

Daniel Ernesto Rodríguez Fernández

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOPROCESSO POR FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO PARA PRODUZIR E RECUPERAR ENZIMAS
DE INTERESSE COMERCIAL.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Processos Biotecnológicos.

Orientadores:

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Prof. Dr. Julio Cesar de Carvalho

Prof. Dr. José Angel Rodríguez León

**CURITBA
2009**

AGRADECIMENTOS

Posso me congratular por ter recebido o apoio de muitas pessoas, amigos e colegas, que me ajudaram e que são em parte responsáveis pelo bom termo a que chegou este trabalho. A todos agradeço, e mesmo correndo o risco da omissão de nomes, agradeço especialmente:

Ao Prof. Dr. Carlos R. Soccol, meu orientador e guia neste trabalho, e além, por toda disposição em ensinar, ajudar nas mais diversas situações e pela excelente orientação. Muito obrigado por tudo.

Aos Prof. Dr. Julio Cesar de Carvalho e Dr. José A. Rodríguez León pela ajuda desinteressada brindada, os excelentes intercâmbios de idéias no trabalho e suas magníficas aulas.

À Profa. Dr. Adriane Bianchi Pedroni Medeiros e o Prof. Dr. José L. Parada pela sua bondade e disposição para ajudar a realizar um bom trabalho.

À Profa. Dr. Vanette Thomaz Soccol por me abrir as portas do seu laboratório e de seus conhecimentos o tempo todo.

A minha colega e amiga Ludmila Troiano, pela ajuda desinteressada em todo momento.

Aos colegas Luiz Gustavo, Fernanda, Rafael, Carlos, Gerson e todo o grupo de Ouro Fino e todos os membros do laboratório de Bioprocessos pela ajuda oferecida.

Aos colegas do laboratório de Parasitología pelos bons momentos que passamos juntos.

A Carolina, Gregorio, Johnny, Raúl e Radjis que em todo momento me fizeram sentir parte de uma família.

Aos colegas do curso de Engenharia Química, Lenzi e Kaminsky.

A meus pais, minha irmã pelo esforço em fazer de mim um homem.

À memória dos meus avós e minha tia que tanto influenciaram em mim.

A todos meus amigos, professores e colegas em Cuba onde fui formado como profissional.

RESUMO

As enzimas produzidas por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* apresentam um grande potencial para a agroindústria podendo ser utilizadas como aditivos alimentares em rações para animais com o objetivo de melhorar o aproveitamento de nutrientes complexos. No presente trabalho foram determinadas as condições de aeração e umidade para a fermentação em estado sólido em biorreatores de 2 e 10 kg de capacidade. Utilizou-se extração e ultrafiltração para obter um complexo enzimático formado por fitases, xilanases e pectinases. Os resultados obtidos indicam que um teor inicial de umidade de 60%, uma intensidade da aeração de 1 VkgM em base úmida são as melhores condições para fermentar o meio sólido a base de polpa cítrica na produção de fitases (65 U g^{-1}), xilanases (65 U g^{-1}) e pectinases (250 U g^{-1}). Foi realizada a análise respirométrica para determinar os parâmetros cinéticos desse bioprocessamento. Também foi estimado o calor metabólico desta fermentação. Comprovou-se que o critério assumido para a mudança de escala foi válido. No estudo de extração, a água se revelou o melhor solvente para extração dessas enzimas. A adição de EDTA contribuiu para melhor estabilidade à temperatura ambiente. O pH de 5,0 e uma agitação de 500 rpm foram as melhores condições físicas para extrair as enzimas do material fermentado. Foram determinadas as constantes cinéticas do processo de extração para cada enzima e proteínas totais extraídas. No estudo da extração sucessiva por etapas foi determinado a quantidade total das enzimas produzidas e observou-se que as aplicações de duas etapas de extração equivalem a duas fermentações submersas. No processo de concentração do extrato enzimático por ultrafiltração foi determinado o comportamento do fluxo do permeado, as concentrações finais e a atividade específica. Foi observado igualmente um incremento na atividade das xilanases e as pectinases, mas não para as fitases durante a fase de concentração. A adição de glicerol permitiu às três enzimas um incremento na atividade original do extrato. A formulação com glicerol 35% (v:v) permitiu uma melhor conservação das enzimas a 4 e 29°C respectivamente. Esta formulação permitiu reter acima de 80% com respeito da atividade inicial em ambas as formulações após 8 semanas.

PALAVRAS-CHAVES:

Fermentação em estado sólido, escalonamento, extração de enzimas, polpa cítrica, modelagem matemática, ultrafiltração, conservação de enzimas.

ABSTRACT

The enzymes produced by filamentous fungus of *Aspergillus* gender present a great potential for the agribusiness since they can be used as foodstuffs for animals with the objective of improving the progress of complex nutrients. In the present work, the aeration conditions and humidity were determined for the fermentation in solid state in bioreactors from 2 to 10 kg of capacity. Extraction and ultra-filtration were used to obtain an enzymatic compound formed by phytases, xylanases and pectinases. The obtained results indicate that an initial value of humidity of 60% and an intensity of the aeration of 1 VkgM in a humid base are the best conditions to ferment the solid medium over the basis of citric pulp in the production of phytases (65 U g^{-1}), xylanases (65 U g^{-1}) and pectinases (250 U g^{-1}). It was also achieved a respirometric analysis to determine the kinetic parameters of that bio-process. It was estimated, as well, the metabolic heat of this fermentation. It was also was proven that the assumed criterion for the scale change was valid. In the study of extraction with water, this was revealed as the best solvent for the extraction of those enzymes. The addition of EDTA contributed to the better stability at room temperature. A pH of 5,0 and an agitation of 500 rpm were the best physical conditions to extract the enzymes from the fermented material. It were determined the kinetic constants of the extraction process for each enzyme and the total of the extracted proteins. In the study of the successive extraction by stages, it was determined the total amount of the produced enzymes and it was observed that the application of two extraction stages represents two submerged fermentations. In the process of concentration of the enzymatic extract by ultrafiltration, It was determined the behaviour of the flow of the permeated, the final concentrations and the specific activity. Likewise, It was observed an increase in the activity of the xylanases and the pectinases, but not in the fitases during the concentration phase. The addition of glycerol allowed to the three enzymes an increase in the original activity of the extract. A formulation with 35% glicerol (v:v) allowed a better conservation of the enzymes to 4 and 29°C respectively. Both formulations retain above 80% of initial activity after 8 weeks.

KEYWORDS:

Solid state fermentation, citrus peel, scale-up of fermentation, leaching, mathematical modeling, ultrafiltration, storage of enzymes.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO GERAL	13
2.1 Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Fitases.....	18
3.2 Xilanases.....	19
3.3 Pectinases.....	20
3.4 Fontes microbianas produtoras de fitases, xilanases e pectinases.....	21
3.5 Fermentações Submersas.....	23
3.6 Fermentação em estado sólido	25
3.6.1 Antecedentes	25
3.6.2 Definição	25
3.6.4 Vantagens e desvantagens da fermentação em estado sólido comparada com a fermentação submersa.....	26
3.4.6 Cinética dos processos de fermentação em estado sólido.....	27
3.4.7 Teoria do crescimento microbiano.....	28
3.4.8 Considerações sobre o calor metabólico gerado nos processos fermentativos em fase sólida.....	30
3.4.9 Considerações sobre o escalonamento dos processos fermentativos em fase sólida.....	31
3.5 Princípios básicos da lixiviação	32
3.5.1. Preparo dos sólidos.....	32
3.5.2 Relação sólido/solvente.....	33
3.5.3 Temperatura.....	33
3.5.4 Agitação.....	34
3.5.5 pH.....	34
3.5.6 Tensão superficial	34
3.5.7 Sistemas de lixiviação mais utilizados na indústria.....	35
3.5.8 Modelagem matemática dos sistemas de lixiviação descontínuos.....	35
3.6 Ultrafiltração	37
3.6.1 Classificação das membranas.....	38
3.6.2 Critérios de seleção das membranas. Vantagens e desvantagens.....	39
3.6.3 Fatores que afetam os processos de ultrafiltração.....	40
3.7 Conservação das enzimas em longo prazo.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Microorganismo.....	44
4.2 Manutenção e conservação do microorganismo.....	44
4.3. Preparo do inóculo.....	44
4.4 Substrato e preparação da fermentação em biorreatores.....	44
4.5 Dispositivos e condições de fermentação.....	46
4.6 Determinação da atividade da enzima Fitase.....	46
4.6.1 Preparo do Tampão Citrato 0,1 M para pH 3,0.....	46
4.6.2 Preparo da solução de Fitato 2,5 mM em tampão Citrato a pH 3,0.....	47
4.6.3 Curva padrão para fosfato liberado.....	47
4.6.4 Reação enzimática.....	48
4.6.5. Cálculo da atividade da enzima Fitase.....	48

4.7	Determinação da atividade da enzima Pectinase.....	49
4.7.1	Preparação do Reativo DNS.....	49
4.7.2	Preparação da solução de Pectina 0.5% em tampão Citrato 0,1 M para pH 4,0.....	49
4.7.3	Curva padrão do ácido galacturônico.....	50
4.7.4	Reação enzimática.....	51
4.7.5	Cálculo da atividade da enzima Pectinase.....	51
4.8	Determinação da atividade da enzima Xilanase.....	52
4.8.1	Preparação da solução de Xilano 1% em tampão Citrato 0,1 M para pH 4,0.....	52
4.8.2	Curva padrão da Xilose.....	52
4.8.3	Reação enzimática.....	53
4.8.4	Cálculo da atividade da enzima xilanase.....	53
4.9	Determinação da concentração de proteína.....	54
4.8.1	Preparação do Reativo C.....	54
4.8.2	Curva Padrão do BSA.....	54
4.8.2	Reação Protéica.....	55
4.8.4	Cálculo da quantidade de proteína.....	55
4.10	Quantificação de biomassa.....	56
4.10.1	Extração do ergosterol.....	56
4.11	Determinações da umidade.....	57
4.12	Estudos da influência dos íons no processo de extração.....	57
4.13	Planejamentos estatísticos realizados.....	58
4.13.1	Planejamento fatorial do tipo 2 ²	58
4.13.2	Planejamento Composto Central.....	58
4.14	Concentração por ultrafiltração.....	59
4.15	Determinação da composição iônica do caldo extraído e concentrado.....	59
4.16	Estudo de conservação das enzimas.....	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1	Determinação das condições apropriadas para a produção das enzimas em reator de escala piloto de 5 Kg.....	61
5.1.1	Estudo das diferentes vazões de ar na fermentação em meio sólido.....	61
5.1.2	Estudo de diferentes teores de umidade inicial na fermentação em meio sólido.....	64
5.1.3	Estudo do sistema de fermentação estático e com agitação.....	65
5.1.4	Cinética da produção de enzima e de biomassa.....	66
5.1.5	Calor metabólico gerado durante a fermentação.....	71
5.1.6	Escalonamento da fermentação em estado sólido.....	73
5.2	Extrações das enzimas.....	75
5.2.1	Análise da influência de íons na extração.....	76
5.2.2	Estabilidade das enzimas extraídas.....	79
5.2.3	Análise do planejamento fatorial 2 ² para condições de extração das enzimas.....	81
5.2.4	Otimização das condições de extração utilizando um Planejamento Composto Central.....	83
5.2.5	Determinação dos parâmetros do modelo cinético.....	85
5.2.6	Estudo da lixiviação por etapas sequenciais.....	90
5.3	Concentração das enzimas por ultrafiltração.....	93
5.3.1	Cálculo da permeabilidade das membranas e dos fluxos de permeado....	94
5.3.2	Determinação das atividades das enzimas.....	95

5.3.3 Determinação dos íons presentes no caldo enzimático final.....	97
5.4 Conservação das enzimas.	98
6. CONCLUSÕES	108
6.1 Fermentação	108
6.2 Extração	108
6.3 Ultrafiltração.	109
6.4 Conservação das enzimas.	109
7. Recomendações	110
8. REFERÊNCIAS.....	111
9. Anexos	121

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 Enzimas de uso freqüente na ração animal.....	18
TABELA 3.2 Classificação das pectinases segundo Fogarte e Kelly.....	21
TABELA 3.3 Distintas enzimas produzidas pelo gênero <i>Aspergillus</i>	23
TABELA 3.4 Distintos sistemas empregados nos processos de lixiviação.....	33
TABELA 3.4 Tipos de ultrafiltros mais utilizados industrialmente.....	36
TABELA 4.1 Composição química da polpa cítrica.....	45
TABELA 4.2 Concentrações das soluções para fazer a curva padrão do fósforo livre.....	45
TABELA 4.3 Concentrações das soluções para fazer a curva padrão do ácido galacturônico.....	48
TABELA 4.4 Concentrações das soluções para fazer a curva padrão da xilose.....	50
TABELA 4.5 Concentrações das soluções para fazer a curva padrão de BSA	53
TABELA 4.6 Sustâncias utilizadas no estudo da influencia dos íons na extração das enzimas.....	55
TABELA 4.7 Níveis e valores dos fatores escolhidos no planejamento 2^2	56
TABELA 4.8 Matriz de desenho do planejamento fatorial 2^2	56
TABELA 4.9 Níveis e valores dos fatores escolhidos no PCC.....	56
TABELA 4.10 Matriz de desenho do PCC.....	56
TABELA 5.1 Influência da aeração na produção de enzimas.....	59
TABELA 5.2 Influência da umidade na produção de enzimas.....	61
TABELA 5.3 Influência da agitação no sistema de produção de enzimas.....	63
TABELA 5.4 Estimativas dos parâmetros cinéticos da fermentação de 2kg de polpa cítrica com a cepa <i>Aspergillus niger F3</i>	67
TABELA 5.5 Estimativas da eficiência energética dos principais componentes da polpa cítrica.....	70
TABELA 5.6 Níveis de produção das enzimas em fermentadores com cargas de 1 kg e 10 kg.....	72
TABELA 5.7 Estimativas dos parâmetros cinéticos da fermentação de 1kg de polpa cítrica com a cepa <i>Aspergillus niger F3</i>	73
TABELA 5.8 Estimativas dos parâmetros cinéticos da fermentação de 10 kg de polpa cítrica com a cepa <i>Aspergillus niger F3</i>	73
TABELA 5.9 Perdas de atividade das enzimas após 24 horas da extração.....	78

TABELA 5.10 Valores das atividades das enzimas no planejamento experimental 2 ² com replicas no ponto central.....	79
TABELA 5.11 Valores dos coeficientes de regressão e da probabilidade do planejamento 2 ² para a fitase.....	79
TABELA 5.12 Valores dos coeficientes de regressão e da probabilidade do planejamento 2 ² para a xilanase.....	80
TABELA 5.13 Valores dos coeficientes de regressão e da probabilidade do planejamento 2 ² para a pectinase.....	80
TABELA 5.14 Valores da atividade fitase no PCC.....	81
TABELA 5.15 Valores dos coeficientes e da probabilidade da análise do PCC.....	82
TABELA 5.16 Valores das constantes cinéticas e das concentrações de equilíbrio..	87
TABELA 5.17 Estudo da extração por etapas das enzimas e das proteínas.....	88
TABELA 5.18 Unidades de enzima extraídas por grama de sólido fermentado lixiviado e rendimento das etapas.....	91
TABELA 5.19 Atividade total das enzimas em cada corrente para a membrana de 100 KDa.....	94
TABELA 5.20 19 Atividade total das enzimas em cada corrente para a membrana de 10 KDa.....	95
TABELA 5.21 Atividade específica das enzimas após a concentração por ultrafiltração com a membrana de 10 KDa.....	95
TABELA 5.22 Composição iônica do caldo enzimático antes e depois de ultrafiltrado.....	96
TABELA 5.23 Atividade inicial das enzimas em cada condição de conservação.....	96
TABELA 5.24 Atividade residual das enzimas armazenadas a 4°C.....	102
TABELA 5.25 Atividade residual das enzimas armazenadas a 29°C.....	102
TABELA 5.26 Atividade residual das enzimas armazenadas a 40°C.....	102
TABELA 5.27 Atividade residual das enzimas armazenadas a 46°C.....	102
TABELA 5.28 Determinação das constantes de desnaturação para a fitase.....	103
TABELA 5.29 Determinação das constantes de desnaturação para a xilanase.....	103
TABELA 5.30 Determinação das constantes de desnaturação para a pectinase....	103

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 Representação esquemática do carboidrato dietético, fibra e NPS com referencia ao analise de Van Soest <i>et al.</i> 1991.....	15
FIGURA 5.1 Gráfico da cinética da produção de fitase, xilanase e pectinase em fermentador carregado com 2 kg.....	64
FIGURA 5.2 Gráfico das produtividades da produção de fitase, xilanase e pectinase em fermentador carregado com 2 kg.....	65
FIGURA 5.3 Produção de biomassa fúngica determinada experimentalmente e a biomassa estimada na fermentação em biorreator carregado cm 2 kg.....	67
FIGURA 5.4 Evolução do Coeficiente Respirométrico durante a fermentação em biorreator carregado cm 2 kg.....	67
FIGURA 5.5 Evolução do calor metabólico produzido durante a fermentação sólida	71
FIGURA 5.6 Demanda de ar necessário para remover o calor metabólico produzido na fermentação sólida.....	71
FIGURA 5.7 Gráficos da produção de biomassa em diferentes escalas.....	72
FIGURA 5.8 Influência dos íons na extração de fitase.....	75
FIGURA 5.9 Influência dos íons na extração de xilanase.....	75
FIGURA 5.10 Influência dos íons na extração de pectinase.....	76
FIGURA 5.11 Superfície de resposta obtida no PCC.....	83
FIGURA 5.12 Gráfico cinético da extração da fitase produzida por FES a temperatura ambiente, pH 5 com uma relação sólido líquido de 1/25 base seca.....	84
FIGURA 5.13 Gráfico cinético da extração da xilanase produzida por FES a temperatura ambiente, pH 5 com uma relação sólido líquido de 1/25 base seca.....	84
FIGURA 5.14 Gráfico cinético da extração da pectinase produzida por FES a temperatura ambiente, pH 5 com uma relação sólido líquido de 1/25 base seca.....	85
FIGURA 5.15 Gráfico cinético da extração das proteínas produzida por FES a temperatura ambiente, pH 5 com uma relação sólido líquido de 1/25 base seca.....	85
FIGURA 5.16 Linearização dos modelos cinéticos para as enzimas e as proteínas.....	87
FIGURA 5.17 Extração da fitase por etapas.....	89
FIGURA 5.18 Extração da xilanase por etapas.....	89
FIGURA 5.19 Extração da pectinase por etapas.....	89

FIGURA 5.20 Extração das proteínas por etapas.....	90
FIGURA 5.21 Comportamento da vazão do permeado no tempo para a membrana de 100 KDa.....	93
FIGURA 5.22 Comportamento da vazão do permeado no tempo para a membrana de 10 KDa.....	93
FIGURA 5.23 Estabilidade da fitase sem adição de glicerol às temperaturas de 4; 29; 40 e 46°C respectivamente.....	97
FIGURA 5.24 Estabilidade da fitase com 25% de glicerol às temperaturas de 4; 29; 40 e 46°C respectivamente.....	98
FIGURA 5.25 Estabilidade da fitase com 35% de glicerol às temperaturas de 4; 29; 40 e 46°C respectivamente.....	98
FIGURA 5.26 Estabilidade da pectinase sem adição de glicerol às temperaturas de 4; 29; 40 e 46°C respectivamente.....	99
FIGURA 5.27 Estabilidade da pectinase com 25% de glicerol às temperaturas de 4; 29; 40 e 46°C respectivamente.....	99
FIGURA 5.28 Estabilidade da pectinase com 35% de glicerol às temperaturas de 4; 29; 40 e 46°C respectivamente.....	100
FIGURA 5.29 Estabilidade da xilanase sem adição de glicerol às temperaturas de 4; 29; 40 e 46°C respectivamente.....	100
FIGURA 5.30 Estabilidade da xilanase com 25% de glicerol às temperaturas de 4; 29; 40 e 46°C respectivamente.....	100
FIGURA 5.31 Estabilidade da xilanase com 35% de glicerol às temperaturas de 4; 29; 40 e 46°C respectivamente.....	101
FIGURA 5.32 Relação entre as constantes de desnaturação e a temperatura.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AD: Lignina ácida.

ADF: Fibra ácida.

Conc.: Concentração molar.

DNS: Solução de ácido dinitro-salicílico.

D.O. Densidade óptica.

E: Energia desenvolvida.

FES: Fermentação em estado sólido.

FS: Fermentações submersas.

GRAS: Microorganismos reportados como seguros.

g: Gramas.

mL: Mililitros.

NPS: Polissacarídeos não-amídicos.

NDF: Fibra neutra.

PCC: Planejamento Composto Central.

VkgM: Intensidade na vazão do ar.

O₂: Oxigênio.

CO₂: Gás Carbônico.

(v:v:v): volume por volume por volume.

1N: Concentração 1 normal.

0,1M: Concentração 0,1 molar.

m: Coeficiente de manutenção

p: produtividade

Y_{X/O} : Rendimento biomassa oxigênio

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o desenvolvimento de processos biotecnológicos, vinculados com setores importantes da economia, tem conquistado um espaço importante. Estes processos promovem vantajosas aplicações na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia reduzindo tempo e custos, tornando-os economicamente mais atrativos. As produções de metabólitos e microorganismos de interesse industrial permitem o reaproveitamento de resíduos agroindustriais como fonte de matéria prima em processos biotecnológicos específicos.

Os processos biotecnológicos convencionais são divididos em três etapas principais: fermentação, recuperação e formulação.

A fermentação em estado sólido tem ganhado importância e atenção de pesquisadores devido aos baixos custos dos meios de cultivos, a alta produtividade e seu reconhecimento como tecnologias limpas. Entretanto a sua implementação na prática ainda é muito pequena quando comparada com as fermentações submersas. Entre os principais problemas que apresentam as fermentações sólidas estão a manipulação dos sólidos, a instrumentação e o controle do processo. Outro fator pouco estudado é a extração de metabólitos produzidos por estes processos, o que entra na área da recuperação de metabólitos das fermentações.

Economicamente, as enzimas são metabólitos comerciais importantes, produzidas a partir de microorganismos de diferentes gêneros e espécies. Estas enzimas possuem uma infinidade de utilidades no cotidiano, com uso em tecidos, alimentos, fármacos, tratamentos industriais e ambientais, entre outros.

A alta especificidade das enzimas as transforma em produtos de grande interesse no setor alimentício humano e animal, uma vez que disponibilizam numerosos nutrientes. Sem a atuação das enzimas as rações não são totalmente aproveitadas pelos animais e, por conseguinte ocorre o encarecimento delas, exigindo suplementos como o fósforo e outros recursos com pouca disponibilidade na natureza.

A produção de fitases, xilanases e pectinases como aditivos alimentares permite a utilização de fontes energéticas presentes nas rações por parte de animais monogástricos incapazes de assimilá-los já que carecem dos complexos enzimáticos necessários para sua degradação. Com isto têm-se uma diminuição dos custos das

rações e uma melhora da conversão dos alimentos nos animais e, por conseguinte, uma melhora no rendimento das produções agropecuárias. Considerando a grande capacidade dos fungos do gênero *Aspergillus* de produzir uma ampla variedade de enzimas, quando cultivados em meios sólidos a base de resíduos agroindustriais, há um grande potencial em avaliar o aproveitamento destes resíduos na produção de enzimas de interesse industrial.

2. OBJETIVO GERAL

Estabelecer um bioprocesso de fermentação no estado sólido de polpa cítrica e recuperação do complexo enzimático de interesse industrial produzido por *Aspergillus niger F3*.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Definir as condições operacionais ótimas para uma fermentação em estado sólido em biorreatores de diferentes capacidades.
- ✓ Avaliar os parâmetros cinéticos que caracterizam o processo de fermentação.
- ✓ Definir um processo de extração das enzimas do meio sólido fermentado.
- ✓ Modelar matematicamente o processo de extração.
- ✓ Estudar o efeito da concentração através da ultrafiltração das enzimas extraídas.
- ✓ Estudar as condições de armazenamento e conservação das enzimas.
- ✓ Modelar matematicamente o comportamento da conservação das enzimas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Enzimas são um grupo de componentes biológicos com atividade intra e/ou extracelular que têm funções catalisadoras de reações químicas ou bioquímicas sendo parte principal dos processos metabólicos das células. Essa propriedade metabólica das enzimas as torna adequadas para aplicações industriais encontrando emprego nos mais diversos processos industriais destacando-se as indústrias farmacêuticas e alimentícia, Cowieson *et al.*, 2006.

No caso da indústria alimentícia é sabido que o principal componente das dietas dos animais são os carboidratos (fontes energéticas) complementadas com fontes protéicas e outros complementos tais como vitaminas, minerais etc. Na Figura 3.1 apresenta-se um esquema da composição das fontes energéticas das rações dos animais incluindo os humanos (Leeuw *et al.*, 2008, Van Soest *et. al.*, 1991). Inicialmente, o interesse dos nutricionistas nas fibras dietéticas esteve relacionado com a possibilidade de empregar produtos secundários da produção de alimentos tais como: casca de milho, trigo, soja, etc. Apesar das fibras dietéticas terem sido amplamente estudadas, ainda não há um consenso na sua definição. Em décadas anteriores se considerava fibra dietética aqueles componentes que são resistentes a degradação pelas enzimas dos animais monogástricos. Atualmente essa definição tem sido modificada e considera-se como fibra dietética a soma dos NSP (polissacarídeos não-amídicos ou “non starch polyssacharides”) mais a lignina (Van Soest *et. al.*, 1991).

No caso dos animais, incluindo os humanos, o amido (um polissacarídeo da glicose) é a fonte principal de energia. O amido está presente nos cereais (gramíneas), nas leguminosas (empregados nas rações animais), podendo ser encontrado na forma de grânulos como uma mistura de dois polissacarídeos: as amiloses e as amilopectinas. O amido se caracteriza por ligações glicosídicas que são lineares ou não, do tipo α (1-4) de moléculas de glicose; as moléculas das amiloses são mais lineares e as amilopectinas são mais ramificadas. Os polissacarídeos apresentam duas zonas chamadas amorfas e cristalinas. Com respeito aos fatores principais que afetam a digestibilidade dos amidos além da proporção entre as amilosas e as amilopectinas, que determinam principalmente as

propiedades físicas e digestivas das fontes energéticas nutricionais e a nutrição do amido Van Soest *et al.* 1991.

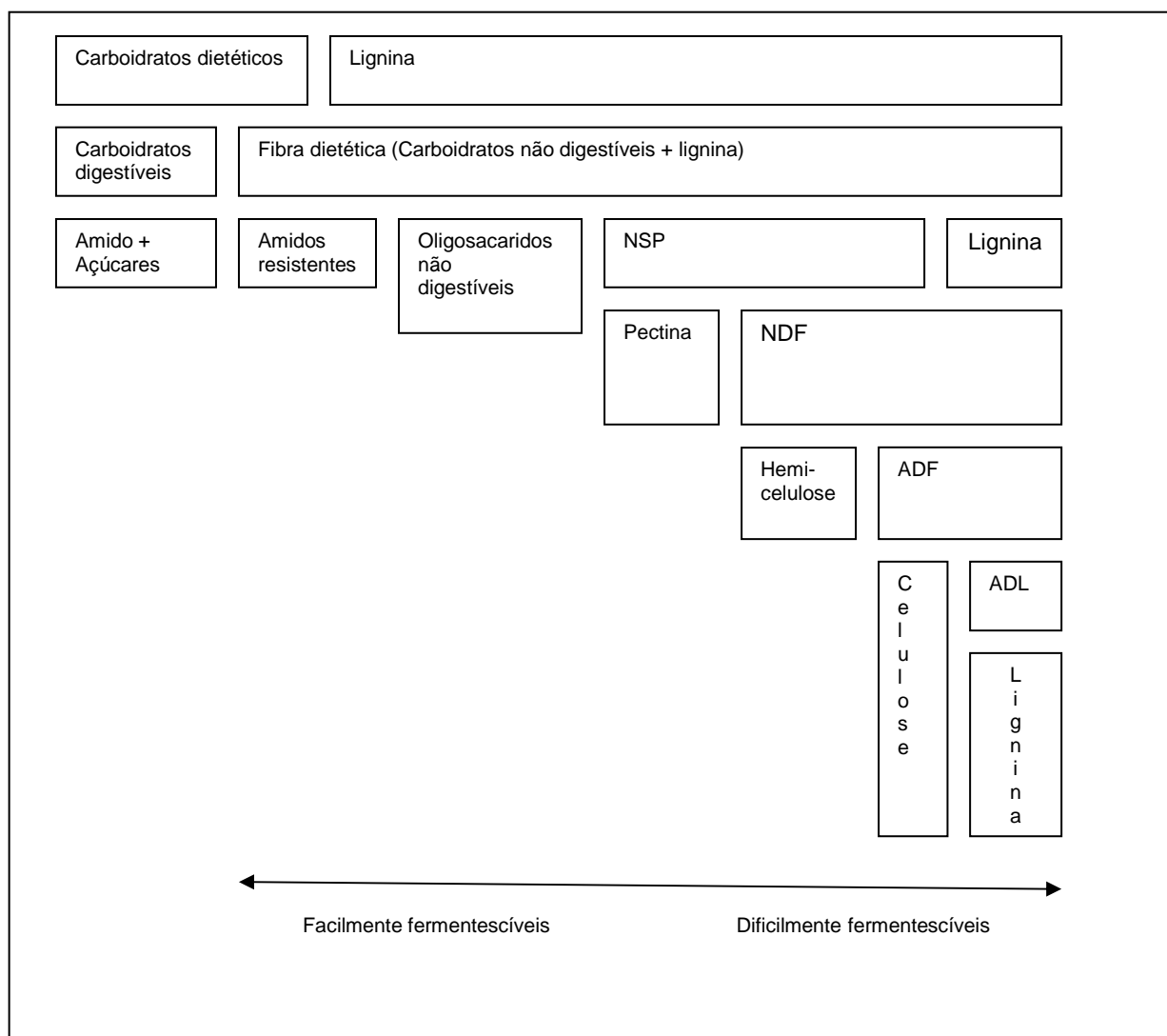


Figura 3.1 Representação esquemática do carboidrato dietético, fibra e NSP com referencia ao análise de Van Soest *et. al.*, 1991.

É preciso também destacar a viscosidade produzida pelos NSP afeta diretamente a digestão dos materiais fibrosos, retendo água livre do intestino e (Carré, 2004).

Os NPS não são utilizados pelos animais monogástricos, sendo eliminados nas fezes. Este fenômeno ocorre com maior frequência em animais jovens que ainda não apresentam um sistema digestivo bem desenvolvido. Os grânulos de amido estão integrados numa rede de pentosanas e glicanas, no entanto, não estão acessíveis diretamente às enzimas digestivas, ocorrendo apenas uma digestão parcial (Zorov *et al.*, 2006).

Segundo Maciel 2006, dentre os NPS mais abundantes na parede celular e nas estruturas vegetais estão as hemiceluloses, as celulosas e as pectinas. As enzimas endógenas dos animais monogástricos são capazes de clivar as seguintes ligações:

- ✓ As ligações da glicose α (1-4) e α (1-6) do amido;
- ✓ As ligações α (1-2) entre a glicose e frutose na sacarose;
- ✓ As ligações β (1-4) entre a glicose e a galactose da lactose;
- ✓ As ligações α (1-1) das glicoses da trealose.

