120 minutos e diferentes valores de fluxo específico de ar.

Fluxo de ar (LkgM)	0,18	0,36	0,54	0,72	0,90
Tempo (h)	Atividade de pectinases totais (U/g)				
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
24	2,1 ± 1,0	1,4 ± 0,5	1,0 ± 0,1	1,9 ± 0,4	1,76 ± 0,1
48	12,1 ± 3,4	19,2 ± 3,2	19,6 ± 2,1	27,9 ± 0,5	27,4 ± 1,8
72	74,3 ± 16,6	75,1 ± 2,6	79,2 ± 3,7	75,1 ± 1,7	73,1 ± 20,4
96	70,6 ± 20,4	115,0 ± 17,7	178,2 ± 15,5	136,2 ± 15,4	117,0 ± 18,1

ANEXO 3 – Concentração de substrato em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo

Tabela 1 – Concentrações de substrato medidas durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 30%, intervalo entre as agitações de 120 minutos e diferentes valores de fluxo específico de ar.

Fluxo de ar (LkgM)	0,18	0,36	0,54	0,72	0,90
Tempo (h)	Concentração de substrato (mg/g)				
0	465,7 ± 24,5	465,5 ± 156,3	462,4 ± 14,0	517,8 ± 91,9	418,4 ± 20,6
24	415,7 ± 52,0	418,3 ± 98,7	347,8 ± 7,6	378,9 ± 23,1	333,3 ± 27,7
48	202,6 ± 27,4	270,3 ± 13,9	276,5 ± 62,3	274,2 ± 22,0	269,3 ± 26,5
72	170,2 ± 6,3	223,1 ± 20,0	194,0 ± 47,3	202,4 ± 16,8	245,6 ± 38,3
96	166,8 ± 1,2	178,7 ± 3,4	143,5 ± 25,0	182,3 ± 2,2	203,5 ± 14,1

Tabela 4 – Concentrações de substrato medidas durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 30%, intervalo entre as agitações de 120 minutos e diferentes valores de fluxo específico de ar.

Fluxo de ar (LkgM)	0,18	0,36	0,54	0,72	0,90
Tempo (h)	Concentração de substrato (mg/g)				
0	375,4 ± 29,8	439,1 ± 21,4	423,2 ± 12,0	367,4 ± 10,6	360,8 ± 12,1
24	298,4 ± 18,3	352,8 ± 10,7	347,1 ± 11,7	314,5 ± 8,0	273,6 ± 21,2
48	194,1 ± 3,5	263,5 ± 13,2	277,5 ± 21,1	285,7 ± 20,6	27,4 ± 1,8
72	136,6 ± 8,3	137,8 ± 14,5	194, ± 3,7	216,4 ± 11,7	185,5 ± 15,7
96	94,1 ± 13,7	110,0 ± 17,7	104,5 ± 9,9	112,3 ± 4,8	115,4 ± 18,1

ANEXO 4 – Umidade do meio em cultivos conduzidos em biorreator de tambor rotativo

Tabela 1 – Valores de umidade medidos durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator sem agitação (estático), fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e diferentes volumes de ocupação.

Vol. Ocup. (%)	30	50	70
Tempo (h)	Umidade (%)		
0	54,3 ± 0,9	54,1 ± 2,8	55,2 ± 0,1
24	56,1 ± 0,1	55,1 ± 0,5	51,2 ± 2,9
48	56,2 ± 0,6	57,2 ± 0,1	55,2 ± 0,9
72	56,5 ± 0,5	59,2 ± 0,4	57,5 ± 0,8
96	65,0 ± 2,1	61,8 ± 2,3	58,5 ± 3,8

Tabela 2 – Valores de umidade medidos durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 70%, fluxo específico de ar de 0,54 LkgM e diferentes intervalos entre as agitações.

Intervalo entre as agitações (minutos)	120	90	60
Tempo (h)	Umidade (%)		
0	53,8 ± 1,2	54,2 ± 2,1	53,0 ± 1,0
24	52,3 ± 0,2	54,6 ± 0,2	53,5 ± 1,8
48	55,9 ± 5,3	50,8 ± 0,0	55,5 ± 2,0
72	59,0 ± 0,3	63,7 ± 1,5	57,1 ± 3,7
96	70,9 ± 3,9	63,8 ± 3,9	62,6 ± 1,4

Tabela 3 – Valores de umidade medidos durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 30%, intervalo entre as agitações de 120 minutos e diferentes valores de fluxo específico de ar.

Fluxo de ar (LkgM)	0,18	0,36	0,54	0,72	0,90
Tempo (h)	Umidade (%)				
0	53,1 ± 2,7	53,5 ± 2,1	54,5 ± 0,3	55,8 ± 1,7	55,1 ± 0,2
24	54,9 ± 2,5	54,5 ± 0,7	56,8 ± 1,1	55,9 ± 1,3	56,7 ± ,8
48	57,7 ± 2,2	57,5 ± 0,7	57,7 ± 1,0	57,3 ± 1,2	54,1 ± 0,3
72	62,6 ± 1,5	58,5 ± 1,0	58,7 ± 1,0	59,1 ± 2,5	51,5 ± 3,2
96	73,2 ± 1,5	74,2 ± 1,4	72,2 ± 3,2	62,4 ± 2,0	51,2 ± 2,3

Tabela 4 – Valores de umidade medidos durante o cultivo de *Aspergillus niger* LB-02-SF em biorreator com volume de ocupação de 50%, intervalo entre as agitações de 120 minutos e diferentes valores de fluxo específico de ar.