Um mecanismo muito importante da parede celular é dado pela presença de celulose, β -glicano e arabinoxilana que protegem o conteúdo das células dos grãos e impedem o acesso das enzimas endógenas ao conteúdo. Os mais importantes são as frações de β -glicano e arabinoxilana que durante a digestão provocam um aumento da viscosidade e uma má absorção dos nutrientes e, portanto, um baixo rendimento em peso do animal por peso de ração consumida (Castro Tavernari *et al.*, 2008).

O emprego de enzimas extracelulares pode diminuir os efeitos negativos dos NPS, uma vez que a inclusão de diversas enzimas na elaboração de dietas para a alimentação de animais, principalmente monogástricos, vem se desenvolvendo há alguns anos (Cowieson *et al.*, 2006; Bedford & Schultze, 1998). Os propósitos de emprego destes aditivos estão relacionados principalmente com os seguintes alvos:

- ✓ Obter maior rendimento do consumo das dietas;
- ✓ Baixar o custo das mesmas e promover a eficiência alimentar.

Outro aspecto importante no emprego das enzimas extracelulares está relacionado com a queda do efeito da produção animal sobre o meio ambiente, considerando que os componentes NSP ao serem excretados no meio podem alterá-lo. As enzimas xilanases, pectinases e celulases são enzimas importantes para diminuir o efeito dos NPS nas dietas. Outra família de enzimas também capazes de degradar substâncias consideradas fatores antinutricionais dos animais monogástricos são as fitases (Mullaney 2003).

Durante a maturação dos cereais e legumes é que ocorre o acúmulo de uma quantidade substancial de ácido fítico na forma de sais ou fitatos nas sementes

(Lei & Porres, 2003). O ácido fítico ou hexafosfato de mio-inositol ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) é um componente natural das sementes, constituindo 1 a 3% do peso das leguminosas e dos cereais, correspondendo a cerca de 60 a 90% do fósforo total (Cúneo *et al.*, 2000). Os fitatos representam a maior fonte de fósforo para a germinação das sementes, sendo que quando o fósforo encontra-se ligado na molécula, ele não é disponível para alimentação dos animais, pois não é hidrolisado pela fosfatase endógena dos animais monogástricos (Sung *et al.*, 2005). Desta forma, é necessário suplementar com fósforo inorgânico a ração alimentar dos animais monogástricos, entretanto é importante ressaltar que o fósforo inorgânico adicionado é uma fonte não renovável e custosa.

Os fitatos têm várias funções fisiológicas importantes para a planta durante o seu ciclo de vida, incluindo o armazenamento de fósforo e cátions, que fornecem matéria-prima para a formação das paredes celulares após a germinação da semente. Além disso, o ácido fítico protege a semente contra o dano oxidativo durante a sua armazenagem. O maior efeito negativo no caso dos fitatos é o efeito quelante ou ligações fortes com outras moléculas tais como aminoácidos, complexos do amido e cátions do tipo cálcio, ferro, zinco e magnésio (Yin *et al.*, 2007, Lei & Porres, 2003). Esse efeito provoca a assimilação de nutrientes necessários na alimentação e, por conseqüência, uma importante diminuição no rendimento das rações empregadas. Outro fator negativo dos fitatos, é que estes não são assimilados durante a alimentação dos animais monogástricos, ocorrendo sua excreção direta no meio ambiente. Os fitatos são degradados pelos microrganismos que estão presentes no solo e o fósforo liberado migra para os lençóis freáticos provocando a eutrofização das águas nas zonas de produção intensiva de animais. Nos últimos anos na União Européia e nos Estados Unidos tem se aprovado importantes leis ambientais que obrigam os produtores de animais monogástricos para alimentação humana suplementar as rações com fitases (Water Quality Improvement Act, 1998; Harter-Denis; 1999, Jongbloed *et al.*, 1996).

Na Tabela 3.1 são mostradas algumas das enzimas utilizadas na ração animal, os substratos sobre os quais atua e os efeitos que produzem nos animais (Couto 2006).

Tabela 3.1. Enzimas de uso freqüente na ração animal.

Enzima	Substrato	Efeito nos animais
Fitases	Ácido fítico ou fitatos	Disponibiliza o fósforo presente no ácido fítico.
Xilanases	Hemicelulose	Redução na viscosidade no trato intestinal.
Pectinases	Pectina	Redução na viscosidade no trato intestinal.
Glucanases	β -glicanos	Redução na viscosidade no trato intestinal.
Celulases	Celulose	Degradação da celulose e liberação de nutrientes
Proteases	Proteínas	Degradação eficiente das proteínas.
Amilases	Amido	Degradação do amido.
Galactosidases	Galactose	Remoção dos galactosidos.

3.1 Fitases

Fitase é um termo genérico empregado para descrever uma enzima que hidrolisa as ligações fosfomonoéster do ácido fítico (*mio*-inositol hexakisfosfato fosfohidrolase; EC 3.1.3.8 e EC 3.1.3.26), portanto libera os ortofosfatos presentes na molécula de ácido fítico em etapas sucessivas até moléculas menores do inositol fosfato, *myo*-inositol e fosfato inorgânico (Mullaney & Ullah, 2003; Vats & Banerjee, 2004). Distinguem-se dois tipos de fitase: a 3-fitase que libera inicialmente os fosfatos ligados pelo carbono 3 da molécula e a 6-fitase que inicia a liberação dos fosfatos ligados ao carbono 6. A 3-fitase é característica dos microorganismos e a 6-fitase dos vegetais (Dvoraková, 1998).

As fitases têm um papel importante na dieta alimentar (Dourmad & Jondreville, 2007), pois:

- ✓ Facilitariam o emprego do fósforo presente no fitato e assim diminuiria o custo das dietas devido ao emprego do fósforo inorgânico;
- ✓ Impediriam a formação de quelatos com minerais e proteínas importantes fazendo-os disponíveis na dieta;
- ✓ Diminuiriam o efeito médio ambiental devido aos fitatos.

Industrialmente as fitases têm sido produzidas com o emprego de microorganismos por métodos fermentativos. Nestes casos é preciso considerar

quais microorganismos são os mais apropriados segundo o tipo de fitase que se deseja produzir. Baseado nas propriedades bioquímicas, as fitases podem ser classificadas em duas classes principais, fitases alcalinas e fitases ácidas. As fitases alcalinas têm uma alta especificidade pelo complexo cálcio-fitato e produzem mio-inositol tri-fosfato como produto final da hidrólise. São produzidas principalmente por espécies do gênero *Bacillus* (Vats & Banerjee, 2004; Oh *et al.*, 2004). Fitases ácidas têm um amplo espectro de especificidade do substrato e hidrolisam o fitato em pH ácido, entre 2 e 5 valores de pH, produzindo mio-inositol monofosfato como produto final da hidrólise. Fitases ácidas são conhecidas como histidina ácida fosfatases, pois empregam a fosfohistidina como intermediário da transferência na reação correspondente. A maioria das fitases encontradas nas plantas assim como as produzidas por fungos pertencem a esta classe de fitases. Espécies de *Aspergillus niger* são as que produzem as fitases de maior interesse industrial (Mullaney & Ullah, 2003; Vats & Banerjee, 2004).

3.2 Xilanases

Xilanases (E.C.3, 2, 1, 8) são as enzimas responsáveis pelo rompimento das ligações $\alpha(1-4)$ que são as ligações principais na estrutura das hemiceluloses, fundamentalmente xilano. As hemiceluloses referem-se a uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos, que podem ser lineares ou ramificados, são amorfos e possuem peso molecular relativamente baixo. As hemiceluloses são divididas em pentosanas e hexosanas e formam parte importante dos NSP das dietas dos animais. As pentosanas por hidrólise produzem açúcares pentoses, como xilose e arabinose (Dekker & Richards 1976).

As xilanases são classificadas em duas famílias principais (F ou 10 e G ou 11) das glicosil hidrolases. As duas famílias utilizam mecanismos catalíticos de par iônico e conservam a configuração anomérica durante a hidrólise. As xilanases da família 10 são maiores, mais complexas e produzem oligossacarídeos menores; as xilanases da família 11 são mais específicas para a xilana (Maciel, 2006).

O emprego das xilanases nas dietas de animais tem como objetivo favorecer a digestão e o valor nutritivo das fibras dos cereais, atendendo a que seus valores ótimos de ação são a pH ligeiramente ácido. O modo o qual ocorre o

aumento da digestibilidade é proposto em dois mecanismos. O primeiro mecanismo considera que as paredes do endosperma (composto por xilanos, β -glucanos e celulose) do cereal encerram os grãos de amido e proteína existente; e como os animais monogástricos não têm a capacidade enzimática para digerir tais estruturas, o conteúdo dos endospermas não sofre o processo da digestão. A utilização das enzimas exógenas que degradam essas estruturas favorece a digestão, aumenta o valor nutritivo da ração e melhora a conversão alimentar das rações (Bedfort, 1998).

O segundo mecanismo concebe que parte dos componentes da parede celular dos cereais dissolve-se no trato digestivo dos animais e interagem para formar compostos viscosos de alto peso molecular. Esses compostos provocam o aumento na viscosidade dos fluidos intestinais dos animais, a exemplos o caso dos frangos é em menor quantidade quando relacionado com suínos. Os principais efeitos do segundo mecanismo são (Maciel 2006):

- ✓ Diminui a velocidade gastrintestinal de nutrientes;
- ✓ Diminui a difusão das enzimas endógenas digestivas, de seus substratos e de seus produtos;
- ✓ Estimula a proliferação bacteriana principalmente no intestino delgado.

As xilanases também são empregadas em outros ramos industriais para clarificar sucos de frutas e vinhos e no tratamento da polpa na fabricação do papel.

3.3 Pectinases

As enzimas conhecidas como pectinases formam um complexo misturado de enzimas que degradam a cadeia principal da pectina e suas cadeias colaterais em pectatos e outros grupos livres de ácidos carboxílicos com baixo peso molecular. A pectina é um polissacarídeo composto de cadeias de ácido galacturônico na forma piranose com ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$, com pesos moleculares entre 20 e 40 kDa. A pectina está presente nas paredes celulares de todas as plantas. Dentro das fontes naturais mais ricas em pectina, encontram-se os frutos cítricos com 30% de pectina, fazendo parte dos NSP (Kocher *et al.*, 2002, Zyla *et al.*, 2001).

As maiores atividades são apresentadas nos valores de pH entre 4 e 4,8; sendo que em valores de pH inferiores a 3 tendem a se desativar rapidamente.

Normalmente são estáveis a temperaturas de 45°C. A classificação das pectinases segundo Fogarty & Kelly (1983) é mostrada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 Classificação das pectinases segundo Fogarty & Kelly (1983).

Classificação das pectinases	
Esterases	Depolimerases
Pectinesterase (PMGE)	Atuam sobre a pectina
	Polimetilgalcturonases (endo PMG y exo PMG)
	Polimetilgalacturonato liase (endo PMGL e exo PMGL)
	Atuam sobre o ácido péctico.
	Poligalacturonase (endo PG e exo PG)
	Poligalacturonato liase (PGL)
	Atuam sobre os oligo-D-galactosiduronatos.
	Oligogalacturonase (OG e OG)
	Oligogalacturonato Liase (OGL)

As pectinases são utilizadas em diversas áreas, como a extração, clarificação e purificação de sucos de frutas, de vinhos e cervejas. Igualmente reporta-se o emprego na extração de produtos para aumentar o sabor, pigmentos e essências de origem vegetal e na fabricação de tecidos de linho (Castilho *et al.*, 2000; Chauhan *et al.*, 2001).

3.4 Fontes microbianas produtoras de fitases, xilanases e pectinases.

Para uma produção efetiva de enzimas num processo industrial é preciso contar com os microorganismos apropriados e considerar o emprego posterior das enzimas. Um fator muito importante a considerar é o pH no qual a enzima atuará. De maneira geral se pode dizer que as enzimas de origem bacteriana têm tendências a ter os ótimos de atividades a valores de pH neutros ou básicos, enquanto as enzimas obtidas a partir de fungos filamentosos e leveduras apresentam valores ótimos de atividade em pH ligeiramente ácidos (Wiseman 1975).

As fitases encontram-se distribuída amplamente na natureza e são encontradas freqüentemente em fungos filamentosos, em particular no gênero *Aspergillus* (Bhargav *et al.*, 2008; Haefner *et a.*, 2005; El-Batal *et al.*, 2001; Ebune *et al.*, 1995), sendo reportada também em bactérias e leveduras (Vats *et al.*, 2004; Brugger *et al.*, 2004).

Alguns autores relatam a produção de xilanase por bactérias (Vieira *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2003; Beg *et al.*, 2000) e fungos (Cao *et al.*, 2008; Maciel *et al.*, 2008; Tapingkae *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004; Lemos & Pereira, 2002).

Os microorganismos produtores de pectinase pertencem a diferentes gêneros de bactérias (Hoondal *et al.*, 2002), leveduras e fungos, destacando-se os fungos do gênero *Aspergillus*, particularmente a espécie *Aspergillus niger* (Costa *te al.*, 2007, Favela-Torres *et al.*, 2006) as quais produzem pectinases do tipo ácidas (Pandey *et al.*, 1999).

O gênero *Aspergillus* é de grande interesse e importância na área de biotecnologia para a produção de enzimas (Vries, 2003) devido a que:

- ✓ Sintetizam altos níveis de proteína;
- ✓ Possuem boas propriedades para a fermentação que permitem a produção em grande escala;
- ✓ Os produtos destes fungos são reconhecidos como “generally regarded as safe (GRAS)” o que permite seu emprego em alimentos e dietas alimentares;
- ✓ Produzem enzimas de interesse na degradação dos polissacarídeos da parede celular;
- ✓ Algumas espécies são capazes de produzir aflatoxinas (Cary & Ehrlich, 2006; El Khoury *et al.*, 2006).

Alem disso, fungos do gênero *Aspergillus* têm sido empregados amplamente na indústria para produção de enzimas extracelulares, ácido cítrico e tratamento de resíduos (Schuster *et al.*, 2002).

Na Tabela 3.3 relata-se referências bibliográficas dos últimos anos para produção de distintos tipos de enzimas de interesse para o tratamento das substâncias NPS e fiticas presentes nas rações alimentares, considerando espécies do gênero *Aspergillus* e as propriedades anteriormente citadas em relação a esse gênero. Reporta-se também a capacidade de determinadas cepas de sintetizar mais de uma enzima em um mesmo processo (Wang *et al.*, 2006; Botella *et al.*, 2007). É por isso que essas espécies são altamente atrativas para uma eventual produção de

várias enzimas ao mesmo tempo e seu emprego nas rações alimentares ou outros ramos industriais.

Para as rações alimentares pode existir uma complementação ou um sinergismo na ação das enzimas (xilanase e fitase) sobre os NPS e os fitatos (Kim *et al.*, 2008). Entretanto, alguns autores descrevem que estas enzimas não são sinérgicas, pois não aumentam a resposta dos efeitos quando são empregadas isoladamente (Moehn *et al.*, 2007).

Tabela 3.3 Distintas enzimas produzidas pelo gênero *Aspergillus* ssp.

Espécie	Enzimas	Substrato	Tipo de Fermentação	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	poly-galacturonase	Farelo de arroz	Sólida em frascos	<i>Costa et al., 2007</i> <i>Wang et al., 2006</i>
	hemicelulase pectinase	Pó de semente de algodão	Sólida em frascos	<i>Mamma et al., 2008</i>
	xilanase pectinase	Polpa cítrica	Sólida em frascos	<i>Maciel et al., 2008</i>
	xilanase	Bagaço de cana de açúcar e farelo de soja	Colunas aereadas	<i>Soni e Khire, 2007</i> <i>Gomes da Silva et al., 2005</i>
	fitase	Dextrina e glicose	Submersa em frascos	
	fitase	Farelo de soja e trigo	Sólida em frascos	
<i>Aspergillus carneus</i>	xilanase	Xilana de aveia	Submersa em frascos	<i>Fang et al. 2007</i>
<i>Aspergillus awamori</i>	xilanase pectinase	Polpa de uva	Sólida em placas Petri	<i>Botella et al., 2007</i>

3.5 Fermentações Submersas

As fermentações submersas (FS) representam cerca de mais de 95% dos processos biotecnológicos, existindo pelo tanto, uma grande experiência neste tipo de fermentações, constituindo as mesmas conjuntamente com seus procedimentos motivo de estudo fundamental em qualquer disciplina acadêmica que trate de biotecnologia.

Na produção de fitase em cultivo submerso destaca-se portanto o emprego de espécies microbianas do gênero *Aspergillus*. Nestes processos se emprega

normalmente açúcares simples, amido e dextrinas como fonte de carbono (Soni & Khire, 2007; Guimarães *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2003; Gargova & Sariyska, 2003).

Para a produção de pectinases em cultivo submerso, geralmente se emprega pectinas (Sharma. & Satyanarayana, 2006; Antov *et al.*, 2001) e para as xilanases, xilana ou derivados (Nascimento *et al.*, 2003), considerando que essas enzimas são induzidas e não constitutivas. Os substratos para a produção de enzimas no meio submerso geralmente são caros, pois às vezes não são açúcares simples.

Por outro lado, no caso das FS de fungos imperfeitos existem problemas relacionados com estes tipos de microorganismos devido a seu crescimento filamentosos (Vats *et al.*, 2004) que provoca aumento na viscosidade dos caldos durante a fermentação e é a causa de diferentes problemas como:

- ✓ Uma mistura menos eficiente;
- ✓ Podem existir gradientes no sistema fermentativo que alterem a diferença de energia e massa;
- ✓ No caso das fermentações aeróbicas podem ocorrer problemas com a limitação de oxigênio devido ao incremento da viscosidade.

Uma das maiores vantagens dos processos de fermentação submersa e a facilidade de manuseio das vazões líquidas de alimentação e saída do fermentador. Essa facilidade permite diferentes manipulações dos processos fermentativos, tais como os processos em batelada, em contínuo (estacionário) ou retro alimentados. Os dois últimos procedimentos permitem aumentar a produtividade e a eficiência de determinados processos com relação aos processos em batelada.

As facilidades de manipulação das vazões líquidas também permitem um maior nível de produção que normalmente está relacionado com os custos de produção. Porém, o maior inconveniente destes processos ocorre na manipulação de maiores níveis de líquido, tornando mais agressivo o processo com relação ao meio ambiente. Em um processo de fermentação submersa é preciso levar em consideração níveis de tratamento de efluentes na saída dos fermentadores que no mínimo constituem 96% do volume de carga inicial e que por seu caráter (metabólitos de detritos no separados não processo, pH, sais residuais, etc.) constituem um poderoso fator de contaminação.

3.6 Fermentação em estado sólido

3.6.1 Antecedentes

Os processos de fermentação em estado sólido (FES) existem de forma natural desde que começou a vida no planeta, a FES é utilizada de forma artesanal nos países do Sudeste Asiático, África e América Central há séculos para a elaboração de alimentos a partir de cereais, mandioca, entre outros.

Os alvos fundamentais destas fermentações são incrementar o teor protéico destes alimentos, melhorar as possibilidades de conservação, alterar as características físicas, como cor, odor e sabor. Exemplo desses produtos é o Koji, que é produzido pelo cultivo do fungo *Aspergillus oryzae* sobre cereais conhecidos, o Shoyu, o Misso e o Ontjom (Hesseltine, 1972).

A produção de queijo Roquefort a partir do leite de cabra tem aproximadamente mil anos. Em 1930 foi reconhecida a importância dos fungos nestes alimentos, quando foi demonstrado que todos os microorganismos neste tipo de queijo eram mesma espécie, *Penicillium roqueforti*.

No final dos anos 70 é que foi promovido com força o estudo científico desta área, com o intuito de aproveitar as vantagens deste tipo de fermentação (Doelle *et al.*, 1992).

3.6.2 Definição

É difícil descrever uma definição precisa da fermentação em estado sólido, devido ao fato de que este sistema caracteriza-se pelo crescimento de microorganismos sobre substratos insolúveis em água e na presença de variadas quantidades de água livre. Portanto, dependendo do conteúdo de água livre a fermentação dos substratos sólidos transita desde a fermentação em estado sólido, fermentação de misturas pastosas até fermentação de partículas sólidas em suspensão (Doelle *et al.* 1992).

Hesseltine (1972) utilizou o termo fermentação em estado sólido a todas as fermentações onde o substrato não é líquido. Posteriormente Raimbault (1981)

propôs um termo mais preciso, “ ... as fermentações onde o substrato não está nem solubilizado, nem em suspensão num grande volume de água”. Moo-Young *et al.* (1985) associaram esse termo a todos os processos que utilizam materiais insolúveis em água para o crescimento em ausência de água livre. Mudgett (1986) e Durand *et al.* (1988) descreveram uma definição geral, “ ... é um método de cultivo dos microorganismos sobre e/ou dentro das partículas sólidas”. O líquido ligado às partículas deve de ser uma quantidade que permita a atividade da água adequada para o crescimento e o metabolismo dos microorganismos sem exceder o máximo poder de retenção deste líquido pela matriz sólida.

Uma definição recente foi formulada por Viniegra-González (1997): “... sendo um processo microbiano que acontece normalmente na superfície de materiais sólidos que tem a propriedade de absorver ou conter água, com ou sem nutrientes solúveis...”. Esta definição compreende processos onde o suporte sólido é inerte e os substratos utilizados pelo microorganismo podem ser substâncias solúveis em água.

3.6.4 Vantagens e desvantagens da fermentação em estado sólido comparada com a fermentação submersa.

São considerados como vantagens os seguintes aspectos (Doelle *et al.*, 1992):

- ✓ Os meios de cultivo são simples, geralmente subprodutos agrícolas que apresentam um alto teor dos nutrientes necessários;
- ✓ A baixa atividade da água impede as contaminações, especialmente bactérias e leveduras;
- ✓ A concentração natural do substrato permite utilizar reatores menores quando comparadas com as fermentações submersas;
- ✓ A aeração forçada é facilitada pela porosidade do suporte, o que permite uma alta transferência de ar e, por conseguinte de oxigênio;
- ✓ Podem se empregar freqüentemente esporos como inóculo nos processos de crescimentos de fungos, o que diminui os custos e as manipulações da propagação do inóculo;

- ✓ Os esporos dos fungos que são produzidos são mais resistentes e tem melhor adaptabilidade nas condições de aplicação agrícola;
- ✓ Os processos de recuperação são simplificados, sendo alguns utilizados integralmente para ração animal e consideradas tecnologias limpas.

Entre as principais desvantagens encontram-se segundo (Doelle *et al.*, 1992):

- ✓ As aplicações geralmente estão limitadas a microorganismos que crescem a baixos teores de umidade.
- ✓ A dissipação do calor gerado pode ser um problema, principalmente quando se trabalha em grande escala e não se controla o processo.
- ✓ A natureza sólida do substrato dificulta a medição de parâmetros da fermentação, tais como pH, temperatura, umidade e concentrações de substratos e produtos.
- ✓ Os processos de transferência de massa são limitados pela difusão.
- ✓ Muitos aspectos de engenharia, como o desenho e escalonamento de processos são pouco caracterizados.
- ✓ O tempo de fermentação é maior, pois geralmente são utilizados microorganismos que apresentam baixas velocidades específicas de crescimento.

Os fungos são potenciais candidatos para produzir enzimas mediante processos de fermentação em estado sólido. Uma importante variedade de produtos enzimáticos comerciais, compostos de fitases, pectinases, xilanases, proteases, alfa e glicoamilases, são produzidos a partir de fungos. Nos últimos anos os estudos das fermentações em estado sólido estão focados no desenvolvimento de meios de cultivo a partir de resíduos agroindustriais e o desenvolvimento e monitoramento destes processos fermentativos (Pandey 2001).

3.4.6 Cinética dos processos de fermentação em estado sólido.

A cinética de um processo representa a variação de uma ou mais variáveis com o tempo. De forma geral, qualquer variável que seja eleita para realizar o

estudo cinético deve ser função dos outros parâmetros que incidem sobre o processo ou estar relacionadas entre elas. Este fato implica identificar as variáveis dependentes e independentes do processo e estabelecer os modelos que as relacionam e realizar as determinações necessárias.

Nos processos fermentativos as variáveis que têm sido mais estudadas são a concentração de biomassa, o consumo do substrato, a síntese de um ou vários metabolitos, o consumo de oxigênio e a produção de gás carbônico. Dentre estas variáveis, a síntese de biomassa e o consumo do substrato têm permitido estabelecer uma série de critérios e parâmetros que caracterizam qualquer processo fermentativo (Pandey 2001).

A partir dos estudos cinéticos das fermentações podem ser definidos:

A velocidade específica de crescimento (μ);

O rendimento do processo ($Y_{X/S}$, $Y_{X/O}$);

A produtividade do processo (p);

O calor metabólico gerado na fermentação (Q);

Os critérios de controle do processo;

A estratégia a seguir para produzir um metabolito específico;

Os critérios de escalonamento.

3.4.7 Teoria do crescimento microbiano.

O estudo de cada uma das fases do crescimento microbiano pode ser realizado através da aplicação das distintas ferramentas matemáticas disponíveis. A variação da biomassa no tempo pode se definir de forma geral através da Equação 1 (Pandey 2001; Domenech 2000).

$$\frac{dX}{dt} = f(X, S, T, \text{etc.}) \quad \text{Eq. 3.1}$$

Onde:

X: concentração de biomassa (g L^{-1} ; No. de células L^{-1})

t: tempo (h)

S: Concentração de substrato (g L^{-1})

T: Temperatura (°C).

O diferencial presente na Equação 1 representa a velocidade de síntese de biomassa por unidade de tempo. Uma das principais dificuldades encontradas no estudo e desenvolvimento dos processos de fermentação em estado sólido está relacionada com as características dos sistemas heterogêneos, onde é praticamente impossível tomar amostras iguais de diferentes lugares durante a fermentação para determinar as concentrações de biomassa, substrato e produtos. Estes fatores refletem de forma aguda quando se estuda os processos cinéticos, mas existem diferentes alternativas que permitem modelar matematicamente este processo tornando-o objetivo e satisfatório (Domenech 2000, Rodríguez-León *et al.*, 1983).

A determinação da biomassa por métodos indiretos tem sido empregada por diferentes pesquisadores (Sato *et al.*, 1982; Rodríguez-León *et al.*, 1983), A metodologia desenvolvida nestas pesquisas está baseada no metabolismo respiratório. O oxigênio consumido e o gás carbônico produzido são os resultados dos processos metabólicos através dos quais os microorganismos aeróbicos realizam a oxidação do substrato para obter a energia necessária para a reprodução e a realização das funções biológicas de manutenção. Estas atividades metabólicas estão associadas ao crescimento do microorganismo e podem ser utilizadas para estimar a biomassa sintetizada. Então é possível relacionar em termos diferenciais o O_2 consumido (dO_2/dt) e o CO_2 produzido (dCO_2/dt) (Sato *et al.* 1982).

$$\frac{dO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{x/O_2}} \frac{dX}{dt} + mX \quad \text{Eq. 3.2}$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{x/CO_2}} \frac{dX}{dt} + mX \quad \text{Eq. 3.3}$$

Estes modelos de correlação são resolvidos mediante a aplicação de métodos numéricos para a solução de equações diferenciais. O emprego de computadores e “softwares” adequados a um bom sistema de detecção de concentrações de gases acoplados à saída dos gases do fermentador garante

determinar de forma contínua a formação de biomassa e a geração de calor (Rodríguez-León 1983; Sato *et al.* 1982).

3.4.8 Considerações sobre o calor metabólico gerado nos processos fermentativos em fase sólida.

A partir dos resultados do estudo cinético das fermentações pode se estimar o calor metabólico produzido e a demanda de ar para remover este calor. A demanda de ar de resfriamento é calculada a partir de um balanço global de energia no biorreator (Narahara *et al.*, 1984; Rodríguez León *et al.*, 2007a). A partir desse balanço são obtidas as Equações 3.4 e 3.5:

$$W_g = \frac{Q_m - hA(T_{out} - T_{in})}{0.24(T_{out} - T_{in}) + 0.45(T_{out}H_{out} - T_{in}H_{in}) + \lambda(H_{out} - H_{in})} \quad \text{Eq.3.4}$$

$$Q_m = \frac{\Delta Q}{\Delta t} = \frac{Q_o}{12} \left(\frac{1 - \eta}{\eta} \right) \sigma_B \gamma_B \mu X_o e^{\mu} \quad \text{Eq.3.5}$$

Onde:

W_g: Fluxo do ar seco requerido (kg ar seco h⁻¹).

Q_m: Calor metabólico gerado (kcal h⁻¹).

h: Coeficiente de transferência de calor externo à parede do biorreator (Kcal m⁻² h⁻¹ °C⁻¹).

A: Área da superfie do reator: (m²)

T_{out}: Temperatura da saída do ar (°C).

T_{in}: Temperatura do ambiente (°C).

λ: Calor latente de vaporização da água (kcal (kg água)⁻¹).

H_{in}: Umidade absoluta do ar na entrada (kg água (kg ar seco)⁻¹).

H_{out}: Umidade absoluta do ar na saída (kg água (kg ar seco)⁻¹).

Q_O: Calor de combustão do substrato (kcal (O₂ equivalente-grama consumido)⁻¹).

η: Rendimento energético.

σ_B: Fração de carbono na biomassa

γ_B: Grau de redução da biomassa.

μ: Velocidade específica de crescimento (h⁻¹)

X_O: Biomassa inicial (kg)

t: tempo de fermentação (h)

O rendimento energético é calculado pela Equação 3.6:

$$\eta = \frac{\gamma_B \sigma_B}{\gamma_S \sigma_S} Y_{x/s} \quad \text{Eq. 3.6}$$

Onde:

σ_s : Fração de carbono no substrato.

γ_s : Grau de redução do substrato.

$Y_{x/s}$: Rendimento biomassa/substrato.

Consideram-se desprezíveis os termos da Equação 3.4 correspondente à produção de água metabólica e o calor transferido através das paredes do fermentador, pode-se obter uma equação simplificada (Equação 3.4) da combinação das Equações 3.4 e 3.5:

$$W_g = \frac{\frac{Q_o}{12} \left(\frac{1-\eta}{\eta} \right) \sigma_B \gamma_B \mu X_o e^{\mu t}}{\lambda (H_{out} - H_{in})} \quad \text{Eq.3.7}$$

3.4.9 Considerações sobre o escalonamento dos processos fermentativos em fase sólida.

No caso das fermentações aeróbicas para prever os resultados, a escala de produção a partir de resultados obtidos no laboratório ou em planta piloto requer uma análise cuidadosa de cada uma das variáveis físico-químicas e biológicas (Quintero, 1993).

Os diferentes critérios para o escalonamento propostos na literatura baseiam-se na similaridade dos processos em escalas diferentes. Esta similaridade (geométrica, cinemática ou dinâmica) nos diferentes fenômenos é o que garante o mesmo padrão de fluxo e a reprodução dos resultados em equipamentos de diferentes dimensões (Skelland 1970).

A fermentação em estado sólido é aplicada comercialmente em muitos países, e obviamente são utilizados critérios de escalonamento no projeto de plantas industriais. Entretanto existe uma falta de informação sobre este tema por parte das

indústrias caracterizando os segredos industriais das tecnologias. Há também uma carência de informação dos centros de pesquisa e das universidades, o que leva a pensar que o escalonamento tem sido feito a partir de métodos de tentativa e erro (Lonsane *et al.*, 1992).

3.5 Princípios básicos da lixiviação

A lixiviação consiste na dissolução preferencial de um ou vários solutos de interesse por meio do contato entre um sólido e um solvente líquido. É uma das operações unitárias mais antigas da engenharia química e encontra-se bem difundida na indústria metalúrgica, na produção de açúcar de cana e beterraba. Também é muito empregada na indústria farmacêutica e de alimentos na obtenção de princípios ativos presentes nas plantas, elaboração de essências para perfumes e cosméticos (Treybal, 1989; Coulson & Richardson, 1981).

Para desenvolver um processo de lixiviação com sucesso, além da seleção de equipamento utilizado, existe com freqüência a influência de diferentes variáveis entre as quais se destacam a preparação dos sólidos, a relação sólido/solvente, a temperatura do processo, o pH do solvente, a tensão superficial do líquido, o grau de agitação do sistema, a presença de reação química ou não na extração (Treybal, 1989; Coulson & Richardson, 1981).

3.5.1. Preparo dos sólidos

A forma de extração depende em muitos casos dos tratamentos prévios a que são submetidos os sólidos porque os solutos não estão na superfície do material. Geralmente, os sólidos são triturados ou moídos com o objetivo de facilitar o contato entre o soluto, que se encontra na fase sólida, e o solvente (fase líquida) o que incrementa a velocidade da transferência dos solutos para o solvente. No caso das fermentações sólidas, como o meio de fermentação geralmente apresenta um alto teor de umidade, o trituração e/ou moagem são dificultados. Quando os metabólitos são extracelulares não é necessária a alteração no tamanho de partícula do meio sólido fermentado. Além disso, o efeito mecânico produzido pela redução do

tamanho de partícula poderia em alguns casos afetar a estrutura das enzimas e a sua atividade catalítica (Rodríguez-Fernández 2004).

3.5.2 Relação sólido/solvente

A relação entre a quantidade de sólido a tratar e o volume de solvente é de grande importância. A intensidade e o caráter do processo de extração sólido-líquido dependem em grande parte da difusividade do soluto na fração do solvente selecionado, assim como da concentração de saturação do soluto no solvente utilizado, pois está diretamente relacionado com a força motriz do processo. Por outro lado, é necessário levar em consideração que um grande volume de solvente na extração dos solutos aumenta consideravelmente os custos de purificação e recuperação do produto de interesse (Treybal, 1989; Coulson & Richardson, 1981).

Também devem ser conhecidos os efeitos dos solventes utilizados sobre os metabólitos de interesse, pois têm sido reportadas perdas de até 90% devido aos solventes empregados na extração (Castilho *et al.*, 1999). No caso específico das pectinases, xilanases e fitases, é necessário saber que essas enzimas são praticamente insolúveis em álcoois e outros solventes orgânicos.

3.5.3 Temperatura

Muitas vezes na indústria química as lixiviações ocorrem em altas temperaturas para incrementar a solubilidade dos solutos no solvente e facilitar a difusividade do soluto no líquido. No caso dos produtos naturais (essências e fármacos) e biológicos (proteínas e enzimas) o incremento excessivo da temperatura afeta a qualidade dos produtos extraídos e a extração de produtos indesejáveis no processo (Treybal 1989). Motivado pelas características dos metabólitos que são extraídos das fermentações sólidas deve-se estabelecer um equilíbrio entre as propriedades físico-químicas do solvente e as propriedades bioquímicas dos solutos (metabólitos).

Outro aspecto importante da temperatura é sua incidência direta na velocidade de extração dos metabólitos, aspecto que será analisado mais adiante ao analisar a cinética do processo.

3.5.4 Agitação

Os sistemas de lixiviação com agitação são muito utilizados, pois favorecem a difusão dos solutos no solvente. Esse efeito diminui os gradientes de concentração que se produzem durante a passagem do soluto desde o sólido até o meio do líquido; e a conseguinte diminuição do tamanho da camada de líquido adjacente ao sólido (Coulson & Richardson 1981).

3.5.5 pH

A influência do pH é fundamental nas extrações acompanhadas de reações químicas; estas por sua vez dependem de um pH ótimo para a extração do soluto. Portanto, a extração de enzimas e proteínas esta influência é baseada no conhecimento que se tenha do intervalo de pH onde a estabilidade seja ótima e, sua atividade biológica seja elevada também (Rodríguez Fernández 2004).

3.5.6 Tensão superficial

A tensão superficial é um parâmetro físico de significativa importância no processo de extração sólido-líquido, já que afeta diretamente a difusividade dos solutos no solvente. A sua influência pode se atenuar por duas vias: o incremento da temperatura e as suas conseqüências, e utilizando substâncias surfactantes que não afetem os solutos e diminuam a tensão superficial dos solventes. Muitas vezes os surfactantes presentes no meio de fermentação, como são considerados inertes e não são degradados durante as fermentações, podem já estar presentes na lixiviação sem necessidade de serem adicionados ao solvente. Entre os surfactantes mais utilizados encontram-se o Tween 80, o Oleato de Sódio, o Sódio Laurilsulfato e o Monooleato de Sacarose (Rodríguez Fernández 2004).

3.5.7 Sistemas de lixiviação mais utilizados na indústria.

Para a realização dos processos de lixiviação têm-se desenvolvido distintos equipamentos relacionados ao tipo de contato entre o sólido e o líquido, sendo os de escorregamento ou de dispersão dos sólidos no solvente. Este último caso pode ser contínuo ou descontínuo. Na Tabela 3.4 são reportados alguns dos equipamentos mais conhecidos (Coulson & Richardson 1981).

Tabela 3.4. Distintos sistemas empregados nos processos de lixiviação.

Sistemas de lixiviação.	
Tanques descontínuos.	Extrator tipo Rotocel.
Filtros adaptados.	Extrator tipo Bollman.
	Extrator tipo Kennedy.
Sistemas de sólidos em dispersão.	
Tanques agitados.	Extrator tipo Hidelbrant de total imersão.
Tanque de Pachuca	Extrator tipo Screw-Conveyor.
	Tanques de agitação.
	Tanques de sedimentação gravimétrica.

3.5.8 Modelagem matemática dos sistemas de lixiviação descontínuos.

O tratamento matemático da lixiviação em sistemas descontínuo é complexo sendo difícil de quantificar a transferência da matéria no interior dos poros da matriz fermentada. É impossível definir a geometria (forma e dimensões) através da qual acontece a transferência. Aplicando o conceito de uma camada delgada como responsável pela resistência à transferência de massa, se define por uma equação de transferência de matéria para sistemas descontínuos reportada por Coulson & Richardson (1981):

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D_{AB}A_T(C_S - C)}{\delta} \quad \text{Eq. 3.8}$$

Onde:

D_{AB} : Difusividade ($\text{cm}^2 \text{min}^{-1}$).

A_T : Área de transferência (cm^2).

δ : Tamanho da camada (cm).

C: Concentração do soluto na solução líquida para um tempo dado (g L^{-1}).

C_S : Concentração de equilíbrio do soluto no solvente (g L^{-1}).

M: Massa de soluto transferido no tempo (min).

Considerando que o volume da solução permanecerá constante, o diferencial de massa fica da seguinte forma:

$$dM = VdC \quad \text{Eq. 3.9}$$

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D_{AB}A_T(C_S - C)}{\delta V} \quad \text{Eq. 3.10}$$

Integrando a equação diferencial acima, é obtida a equação utilizada na determinação dos parâmetros que definem o processo de lixiviação num sistema descontínuo representada na Equação 7:

$$C = C_s (1 - e^{-kt}) \quad \text{Eq.3.11}$$

Onde:

C: Concentração do soluto na solução líquida para um tempo dado (g/L).

C_S: Concentração de equilíbrio do solvente (g/L).

k: Constante cinética da velocidade de extração (min⁻¹).

t: Tempo de extração (min).

A constante cinética do processo depende da temperatura e do sistema sólido-líquido que seja empregado. Esta constante está relacionada com outros parâmetros que caracterizam o processo através da Equação 3.12:

$$k = \frac{D_{AB}A_T}{\delta V} \quad \text{Eq. 3.12}$$

Onde:

D_{AB}: Difusividade (cm² min⁻¹).

A_T: Área de transferência (cm²).

δ: Espessura da camada (cm).

V: Volume de solvente (cm³).

Como já mencionado, os processos de lixiviação ou extração sólido-líquido, podem estar ou não relacionados a uma reação química. O mecanismo que

controlará a transferência de massa de solutos do sólido ao líquido vai depender da ocorrência de uma reação química ou não. No caso de não existir reação química o mecanismo de controle será a difusividade dos solutos no líquido. Caso ocorra reação química durante a extração o mecanismo que controlará a lixiviação será a própria reação. O seguinte critério é estabelecido para determinar qual dos dois mecanismos controla a extração (Coulson & Richardson 1981).

Se $E > 40 \text{ KJ mol}^{-1}$	Controla a reação química.
$E < 12 \text{ KJ mol}^{-1}$	Controla a difusividade.

E: Energia desenvolvida no processo.

3.6 Ultrafiltração

Nos últimos anos, com o avanço e o desenvolvimento alcançado no mundo pela biotecnologia, é notável o desenvolvimento dos processos de filtração através de membranas. Estes processos têm grande importância, pois se trabalha com elementos de tamanho microscópicos (células, proteínas, metabólicos, etc.) de difícil recuperação com os métodos tradicionais da indústria química. Normalmente, a filtração por membranas não vem substituí-los, pois todo processo de filtração por membranas utiliza uma etapa prévia de filtração convencional, centrifugação, sedimentação ou até tratamentos enzimáticos ou físico-químicos com o objetivo de separar ou “quebrar” os sólidos de maior tamanho e favorecer assim a separação por membranas (Schweitzer 1997; Belter 1988).

Os processos de filtração por membranas são processos que buscam separar moléculas de soluto em soluções aquosas diluídas onde não haja formação de torta. Isto é alcançado com a aplicação de sistema de fluxo cruzado, ou seja, o fluxo de alimentação é tangente à superfície do filtro; ao mesmo tempo a vazão através do filtro (membrana) é menor que a vazão tangencial, o qual possibilita que não exista acumulação de torta na superfície da membrana. Estes processos são utilizados com três finalidades específicas: concentrar, purificar e diafiltrar (Schweitzer 1997; Belter 1988).

As membranas (consideradas meios filtrantes) são camadas delgadas com muitos microporos, de tamanho entre 1,0 e 0,1 μm , dispersos por toda a superfície. A porosidade, em alguns casos 80% da superfície da membrana, é capaz de permear moléculas de pequeno tamanho e reter as de grande tamanho (Schweitzer 1997; Belter 1988).

A Tabela 3.5 demonstra os distintos tipos de filtração com membranas segundo o tamanho do soluto que se deseja separar (Schweitzer 1997; Belter 1988).

Tabela 3.5. Tipos de ultrafiltros mais utilizados industrialmente

Propriedades	Tipo de módulo		
	Hollow fiber	Spiral wound	Plate and frame
Densidade de empacotamento.	Alta	Moderada	Moderada
Relação área/volume	15 000 $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$	300-900 $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$	200-400 $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$
Tolerância a sólidos suspensos	Baixa	Baixa	Moderada
Facilidade de limpeza.	Retrolavagem	Regular	Regular
Configuração	Módulo	Módulo	Folha ou módulo
Resistência à Ruptura	Baixa	Moderada	Boa
Custo de Fabricação	50-200 U\$ m^{-2}	300-1000 U\$ m^{-2}	1000-3000 U\$ m^{-2}

3.6.1 Classificação das membranas

As membranas se classificam em dois grandes grupos: Hidrofílicas e Hidrofóbicas. As membranas hidrofílicas são construídas normalmente por diferentes materiais como os ésteres de celulose, nylon, polivinilclorado e acronitrilo. Estes polímeros permitem a estabilidade da membrana em um amplo espectro de pH, temperatura e presença de solventes orgânicos. Estas membranas são caracterizadas pelo peso molecular nominal de corte ("*cut off*"), medidas de 1 kDa, 10 kDa, 100 kDa e 1.000 kDa. O "*cut-off*" do peso molecular representa o tamanho máximo da molécula que consegue permear pela membrana (Schweitzer 1997; Belter 1988).

As membranas hidrofóbicas são fabricadas marcando com calor os poros em filmes poliméricos, tais como o polipropileno. Em seguida, são derramadas gotas de um polímero hidrofóbico na superfície da membrana, tornando sua porosidade ao redor de 35% com uma espessura de 3 mm. O filme polimérico recoberto pelo

polímero hidrofóbico é usado na construção da membrana, projetando-a para que a superfície recoberta fique em contato com o fluido de alimentação. Estas membranas têm o inconveniente de que a sua hidrofobicidade durante a sua utilização causa deformações, tornando seu emprego limitado a soluções diluídas onde o solvente não seja água ou sejam impregnadas em uma mistura etanol-água para soluções aquosas (Schweitzer 1997; Belter 1988).

3.6.2 Critérios de seleção das membranas. Vantagens e desvantagens.

Para a escolha de uma membrana que vai ser utilizada em um processo de ultrafiltração devem ser considerados os seguintes aspectos (Schweitzer 1997; Belter 1988):

- ✓ Tamanho do soluto de interesse;
- ✓ Temperatura e pH da solução;
- ✓ Geometria da membrana;
- ✓ Tipo de solvente presente no meio.

Os processos de ultrafiltração têm as seguintes vantagens (Schweitzer 1997; Belter 1988):

- ✓ Permitem a separação de partículas de tamanho pequeno e de ordem molecular, onde se destacam as proteínas produzidas durante o processo de fermentação;
- ✓ Como são processos de filtração por membranas, não há formação de torta na superfície do meio filtrante;
- ✓ Obtém-se um alto grau de purificação e pureza do soluto de interesse.

E apresentam as seguintes desvantagens (Schweitzer 1997; Belter 1988):

- ✓ As fermentações em batelada, precedentes a estes processos, raras vezes produzem produtos de igual quantidade;
- ✓ São poucos os produtos atualmente conhecidos por sua importância no mercado, os quais permitem a operação de filtração por membranas de forma contínua;

- ✓ A forma mais simples de controlar a qualidade dos produtos que se obtêm é trabalhando em forma descontínua.

É importante destacar a grande aceitação dos processos de ultrafiltração na purificação de proteínas, pois estas são moléculas com uma cadeia polipeptídica grande contendo grupos terminais que conferem uma carga total à molécula, a qual varia com o pH do meio. O aperfeiçoamento das técnicas de ultrafiltração para separar proteínas ocorre devido à deficiência dos processos tradicionais de separação para tratar estes solutos. Esta técnica consegue separar produtos da indústria farmacêutica e biotecnológica com a qualidade exigida pelo mercado, utilizando o peso molecular destes produtos. Estes processos com membranas produzem pequenas mudanças no pH, sobretudo na zona mais próxima ao meio filtrante (membrana), o qual favorece o desprendimento de grupos carregados anexos aos grupos terminais da proteína, favorecendo assim o isolamento. A ultrafiltração também é utilizada para fazer purificações parciais das soluções. Dependendo do objetivo que se busque se pode definir a melhor estratégia, ou seja, concentrar, purificar ou diafiltrar (Schweitzer 1997; Belter 1988).

Os processos de filtração através de membranas são influenciados por um fator determinante: a geometria do sistema que está relacionada ao tipo de módulo utilizado. Na maioria dos casos, é esta geometria que define qual modelo será empregado no processo de recuperação ou “down-stream”.

3.6.3 Fatores que afetam os processos de ultrafiltração.

É conveniente analisar as principais resistências que se podem encontrar nos processos de ultrafiltração. A primeira é a *concentração de polarização*, a qual surge ao ser retido parte do soluto presente na alimentação, provocando um aumento na concentração dessas espécies na zona próxima ao filtro, criando uma diferença de concentração entre a referida zona e o líquido, afetando a difusividade das partículas menores pelo filtro (Schweitzer 1997; Belter 1988).

Outra resistência é devida à formação de uma camada de gel polarizada sobre a superfície do filtro, a qual se manifesta de forma parecida com a

concentração de polarização, mas esta obstrui a passagem das moléculas através do filtro (Schweitzer 1997; Belter 1988).

A última resistência presente nos processos com membranas é conhecida como “fouling”. Consiste na deposição no interior dos canais da membrana, por adsorção de partículas que tenham o diâmetro maior que os poros, até o bloqueio total desses canais, o que dificulta a separação por uma redução na vazão (Schweitzer 1997; Belter 1988).

Existem diferentes estratégias para minimizar estas resistências:

- ✓ Reduzir a concentração de partículas e géis na alimentação mediante uma operação de filtração convencional ou centrifugação prévia da alimentação;
- ✓ Manter o valor mais alto possível da velocidade da alimentação do filtro manter o fluxo de alimentação paralelo à superfície do filtro;
- ✓ Utilização de um ciclo de lavagem, o qual pode ser em igual sentido da alimentação (co-corrente) ou em sentido inverso (contra-corrente). Nos módulos “hollow fiber” se utiliza este último tipo de lavagem (também chamada “retro-lavagem”).

3.7 Conservação das enzimas em longo prazo.

Além do custo de produção das enzimas purificadas, os processos esbarram em outra dificuldade no uso de enzimas, que possuem uma relativa instabilidade durante o processo catalítico. A estabilização e proteção de atividades enzimáticas são fenômenos que normalmente envolvem a compactação de estruturas proteicas, aumentando as forças que mantêm as estruturas terciárias e quaternárias destas moléculas. As proteínas podem ser desnaturadas por calor, pH, certos solventes orgânicos miscíveis (álcool ou acetona), e por alguns solutos (uréia e cloreto de guanidina e detergentes) (Ortiz-Costa, 2002; Lopes & Sola-Pena, 2001; Sola-Penna, 1998).

Os métodos mais empregados na estabilização das enzimas reportados na literatura científica são (Iyer, 2008; Fágián, 1995):

- ✓ Procura de enzimas com alta estabilidade natural;

- ✓ Melhoramento genético dos microorganismos produtores de enzimas;
- ✓ Adição de agentes estabilizadores;
- ✓ Modificação química;
- ✓ Encapsulamento em géis, fibras e micélios.

A influência da adição de agentes estabilizadores para estabilizar as proteínas e as enzimas é um balanço entre as interações intramoleculares da molécula protéica (grupos COOH e grupos NH₂) com o solvente do ambiente. Esta estabilidade está relacionada à resistência de fatores negativos como a temperatura, pH ou agentes desnaturantes que afetam a estabilidade da molécula ou sua função biológica. A perda da estrutura espacial ou estrutura terciária da enzima e a sua capacidade de degradação do substrato é conhecida como desnaturação das enzimas. A desnaturação das proteínas pode ser reversível pela remoção dos agentes desnaturantes, ou mudanças nas condições de conservação; mas quando a perda de atividade é irreversível é conhecida como inativação (Fágáin *et al.*, 1995).

A estabilização das enzimas é consequência particular de um simples fenômeno termodinâmico, a ligação preferencial dos componentes do solvente (água + agente) pela proteína. De fato, estabilizadores (sacarose, glicerol, triose, etc.) são classes singulares de compostos que induzem a estrutura da proteína para uma forma mais compacta (Iyer, 2008; Ortiz-Costa, 2002; Lopes, 2001; Sola-Penna, 1998; Fágáin, 1995).

A adição de estabilizadores, como é o caso do glicerol, é atribuída ao efeito negativo sobre a atividade da água na solução e a diminuição de possíveis contaminações microbianas. Como exemplo, proteases podem ser armazenadas em soluções com glicerol (50% a 70%) a uma temperatura de 33°C durante 23 dias sem se observar perdas na sua atividade. As soluções com aproximadamente 40% de glicerol são capazes de reter 100% de atividade de malate desidrogenases durante meses (Iyer 2008; Schmid 1979).

Normalmente a conservação da atividade das enzimas nos formulados enzimáticos é modelada pela equação de Arrhenius (Garcia *et al.*, 1998) como é mostrado abaixo:

$$A = A_0 e^{-kt} \quad \text{Eq.3.13}$$

Onde:

A: Atividade num tempo determinado (U mL^{-1}).

A_0 : Atividade inicial (U mL^{-1}).

k: Constante de desnaturação (semanas^{-1}).

t: Tempo (semanas).

A constante cinética de desnaturação das enzimas nas diferentes condições de armazenamento pode ser isolada e calculada através da Equação 3.14

$$k = -\frac{\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)}{t} \quad \text{Eq.3.14}$$

Este modelo permite prever o valor da atividade das enzimas capaz de ser retida, vida de prateleira, pelas formulações no tempo uma vez armazenadas, assim como a que intervalo de temperatura é recomendável conservar estas formulações.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microorganismo.

Foi utilizada uma cepa de *Aspergillus niger* F3, procedente da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. Esta cepa foi escolhida por suas potencialidades e devido ao interesse industrial nas enzimas produzidas pelas espécies do gênero *Aspergillus*.

4.2 Manutenção e conservação do microorganismo.

A manutenção da cepa foi feita mediante sementeiras periódicas em meio Czapek sólido. Os tubos inclinados foram incubados durante 7 dias a temperatura de 30°C. Após a incubação foram conservadas em geladeira a uma temperatura entre 4 e 8°C.

4.3. Preparo do inóculo.

Foram pesadas 10 g de polpa cítrica moída e adicionadas em 100 mL de água destilada. Esta suspensão foi autoclavada por 15 minutos a 121°C para extrair os açúcares livres presentes na matriz sólida. Após a autoclavagem, a solução foi esfriada até temperatura ambiente e filtrada a vácuo. O filtrado foi diluído em uma proporção 1:10. Como fonte de nitrogênio foi empregado Nitrato de Amônio no inóculo, sendo adicionada à solução filtrada e diluída numa relação 1,5% peso/volume. O pH foi ajustado a 5,0 com HCl 0,1N. O meio foi novamente autoclavado a 1atm durante 20 minutos. Após resfriamento o meio foi inoculado com a cepa de *Aspergillus niger* F3. O inóculo foi incubado em shaker a 30°C com uma agitação rotatória de 120 rpm durante 96 horas.

4.4 Substrato e preparação da fermentação em biorreatores.

O meio de cultivo e o tempo de fermentação foram definidos por Spier 2008. Foi empregada como suporte sólido e matriz dos açúcares a polpa cítrica moída. A

distribuição de tamanho da polpa usada no meio foi de 75% com um tamanho de partícula entre 2 e 0,8 mm e 25% com um tamanho superior a 2 mm.

A composição química e bromatológica da polpa cítrica definida por Castro Neto (2004) é mostrada na Tabela 4.1:

Tabela 4.1. Composição química e bromatológica da polpa cítrica seca.

Componente	Teor (%)
Matéria seca	89,17
Matéria orgânica	79,31
Proteína bruta	6,87
Extrato etéreo	2,73
Fibra bruta	12,19
FDN	23,85
FDA	20,15
Pectina	29,3
Lignina	1,09
Celulose	22,54
NIDA (% do N total)	11,02
CHO sol.	19,65
Cinzas	5,87
Cálcio	2,02
Fósforo	0,19

Como sais suplementares o meio teve a seguinte composição levando em consideração o peso dos sais e o peso do substrato em base seca:

NH_4NO_3	0,43 %
Na_2SO_4	0,021 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,077 %
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,042 %
KCl	0,162 %
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0,011 %

Para a preparação do substrato os sais e o Tween 80 (1% v/v) foram dissolvidos em água, o pH foi ajustado para 5,0. Uma vez obtido esse valor de pH

foram misturadas a solução com os sais, o inoculo e a polpa cítrica, mantendo a relação de inoculação 1/10 volume/peso sobre a base do substrato úmido a fermentar. O meio foi balanceado considerando as umidades desejadas (55%; 60%; 65%).

4.5 Dispositivos e condições de fermentação.

As fermentações foram realizadas em fermentadores de 5 e 20 kg de carga total de substrato (Ver Anexo 4). A aeração foi estudada em quatro níveis 0,5; 0,75; 1 e 1,25 VKgM e fornecida através um compressor marca Schultz modelo WSV 6 com capacidade máxima de 6 pés³/min de ar.

A vazão de ar a ser fornecida no sistema de fermentação foi calculada pela seguinte equação:

$$F_{Ar} = VkgM \cdot M_s \quad \text{Eq. 4.1}$$

Onde:

F_{Ar} : vazão do ar (L min⁻¹).

VkgM: volume de ar que passa através do meio / quilograma de meio / minuto.

M_s : Massa do substrato (kg).

4.6 Determinação da atividade da enzima Fitase.

A metodologia para determinar a atividade da fitase foi similar à descrita por Greiner & Farouk (2007). Neste caso é importante assinalar que foi seguida a mesma metodologia reportada na literatura, porém utilizou-se tampão Citrato a pH 3,0.

4.6.1 Preparo do Tampão Citrato 0,1 M para pH 3,0.

A: Solução de Citrato Dissódico 0.1 M

Foram pesados 21 gramas Acido Cítrico Monohidratado da marca SIGMA e dissolvidas em 200 mL de NaOH 1 N, e completou-se com água destilada até 1 litro.

B: Solução Tampão Citrato 0,1 M pH 3,0.

Foram tomados 4,9 mL de HCl concentrado e adicionados em 500 mL de água destilada.

- ✓ Foram misturados 40,5 mL da solução de Citrato Dissódico 0,1 M e 59,5 mL da solução de HCl 0,1 N.
- ✓ Foi ajustado o pH para 3,0.

4.6.2 Preparo da solução de Fitato 2,5 mM em tampão Citrato a pH 3,0.

- ✓ Foram pesados 0.125 g de fitato de sódio em um copo de Becker.
- ✓ Foram dissolvidos em 45 mL da solução de Citrato Dissódico 0,1 M para pH 3,0.
- ✓ A solução foi ajustada para volume final de 50 mL.

4.6.3 Curva padrão para fosfato liberado.

- ✓ Foram pesados 0,439 g de Fosfato de Potássio monohidratado (KH_2PO_4).
- ✓ Posteriormente foram dissolvidos em 80 mL de água destilada e ajustados para 100 mL.
- ✓ Da solução anterior, foram tomados 5 mL e adicionados em 80 mL de água destilada e ajustados para 100 mL.
- ✓ Desta última solução, foram tomados diferentes volumes desde 0,1 mL até 0,9 mL, completando-se com água destilada até 1 mL. Os valores das concentrações de fósforo são mostrados na Tabela 4.2.
- ✓ As soluções foram agitadas em um vortex.
- ✓ Foram tomados de cada solução anterior 0,40 mL, misturados com 1,5 mL de uma solução 1:1:2 (v:v:v) de H_2SO_4 5N, Molibdato de Amônio 10 mM e Acetona.
- ✓ O branco foi feito adicionando 0,4 mL de água destilada num tubo de ensaio.
- ✓ Após 1 minuto foram adicionados 0,1 mL de uma solução de Ácido Cítrico 1N.

- ✓ As amostras foram lidas num espectrofotômetro com 355 nm de comprimento de onda.

Tabela 4.2. Concentrações das soluções para fazer a curva padrão do fósforo livre.

Solução de KH_2PO_4 (mL)	Água destilada (mL)	Conc. de Fósforo ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)
0,1	0,9	0,0646
0,2	0,8	0,1293
0,3	0,7	0,2000
0,4	0,6	0,2585
0,5	0,5	0,3232
0,6	0,4	0,3878
0,7	0,3	0,4524
0,8	0,2	0,5170
0,9	0,1	0,5820

4.6.4 Reação enzimática

- ✓ Foram adicionados 0,35 mL da solução de Fitato 2,5 mM em tampão Citrato a pH 3,0 em tubos eppendorf.
- ✓ Os tubos foram aquecidos a 50°C durante 10 minutos .
- ✓ Posteriormente, foram adicionados 0,05 mL do extrato contendo a enzima.
- ✓ Foram agitados imediatamente os tubos.
- ✓ A reação foi incubada a 50°C durante 15 min.
- ✓ Foi detida a reação adicionando 1,5 mL de uma solução 1/1/2 (v/v/v) de H_2SO_4 5N, Molibdato de Amônio 10 mM e Acetona
- ✓ Após 1 minuto foram adicionados 0,1 mL de uma solução de Ácido Cítrico 1N.
- ✓ As amostras foram centrifugadas a 10 000 rpm durante 5 minutos.
- ✓ As amostras foram lidas num espectrofotômetro a 355 nm de comprimento de onda.

4.6.5. Cálculo da atividade da enzima Fitase.

O cálculo da atividade da enzima fitase foi feita mediante a Equação 4.2:

$$A = \left(\frac{D.O.}{m} \right) \left(\frac{1}{t} \right) \left(\frac{V_T}{V_A} \right) d \quad \text{Eq. 4.2}$$

Onde:

A: Atividade enzimática (U/mL).

DO: Densidade ótica da amostra.

m: Coeficiente angular da curva padrão (μmol de fósforo/mL).

V_T : Volume total da mistura do ensaio (2mL).

V_A : Alíquota do extrato enzimático (0,05 mL).

t: Tempo de reação (min).

d: Diluição.

A unidade de atividade foi definida como a quantidade de fósforo liberado por mililitro por minuto ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$) nas condições estabelecidas.

4.7 Determinação da atividade da enzima Pectinase.

A metodologia para determinar a atividade da pectinase foi a mesma descrita por Rodríguez-Fernández 2007.

4.7.1 Preparação do Reativo DNS

- ✓ Foram pesados 8 g de NaOH e dissolvidos em 200 mL de água destilada.
- ✓ A solução de NaOH foi aquecida.
- ✓ Foram pesadas 5 g de Ácido Dinitrosalissílico e dissolvidas lentamente na solução de NaOH.
- ✓ Foram pesadas 150 g de Tartarato de Sódio e Potássio e dissolvidas em 250 mL de água fervendo.
- ✓ As duas soluções foram misturadas e deixadas resfriando até temperatura ambiente durante 24 horas.
- ✓ Finalmente foram completadas para um volume de 500 mL.

4.7.2 Preparação da solução de Pectina 0.5% em tampão Citrato 0,1 M para pH 4,0.

- ✓ Foram pesados 0,5 g de pectina da marca SIGMA em um copo de Becker.

- ✓ Foram adicionados 80 mL da solução de Citrato Dissódico 0,1 M para pH 4,0 e aquecidos até dissolver toda a pectina.
- ✓ A solução foi resfriada até temperatura ambiente e completada com tampão Citrato Dissódico 0,1 M pH 4,0 para 100 mL.

4.7.3 Curva padrão do ácido galacturônico.

Para o cálculo da atividade enzimática, os açúcares liberados pela reação enzimática foram determinados utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959).