Fluxo de ar (LkgM)	0,18	0,36	0,54	0,72	0,90
Tempo (h)	Umidade (%)				
0	56,1 ± 0,5	52,8 ± 1,8	55 ± 0,0	53,8 ± 0,3	53,5 ± 0,1
24	59,3 ± 2,9	56,2 ± 0,5	55 ± 1,0	54,7 ± 0,6	58,8 ± 0,6
48	59,5 ± 1,2	57,9 ± 0,4	56,7 ± 2,3	56,0 ± 0,9	55,9 ± 0,3
72	62,6 ± 2,6	59,0 ± 2,6	59,7 ± 0,5	57,8 ± 0,3	54,5 ± 0,9
96	71,8 ± 2,8	70,9 ± 2,5	69,6 ± 0,6	66,1 ± 1,8	53,5 ± 1,9

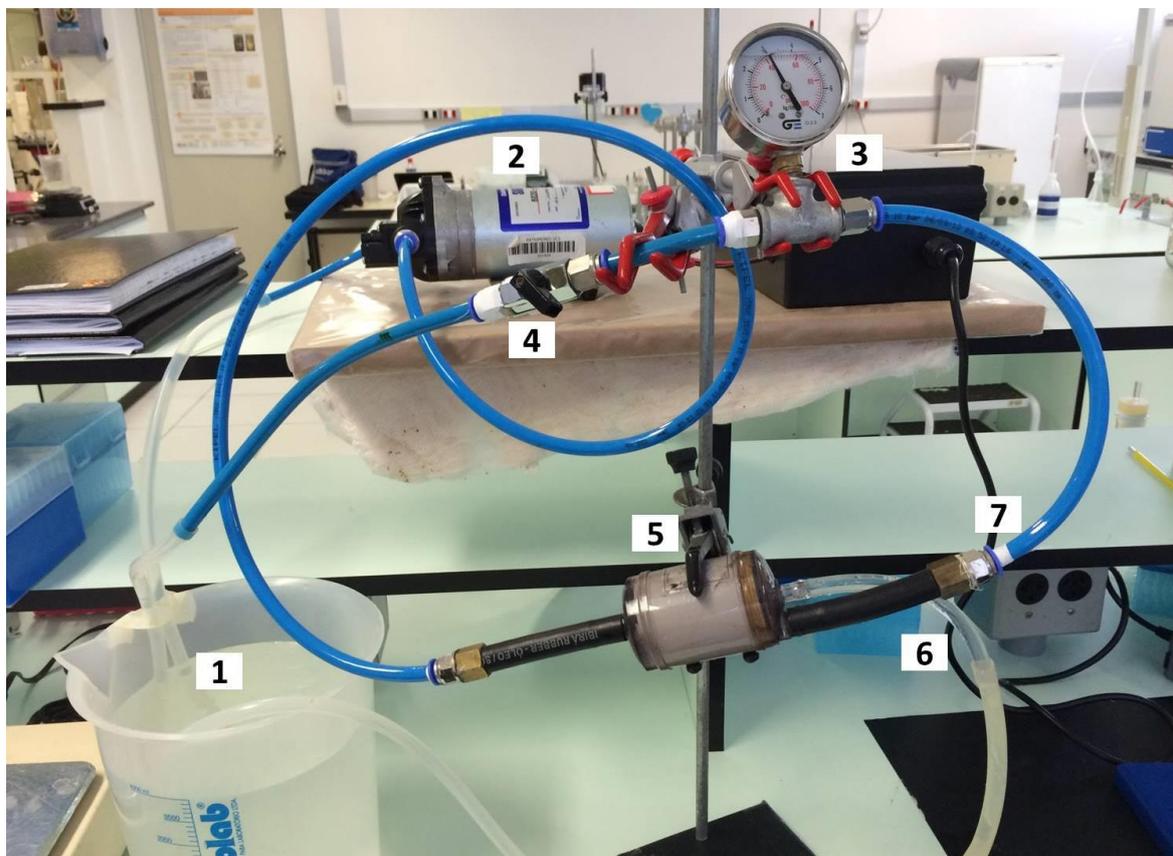
ANEXO 5 – Sistema de ultrafiltração

Figura 1 – Sistema de ultrafiltração utilizado na concentração do extrato pectinolítico. 1 – tanque de alimentação, 2 – bomba diafragma, 3 - manômetro, 4 – válvula reguladora de fluxo, 5 – membrana em espiral, 6 - corrente de permeado, 7 – corrente de concentrado

ANEXO 6 – Caracterização dos sucos de maçã, uva rosada e amora

Tabela 1 – Dados determinados para os sucos de frutas sem tratamento enzimático (amostra controle) na etapa de despectinização.

Parâmetros	Sucos Controle		
	Maçã	Uva rosada	Amora
pH	4,16	3,7	nd
Viscosidade (cp)	2,96	2,10	2,3
Turbidez (NTU)	206	125	160
Cor (abs)	1,06	0,95	0,76
Polifenóis Totais (EAG/100 mL)	39,8	63,3	183,1