- ✓ Foram pesados 0,025 g de ácido galacturônico da marca SIGMA, posteriormente foram dissolvidos em 25 mL de água destilada e ajustados em um balão volumétrico de 25 mL.
- ✓ Foram tomados diferentes volumes da solução anterior desde 0,2 mL até 0,8 mL, completando com água destilada até 1 mL (Ver tabela 4.3). As soluções foram agitadas em um vortex.
- ✓ O branco foi feito adicionando-se 1mL de água destilada num tubo de ensaio.
- ✓ Foi adicionado 1mL do Reativo DNS em cada tubo de ensaio.
- ✓ Os tubos de ensaio foram colocados em um banho-maria com água em ebulição durante 5 minutos.
- ✓ Após os 5 minutos os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e adicionados 5mL de água destilada em cada tubo de ensaio.
- ✓ Os tubos foram agitados em um vortex.
- ✓ As amostras foram lidas no espectrofotômetro (540 nm).
- ✓ Foi feito um gráfico de D.O. (densidade ótica) v.s. Conc. (concentração do ácido galacturônico). O coeficiente angular (m) e o intercepto da reta(n) foram calculados por mínimos quadrados.

Tabela 4.3 Concentrações das soluções para fazer a curva padrão do ácido galacturônico.

Solução de Ác. Galacturônico (mL)	Água destilada (mL)	Conc. de Ac. Galacturônico ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)
0,2	0,8	1,03
0,3	0,7	1,55
0,4	0,6	2,06
0,5	0,5	2,58
0,6	0,4	3,09
0,7	0,3	3,61
0,8	0,2	4,12

4.7.4 Reação enzimática.

- ✓ Foram adicionados nos tubos de ensaio 0,9 mL da solução tampão de pectina.
- ✓ Foram incubados em banho-maria a 50°C durante 5 min.
- ✓ Foram adicionados 0,1 mL do extrato contendo a enzima.
- ✓ Foram agitados imediatamente os tubos.
- ✓ A reação foi incubada a 50°C durante 15 min
- ✓ Foi detida a reação pela adição de 1 mL de DNS e imediatamente agitada.
- ✓ Os tubos de ensaio foram colocados em um banho-maria com água fervendo durante 5 minutos.
- ✓ Após os 5 minutos os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e adicionados 5 mL de água destilada em cada tubo de ensaio.
- ✓ As amostras foram lidas em espectrofotômetro (540 nm).

4.7.5 Cálculo da atividade da enzima Pectinase.

A atividade da pectinase foi calculada pela Equação 4.3.

$$A = ((mD.O.) + n) \left(\frac{V_R}{V_a} \right) \left(\frac{1}{t} \right) d \quad \text{Eq. 4.3}$$

A: Atividade enzimática (U/mL).

DO: Densidade ótica da amostra.

m: Coeficiente linear da curva padrão ($\mu\text{mol de Ac. Galact./mL}$).

n: Interseção da curva padrão.

V_R : Volume de reação (1mL).

V_a : Alíquota do extrato enzimático (0,1 mL).

t: Tempo de reação (min).

d: Diluição.

A unidade de atividade foi definida como a quantidade de ácido galacturônico liberado por mililitro por minuto ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$) nas condições estabelecidas.

4.8 Determinação da atividade da enzima Xilanase.

A metodologia para determinar a atividade da fitase foi similar à descrita por Rodríguez-León (2002).

4.8.1 Preparação da solução de Xilano 1% em tampão Citrato 0,1 M para pH 4,0.

- ✓ Foi pesado 1 g de xilano em um copo de Becker.
- ✓ Foram adicionados 80 mL da solução de Citrato Dissódico 0,1 M para pH 4,8 e aquecidos até ebulição.
- ✓ A solução foi resfriada sob agitação até temperatura ambiente.
- ✓ Posteriormente foi centrifugada a 5000 rpm durante 10 minutos para remover os sólidos insolúveis.
- ✓ O volume final da solução foi ajustado com tampão Citrato Dissódico 0,1M pH 4,8 num balão volumétrico de 100mL.

4.8.2 Curva padrão da Xilose.

Para determinar os açúcares liberados pela atividade enzimática foi utilizado o método do ácido dinitros-salicílico (Miller 1959).

- ✓ Foi colocado na estufa a 60 °C uma pequena quantidade de xilose durante 1 hora.
- ✓ Foram pesados 0,025 g de xilose; posteriormente foram dissolvidas em 25 mL de água destilada e ajustadas em um balão volumétrico de 25 mL.
- ✓ Foram tomados diferentes volumes da solução anterior desde 0,2 mL até 0,7 mL e completados com água destilada até 1 mL (ver Tabela 4.4). As soluções foram agitadas em um vortex.
- ✓ O branco foi feito adicionando 1mL de água destilada num tubo de ensaio.
- ✓ Foi adicionado 1mL do Reativo DNS.
- ✓ Os tubos de ensaio foram colocados em um banho a 100°C durante 5 minutos.

- ✓ Após os 5 minutos os tubos foram esfriados e adicionados 5mL de água destilada em cada tubo de ensaio.
- ✓ Os tubos foram agitados em um vórtex.
- ✓ As amostras foram lidas em um espectrofotômetro (540 nm).

Tabela 4.4 Concentrações das soluções para fazer a curva padrão da xilose.

Solução de Xilose (mL)	Água destilada (mL)	Conc. de Xilose ($\mu\text{mol mL}^{-1}$)
0,2	0,8	1,33
0,3	0,7	2,00
0,4	0,6	2,67
0,5	0,5	3,33
0,6	0,4	4,00
0,7	0,3	4,67

4.8.3 Reação enzimática.

- ✓ Foi adicionado num tubo de ensaio 0,5 mL da solução tampão de xilano e incubados em banho a 50°C durante 5 min.
- ✓ Foram adicionados 0,5 mL do extrato contendo a enzima e incubada a reação a uma temperatura de 50°C durante 20 minutos.
- ✓ A reação foi detida pela adição de 1 mL de DNS e agitada.
- ✓ A mistura foi colocada num banho de água a 100°C durante 5 minutos.
- ✓ Após foi resfriada, foram adicionados 5 mL de água destilada e agitados.
- ✓ As amostras foram lidas num espectrofotômetro (540 nm).

4.8.4 Cálculo da atividade da enzima xilanase.

A atividade da enzima xilanase foi calculada pela Equação 4.4

$$A = ((mD.O.) + n) \left(\frac{V_R}{V_a} \right) \left(\frac{1}{t} \right) d \quad \text{Eq. 4.4}$$

A: Atividade enzimática (U/mL).

DO: Densidade ótica da amostra.

m: Coeficiente lineal da curva padrão ($\mu\text{mol de xilose/mL}$).

n: Interseção da curva padrão.

V_R : Volume de reação (1mL).

V_a : Alíquota do extrato enzimático (0,5 mL).

t: Tempo de reação (min).

d: diluição.

As unidades de atividades são definidas como a quantidade de xilose liberadas por mililitro por minuto ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$).

4.9 Determinação da concentração de proteína.

A concentração das proteínas foi determinada utilizando a metodologia de Lowry (1951), utilizando como padrão Albumina de Soro Bovino (BSA).

4.8.1 Preparação do Reativo C.

Reativo A.

- ✓ Foram pesados 2 g de Na_2CO_3 e 0,4 g de NaOH.
- ✓ Foram dissolvidos em água destilada e ajustados em um balão volumétrico de 100 mL.

Reativo B1.

- ✓ Foi pesado 1g de Tartarato de Sódio e Potássio.
- ✓ Foi dissolvida em água destilada e ajustado o volume em um balão volumétrico de 50 mL (Reativo B1)

Reativo B2.

- ✓ Foi pesada 0,5g de Sulfato de Cobre Heptahidratado.
- ✓ Foi dissolvido em água destilada e ajustado o volume em um balão volumétrico de 50 mL (Reativo B2).

Reativo C.

- ✓ Foram tomados 50 mL do Reativo A.
- ✓ Foram adicionados 0,5 mL do Reativo B1 e 0,5 mL do Reativo B2.

4.8.2 Curva Padrão do BSA.

- ✓ Foram pesados 19,5 g de BSA e dissolvidas em água destilada.

- ✓ Foram ajustados em um balão volumétrico de 50 mL.
- ✓ Foram tomados diferentes volumes da solução anterior de 0,05 mL até 0,3 mL completando com água até 6mL (ver Tabela 4.5).
- ✓ Foram tomados 1,25 mL do Reativo C e adicionados em tubos de ensaio limpos.
- ✓ Foram adicionados 125 µL de cada solução padronizada nos tubos de ensaio contendo o Reativo C. O branco foi feito utilizando 125 µL de água.
- ✓ Os tubos de ensaio foram agitados e deixados reagir durante 15 minutos.
- ✓ Foram adicionados 125 µL do Reativo de Folin em cada tubo diluído em uma relação 1:3 (v:v).
- ✓ Os tubos foram agitados e deixados reagir durante 10 minutos.
- ✓ As amostras foram lidas num espectrofotômetro (700 nm).

Tabela 4.5. Concentrações padrões de proteína tomando como referência BSA.

Solução de BSA (mL)	Água destilada (mL)	Conc. de Proteína (mg mL ⁻¹)
0,05	5,95	3,25
0,10	5,90	6,50
0,15	5,85	9,75
0,20	5,80	13,00
0,25	5,75	16,25
0,30	5,70	19,50

4.8.2 Reação Protéica.

- ✓ Foram tomados 1,25 mL do Reativo C e adicionados em tubos de ensaio limpos.
- ✓ Foram adicionados 125 µL de cada solução padronizada nos tubos de ensaio contendo o Reativo C. O branco foi feito utilizando 125 µL de água.
- ✓ Os tubos de ensaio foram agitados e deixados reagir durante 15 minutos.
- ✓ Foram adicionados 125 µL do Reativo de Folin em cada tubo diluído em uma relação 1:3 (v:v).
- ✓ Os tubos foram agitados e deixados reagir durante 10 minutos.

4.8.4 Cálculo da quantidade de proteína.

A quantidade de proteína foi calculada pela Equação 4.5

$$Pr_{ot.} = \frac{m(D.O.) + n}{Dil}$$

Eq. 4.5

Prot.: Concentração de proteína (mg mL^{-1}).

DO: Densidade ótica da amostra.

m: Coeficiente linear da curva padrão (mg mL^{-1}).

n: Interseção da curva padrão.

d: Diluição.

4.10. Quantificação de biomassa.

A quantidade de biomassa produzida durante as fermentações foi determinada através da quantificação do ergosterol presente nas amostras tomadas durante diferentes tempos de fermentação similar à reportada por Carvalho *et al.* 2006.

4.10.1 Extração do ergosterol.

- ✓ Foi pesada 1 grama de meio sólido fermentado em diferentes frascos e foram adicionados 2 mL de uma solução de NaOH 2M e 4 mL de etanol.
- ✓ Os frascos foram incubados durante 1 hora a 70°C em banho-maria.
- ✓ Posteriormente foram adicionados 2 mL de HCl 1M e 1mL de KHCO_3 1M e os frascos foram agitados.
- ✓ Foram adicionados 4 mL de n-Hexano e agitados vigorosamente.
- ✓ As amostras foram centrifugadas para separar as fases.
- ✓ As fases leves (n-Hexano) foram recolhidas e se adicionaram outros 4 mL de n-Hexano.
- ✓ Novamente as amostras foram centrifugadas e a fase leve foi recolhida.
- ✓ O extrato foi evaporado em temperatura ambiente durante 24 horas.
- ✓ O ergosterol extraído foi dissolvido em 50 μL de n-Hexano.
- ✓ A análise dos extratos foi feita em um HPLC Varian ProStar, com coluna C18 e detetor PDA (matriz de fotodiodos) regulado a 282 nm.

4.11 Determinações da umidade.

Os teores de umidade inicial e final do meio de fermentação foram determinados utilizando uma balança analítica com radiação infravermelha marca Sartorius modelo MA-50.

4.12 Estudos da influência dos íons no processo de extração.

O estudo do efeito de diferentes íons sobre o comportamento da extração das enzimas do meio foi realizado em copos de Becker com agitação magnética no caso do estudo da influência dos íons. Os ácidos contendo os ânions analisados e as concentrações são mostradas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Sustâncias utilizadas no estudo da influência dos íons na extração das enzimas.

Sustância	Concentração
H ₂ SO ₄	30 mM
HCl	30 mM
Acido Cítrico	30 mM
Acido Acetico	30 mM
HNO ₃	30 mM
EDTA	50 μM

Para a obtenção dos extratos enzimáticos foi considerada uma relação sólido/líquido de 1 g de material sólido seco para cada 25 mL de solvente, ajustada tendo em consideração a umidade final do produto. A quantidade de material sólido fermentado que deve ser adicionada para obter a relação sólido/líquido desejada foi calculada pela Equação 4.6.

$$M_S = \frac{Hid_{BS} \cdot V_T}{\%Mat.Seca} \quad \text{Eq. 4.6}$$

Onde:

M_S: massa de sólido fermentado (g).

Hid_{B.S.}: Relação sólido líquido em base seca (gseco mL⁻¹).

V_T: Volume de trabalho (L).

%Mat. Seca: Matéria seca do sólido fermentado (gsecos (gtotais)⁻¹).

Após o ajuste da relação sólido/líquido, as misturas foram agitadas durante os tempos fixados e se tomaram 50 mL de meio líquido que foram centrifugados a 5000

rpm durante 20 minutos, sendo coletados os sobrenadantes para a determinação das enzimas.

4.13 Planejamentos estatísticos realizados.

4.13.1 Planejamento fatorial do tipo 2^2 .

O estudo da influência do pH e da agitação sobre a atividade enzimática recuperada na extração foi realizado através de um planejamento fatorial tipo 2^2 com quatro réplicas do ponto central. Os níveis selecionados e a matriz de realização do planejamento são descritos nas Tabelas 4.7 e 4.8. Os experimentos foram realizados utilizando um agitador mecânico da marca FISATOM Modelo 713D.

Tabela 4.7. Níveis e valores dos fatores escolhidos no planejamento 2^2 .

Fator	Nível Baixo	Nível Médio	Nível Alto
pH	3,5	5,0	6,5
Agitação	150	300	450

Tabela 4.8. Matriz de desenho do planejamento experimental 2^2 .

Experimento	pH	Agitação (rpm)
1	3,5	150
2	6,5	150
3	3,5	450
4	6,5	450
PC1	5,0	300
PC2	5,0	300
PC3	5,0	300
PC4	5,0	300

4.13.2 Planejamento Composto Central.

Tendo em consideração a falta de ajuste do modelo linear obtido no planejamento fatorial, em função da influência no processo da interação entre o pH e a agitação, da seção anterior foi desenvolvido um planejamento de superfície de resposta do tipo planejamento composto central (PCC). Nas Tabelas 4.9 e 4.10 são mostrados os níveis de trabalho.

Tabela 4.9. Níveis e valores dos fatores independentes no PCC.

Fator	N. Baixo	N. Medio	N. Alto	$-\alpha$	$+\alpha$
pH	3,5	5,0	6,5	2,9	7,1
Agitação (rpm)	150	300	450	89	520

Tabela 4.10. Matriz de desenho do PCC.

Experimento	pH	Agitação (rpm)
1	3,5	150
2	6,5	150
3	3,5	450
4	6,5	450
PC1	5,0	300
PC2	5,0	300
PC3	5,0	300
PC4	5,0	300
Ax1	2,9	300
Ax2	7,1	300
Ax3	5,0	89
Ax4	5,0	512

Os experimentos foram realizados de forma aleatória e para o processamento dos dados obtidos foi utilizado o programa Statistica 5.0.

4.14 Concentração por ultrafiltração.

Após a extração das enzimas do meio sólido fermentado foi feita a concentração destas mediante um processo de ultrafiltração. A ultrafiltração foi desenvolvida em um ultrafiltro da marca Millipore modelo acoplado a uma bomba de vazão constante da marca Master Flex. A queda de pressão (ΔP) no ultrafiltro foi de 5psi e o fluxo de alimentação do caldo enzimático foi de 1,8 L/min. Foram testadas duas membranas de 10 e 100 kDa de cutoff com um área de 0,5 m² cada. Antes da ultrafiltração do caldo as membranas foram lavadas através da recirculação de água ultrapura com pressão de entrada de 5 psi e uma vazão de alimentação de 3,6 L min⁻¹ m⁻².

4.15. Determinação da composição iônica do caldo extraído e concentrado.

Os íons presentes no caldo extraído da matriz sólida e o caldo concentrado por ultrafiltração foram determinados empregando o cromatógrafo de íons 761 Compact IC da marca Methrom.

4.16. Estudo de conservação das enzimas.

O estudo de conservação foi desenvolvido realizando três formulações com glicerol: o controle (sem adição de glicerol), 25% de glicerol e 35% de glicerol. As concentrações de glicerol adicionado foram calculadas em relações volume/volume. Uma vez preparadas as respectivas formulações as amostras foram armazenadas em frascos de vidro escuro, selados e acondicionados em quatro condições de temperaturas (4°C; 29°C; 40°C e 46°C). Estas amostras foram analisadas periodicamente para observar o comportamento da atividade no tempo. A cinética de desnaturação das enzimas foi calculada mediante a equação de Arrhenius como foi descrita no item 3.7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O alvo de desenvolvimento do trabalho foi tentar reproduzir em escala piloto os resultados em pesquisas anteriores, desenvolvidas por Spier 2008, os quais se tinham alcançado em nível de laboratório e estabelecer os modelos que determinam as condições de trabalho em escalas produção maiores, assim como os critérios para recuperar as enzimas produzidas. Com este objetivo foram desenvolvidas pesquisas tomando como base critérios de engenharia para dar coerência e visão industrial ao processo.

5.1 Determinação das condições apropriadas para a produção das enzimas em reator de escala piloto de 5 Kg.

5.1.1. Estudo das diferentes vazões de ar na fermentação em meio sólido.

O primeiro aspecto estudado foi a vazão de ar, devido a sua extrema importância neste tipo de fermentação. A vazão de ar é responsável pelo fornecimento do oxigênio necessário para o crescimento da biomassa, pela remoção do CO₂ e do calor metabólico produzido durante a fermentação em meio sólido (Rodríguez León *et. al* 2007a). O estudo da vazão de ar até 1,25 VkgM foi selecionado levando em consideração a experiência desenvolvida em Cuba com cepas de *Aspergillus* utilizando polpa cítrica como suporte nas fermentações em estado sólido. Testar variantes acima de 1,25 VkgM implicaria uma quantidade excessiva de ar. Outro aspecto futuro a levar em consideração é o escalonamento do processo, uma demanda excessiva de ar exigiria compressores de grande capacidade.

Uma vez determinadas as vazões de ar para cada condição e trabalhando com fermentações de massa inicial de 2 kg calculou-se as atividades das enzimas produzidas na fermentação em estado sólido pelo microrganismo *Aspergillus niger* F3. Os valores após 96 horas de fermentação para a produção das três enzimas estudadas são apresentados na Tabela 5.1.

Na Tabela 5.1 observa-se que as melhores condições de aeração na produção das enzimas foram de 1 e 1,25 VkgM. Na literatura consultada só foram encontradas duas referências sobre o efeito da aeração na produção de enzimas por

fermentação em estado sólido, uma se referindo a xilanase (47,16 U g⁻¹ Heck *et al.*, 2005) e outra à pectinase (132 U g⁻¹ Loera *et al.*, 1999).

Tabela 5.1. Influência da aeração na produção de enzimas.

Aeração (VkgM)	Fitase prod. (U g ⁻¹) (b.s.)	Xilanase prod. (U g ⁻¹) (b.s.)	Pectinase prod. (U g ⁻¹) (b.s.)
0,5	39,39	24,23	118,45
0,75	51,21	50,40	192,66
1,0	64,22	65,38	235,30
1,25	64,04	64,72	238,80

No caso da produção de xilanase o regime de aeração estabelecido por Heck *et al.* (2005) foi de 0,77 Vkgm, enquanto na produção de pectinase foi de 3 VkgM (Loera *et al.*, 1999).

Visualmente foi observado um crescimento micelial maior para os experimentos com 1,0 e 1,25 VkgM nas primeiras 96 horas de fermentação; já nos experimentos com aerações de 0,5 e 0,75 VkgM foi notada uma limitação desse crescimento micelial. Tais resultados tomando como base a aeração para produzir biomassa se equivalem aos resultados reportados por Echevarria *et al.*, (1987), que foi 1 VkgM para meios sólidos composto de polpa cítrica e crescimento de uma cepa de *Aspergillus niger*. O nível de aeração de 1VkgM, necessário para produzir estas enzimas, poderia ser atribuído ao esgotamento do oxigênio presente nos espaços entre as partículas, além de uma elevada concentração de CO₂ produzido. Giovannozzi *et al.*, (1997) descreve que uma concentração de 9% de CO₂ no meio de fermentação afeta sensivelmente o coeficiente respirométrico de crescimento do *Lentinus edodes* e a sua habilidade para degradar a palha de arroz. O escasso crescimento nesta condição de aeração confirma a importância de uma vazão de ar capaz não só de fornecer as quantidades de oxigênio necessário para o crescimento do microrganismo, como também de remover o CO₂ produzido.

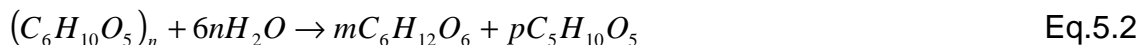
Outro efeito importante da aeração das fermentações sólidas é a transferência do calor produzido durante o crescimento do microrganismo. Esta transferência é favorecida pela aeração forçada do sistema. No caso deste estudo foi necessária uma aeração grande porque foi levado em consideração que microrganismos dos gêneros *Aspergillus ssp.* e *Trichoderma ssp.* apresentam uma velocidade específica de crescimento elevada e, portanto, gerariam uma maior quantidade de calor por unidade de tempo (Rodríguez-León *et al.*, 1991).

A quantidade teórica de ar necessário para oxidar os açúcares presentes no meio de fermentação pode ser calculada pela Equação 5.1 do catabolismo da glicose:



Para oxidar um mol de glicose são necessários 6 moles de oxigênio. Aplicando a lei dos gases ideais pode ser calculado o volume de O_2 . Um mol de O_2 nas condições experimentais ocupa 24,87 litros, e considerando que o ar apresenta um teor de 20,9% de oxigênio, pode se concluir que para oxidar um mol de glicose são necessários 714 litros de ar.

A partir da composição química e bromatológica da polpa cítrica, pode-se assumir que há no substrato uma concentração em peso de pectina e de hemicelulose de 0,30 e 0,05 g/g respectivamente e, que os açúcares simples formados pela degradação da pectina e da hemicelulose são moléculas de ácido galacturônico e xilose respectivamente, foi estabelecida a quantidade de ácido galacturônico e de xilose através da Equação 5.2



Um fermentador carregado só com 2 kg de polpa cítrica úmida apresenta um teor de 0,6 Kg de pectina e 0,1 Kg de hemicelulose que produzem 0,75 Kg açúcares redutores. Para que ocorra a oxidação total destes açúcares seriam necessários 2.975 L de ar. Em um tempo de fermentação de 120 horas, seria o equivalente a uma vazão de ar 24 L h^{-1} , ou $0,41 \text{ L min}^{-1}$. Dividindo este último valor pela quantidade carregada no biorreator (2Kg de material úmido) é obtida a quantidade teórica de ar para a oxidação dos açúcares presentes no meio, neste caso 0,2 VKgM. Este valor remete uma idéia das quantidades mínimas de ar que devem ser fornecidas no decorrer da fermentação para que o oxigênio não chegue a níveis limitantes no metabolismo do microrganismo em condições aeróbias; isto implicaria uma demanda mínima de ar de 0,20 VKgM. Partindo deste valor pode ser afirmado que nos casos analisados, o fluxo de ar foi suficiente para satisfazer a demanda mínima de oxigênio requerida para oxidar a pectina e a hemicelulose. Quando analisados os resultados obtidos, deve ser considerado também que a demanda de ar do sistema para transferir o calor metabólico gerado mediante um fluxo forçado em cultivo estático é 5 vezes maior que a demanda mínima de oxigênio

requerida (Domenech *et al.*, 2000). A demanda de ar para a remoção do calor metabólico gerado na fermentação foi analisada mais adiante uma vez desenvolvida a análise cinética do processo.

5.1.2 Estudo de diferentes teores de umidade inicial na fermentação em meio sólido.

O segundo aspecto analisado foi o teor de umidade no meio de fermentação. O meio de fermentação em estado sólido descrito por Spier *et al.* 2008 apresenta uma umidade de 65%. Nestas condições de umidade a atividade da água tem um valor de 0,978, sendo possível o crescimento de contaminantes como espécies de bactérias, leveduras e outros fungos como os *Rizhopus sp.* (Oriol *et al.*, 1988). Levando em consideração o risco de contaminação que pode vir acontecer durante uma fermentação se decidiu estudar a influência de diferentes níveis de umidade na produção da fitase, da xilanase e da pectinase. Outro aspecto também considerado foi a capacidade de absorção da polpa cítrica, onde a máxima quantidade de água que pode ser retida pela polpa cítrica não esterilizada é 66% de umidade (Echevarría *et al.*, 1985). Diante disso, corre-se o risco de ter água livre no sistema, o que pode ser também um facilitador para o crescimento de outros microrganismos indesejáveis. Na Tabela 5.2 são mostrados os valores de umidade, atividade de água e os valores das atividades das enzimas fitase, xilanase e pectinase após 96 horas de fermentação.

Tabela 5.2. Influência da umidade na produção das enzimas.

% Umidade	Atividade da Água	Fitase Prod. (U g ⁻¹) (b.s.)	Xilanase Prod. (U g ⁻¹) (b.s.)	Pectinase Prod. (U g ⁻¹) (b.s.)
55%	0,936	48,58	34,68	169,64
60%	0,952	61,62	53,73	221,03
65%	0,978	67,93	66,01	238,46

Na Tabela 5.2 pode-se apreciar que foram obtidos os maiores valores de atividade para cada enzima no valor de umidade inicial pré-estabelecido em 65%; onde a fitase apresentou uma produção de 67,93 U g⁻¹, a xilanase de 56,01 U g⁻¹ e a pectinase de 238,46 U g⁻¹, em base seca. A diminuição de atividade de produção da fitase e da pectinase nas condições de fermentação com teor de umidade inicial de 65 e 60% foi menor do que a observada para a xilanase. A queda na produção da enzima fitase foi de 9,3% e da enzima pectinase foi de 7,3%, enquanto a enzima

xilanase apresentou uma queda de produção em torno de 22%. Mesmo existindo esta queda na produção das enzimas, os resultados obtidos para as mesmas podem ser considerados como excelentes quando comparados aos valores relatados na literatura científica. No caso da fitase os maiores valores encontrados foram de 35 U g⁻¹ (Pandey *et al.*, 1999) em base seca; para a pectinase foram encontrados valores de 250 U g⁻¹ em base seca (Loera 1999). É necessário evidenciar que o meio de fermentação utilizado neste estudo não foi desenvolvido para produção de xilanase.

Comportamento semelhante se observa ao diminuir a umidade inicial para 55%, ou seja, uma queda acentuada na produção das três enzimas estudadas. Também deve ser mencionado que o crescimento do *Aspergillus niger* teve a mesma tendência que a atividade das enzimas, sendo maior na medida em que foi elevada a umidade inicial. Isso leva a afirmar que na medida em que diminui a umidade inicial, a produção de fitase, xilanase e pectinase para este meio de fermentação em estado sólido também diminuirá. Mesmo sendo a umidade de 65% onde são obtidas as maiores atividades das enzimas, desde o ponto de vista prático é melhor trabalhar com 60% de umidade, pois neste valor também são obtidos bons valores de atividades das enzimas e, além disso, a atividade da água inibe o possível crescimento de outras espécies como bactérias e leveduras (Oriol *et al.*, 1988).

5.1.3 Estudo do sistema de fermentação estático e com agitação.

Considerando o alto grau de compactação que é observado no crescimento dos fungos filamentosos em sistemas de fermentação em estado sólido, foram testadas duas variantes de agitação, sendo uma contínua e a outra descontínua com valores de 5 rpm para o agitador do fermentador empregado. Na Tabela 5.3 pode se observar a influência da agitação no sistema de produção das enzimas fitase, xilanase e pectinase.

Tabela 5.3. Influência da agitação no sistema de produção de enzimas.

Agitação	Fitase prod. (U g ⁻¹) (b.s.)	Xilanase prod. (U g ⁻¹)(b.s.)	Pectinase prod. (U g ⁻¹)(b.s.)
Estático	52,89	48,95	240,6
Agitação contínua	1,46	4,31	172,9
Agitação descontínua	24,99	4,13	183,3

Comparando o sistema de fermentação estático com o sistema de agitação contínuo e descontínuo se observa na Tabela 3 que há uma grande diferença entre as quantidades de enzimas produzidas nos referidos sistemas de fermentação; além disso, o crescimento microbiano observado foi bem menor nas fermentações com agitação que nas fermentações do sistema estático.

As agitações foram provocadas nas fermentações com o intuito de se obter uma melhor transferência de oxigênio nos espaços entre as partículas, remover o CO₂ e o calor produzidos, assim como evitar uma compactação do meio fermentado a fim de facilitar a posterior extração das enzimas; o que aparentemente poderia ser considerado uma contradição, pois o sistema de fermentação com agitação, tanto contínua quanto descontínua, deveria ter apresentado os melhores resultados (Echevarría 1985). Porém, é importante mencionar que o tipo de agitador construído para este biorreator produz uma força de cisalhamento entre o meio sólido e a malha que cobre o sistema de aeração do fermentador. Isso, unido ao alto teor de umidade do meio, provoca a formação de uma camada pastosa que irá impedir a entrada do ar e criar condições de anaerobiose no sistema. Nesse caso haveria condições propícias para o desvio das vias metabólicas, o que resultaria na produção de alcoóis e ácidos voláteis ao invés de haver produção de biomassa e enzimas desejadas.

Seria recomendado testar outros tipos de agitadores para melhorar o rendimento desta fermentação, porém neste caso não foi possível trocar o fermentador. Echeverria *et al.*, (1985); Rodríguez León *et al.*, (1991) consideraram em seus trabalhos, sistemas com agitação em reatores tipo tambor rotatório para produzir biomassa. Outra alternativa possível é o emprego de um agitador do tipo eixo com aletas, sendo a largura das aletas menor que o raio do fermentador.

5.1.4 Cinética da produção de enzima e de biomassa.

Uma vez considerados os fatores anteriores para o implemento do meio de cultivo para fitases e sua produção em escala semi-industrial, procedeu-se ao estudo da cinética de produção das enzimas e da biomassa nas condições estabelecidas de 60% de umidade, 1 VkgM de aeração e sem agitação. Na Figura 5.1 é representada a cinética de produção das enzimas fitase, pectinase e xilanase.

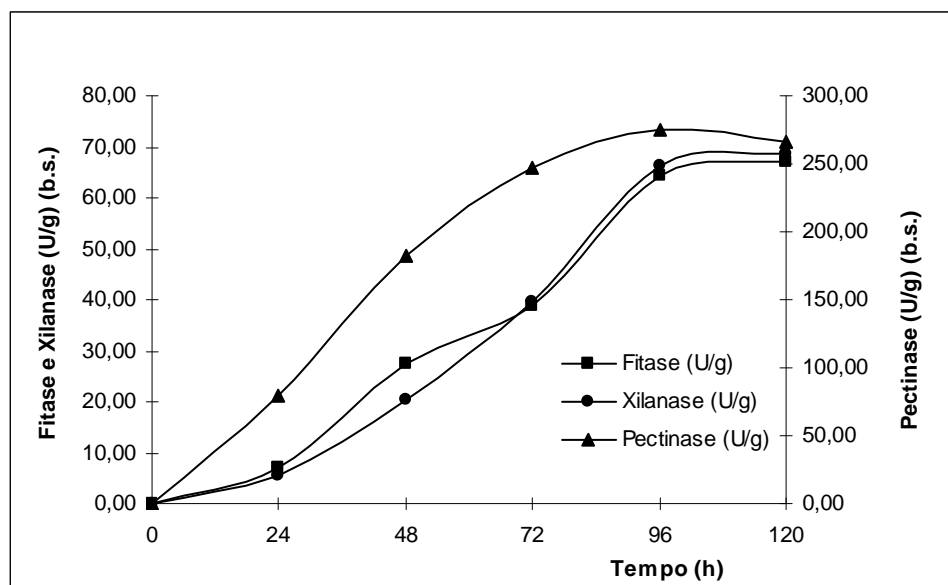


Figura 5.1 Gráfico da cinética da produção de fitase, pectinase e xilanase em fermentador carregado com 2 kg.

Pode-se observar que a produção de fitase e xilanase alcança o seu máximo valor entre as 96 e 120 horas, com valores de $67,51$ e $64,95 \text{ U g}^{-1}$ em base seca respectivamente. No caso da pectinase o valor máximo de produção, 258 U g^{-1} em base seca, é obtido às 96 horas, porém a partir das 72 horas diminui consideravelmente a produção desta enzima, possivelmente devido ao consumo de grande parte da pectina presente no meio de fermentação. Analisando a produtividade das enzimas (Figura 5.2) observa-se que no caso da fitase e a xilanase os maiores valores de produtividade ($0,68 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) são obtidos às 96 horas. Tomando como base de trabalho a produção de fitase, a Figura 5.2 indica que a fermentação deve ser concluída às 96 horas, pois nesse tempo é que se alcança o maior valor de produtividade.

No caso da pectinase o máximo valor de produtividade ($3,5 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) é alcançado às 48 horas. Estes resultados podem indicar dois fatos relacionados com a fermentação. O primeiro é que o microorganismo degrada primeiro a pectina em base do carbono necessário para o seu crescimento e, posteriormente as hemiceluloses. E o segundo é que quando se utiliza a xilana como fonte de carbono, observa-se também um incremento na produção de fitases. Vista a cinética de produção, os padrões de síntese da xilanase e da fitase são similares. A Figura 5.2

identifica que ambas as enzimas alcançam um maior valor da produtividade às 96 horas de fermentação.

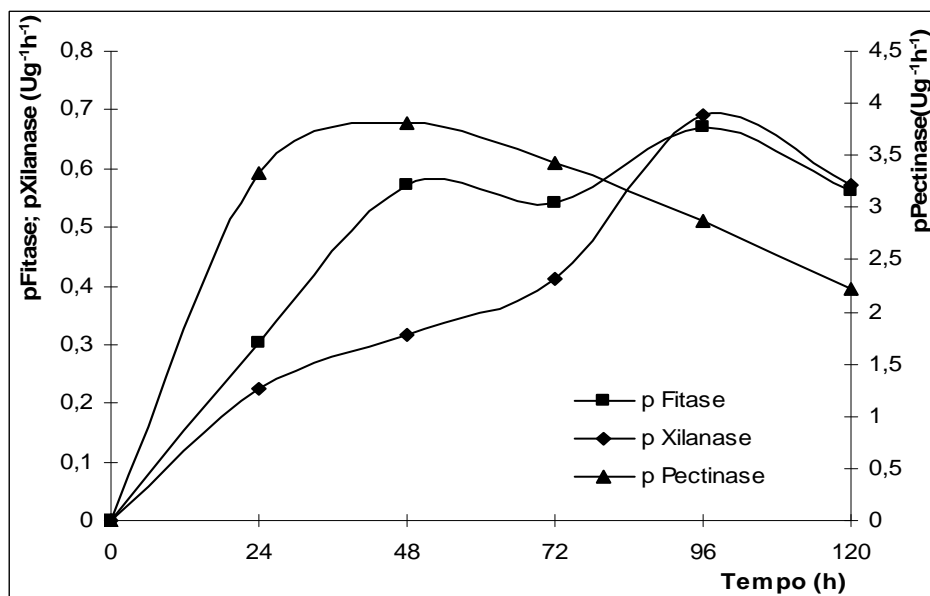


Figura 5.2 Gráfico das produtividades da produção de fitase, pectinase e xilanase em fermentador carregado com 2 kg.

Esta correlação pode ocorrer devido à necessidade do microorganismo dispor de mais energia para consumir a xilana. É necessário esclarecer duas coisas, primeiro, geralmente os substratos sólidos residuais da agroindústria apresentam na sua composição mais de uma fonte de carbono, no caso da polpa cítrica estão presentes açúcares simples, pectina e fibra. A ordem de degradação das fontes de carbono pelo microorganismo vai depender da energia que demande a degradação de cada fonte, ou seja, as primeiras a serem degradadas demandam menor esforço energético do microorganismo. Para compreender melhor este postulado seria analisar o comportamento do coeficiente de manutenção na fermentação.

Uma vez analisado o padrão de produção das enzimas foi realizada a análise respirométrica do crescimento do fungo *Aspergillus niger* F3. Nas Figuras 5.3 e 5.4, e na Tabela 5.4 são mostrados o crescimento da biomassa, o coeficiente respirométrico e as variáveis cinéticas do processo de crescimento da biomassa. Os valores cinéticos foram calculados resolvendo o balanço de O₂ consumido e de CO₂ produzido por métodos iterativos (Sato et al., 1988; Rodríguez et al., 2007b).

$$\frac{dO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dX}{dt} + mX \quad \text{Eq. 5.3}$$

Aplicando métodos de solução numérica à Equação 5.3, logra-se estabelecer que:

$$X_n = \left(Y_{x/o} \Delta t \left(\frac{1}{2} \left(\left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=0} + \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=n} \right) + \sum_{i=1}^{i=n-1} \left(\frac{dO_2}{dt} \right)_{t=i} \right) + \left(1 - \frac{a}{2} \right) X_0 - a \sum_{i=1}^{i=n-1} X_i \right) / \left(1 + \frac{a}{2} \right) \quad \text{Eq. 5.4}$$

Onde para simplificar a expressão da Equação 5.4 considerou-se que (Rodríguez *et al.*, 2007b; Sato & Yoshizawa, 1982):

$$a = mY_{x/o} \Delta t \quad \text{Eq. 5.5}$$

Onde:

m : coeficiente de manutenção ($\text{gO}_2 \text{ gbio}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

$Y_{x/o}$: Rendimento biomassa/oxigênio (gbio gO_2^{-1})

Δt : Intervalo de tempo (h)

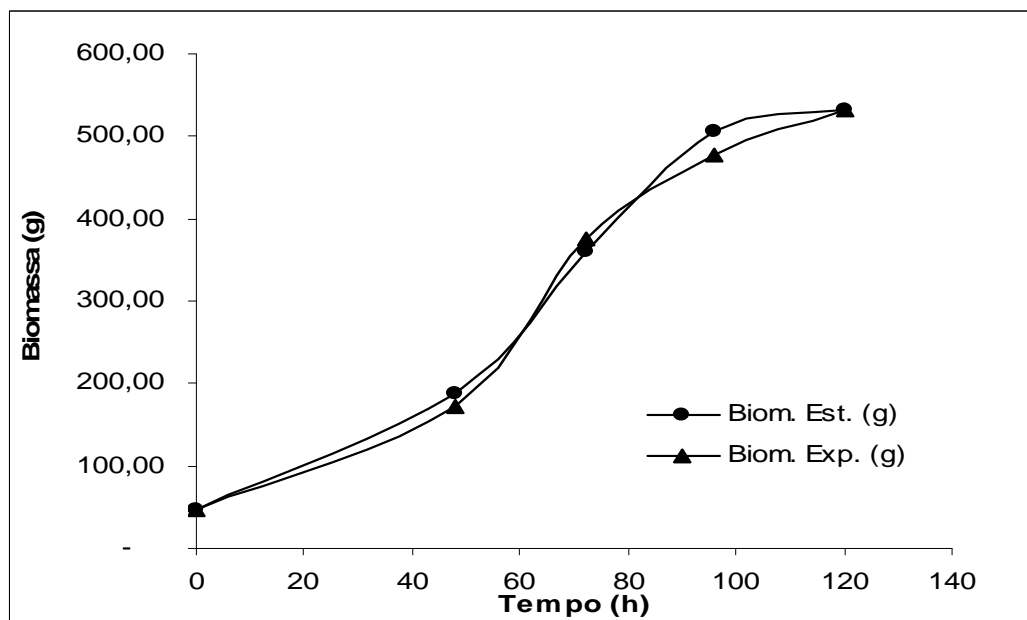


Figura 5.3. Evolução da produção de biomassa fúngica determinada experimentalmente e estimada em biorreator de 2 kg

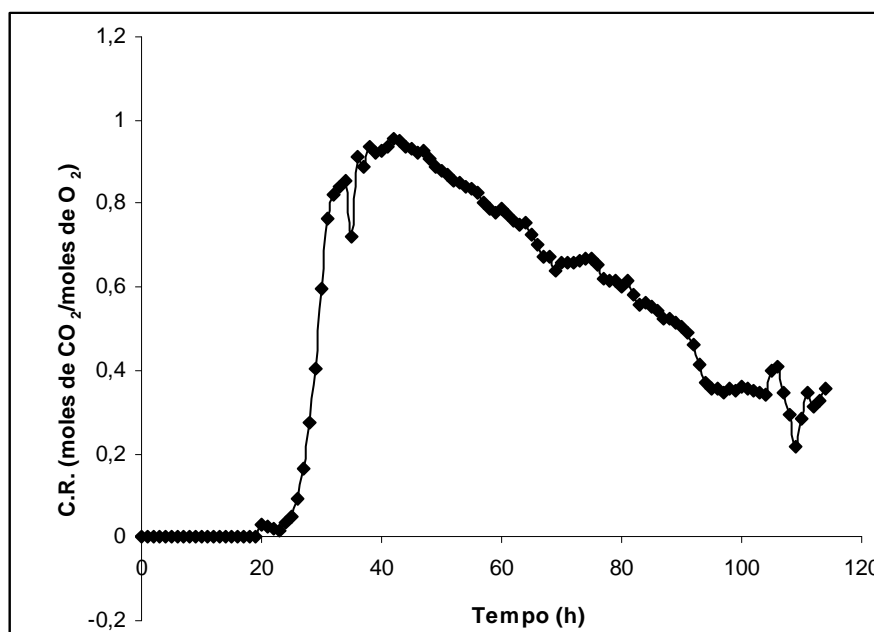


Figura 5.4. Evolução do Quociente Respiratório durante a fermentação em biorreator de 2 kg.

Tabela 5.4 Estimativas dos parâmetros cinéticos da fermentação em biorreator de 2Kg de polpa cítrica com a cepa *Aspergillus niger* F3.

Intervalo de tempo	$\mu_{Máx}$ (h^{-1})	m ($gO_2 \text{ gbio}^{-1} h^{-1}$)	$Y_{O/X}$ ($gbio \text{ gO}_2^{-1}$)
0-72 h	0,035	0,0023	2,29
72-120 h	0,014	0,0112	1,82

Os valores cinéticos da produção de biomassa foram determinados considerando o processo dividido em duas etapas, as primeiras 72 horas e a segunda o tempo restante. O valor maior na velocidade de crescimento foi de $0,035 \text{ h}^{-1}$, alcançado nas primeiras 72 horas de fermentação, ademais nesse intervalo de tempo foi observado maior valor do rendimento biomassa produzida por oxigênio consumido ($2,29 \text{ gbio gO}_2^{-1}$), neste mesmo período o valor do coeficiente de manutenção ($0,0023 \text{ gO}_2 \text{ gbio}^{-1} h^{-1}$) é o menor. No intervalo das 48 horas posteriores a tendência dos parâmetros cinéticos foi totalmente contrária, a velocidade específica de crescimento decresceu para um valor de $0,014 \text{ h}^{-1}$ e o rendimento biomassa por oxigênio consumido caiu para $1,82 \text{ gbio gO}_2^{-1}$.

O coeficiente de manutenção neste intervalo de tempo foi de $0,0112 \text{ gO}_2 \text{ gbio}^{-1} h^{-1}$. Estas duas tendências opostas significam que nas primeiras 72 horas são consumidos os açúcares livres no meio de fermentação e a pectina. A degradação desta parte do substrato mostra um gasto energético menor para o microorganismo no seu processo de reprodução e manutenção, o que indica que a pectina e o oxigênio consumidos nesse intervalo de tempo apresentam o maior rendimento na

transformação do substrato em biomassa. Nas 48 horas posteriores, com o incremento na expressão dos complexos enzimáticos de fitase e xilanase, observa-se que há uma diminuição na quantidade de biomassa produzida e um incremento no coeficiente de manutenção. O quociente respirométrico (Figura 5.4) mostra que nas primeiras 48 horas alcançou os maiores valores, o que significa que neste período de tempo são consumidos os açúcares livres presentes no meio e parte da pectina; a progressiva queda no valor do coeficiente respirométrico está relacionada com o coeficiente de manutenção, o que indica que para produzir pectinases o microorganismo precisa de uma menor quantidade de energia quando comparada com a produção de xilanases e fitases. Isso pode ser observado nos valores do coeficiente de manutenção, na medida em que diminui o coeficiente respirométrico, o valor do coeficiente de manutenção se incrementa, provocando um aumento na quantidade da energia consumida nos processos endógenos para produzir fitases e xilanases.

5.1.5 Calor metabólico gerado durante a fermentação.

Na Tabela 5.5 são descritos os cálculos para a eficiência energética, das substâncias fermentadas. Para a formulação da Tabela 5.5 foi utilizado-se a glicose como açúcar principal dos açúcares livres no meio, o ácido galacturônico e a xilose como as unidades monoméricas fundamentais da pectina e das hemiceluloses respectivamente. O valor de $\sigma_B \gamma_B$ para a biomassa é de 1,85 para espécies do gênero *Aspergillus sp.* (Rodríguez *et al.*, 1991).

Tabela 5.5. Estimativas da eficiência energética dos principais componentes da polpa cítrica.

Sustância	Formula	$\sigma_s \gamma_s$	η
Glicose	$C_6H_{12}O_6$	1,6	0,58
Ácido Galacturônico	$C_6H_{10}O_7$	1,2	0,75
Xilose	$C_5H_{10}O_5$	1,6	0,58

A Tabela 5.5 identifica que as substâncias assumidas estão na mesma faixa do rendimento energético para a glicose e a xilose. O valor maior, que corresponde ao ácido galacturônico, deve-se a que apresenta menos elétrons disponíveis na molécula; tem se assumido um rendimento de 0,5 de $g_{bio} g_{sub}^{-1}$. Não obstante consideraremos estes valores para o cálculo da demanda de ar para resfriamento do processo de fermentação. É preciso lembrar que na fermentação foram

determinadas duas velocidades específicas de crescimento, ou seja, a determinação da demanda de ar de resfriamento será considerada em duas fases, do início até 72 horas; e de 72 horas até o final.

Nas Figuras 5.5 e 5.6 são descritas estimativas do calor metabólico produzido e da demanda do ar para a remoção do calor metabólico produzido na fermentação. O calor latente de vaporização para uma temperatura de 30°C é de 560 kcal kg⁻¹ de água. Ao mesmo tempo a umidade absoluta no ar na entrada a 30°C de 0,028 kg água/kg ar seco e na saída a umidade absoluta de 0,037 kg água kg⁻¹ ar seco, assumindo 35°C de temperatura do ar na saída. O ar está saturado na entrada e na saída. O calor de combustão do substrato foi de 27 kcal gO₂⁻¹ equivalente consumido (Minkievich & Eroshin, 1973).

Nas Figuras 5.5 e 5.6 pode-se observar que o maior valor do calor metabólico gerado foi alcançado às 72 horas, revelando neste período uma maior demanda de ar necessária para remover o calor metabólico do meio de fermentação. Após as primeiras 72 horas observa-se um decréscimo no calor metabólico gerado. Esta queda está relacionada com a queda na velocidade específica de crescimento, uma vez que o calor metabólico gerado está diretamente relacionado com a velocidade específica de crescimento e quantidade de biomassa produzida. Analisada a demanda de ar para remover o calor metabólico gerado, é possível concluir que a demanda de ar como fator de resfriamento é alta (1 VkgM) sendo utilizada somente para o resfriamento conforme descrito por Rodríguez-León *et al.*, (1991).

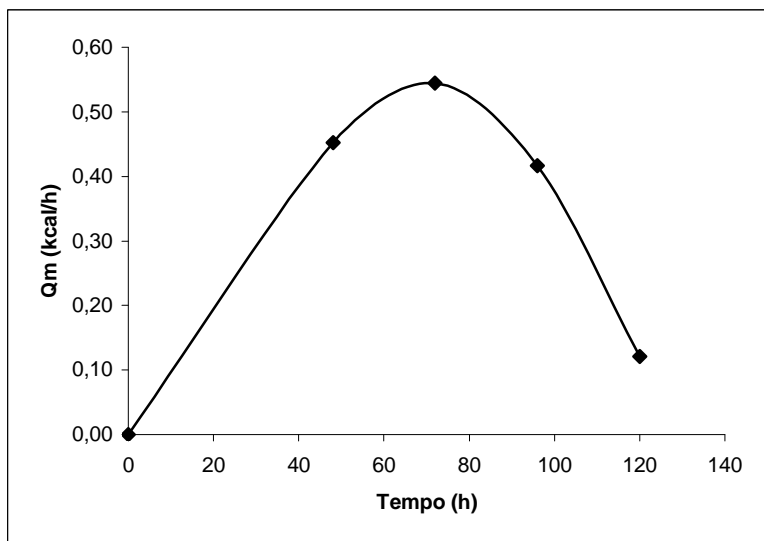


Fig.5.5. Evolução do calor metabólico produzido durante a fermentação sólida.

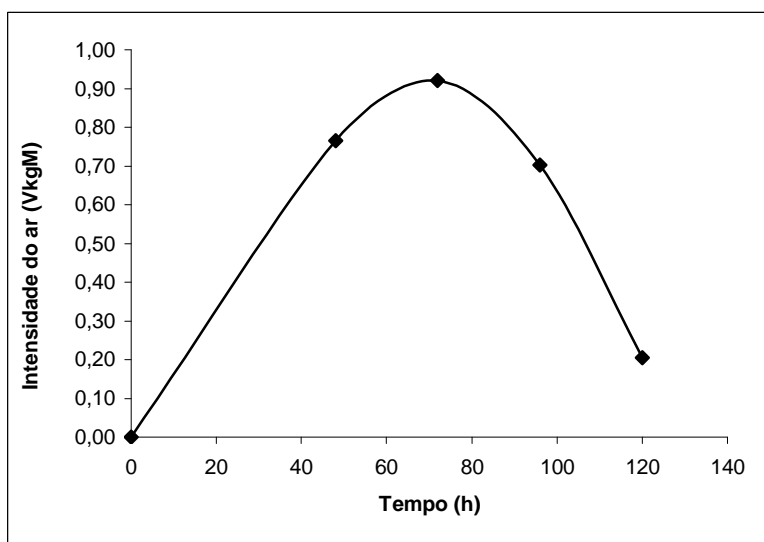


Fig. 5.6. Demanda de ar necessário para remover o calor metabólico produzido na fermentação em estado sólido.

Uma das diferenças deste trabalho em relação ao descrito por Rodríguez-León *et al.* (1991) foi a demanda de ar para produzir biomassa até 72 horas, entretanto não foi seguida a evolução do calor metabólico após as 72 horas.

5.1.6 Escalonamento da fermentação em estado sólido.

Devido à falta de números adimensionais e de equações correspondentes que os relacionam nos processos fermentativos, a intensidade de aeração foi eleita

como critério de escalonamento tendo em consideração que este é um fator intensivo que não depende da escala do processo.

A partir do resultado do estudo da aeração foi selecionado como critério da intensidade da aeração 1 VKgM, valor na faixa onde foram obtidos os maiores níveis de produção das enzimas. Para o escalonamento foi usado 1 Kg de meio na escala menor e 10 Kg na escala maior. Os reatores foram tipos tambor com características similares. Na Figura 5.7 são mostrados os valores de biomassa em ambos os biorreatores e na Tabela 5.6 são mostradas as quantidades das enzimas produzidas nas duas escalas de produção.

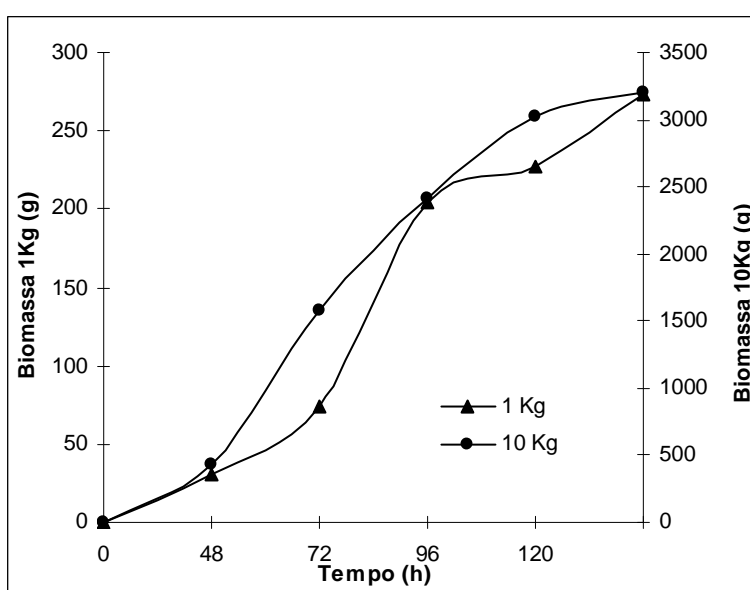


Fig. 5.7. Gráficos da produção de biomassa em diferentes escalas.

Tabela 5.6 Níveis de produção das enzimas em biorreatores com cargas de 1 kg e 10 kg de substrato inicial.

Capacidade do Fermentador	Fitase (U g ⁻¹)(b.s.)	Xilanase (U g ⁻¹)(b.s.)	Pectinase (U g ⁻¹)(b.s.)
1 Kg	62,03	62,58	267,30
10 Kg	58,07	58,71	243,33

Como podemos identificar na Figura 5.7 e nas Tabelas 5.7 e 5.8 o critério de manter a intensidade do fluxo de ar (1VKgM) em duas escalas de fermentação diferentes é válido. Observa-se que os níveis de enzimas produzidas em ambas as escalas foram similares e o padrão de produção de biomassa é também similar. Os coeficientes cinéticos determinados estão na mesma faixa e o seu comportamento nas duas etapas que foi dividido para os cálculos foram similares. Um aspecto importante foi o incremento no rendimento biomassa/oxigênio no fermentador

carregado com 10 Kg de material comparado com o fermentador carregado com 1 Kg de material. Isto pode ser devido à diferença entre os sistemas de aeração que apresentam os fermentadores, sendo melhor a distribuição do ar no fermentador maior.

Tabela 5.7 Estimativas dos parâmetros cinéticos da fermentação de 1 kg de polpa cítrica com a cepa de *Aspergillus niger* F3

Intervalo de tempo	$\mu(\text{h}^{-1})$	$m(\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gbio}^{-1})$	$Y_{\text{O}_2/\text{X}} (\text{gbio gO}_2^{-1})$
0-72 h	0,035	0,006	2,17
72-120 h	0.016	0.016	1,61

Tabela 5.8 Estimativas dos parâmetros cinéticos da fermentação de 10 kg de polpa cítrica com a cepa *Aspergillus niger* F3.

Intervalo de tempo	$\mu(\text{h}^{-1})$	$m(\text{gO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gbio}^{-1})$	$Y_{\text{O}_2/\text{X}} (\text{gbio gO}_2^{-1})$
0-72	0,031	0,004	4,01
72-120	0,014	0,012	2,61

A partir destes resultados considera-se que o critério de tomar a intensidade de aeração como um primeiro critério de escalonamento foi válido.

5.2 Extrações das enzimas.

Para o estudo da extração das enzimas, produzidas através da fermentação em estado sólido pelo fungo *Aspergillus niger* F3, realizou-se fermentações de 96 horas de duração, tempo suficiente para estabilizar a quantidade de enzimas conforme já discutido no Item 5.1.4. No final do processo fermentativo a umidade era de 63% e não havia presença de meio líquido livre no reator, sendo possível observar uma compactação do substrato. Note-se que nessas condições finais de umidade é difícil a redução do tamanho da partícula e peneiramento através das operações unitárias tradicionais tais como a moagem de sólidos, fator que é importante no processo de transferência de massa. Diante desses dados se realizou as pesquisas de extração das enzimas em sistemas que simulem um tanque com agitação, usando para tanto um agitador tipo hélice.

Outros dois fatores de extrema importância na extração das enzimas do meio fermentado são a relação sólido/líquido e a temperatura. Porém, na realização desse estudo foi fixada em $1/25 \text{ g mL}^{-1}$, em base seca, a relação sólido/líquido, atendendo ao alto grau de concentração das enzimas que é possível se alcançar

com tal valor, e a temperatura considerada foi a ambiente, de aproximadamente 25°C.

5.2.1 Análise da influência de íons na extração.

Para avaliar a influência dos íons sobre a atividade das enzimas durante o processo de extração, o meio fermentado foi exposto em contato com o solvente por 30 minutos. Lembrando que essas extrações foram realizadas em um copo de Becker com agitação.

Nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 pode ser visualizada a influência dos íons na extração da fitase, da xilanase e da pectinase, respectivamente. No caso da fitase (Figura 5.8), os resultados não podem ser comparados com a literatura, uma vez que não foram encontradas referências bibliográficas pertinentes ao assunto. É importante salientar que a escolha dos íons foi feita em função do ânion que se encontrará livre na dissolução da substância. De uma maneira geral, os ânions analisados, como referência nesse estudo, não possuem influência positiva na atividade da enzima extraída do meio fermentado. Apenas com o inibidor de proteases EDTA foi possível observar um resultado semelhante ao controle (água como solvente). Na análise do ânion citrato foi demonstrado uma maior inibição da atividade da fitase, apresentando um valor de 50,26% menor que o apresentado pelo controle. No controle, o valor da atividade da fitase nessa extração foi de 3,57 U mL⁻¹, o que pode ser considerado um bom resultado tendo em comparação as cepas de *Escherichia coli* PGR-2 e PGR-3 modificadas geneticamente para produzir fitases as quais produzem um máximo valor de 2 U mL⁻¹ durante as fermentações submersas. Para a xilanase e a fitase os valores da atividade nos controles foram de 2,3 U mL⁻¹ e 11,56 U mL⁻¹ respectivamente.

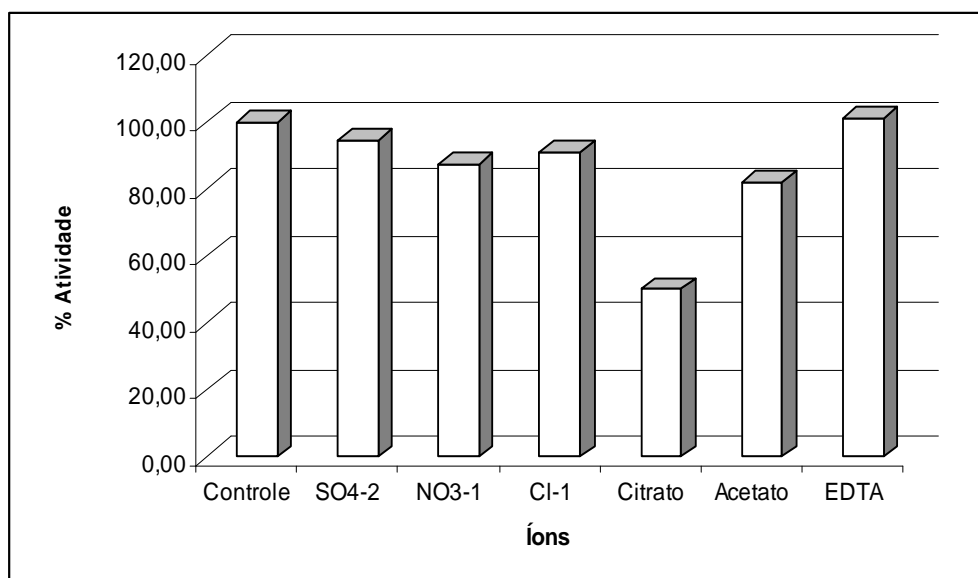


Figura 5.8. Influência dos íons na extração da fitase atendendo a uma atividade no controle de 3,57 U mL⁻¹.

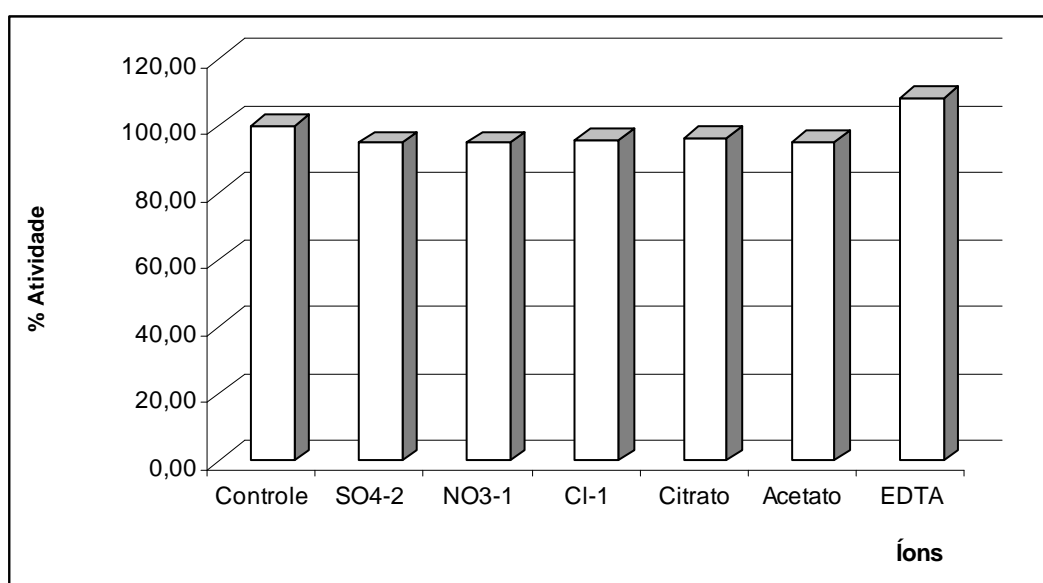


Figura 5.9. Influência dos íons na extração da xilanase atendendo a uma atividade no controle de 2,37 U mL⁻¹.

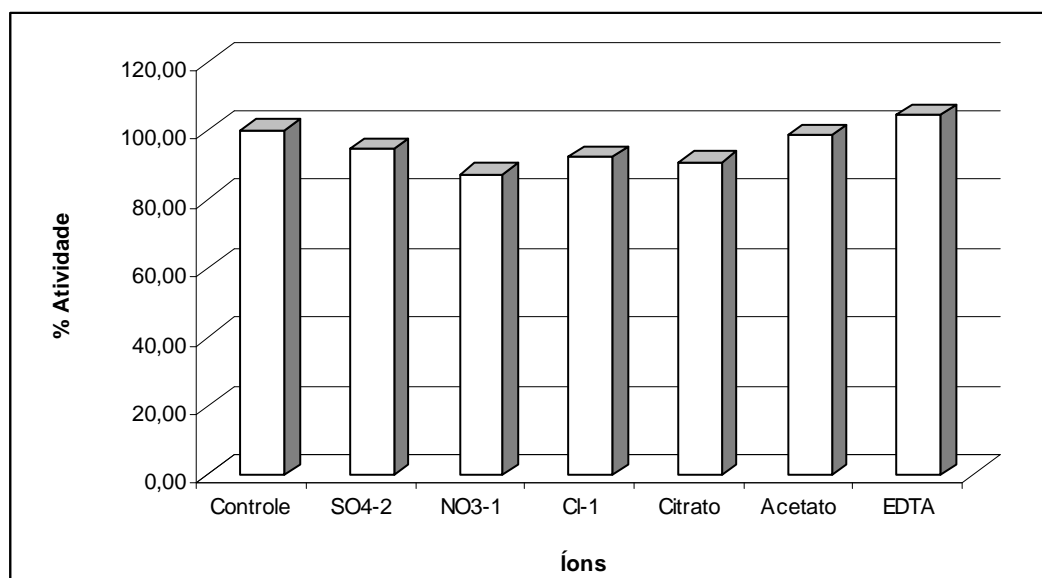


Figura 5.10. Influência dos íons na extração da pectinase atendendo a uma atividade no controle de 11,56 U mL⁻¹.

Em relação à xilanase, o resultado da influência dos íons mostrou os solventes com íons diminuem a atividade das três enzimas comparadas com cada controle, exceto na adição do EDTA. Nesse caso a adição do EDTA mostrou uma maior diferença na atividade da enzima. Resultados diferentes foram obtidos por Rezende *et al.* (2002), que revelaram que o melhor solvente foi a água destilada, porém deve se mencionar que o meio de fermentação tinha na sua composição uma mistura de ácido cítrico e citrato de sódio para garantir a estabilidade do pH durante a fermentação. Estes sais foram extraídos também durante o processo e poderiam ser parte dos íons presentes na extração, o que pode explicar que a adição do íon citrato não teve influência no processo de extração da xilanase no caso deste estudo.

Comparando com resultados descritos por Heck *et al.* (2005), pode ser observado novamente que o melhor solvente é a água destilada para extrair as enzimas. Já outros autores (Ruegger, 2001; Rezende *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005) relatam que o Tween 80 (0,1%) é o melhor solvente para extrair a xilanase e demais metabólitos porque tal solvente aumenta a permeabilidade celular, facilitando a liberação de diversas moléculas através da membrana celular. Neste trabalho não foi adicionado Tween 80 na extração e, sim foi adicionado no meio de fermentação, o que possivelmente influenciou na liberação dos metabólitos durante a fermentação, facilitando sua posterior extração. Já Fadel (2001), avaliando solventes

para a extração de xilanase, concluiu que uma solução de NaCl 0,3 M foi o mais eficiente dos solventes testados; nesse mesmo trabalho, os pesquisadores também puderam observar que houve um incremento de 16% na atividade enzimática em comparação com tampões citrato e acetato. Tal relato difere do observado neste estudo, onde os melhores resultados de extração foram obtidos quando foi usado somente água como solvente.

A atividade volumétrica obtida após a extração da xilanase foi de 2,31 U mL⁻¹, um valor menor que o relatado por Heck *et al.* (2005) que foi de 7,86 U mL⁻¹; porém, faz-se necessário considerar que o meio de fermentação utilizado neste estudo foi feito para produzir fitases e não xilanases.

Na Figura 5.10 é possível visualizar que a extração da pectinase apresentou um comportamento similar ao encontrado na extração da fitase (Figura 5.8), analisando-se a influência dos ânions estudados e demonstrando que o ânion NO₃⁻ é o que apresenta maior grau de inibição e reduz aproximadamente 13% da atividade se comparado ao controle. Na extração de pectinases, há dados na literatura reportando uma concentração de 15 U mL⁻¹, porém empregando acetato (Castilho *et al.*, 2000).

5.2.2 Estabilidade das enzimas extraídas.

Observando os resultados do item 5.9, pode-se comprovar que tanto o extrato bruto controle quanto aquele com adição de EDTA não tiveram uma diminuição da atividade enzimática. No entanto a adição de EDTA garante uma atividade enzimática residual superior a 80% comparada com a atividade enzimática inicial. No caso do extrato controle a atividade enzimática residual desceu para 61-67% da atividade enzimática inicial.

Tabela 5.9. Perdas da atividade das enzimas após 24 horas de extração.

Enzima	% de Perdas de Atividade	
	Controle	EDTA
Fitase (U mL ⁻¹)	38,71	19,77
Xilanase (U mL ⁻¹)	25,29	16,82
Pectinase (U mL ⁻¹)	33,31	11,09

Esses resultados indicam dois possíveis mecanismos a inibição das proteases e o efeito de captar íons que podem diminuir a atividade das três enzimas,

já que o mesmo efeito é observado para as três enzimas; que por sua vez possuem mecanismos de funcionamento diversos e que não seriam afetadas de forma tão similar por um único composto.

A adição do EDTA teve os mesmos resultados para a extração da fitase e da pectinase, e uma influência ainda maior na extração da xilanase. Na Tabela 5.9 são mostrados os valores em percentual das perdas de atividade das enzimas após 24 horas de extração. É possível observar na referida tabela que a enzima fitase foi a que apresentou maiores perdas, tanto no controle (38,71%) quanto na adição de EDTA (19,77%); como a perda de atividade quando foi adicionado EDTA foi praticamente metade do valor apresentado após 24 horas de extração mantendo as amostras a temperatura ambiente, pode-se afirmar que a enzima fitase conservou 80% de sua atividade inicial.

Analisando o efeito da adição de EDTA na estabilidade da xilanase pode se verificar que as perdas diminuíram aproximadamente em 17%. Comparando a estabilidade da xilanase com a fitase e a pectinase, a primeira foi a enzima que apresentou maior estabilidade sem adição de EDTA.

No caso da pectinase se observou uma maior diminuição na perda de atividade após 24 horas quando foi adicionado EDTA no meio, conservando 90% de sua atividade inicial quando foi adicionado EDTA ao solvente de extração.

O fato da enzima se manter estável com a adição de EDTA no meio pode ser devido a dois fatores: o primeiro a quelação de íons que podem inibir a atividade das enzimas presentes no meio de fermentação que pudessem ter sido liberados durante o processo fermentativo, ou simplesmente são resíduos do processo fermentativo. É preciso ter em consideração que os íons Zn^{2+} têm uma influência positiva na produção da enzima, mas são ao mesmo tempo inibidores da atividade da fitase (Greiner & Farouk 2007). Também no caso da xilanase íons de Zn^{2+} podem ter ação inibitória sobre a atividade desta enzima (Maciel 2006).

O segundo fator pode ser atribuído ao fato do EDTA ser um inibidor de proteases, que poderiam ter sido liberadas no meio durante a fermentação e extraídas, as quais destruiriam as proteínas presentes no extrato, incluídas as enzimas.

5.2.3 Análise do planejamento fatorial 2^2 para condições de extração das enzimas.

Para planejar os experimentos nesta parte do trabalho levou-se em consideração os resultados obtidos por Rodríguez Fernández (2004), onde foram estudados alguns fatores físico químicos que influenciam os processos de extração sólido líquido.

Segundo Maciel (2006) e Singh *et al.*, (1999) é necessário apontar que o valor do pH selecionado no ponto central do planejamento deve ser escolhido atendendo ao valor do pH na fermentação conjuntamente com a influência na estabilidade nas enzimas extraídas. A velocidade de agitação selecionada foi a mesma velocidade de agitação que foi trabalhada por Rodríguez Fernández (2004). Tendo em consideração o planejamento fatorial do tipo 2^2 com 4 réplicas no ponto central selecionado, se procedeu à realização dos experimentos cujos resultados são mostrados na Tabela 5.10. Na Tabela 5.10 podemos identificar que os maiores valores de atividade da fitase são obtidos no ponto central, onde o pH tem valor de 5,0 e a agitação foi de 300 rpm. No caso da xilanase e da pectinase os valores oscilam independentemente dos níveis dos fatores independentes.

Tabela 5.10. Valores das atividades das enzimas no planejamento experimental 2^2 com réplicas no ponto central.

Exp.	pH	Agitação (rpm)	Fitase (U mL ⁻¹)	Xilanase (U mL ⁻¹)	Pectinase (U mL ⁻¹)
1	3,5	150	3,462	2,386	10,893
2	6,5	150	3,277	2,325	10,362
3	3,5	450	3,362	2,313	10,083
4	6,5	450	3,502	2,327	9,074
PC1	5,0	300	3,911	2,397	9,884
PC2	5,0	300	3,880	2,379	10,973
PC3	5,0	300	3,928	2,370	10,335
PC4	5,0	300	3,831	2,379	9,944

Tabela 5.11. Valores dos coeficientes de regressão e da probabilidade do planejamento experimental 2^2 para a fitase.

Fator	Coefficiente de Regressão	p
Termo independente (β_0)	3,644	0,0000001*
pH (β_1)	-0,01122	0,635184
Agitação (β_2)	-0,03118	0,240004
Interação (β_{12})	0,08106	0,032001*
Falta de ajuste	-	0,000518*

*Variáveis significativas.

Tabela 5.12. Valores dos coeficientes de regressão e da probabilidade do planejamento experimental 2² para a xilanase.

Fator	Coeficiente de Regressão	p
Termo independente (β_0)	2,359500	0,0000001*
pH (β_1)	-0,011750	0,129608
Agitação (β_2)	-0,017750	0,051875
Interação (β_{12})	0,018750	0,173509
Falta de ajuste	-	0,12245

*Variáveis significativas.

Tabela 5.13. Valores dos coeficientes de regressão e da probabilidade do planejamento experimental 2² para pectinase.

Fator	Coeficiente de Regressão	p
Termo independente (β_0)	10,35688	0,0000001*
pH (β_1)	-0,24725	0,186050
Agitação (β_2)	-0,38675	0,075518
Interação (β_{12})	-0,25725	0,045347*
Falta de ajuste	-	,031416*

*Variáveis significativas.

Nas Tabelas 5.11 até 5.13 são descritos os coeficientes de regressão e os seus níveis de influencia correspondente ao planejamento fatorial desenvolvido para a xilanase e a pectinase respectivamente. É interessante apreciar que a influência dos fatores independentes não foi significativa para cada enzima, mas para o caso da interação entre o pH e a agitação e a falta de ajuste do modelo foram significativas para fitase e pectinase. Isto indica que se estaria trabalhando em uma zona com curvatura onde há possivelmente um ponto otimizável da atividade das enzimas. Segundo Rodríguez-Fernández (2004), o pH e a agitação, como fatores independentes, não tiveram nenhuma influência na extração da enzima pectinase, mas no planejamento fatorial fracionado realizado para a extração da pectinase, a interação teve também uma influência significativa, o que poderia ser interpretado por dois motivos; o primeiro é relacionado com a estabilidade das enzimas, visto que o coeficiente que representa este fator é muito próximo de zero, ou seja, do pH com valor de 5,0, que é ao mesmo tempo o valor de pH no meio de fermentação, e segundo (Singh *et al.*, 1999) o solvente deve ter um valor semelhante ao valor do pH no substrato da fermentação.

A outra justificativa para a importância da interação entre o pH e a agitação estaria relacionada com a necessidade de agitar para eliminar os gradientes de concentração que poderiam existir no interior do líquido, e favorecer a diminuição da capa de líquido aderida ao sólido que é uma resistência à transferência de massa no

sistema. Também é necessário assinalar que um incremento na agitação poderia ter efeitos negativos na extração da enzima causados pela formação de espuma e possíveis alterações da estrutura espacial da enzima causada pelos efeitos mecânicos. Estes resultados concordam com os encontrados na literatura científica Castilho *et al.* (1999), onde são descritos sistemas agitados de extração sempre que se evite a formação de espuma.

Desta primeira parte do estudo dos fatores físico-químicos do planejamento fatorial pode se concluir que os fatores em independentes não tiveram uma influência significativa no processo, mas ao apresentar uma falta de ajuste significativa indica que pelo menos um dos dois fatores deve ter uma influência significativa de forma não linear. Para comprovar esta hipótese se complementou o planejamento anterior com um desenho de superfície de resposta tipo composto central.

5.2.4 Otimização das condições de extração utilizando um Planejamento Composto Central.

Levando em consideração os fatores anteriores realizou-se a otimização da extração da enzima fitase do meio de cultivo, sendo esta a enzima de maior interesse no trabalho realizado. Na Tabela 5.14 são mostrados os resultados do desenho composto central. Nessa tabela pode se observar que os valores dos pontos axiais são inferiores aos valores no ponto central, indicando certamente um efeito de curvatura na zona analisada.

Na Tabela 5.15 são mostrados os coeficientes de regressão e a probabilidade com um nível de confiança de 95% para o desenho realizado. Na Figura 5.11 é mostrada a superfície de contorno obtida na otimização da extração da fitase.

Uma vez realizada a análise estatística foi obtido o seguinte modelo, com um coeficiente de regressão de 0,97724.

$$Y = 3,70 - 0,28X_1^2 - 0,20X_2^2 + 0,08X_1X_2 \quad \text{Eq. 5.7}$$

Onde:

X_1 : pH

X₂: Agitação (rpm).

Y: Atividade da fitase (U/mL).

Tabela 5.14 Valores da atividade da fitase no PCC.

Exp.	pH	Agitação (rpm)	Fitase (U mL ⁻¹)
1	3,5	150	3,462
2	6,5	150	3,277
3	3,5	450	3,362
4	6,5	450	3,502
PC1	5,0	300	3,911
PC2	5,0	300	3,880
PC3	5,0	300	3,928
PC4	5,0	300	3,831
Ax1	2,9	300	3,365
Ax2	7,1	300	3,230
Ax3	5,0	90	2,894
Ax4	5,0	510	3,417

Tabela 5.15 Valores dos coeficientes e da probabilidade da análise do PCC.

Fator	Coefficiente de Regressão	p
Termo independente (β_0)	3,864134	0,0000001*
pH (L) (β_1)	-0,028114	0,133186
pH (Q) (β_{11})	-0,220867	0,000429*
Agitação (L) (β_2)	0,002276	0,878957
Agitação (Q) (β_{22})	-0,162987	0,001057*
Interação (β_{12})	0,081057	0,032001*
Falta de ajuste*	-	,051091

Na Tabela 5.15 pode se observar como os dois fatores são significativos no termo quadrático e a interação continua sendo significativa, o que nos leva ao modelo codificado escrito acima. Ao calcular os valores do pH e da agitação, e decodificá-los obtem-se que as melhores condições de pH e agitação são 5,0 e 300 rpm respectivamente, em torno do ponto central.

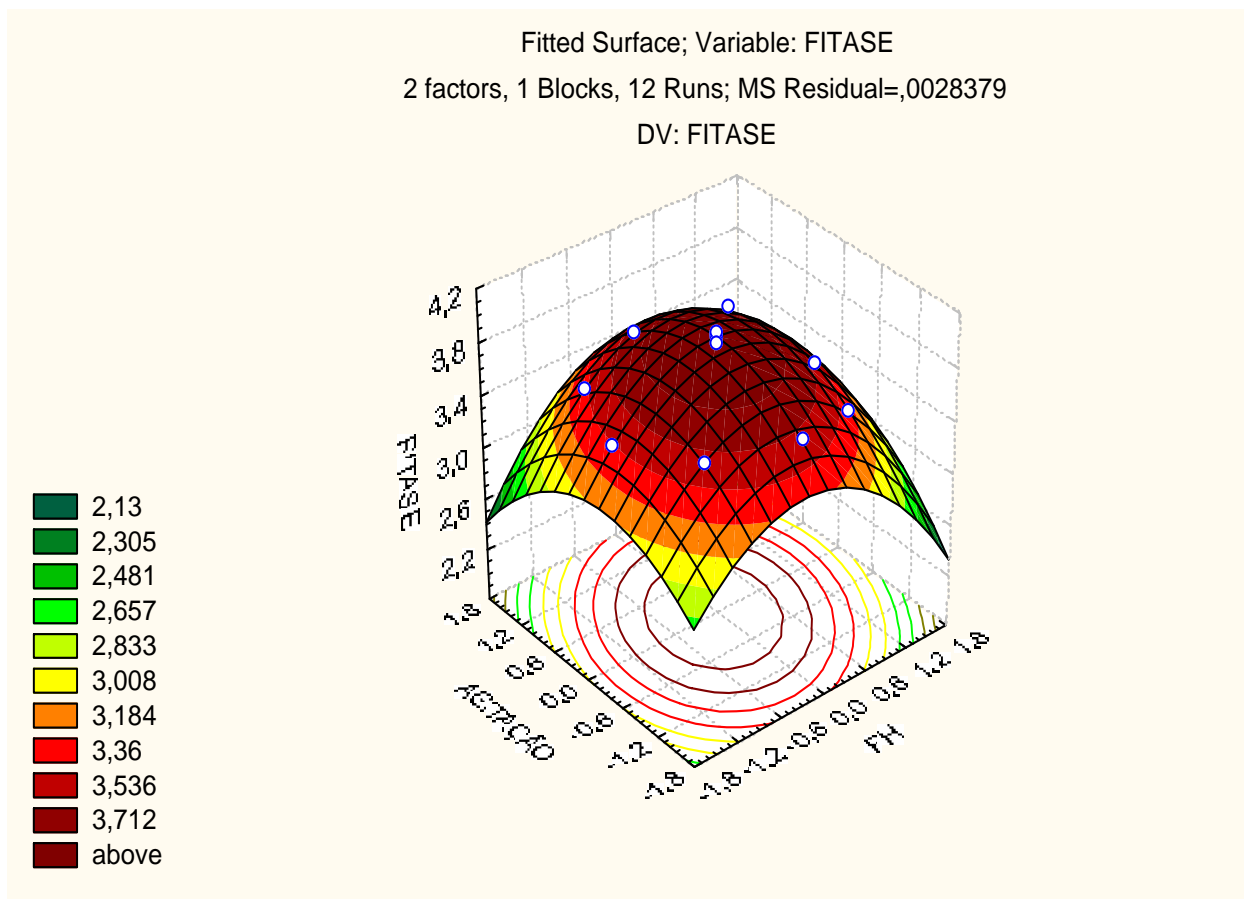


Figura 5.11. Superfície de resposta obtida no Planejamento Composto Central.

5.2.5 Determinação dos parâmetros do modelo cinético.

Uma vez determinadas as condições de pH foi realizada a análise cinética da extração das enzimas e das proteínas presentes no meio fermentado. Nas Figuras 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15 são ilustrados os resultados nos distintos tempos de extração das enzimas, assim como a quantidade de proteína total que foi extraída.

Analisando os resultados reportados nas Figuras 5.12 até 5.15 pode se observar que na etapa de extração é obtido um caldo com uma composição de 4 U/mL de fitases, 2,9 U mL⁻¹ de xilanases, 12 U mL⁻¹ de pectinases e aproximadamente 18 mg mL⁻¹ de proteínas totais. É importante ressaltar que nos resultados alcançados é obtida uma concentração de fitase (4 U mL⁻¹) ao extrair a enzima produzida; se essa concentração é comparada com os resultados das cepas de referencia de *Escherichia coli* PGR-2 e *Escherichia coli* PGR-3 da Divisão de Bioengenharia e Biotecnologia da UFPR modificadas geneticamente para produzir

fitases por fermentação submersa, as quais produzem 2 U mL^{-1} pode-se observar que a concentração alcançada na extração é o duplo da concentração produzida por duas cepas modificadas geneticamente para produzir fitases.

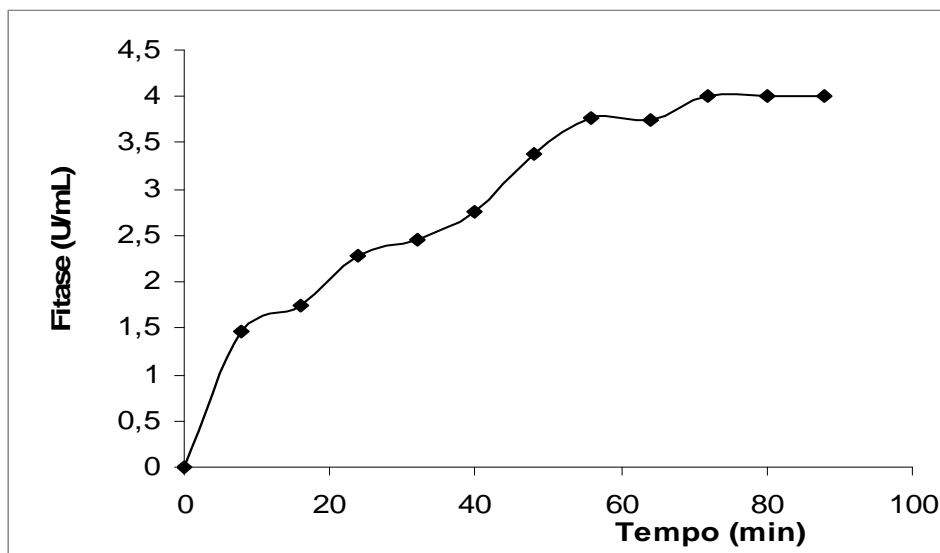


Figura 5.12. Gráfico cinético da extração de fitase produzida por FES a temperatura ambiente, pH 5 com uma relação sólido líquido de 1/25 base seca.

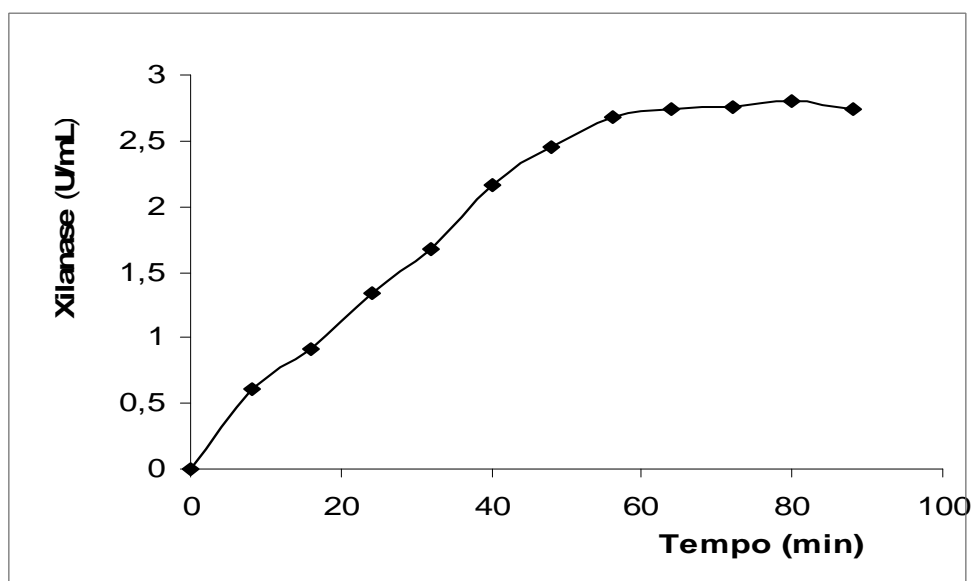


Figura 5.13. Gráficos cinéticos da extração de xilanase produzida por FES a temperatura ambiente, pH 5 com uma relação sólido líquido de 1/25 base seca.

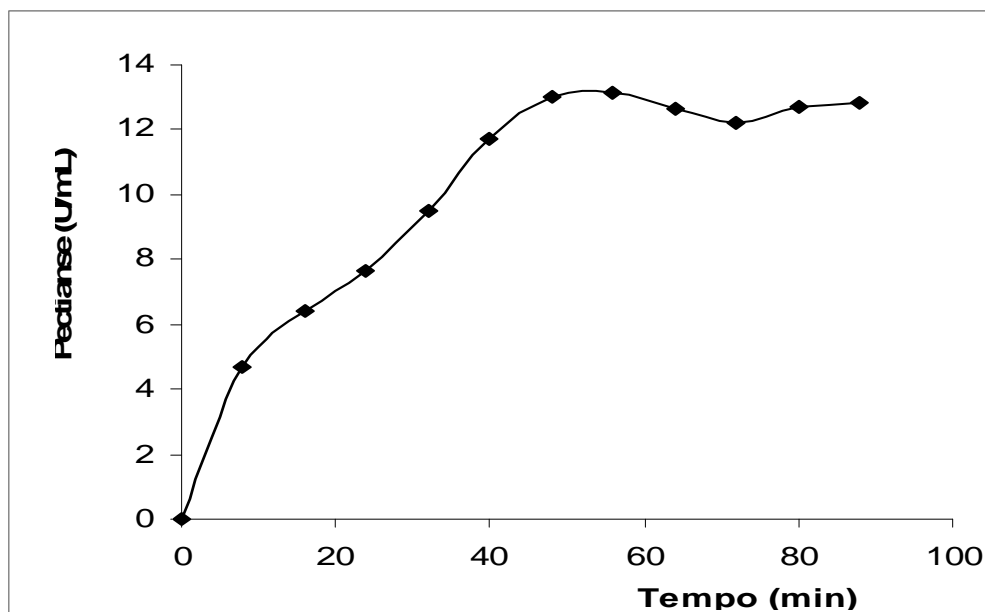


Figura 5.14 Gráfico cinético da extração de pectinase produzida por FES a temperatura ambiente, pH 5 com uma relação sólido líquido de 1/25 base seca.

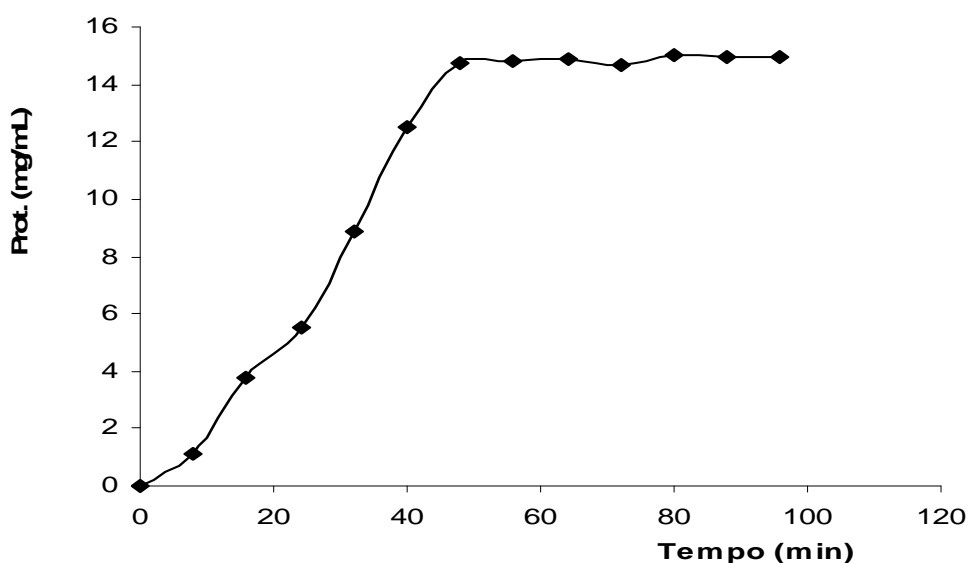


Figura 5.15. Gráfico cinético da extração das proteínas produzidas na FES a temperatura ambiente, pH 5 com uma relação sólido líquido de 1/25 base seca.

O argumento anterior demonstra a vantagem da fermentação em estado sólido com respeito às fermentações submersas, ao se obter um produto mais concentrado no começo da fase de recuperação o que faz com que a fermentação em estado sólido seja mais atrativa do ponto de vista econômico, assim como também da quantidade menor de resíduos gerados a tratar; os quais poderiam ser utilizados como parte também de ração animal atendendo a sua composição proteica.

No caso da pectinase quando se compara os valores descritos na literatura para a extração do meio de fermentação em estado sólido, com os deste trabalho, os valores estão na mesma faixa de atividade (14 U mL^{-1}) (Castilho *et al.* 1999). Para a fermentação submersa as quantidades máximas reportadas para cepas de *Aspergillus niger*, são de 10 e 18 U mL^{-1} . No caso da obtenção de pectinase em condições de cultivo submerso com cepas do *Aspergillus niger* observa-se que as concentrações obtidas no processo de lixiviação são comparáveis as obtidas nos processos submersos (Favela-Torres *et al.*, 2006).

Outro aspecto de interesse é a estabilidade da atividade enzimática durante o processo de lixiviação, comparando com Castilho *et al.* (1999) no qual após 30 minutos de operação, a atividade da pectinase cai 40%, enquanto que neste estudo a atividade da pectinase permanece constante durante todo o processo de extração.

Também a partir das Figuras 5.12, 5.13, 5.14 e 5.15 anteriores, observa-se que aproximadamente aos 40 minutos de extração se alcançam os valores de concentração de saturação para a pectinase, a xilanase e a proteína total. No caso da fitase essa concentração se alcança aos 72 minutos de extração. Levando em consideração a equação básica da lixiviação reportada por Coulson (1981) (Equação 3.11), foi realizada a determinação das constantes cinéticas que determinam este processo.

$$C = C_s(1 - e^{-kt}) \quad \text{Eq.5.10}$$

Linearizando a expressão anterior é obtida a expressão que permite calcular as constantes cinéticas para cada enzima estudada.

$$-kt = \left(\frac{C - C_s}{C_s} \right) \quad \text{Eq. 5.11}$$

Os valores das constantes cinéticas (k) são numericamente iguais aos valores dos coeficientes lineares de cada reta obtida para cada enzima. A Figura 5.16 mostra a linearização para cada enzima. A Tabela 5.16 identifica os parâmetros dos modelos cinéticos de lixiviação e os coeficientes de regressão para as linearizações dos modelos.

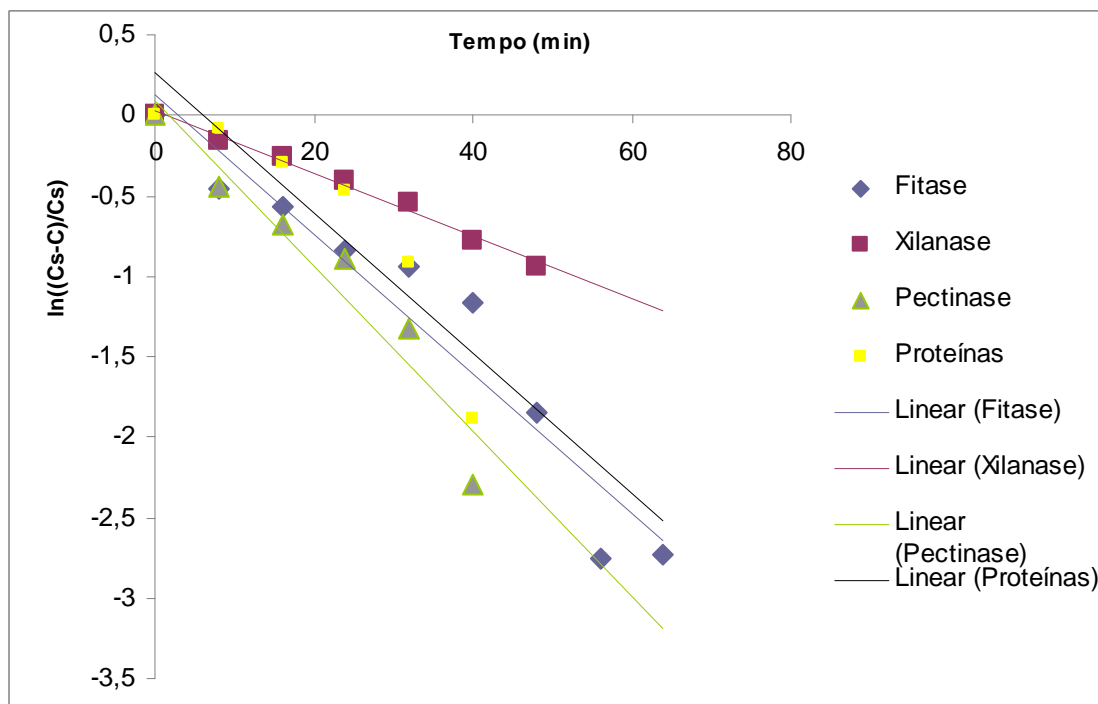


Figura 5.16 1 Linearização dos modelos cinéticos para as enzimas e as proteínas

Tabela 5.16. Valores das constantes cinéticas e das concentrações de equilíbrio.

Enzima	k (min ⁻¹)	Cs (U mL ⁻¹)	R ²
Fitase	0,052	4,01	0,9233
Xilanase	0,023	2,87	0,9873
Pectinase	0,102	12,35	0,9183
Proteínas	0,096	14,33 mg mL ⁻¹	0,9805

Os modelos que definem a extração para cada enzima são, portanto:

Para fitase

$$C = 4,01(1 - e^{-0,52t}) \quad \text{Eq.5.12}$$

Para xilanase

$$C = 2,78(1 - e^{-0,023t}) \quad \text{Eq.5.13}$$

Para pectinase

$$C = 12,35(1 - e^{-0,103t}) \quad \text{Eq.5.14}$$

Para as proteínas

$$C = 19,33(1 - e^{-0,096t}) \quad \text{Eq.5.15}$$

Os valores da constante cinética para a fitase, a xilanase e a pectinase foram de 0,059 min⁻¹, 0,023 min⁻¹ e 0,102 min⁻¹ respectivamente, para a proteína foi

de $0,096 \text{ min}^{-1}$. É importante assinalar que não foi encontrado na literatura nenhum dado comparativo dos valores das constantes cinéticas. No caso da pectinase, o valor é semelhante ao coeficiente cinético reportado por Rodríguez-Fernández (2004), onde o valor obtido na extração da pectinase foi de $0,107 \text{ min}^{-1}$. Estes resultados também poderiam ser comprovados pelo fato de que em ambos os sistemas, a concentração de saturação para a atividade da pectinase foi alcançada aos 40 minutos de extração. Para o caso da constante cinética na extração da proteína, o valor foi de $0,096 \text{ min}^{-1}$, um valor pouco mais baixo que o descrito por Rodríguez-Fernández (2004). Esta diferença poderia estar relacionada à relação sólido líquido neste trabalho que foi de $1:25 \text{ U mL}^{-1}$ em base seca, e no trabalho referido a relação sólido líquido foi fixada em $1:12 \text{ U mL}^{-1}$ em base seca.

5.2.6 Estudo da lixiviação por etapas seqüenciais.

Para analisar o rendimento total do processo de extração das enzimas decidiu-se avaliar a eficiência da lixiviação através de várias etapas considerando as condições anteriores, relação sólido/líquido $1:25 \text{ U mL}^{-1}$ em base seca, temperatura ambiente, pH 5 e agitação de 300 rpm. A cada etapa se adicionaram 1,6L de água com agitação durante 60 minutos. Além da atividade das enzimas foi quantificada a proteína total extraída em cada etapa para avaliar a atividade específica obtida nas etapas. Além disso, as extrações sucessivas permitem ter uma estimativa mais efetiva da quantidade total de enzima produzida na fermentação. A Tabela 5.17 mostra as diferentes concentrações obtidas em cada etapa de extração. Nas Figuras 5.17 até 5.20 são mostradas as tendências das concentrações das enzimas extraídas em função do número de etapas utilizadas no estudo de extração.

Tabela 5.17. Estudo da extração por etapas das enzimas e das proteínas.

Etapa	Conc. de Fiatse (U mL^{-1})	Conc. de Pectinase (U mL^{-1})	Conc. de Xilanase (U mL^{-1})	Conc. de Proteína (mg mL^{-1})
1	3,86	16,52	2,58	14,45
2	3,00	11,79	2,57	8,16
3	0,99	6,03	0,95	7,07
4	0,18	1,61	0,24	4,74

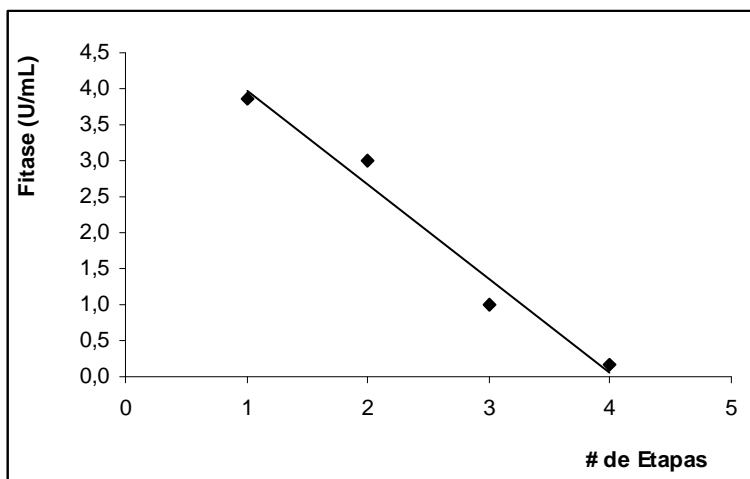


Figura 5.17. Extração da fitase por etapas.

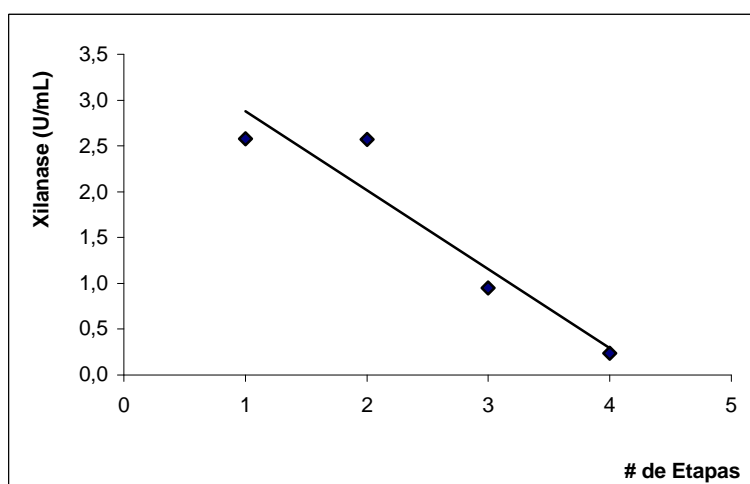


Figura 5.18 Extração da xilanase por etapas.

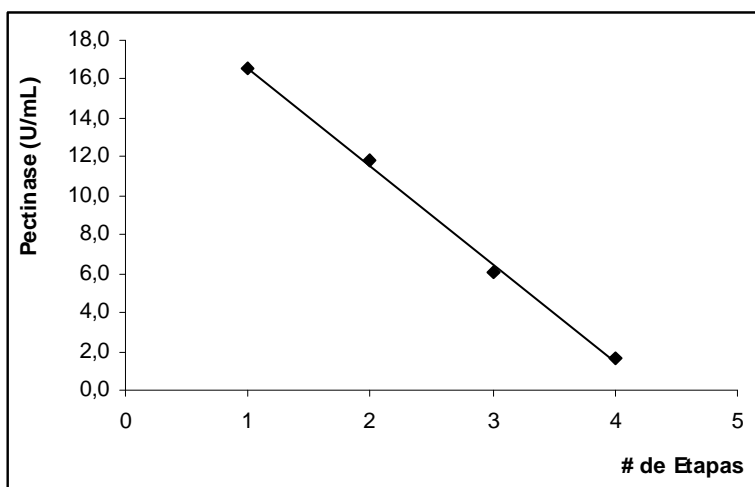


Figura 5.19. Extração da pectinase por etapas.

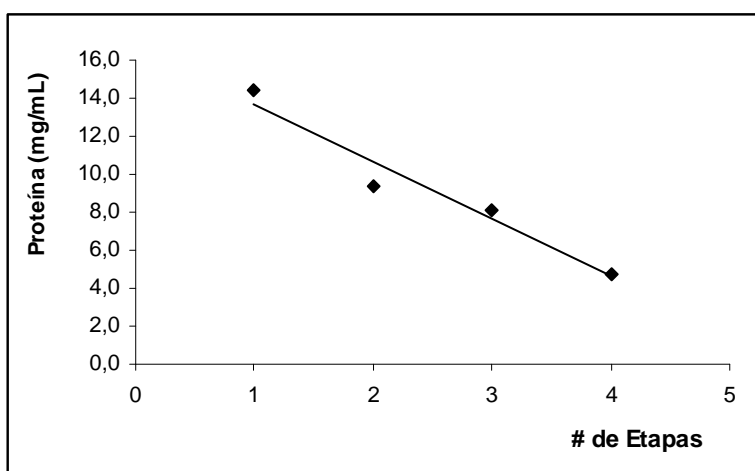


Figura 5.20. Extração das proteínas por etapas.

É possível verificar que as extrações em 4 etapas apresentam um decréscimo linear e, nas duas primeiras etapas, para a fitase e a pectinase, é onde se encontram concentrações altas tomando como referência os valores de concentração analisados na primeira parte do estudo da extração das enzimas. Os modelos matemáticos que descrevem estas extrações sucessivas são mostrados nas Equações 5.16 até 5.19:

$$At.Fitase = -1,31(\# Etapa) + 5,27 \quad \text{Eq. 5.16}$$

$$At.Xilanase = -0,86(\# Etapa) + 3,74 \quad \text{Eq. 5.17}$$

$$At.Pectinase = -5,05(\# Etapa) + 21,61 \quad \text{Eq. 5.18}$$

$$Pr oteína = -3,04(\# etapa) + 16,75 \quad \text{Eq. 5.19}$$

No resultado da pectinase se observa um comportamento semelhante ao comportamento descrito por Rodríguez-Fernández (2004), atingindo-se a extração da maior parte da enzima nas duas primeiras etapas, sendo concentrações consideradas altas quando comparadas com os resultados encontrados na literatura. O mesmo pode se falar para o caso da fitase, obtendo-se valores considerados altos nas duas primeiras etapas da extração. Frente a este comportamento é possível concluir que duas etapas de extração são suficientes para obter uma concentração

de enzimas possivelmente economicamente viável para posteriores processos de recuperação.

Na Tabela 5.18 são mostradas as quantidades totais de enzima extraída por etapa e o rendimento na extração destas. Uma análise das enzimas extraídas em cada etapa mostra que o total das enzimas produzidas que podem ser extraídas da fermentação, sendo um total de 93,07 unidades de fitase extraídas, 73,47 unidades de xilanase e 416,8 unidades de pectinase. Trabalhando com as duas primeiras etapas obtém-se 85% do rendimento da extração das fitases totais presentes no meio, e 80% para a xilanase e para a pectinase totais que poderiam ser extraídas.

Tabela 5.18. Unidades de enzima extraídas por grama de sólido fermentado lixiviado e rendimento das etapas.

Etapa	Fitase ext. (U g ⁻¹)	Rend. (%)	Xilanase ext. (U g ⁻¹)	Rend. (%)	Pectinase ext. (U g ⁻¹)	Rend. (%)
1	44,79	48,12	29,87	40,66	191,51	45,95
2	34,79	37,37	29,78	40,53	136,73	32,81
3	11,44	12,29	11,04	15,02	69,87	16,76
4	2,06	2,21	2,78	3,79	18,68	4,48

Ao analisar a extração por etapas e não se alcançar mais a concentração de equilíbrio (ver Fig. 5.17 a 5.20), a constante cinética do processo pode ter diminuído na medida em que foi incrementado o número de etapas. Esta queda pode ocorrer devido à difusividade efetiva (Bird *et al.*, 1963) das enzimas, viu se afetada pela característica porosa do material fermentado e a que esta quantidade de enzimas fica inserida no seio da matriz sólida, permanecendo mais retida no material, e portanto sendo mais difícil de extrair. Deve ser esclarecido que nos sistemas porosos a difusividade é medida como “*difusividade efetiva*” que depende da temperatura, a pressão (no caso dos gases) e as características dos poros.

5.3 Concentração das enzimas por ultrafiltração.

Uma vez estabelecidas as condições de extração das enzimas do meio de fermentação em estado sólido, o próximo passo foi centrifugar e concentrar o caldo contendo as enzimas. Além da concentração das enzimas, também é possível através da ultrafiltração eliminar impurezas ou inibidores de diferentes pesos moleculares presentes no caldo. No estudo inicial da concentração das enzimas foi

testada uma membrana de 100 kDa com o objetivo de eliminar inibidores de maior peso molecular, fundamentalmente proteínas.

5.3.1 Cálculo da permeabilidade das membranas e dos fluxos de permeado.

Após a montagem do sistema, foi determinada a permeabilidade hidráulica da membrana, através da medição do fluxo de permeado de água. A permeabilidade hidráulica é definida como a quantidade de água que unidade de área por unidade de pressão e foi calculada através da equação:

$$Per = \frac{Q_P}{A \cdot \Delta P} \quad \text{Eq. 5.20}$$

Onde:

Q_P : Vazão do permeado (mL min^{-1})

A: Área da membrana ($0,5 \text{ m}^2$)

ΔP : Queda de pressão no ultrafiltro (5 psi)

As membranas apresentaram uma permeabilidade de 120 e 49,2 $\text{mL/m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{atm}$ para a de 100 kDa e 10 kDa, respectivamente. Este resultado pode ser associado à estrutura porosa de cada membrana. Por apresentar uma maior rejeição de solutos com maior peso molecular, a membrana de 100 KDa, apresenta uma distribuição de poros maiores o que contribui para um maior fluxo de permeado nas mesmas condições de pressão. Nas Figuras 5.21 e 5.22 são apresentados os comportamentos do fluxo de permeado no tempo, onde pode-se apreciar que as curvas apresentaram o mesmo comportamento, o que pode ser um indício da reprodutibilidade do processo. No caso da membrana de 100 KDa aos 10 minutos de operação é alcançado a vazão de permeado constante de 300 mL min^{-1} , no caso da outra membrana este fluxo de permeado constante, 120 mL min^{-1} , foi alcançado após 35 minutos de operação.

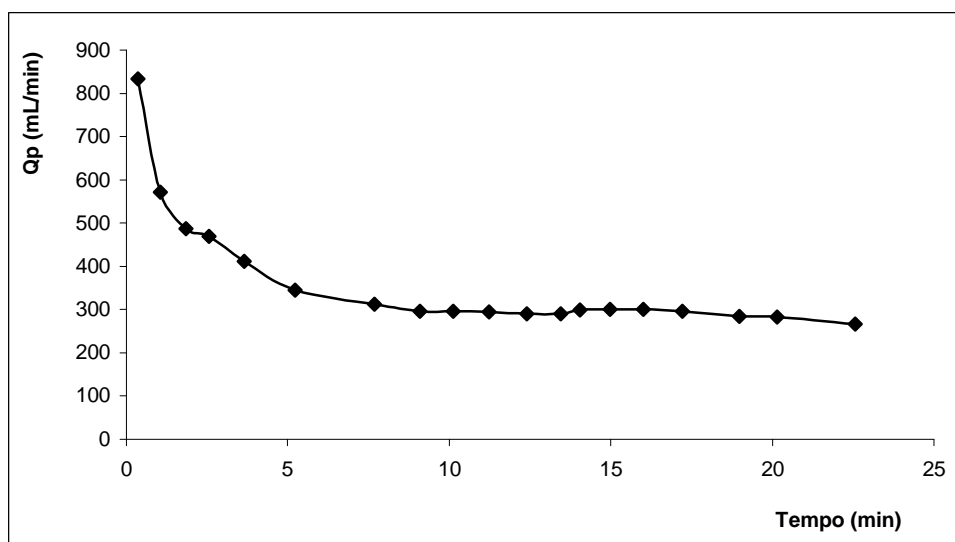


Figura 5.21. Comportamento da vazão do permeado no tempo para a membrana de 100 KDa.

Em ambos os casos foram observados uma redução no fluxo de permeado. Este fenômeno é conhecido como efeito de “*fouling*”, e representa uma resistência adicional para a passagem da corrente de permeado, causado pela acumulação de componentes e formação de incrustações na superfície da membrana.

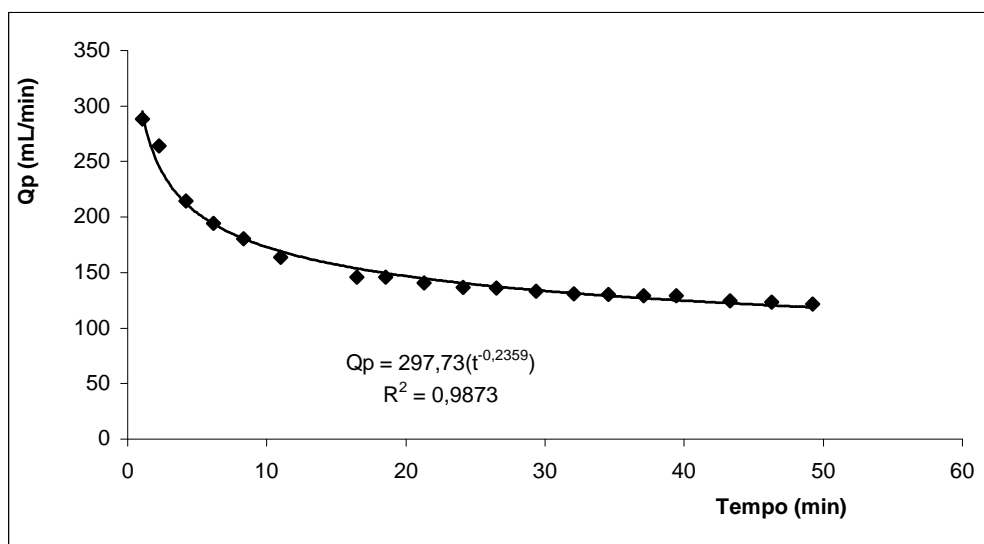


Figura 5.22. Comportamento da vazão de permeado no tempo para a membrana de 10 KDa.

5.3.2 Determinação das atividades das enzimas.

Uma vez avaliados os comportamentos dos fluxos de permeados com o tempo, foram determinadas as quantidades de unidades totais em cada uma das três correntes analisadas, a alimentação, o retido e o permeado. Na Tabela 5.19 são

mostrados os resultados, para a membrana de 100 KDa da atividade enzimática em cada uma das correntes. É necessário assinalar que o extrato enzimático foi concentrado três vezes.

Tabela 5.19. Atividade total das enzimas em cada corrente para a membrana de 100 KDa.

Enzima	Alimentação (U Totais)	Retido (U Totais)	Permeado (U Totais)
Fitase	47709,86	41645,39	485,68
Xilanase	10839,65	329,53	9467,85
Pectinase	43413,77	2675,60	41636,51

Na Tabela 5.19, ao ser utilizada a membrana com cutoff de 100 KDa é obtido um fracionamento das enzimas, com a maior parte da fitase (82%) no retido, o que indica que o valor do peso molecular da enzima é da ordem de 100 KDa. Este comportamento está de acordo com os valores encontrados na literatura onde os valores de peso molecular da fitase de *Aspergillus niger* oscilam entre os 80 e os 120 KDa, no caso da enzima aqui mostrada o tamanho poderia ser considerado superior aos 100 KDa. Outro aspecto importante é o incremento na atividade total da fitase que foi de 18%. Isto pode ter ocorrido porque no permeado foram eliminados inibidores da atividade da enzima, como íons ou outros compostos de baixo peso molecular, o que seria ao mesmo tempo uma purificação parcial do extrato obtido. No caso da pectinase e da xilanase o comportamento observado foi diferente. Para ambas as enzimas a maior quantidade é observada no permeado, estando de acordo com os valores de tamanho de molécula (30~60 KDa) para ambas as enzimas descritas na literatura. Também foi observado um decréscimo na atividade das enzimas sendo para a pectinase uma redução de 5% e para a xilanase de 12%, ao contrário do que aconteceu com a fitase. Este decréscimo pode se dever a diferentes causas; acúmulo no permeado de uma maior concentração de inibidores o que reprime a atividade das enzimas, perda de atividade (desnaturação) ou a perdas na membrana.

Uma vez que não se obteve sucesso com a tentativa de tirar as impurezas de peso superiores a 100 KDa do caldo extraído contendo as enzimas, decidiu-se concentrar o caldo utilizando uma membrana com cutoff de 10 KDa. Na Tabela 5.20 são descritas as atividades totais e a quantidade de proteína obtida pra cada corrente. Desta vez o extrato enzimático foi concentrado cinco vezes.

Tabela 5.20. Atividade total das enzimas em cada corrente com a membrana de 10 KDa.

Enzima	Alimentação (U Totais)	Retido (U Totais)
Fitase	48665,17	43026,22
Xilanase	26831,42	37569,16
Pectinase	96604,16	135971,46
Proteínas*	35555,56	21357,58

*As proteínas foram reportadas em mg totais.

Nesta concentração das enzimas pode se apreciar que ficam no retido praticamente toda a atividade das enzimas observando-se que para a fitase há uma perda de atividade de 12% tomando em consideração a quantidade total de enzima. Para a xilanase e a pectinase é observado um aumento na atividade de 40% em ambos os casos, o que indica que no permeado foram eliminados compostos de baixo peso molecular que tinham uma incidência negativa direta na atividade da enzima, atuando como inibidores. Para as proteínas totais observa-se que há um decréscimo de 40% na quantidade total de proteína. Disto pode-se concluir que os compostos de baixo peso molecular poderiam ser ativadores da enzima fitase que são eliminados do caldo com as enzimas, ao mesmo tempo estes compostos de baixo peso molecular são inibidores da atividade das pectinases e das xilanases. Com estas variações nas atividades foram determinadas as atividades específicas da alimentação e do retido as quais são descritas na Tabela 5.21.

Tabela 5.21. Atividades específicas das enzimas após a concentração por ultrafiltração com a membrana de 10 KDa.

Corrente	Ativ. Esp. Fitase (U mg ⁻¹ prot.)	Ativ. Esp. Xilanase (U mg ⁻¹ prot.)	Ativ. Esp. Pectinase (U mg ⁻¹ prot.)
Alimentação	1,37	0,75	2,72
Retido	2,01	1,76	6,37

Uma vez analisados os dados descritos na Tabela 5.21 podemos verificar que há um importante aumento na atividade específica para as três enzimas estudadas; sendo de 47% para a fitase, 134% para a pectinase e 135% para a xilanase. Isso indica que a concentração por ultrafiltração, também ajuda a aumentar a atividade total das enzimas, assim como as suas atividades específicas.

5.3.3 Determinação dos íons presentes no caldo enzimático final.

Outro aspecto importante considerado na concentração do caldo enzimático é a composição de íons livres presentes no meio antes e depois de ultrafiltrado o

caldo. Na Tabela 5.22 são mostrados os valores da concentração de alguns íons presentes no caldo enzimático extraído da fermentação e após a etapa de concentração por ultrafiltração.

Tabela 5.22. Composição iônica do caldo enzimático antes e depois de ultrafiltrar com a membrana de 10 KDa.

Íons	Alimentação (ppm)	Retido (ppm)
Na ⁺	713,24	16,67
NH ₄ ⁺	99,01	52,29
K ⁺	8893,51	96,17
Mg ⁺²	1075,93	29,31
Zn ⁺²	2236,22	0,02

Pode se observar uma perda significativa na concentração dos íons presentes no caldo, o que poderia ser uma explicação para a queda ou aumento da atividade das enzimas presentes no meio. É importante observar que o íon de Zinco livre presente no caldo desaparece quase totalmente no retido, enquanto que os íons de Amônio só perdem a metade da sua concentração. Também é possível observar perdas significativas na concentração de íons de Potássio e de Magnésio livres.

5.4 Conservação das enzimas.

Uma vez concentradas as enzimas utilizando a ultrafiltração decidiu-se analisar a estabilidade de longo prazo das enzimas, levando em consideração o controle (sem adição de glicerol) e as duas variantes de formulação do produto final com 25 e 35% de glicerol adicionado no caldo de enzimas concentrado. O primeiro fator analisado foi a influência do glicerol na atividade destas enzimas. Na Tabela 5.23 são mostradas as atividades das enzimas considerando o volume de glicerol (diluição) de extrato concentrado em cada condição de conservação.

Tabela 5.23. Atividade inicial das enzimas em cada condição de conservação.

Condição	Fitases (U ml ⁻¹ ext. conc.)	Xilanases (U ml ⁻¹ ext. conc.)	Pectinases (U ml ⁻¹ ext. conc.)
Controle	39,40	27,45	114,50
25% de Glicerol	56,33	30,73	150,78
35% de Glicierol	53,13	33,93	167,72

Na Tabela 5.23, a fitase apresenta um aumento na atividade de aproximadamente 42% para a formulação com 25% de glicerol e 35 % para a

formulação com 35% de glicerol; para a pectinase há um incremento em 31% para a solução com 25% de glicerol e de 46% para a formulação com 35% de glicerol, o que indica um efeito significativo e positivo na atividade das enzimas, aportando possivelmente uma melhor conformação espacial das enzimas e permitindo um melhor contato entre o substrato e o sítio ativo da enzima. No caso da xilanase foram identificados incrementos de 12% na atividade para a formulação de 25% de glicerol e de 24% para a formulação de 35% de glicerol. Estes efeitos sobre a atividade poderiam se dever a uma melhora na conformação espacial das enzimas com a adição do glicerol. É importante assinalar que a atividade da água foi de 0,925 e 0,908 para as formulações de 25% e 35% de glicerol adicionado respectivamente.

Este efeito na conformação espacial das enzimas e conseqüentemente um aumento na atividade dessas enzimas, pode-se dever ao fato que há uma maior estabilidade de estruturas quaternárias oligoméricas, quando estas são favorecidas pela formação de pontes de hidrogênio intramoleculares. Este mecanismo se dá a partir da diminuição das interações entre a água e a enzima, devido à diminuição na concentração de água livre, promovendo a formação de interações intramoleculares, bem como de interações entre moléculas de proteínas distintas (Iyer *et al.* 2008, Sola-Penna *et al.* 1998).

Posteriormente às formulações das três variantes de conservação, realizaram-se a análise da atividade ao longo do tempo a diferentes temperaturas, com o objetivo de determinar em que condições a atividade se manteria mais estável. Nas Figuras 5.23 até 5.31 mostradas a seguir, pode-se observar o comportamento da atividade das enzimas para oito semanas de armazenamento a diferentes temperaturas.

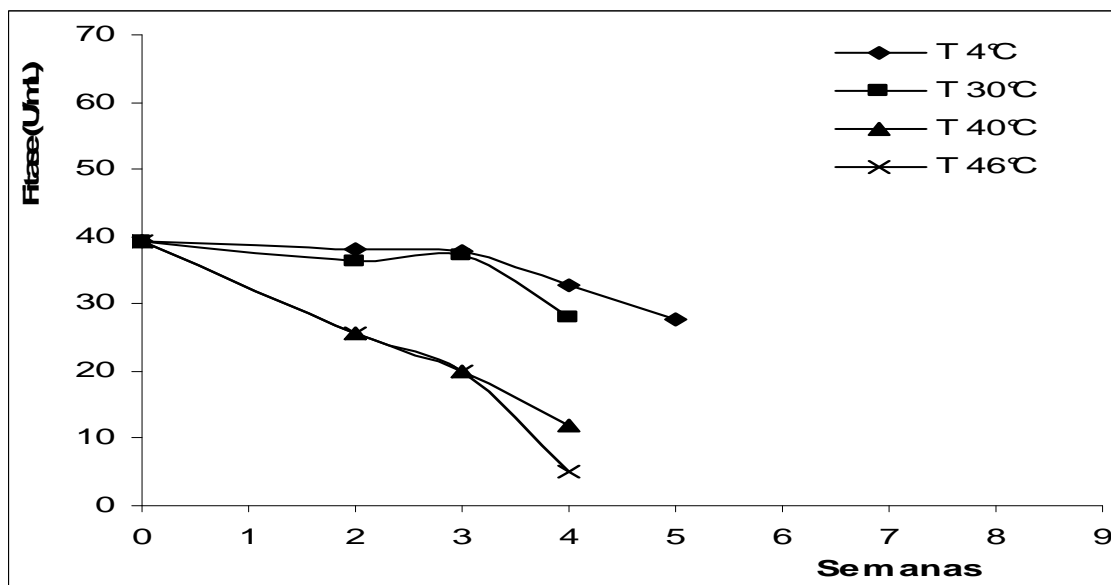


Fig. 5.23. Estabilidade da fitase sem adição de glicerol às temperaturas de 4°C; 29°C; 40°C e 46°C respectivamente.

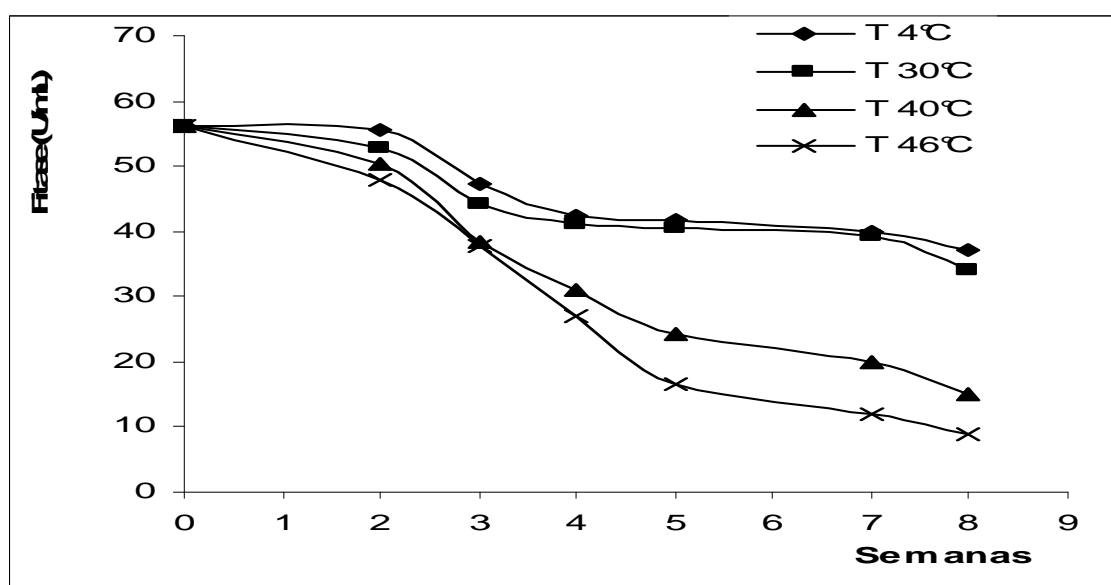


Fig.5.24. Estabilidade da fitase com 25% de glicerol às temperaturas de 4°C; 29°C; 40°C e 46°C respectivamente.

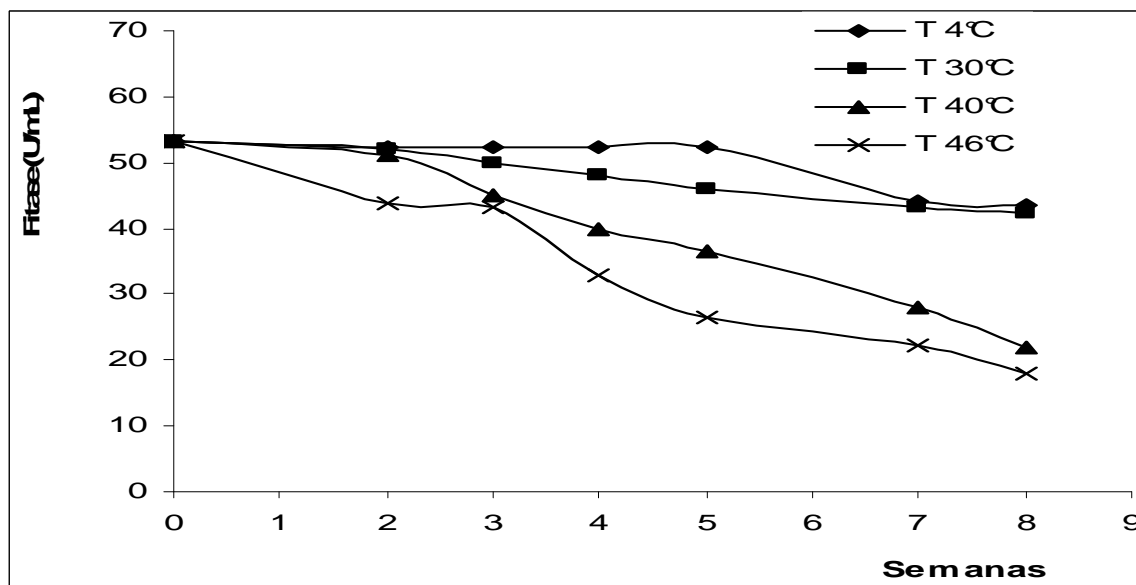


Fig. 5.25. Estabilidade da fitase com 35% de glicerol às temperaturas de 4°C; 29°C; 40°C e 46°C respectivamente.

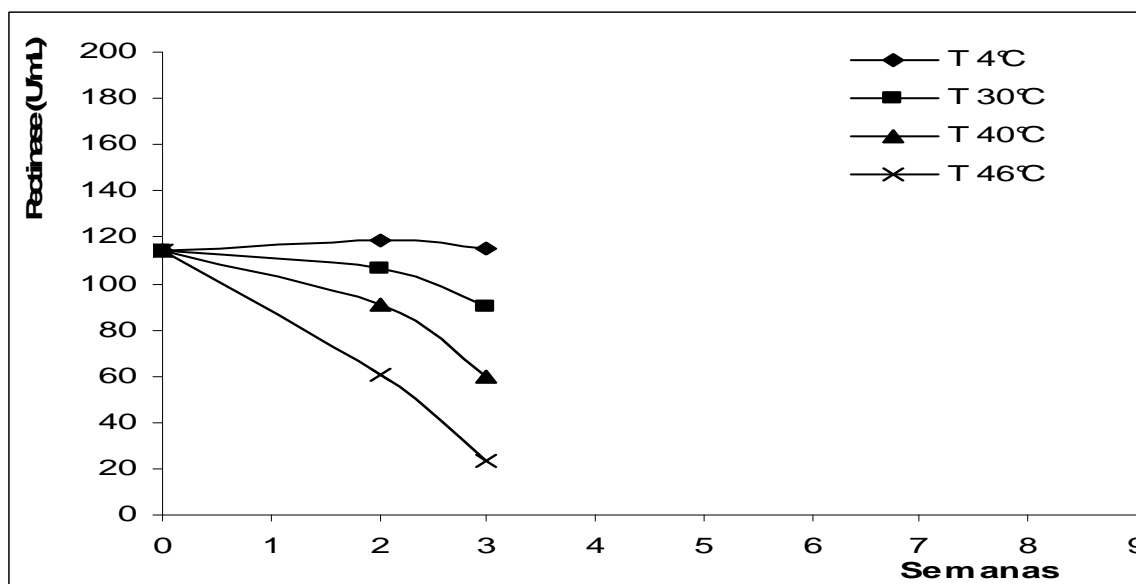


Fig. 5.26. Estabilidade da pectinase sem glicerol às temperaturas de 4°C; 29°C; 40°C e 46°C e respectivamente.

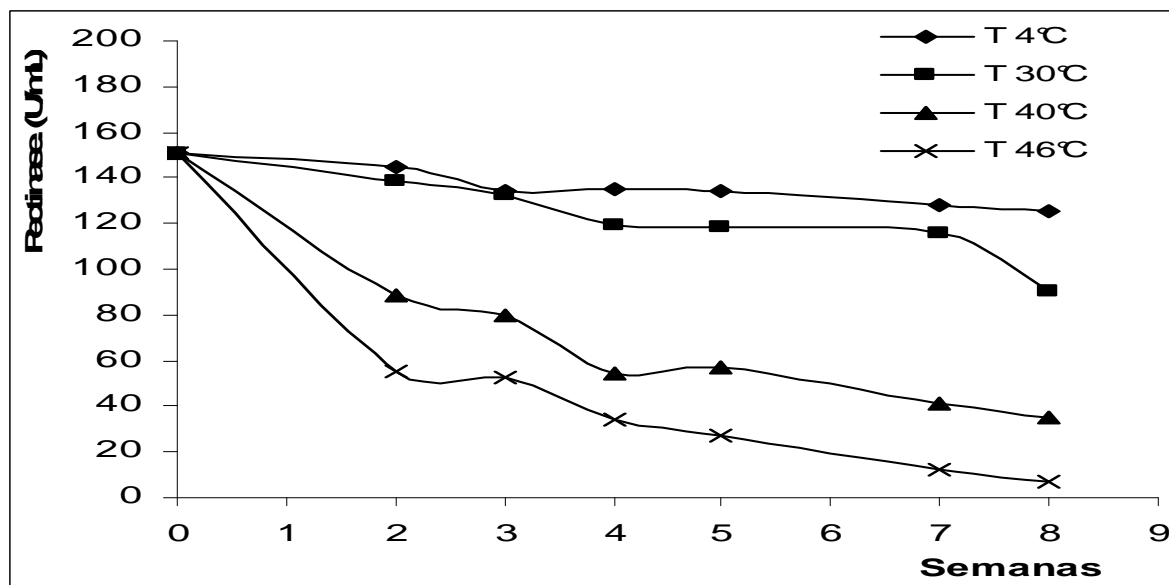


Fig. 5.27. Estabilidade da pectinase com 25% de glicerol às temperaturas de 4°C; 29°C; 40°C e 46°C respectivamente.

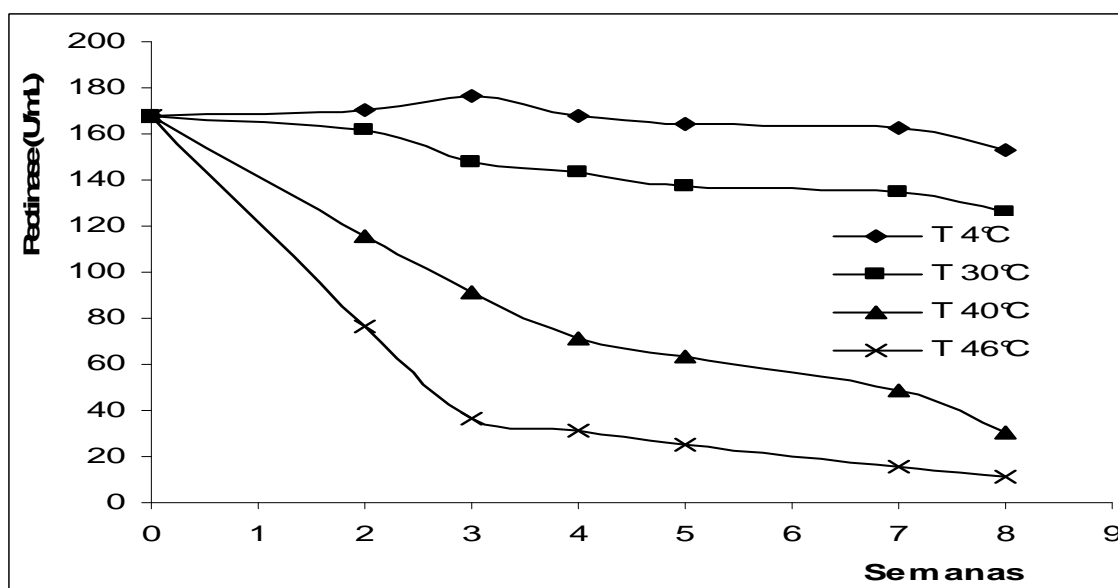


Fig. 5.28. Estabilidade da pectinase com 35% de glicerol às temperaturas de 4°C; 29°C; 40°C e 46°C respectivamente.

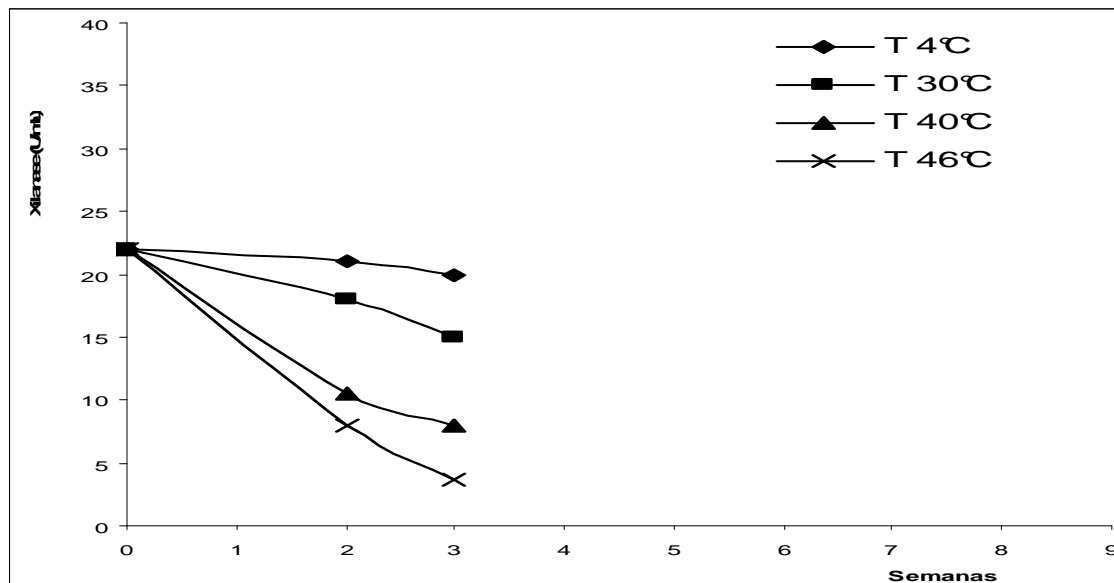


Fig. 5.29. Estabilidade da xilanase sem glicerol às temperaturas de 4°C; 29°C; 40°C e 46°C respectivamente.

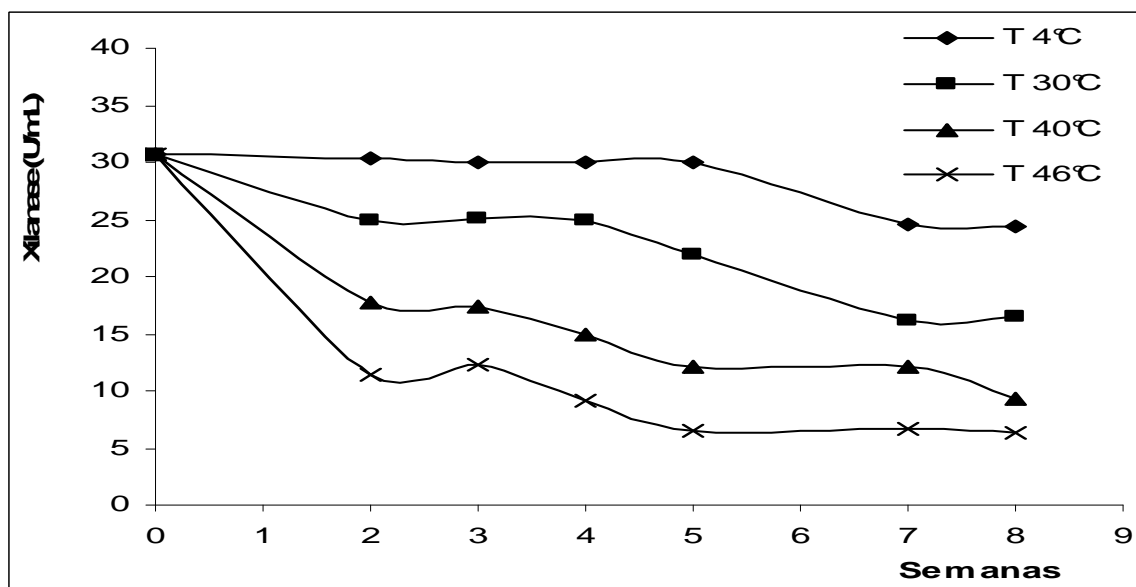


Fig. 5.30. Estabilidade da xilanase com 25% de glicerol às temperaturas de 4°C; 29°C; 40°C e 46°C respectivamente.

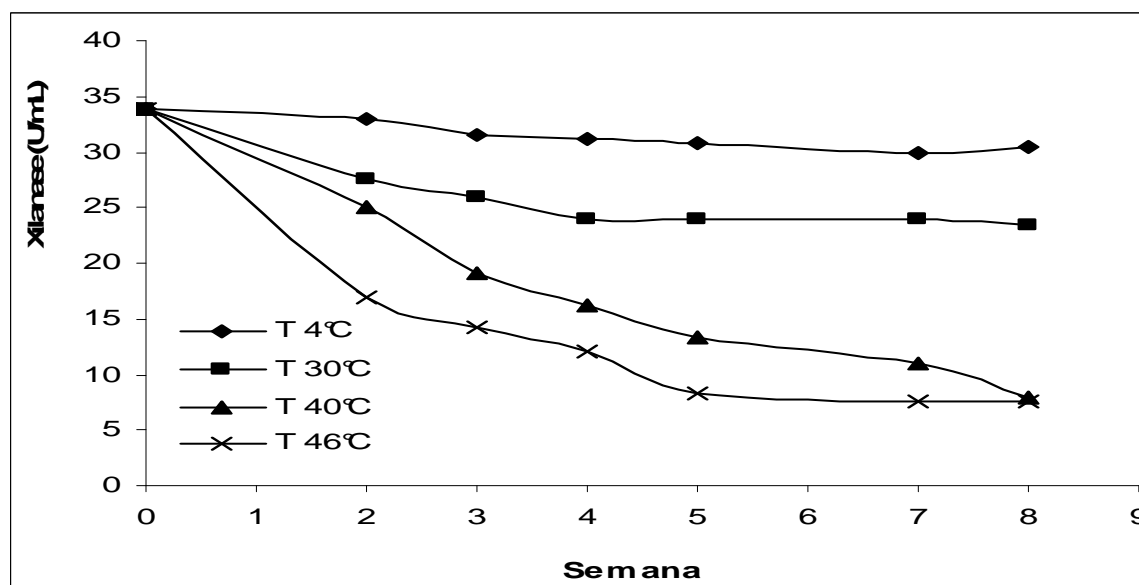


Fig. 5.31. Estabilidade da xilanase com 35% de glicerol às temperaturas de 4°C; 29°C; 40°C e 46°C respectivamente.

Nas Figuras 5.23 até 5.31 é importante verificar que as variantes onde não foi adicionado o glicerol, os controles, só puderam ser medidas as atividades até a semana três de armazenamento devido ao crescimento de microorganismos, principalmente leveduras nas formulações armazenadas a 29°C e 40°C, o que significou a alteração biológica do produto formulado. Nos casos das formulações com 25% e 35% de glicerol não foram observadas estas contaminações, pois a baixa atividade da água que apresentam impede o crescimento da maioria dos microorganismos.

Avaliando a atividade das formulações ao longo do tempo pode se observar que no caso das três enzimas estudadas, com a formulação de 35% de glicerol se alcançou a maior estabilidade da atividade no tempo. Nas Tabelas 5.24 até 5.27 são mostrados os valores percentuais de retenção das atividades iniciais das três enzimas nas duas formulações analisadas após 8 semanas de armazenamento para cada temperatura.

Tabela 5.24. Atividade residual das enzimas armazenadas a 4°C após 8 semanas.

T (4°C)	% Atividade residual	
	25% de glicerol	35% de glicerol
Enzima		
Fitase	65,7%	81,8%
Pectinase	83,4%	91,0%
Xilanase	79,4%	90,0%

Tabela 5.25. Atividade residual das enzimas armazenadas a 29°C após 8 semanas.

T (29°C)	% Atividade residual	
Enzima	25% de glicerol	35% de glicerol
Fitase	60,9%	79,5%
Pectinase	59,9%	75,4%
Xilanase	53,5%	69,3%

Tabela 5.26. Atividade residual das enzimas armazenadas a 40°C após 8 semanas.

T (40°C)	% Atividade residual	
Enzima	25% de glicerol	35% de glicerol
Fitase	26,1%	41,2%
Pectinase	23,5%	18,2%
Xilanase	30,1%	23,1%

Tabela 5.27. Atividade residual das enzimas armazenadas a 46°C após 8 semanas.

T (46°C)	% Atividade residual	
Enzima	25% de glicerol	35% de glicerol
Fitase	14,1%	17,6%
Pectinase	4,7%	6,7%
Xilanase	15,6%	18,2%

Como pode ser analisado nas Tabelas 5.24 até 5.27 as melhores condições para as enzimas foi quando estas foram armazenadas sob refrigeração (4°C), pois após as oito semanas de armazenamento conservaram acima dos 80% da atividade inicial para as duas formulações estudadas. Para a formulação com 35% de glicerol é notável que chegue a alcançar 90% na retenção da atividade inicial das três enzimas. Esta mesma formulação (35% de glicerol) à temperatura ambiente, conserva 85% da atividade inicial da fitase e da pectinase, já para a xilanase conserva-se 70% da atividade inicial.

Nas outras condições de temperatura as perdas de atividade das três enzimas são significativas, restando menos de 30% da atividade inicial das formulações.

Uma vez analisado os rendimentos e o comportamento da atividade no tempo foram determinadas as constantes de desnaturação das enzimas, isolando-a da equação de Arrhenius (Eq. 3.10)

$$k = -\frac{\ln\left(\frac{A}{A_0}\right)}{t}$$

Nas Tabelas 5.30, 5.31 e 5.32 são reportados os valores da constante de desnaturação para as enzimas em cada condição de temperatura.

Tabela 5.28. Determinação das constantes de desnaturação para a fitase.

Temperatura	k(sem ⁻¹) 25%	R ²	k(sem ⁻¹) 35%	R ²
4	0,056	0,962	0,027	0,943
29	0,071	0,982	0,031	0,977
40	0,171	0,971	0,112	0,937
46	0,248	0,970	0,139	0,965

Tabela 5.29. Determinação das constantes de desnaturação para a xilanase.

Temperatura	k(sem ⁻¹) 25%	R ²	k(sem ⁻¹) 35%	R ²
4	0,066	0,969	0,013	0,927
29	0,082	0,967	0,049	0,953
40	0,152	0,963	0,175	0,980
46	0,250	0,957	0,201	0,940

Tabela 5.30. Determinação das constantes de desnaturação para a pectinase.

Temperatura	k(sem ⁻¹) 25%	R ²	k(sem ⁻¹) 35%	R ²
4	0,022	0,971	0,021	0,969
29	0,058	0,934	0,035	0,947
40	0,174	0,958	0,199	0,978
46	0,361	0,982	0,321	0,958

Observa-se que para todos os casos analisados nas Tabelas 5.30 até 5.32 os valores da constante de desnaturação são maiores para a formulação de 25% de glicerol quando comparados à formulação de 35% de glicerol. Esta queda poderia estar relacionada com a concentração do agente protetor que diminui a desnaturação térmica das enzimas. Como a temperatura, entre outros fatores, tem uma influência direta na constante de desnaturação decidiu-se mostrar graficamente a relação entre a constante de desnaturação (K_d) e a temperatura.

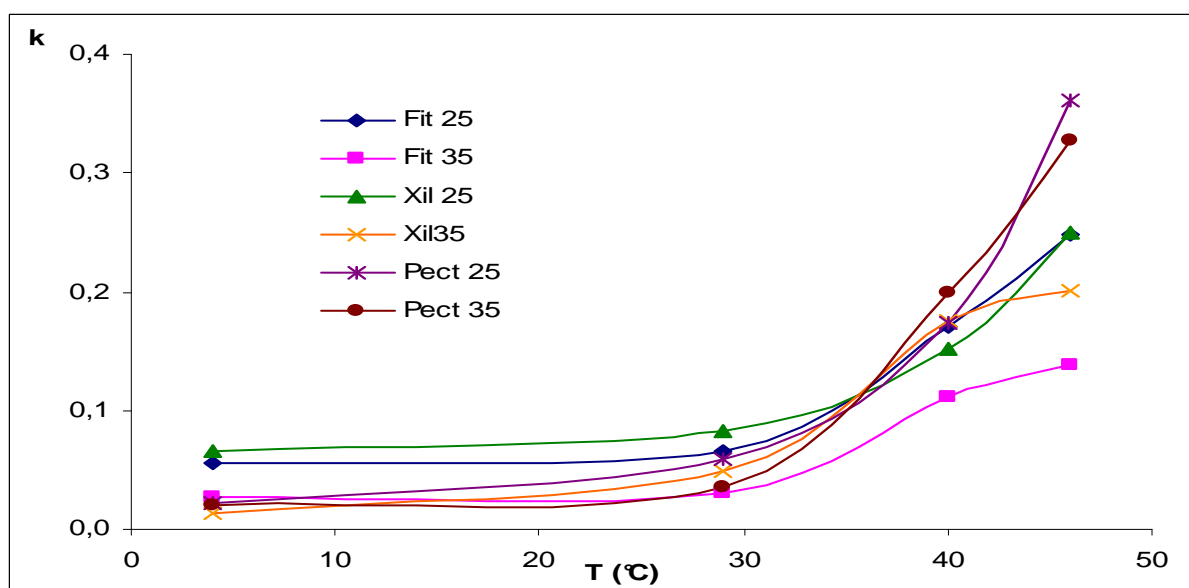


Fig. 5.32. Relação entre as constantes cinéticas e a temperatura.

É importante ressaltar que a Figura 5.32 mostra o comportamento da constante de desnaturação das enzimas; nota-se que no intervalo de temperatura entre 4°C e 30°C há um pequeno aumento no valor da mesma comparada com o intervalo da temperatura entre 30°C até 46°C. Entre tanto, ao aumentar a temperatura de armazenamento acima de 30°C aumenta o valor da constante de desnaturação de forma exponencial. A pectinase apresenta um maior valor quando comparada com a fitase. Este comportamento das constantes de desnaturação nos demonstra que o glicerol como agente crioprotetor das enzimas, funciona melhor a temperaturas ambiente ou menores. O aumento da temperatura não oferece garantia para um armazenamento em longo prazo nesta condição de conservação.

Outro aspecto importante da relação entre a temperatura e as constantes cinéticas é poder prever os valores da constante de desnaturação a outros valores de temperatura; e a sua incidência sobre a atividade das enzimas armazenadas naquela condição que queira ser estudada com estas formulações.

6. CONCLUSÕES

Uma vez desenvolvidos os experimentos e analisados os resultados obtidos na pesquisa pode se chegar às seguintes conclusões:

6.1 Fermentação

- ✓ Os resultados obtidos mostram que o conteúdo de umidade a 60% no meio de fermentação permite alcançar altos níveis na produção das enzimas. A produção média de fitases foi de 60 U/g, para xilanase foi de 60 U/g e de pectinase foi de 250 U/g em base seca.
- ✓ O sistema de fermentação estático apresentou os melhores resultados na produção das enzimas em relação ao sistema com agitação.
- ✓ A condição ótima na intensidade da aeração foi de 1 VkgM, sendo utilizada a maior parte do ar fornecido ao sistema para remover o calor metabólico gerado.
- ✓ O critério de escalonamento baseado na intensidade do ar (1 VkgM) pode ser considerado como um critério válido para o escalonamento deste tipo de fermentações.
- ✓ O consumo dos açúcares livres e da pectina supõe um menor gasto energético para o microorganismo, e são consumidos nas primeiras 48 horas de fermentação, entre a hora 48 e 72 é consumida a pectina, e produzida a maior quantidade de pectinase, sendo produzidas as maiores quantidades de fitase e xilanase nas horas posteriores ao consumo dos açúcares livres e a pectina.

6.2 Extração

- ✓ Dos solventes estudados a água foi o solvente que proporciona melhores rendimentos na extração. A concentração foi de 3,57 U/mL para a fitase, 2,3 U/mL para a xilanase 3 12 U/mL para a pectinase.
- ✓ A adição de EDTA aporta uma maior estabilidade às enzimas extraídas do meio sólido.
- ✓ As melhores condições de extração foram 300 rpm e pH 5,0.

- ✓ A pectinase foi a enzima de maior constante cinética na extração das enzimas do meio sólido com um valor de $0,102 \text{ min}^{-1}$.
- ✓ Na extração por etapas pode-se determinar a quantidade total de enzimas produzidas durante a fermentação.
- ✓ Na extração por etapas há uma queda linear da concentração do extrato, e nas duas primeiras etapas é possível recuperar 80-85% das enzimas produzidas.

6.3 Ultrafiltração.

- ✓ Quando foi utilizado o ultrafiltro com membrana de 100 kDa se observou que a maior parte das enzimas pectinase e xilanase ficaram no permeado, enquanto que a fitase ficou no retido.
- ✓ Ao utilizar o ultrafiltro com membrana de 10 kDa a atividade total das enzimas xilanase e pectinase melhoraram, servindo esta concentração por membranas para eliminar impurezas que inibem a atividade destas enzimas.
- ✓ No caso da fitase para membranas de 10 kDa no ultrafiltro foi observada uma diminuição na atividade desta enzima, sendo possível a perda de íons que favoreçam a atividade desta enzima.

6.4 Conservação das enzimas.

- ✓ A adição de glicerol confere às enzimas fitase e pectinase uma possível conformação espacial que incrementa positivamente a atividade destas enzimas. Os maiores incrementos de atividade destas enzimas foram de 42% para a fitase e 46% para pectinase.
- ✓ Para a xilanase o incremento na atividade foi muito baixo pelo que poderia se dizer que não tem ação sobre a conformação espacial desta enzima.
- ✓ A formulação com 35% de glicerol apresentou os melhores resultados no armazenamento das enzimas comparado com a formulação com 25% de glicerol.

- ✓ Ambas as formulações com glicerol apresentaram os melhores valores de conservação trabalhando com temperatura ambiente ou abaixo desta, mantendo no caso da formulação com 35% de glicerol atividades acima de 80% com respeito à atividade inicial.
- ✓ As constantes cinéticas de desnaturação apresentaram uma variação pequena no intervalo entre a temperatura de refrigeração e a temperatura ambiente, e os incrementos foram exponenciais para temperaturas acima de 30°C.

7. Recomendações

Uma vez feitas as conclusões do trabalho realizado, restam como recomendações para obter uma tecnologia capaz de ser aplicada comercialmente:

- ✓ Testar outros conservantes para a formulação de um produto final estável a temperaturas acima dos 30°C.
- ✓ Testar outras técnicas para obter um produto final seco que é mais estável no armazenamento a longo prazo.
- ✓ Escalonar o processo total com o objetivo de obter uma tecnologia reproduzível industrialmente.
- ✓ Realizar o estudo da viabilidade econômica do processo desenvolvido.
- ✓ Realizar testes do produto final obtido em animais monogástricos, principalmente em frangos e suínos.

8. REFERENCIAS

- ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M.; DIMIC, G. R. **Cultivation of *Polyporus squamosus* for pectinase production in aqueous two-phase system containing sugar beet extraction waste.** *Journal of Biotechnology* 91 83–87. (2001).
- BAMPIDIS, V. A.; ROBINSON, P. H. **Citrus by-products as ruminant feeds: A review.** *Animal Feed Science and Technology* 128: 175–217. (2006).
- BEDFORD, M. R.; SCHULZE, H. **Exogenous enzymes for pigs and poultry.** *Nutrition Research Reviews* 11 (1) 91-114. (1998).
- BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; KAPOOR, M.; HOONDAL, G. S. **Effect of amino acids on the production of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 211- 213. (2000).
- BELTER, P.; CUSSLER, E. L.; HU, W. S. **Bioseparations, downstream processing for biotechnology.** Wiley, NY. (1988).
- BHARGAV. S.; PANDA, B. P.; ALI M.S. JAVED. **Solid-state Fermentation: An Overview.** *Chem. Biochem. Eng. Q.* 22 (1) 49–70. (2008).
- Bird, R. B.; Stewart, W. E.; Lightfoot, E. N. **Transport Phenomena.** Ed. Wiley and Sons. New York. (1963).
- BOTELLA, C.; DIAZ, A.; DE ORY, I.; WEBB, C.; BLANDINO, A. **Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation.** *Process Biochem.* 42: 98–101. (2007).
- BRUGGER, R.; NUNES, C. S.; HUG, D.; VOGEL, K.; GUGGENBUHL, P.; MASCARELLO, F.; AUGEM, S.; WYSS, M.; VAN LOON, A. P. G. M.; PASAMONTES, L. **Characteristics of fungal phytases from *Aspergillus fumigatus* and *Sartorya fumigata*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 63:383–389. (2004).
- CAO, Y.; MENG, D.; LU, J.; LONG, J. **Statistical optimization of xylanase production by *Aspergillus niger* AN-13 under submerged fermentation using response surface methodology.** *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (5). 631-638. (2008).
- CARRÉ, B. **Causes for variation in digestibility of starch among feedstuffs.** *World's Poultry Science Journal* Vol. 60, March 2004. (2004).
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. **Production and extraction of pectinases obtained buy solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*.** *Bioresource Technol.* 71: 45-50. (2000).
- CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. **Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*.** *Process Biochem.*, 34, 181–186. (1999).

CARVALHO, J. C.; PANDEY, A.; OISHI, B.; BRAND, D.; RODRIGUEZ-LEÓN, J. A.; SOCCOL, C. R. **Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation.** *Biochemical Engineering Journal* 29 262–269. (2006).

CARY, J. W.; EHRLICH, K. C. **Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications** *Mycopathologia* 162: 167–177. (2006).

CASTRO TAVERNARI, F.; CARVALHO, T. A.; DE ASSIS, A. P.; LIMA, H. D. J. **Polissacarídeo não amiláceo solúvel na dieta de suínos e aves.** *Revista Eletrônica Nutritime*, Artigo 68, Vol 5 (5) 673-689. (2008).

CASTRO NETO, A. G. **Polpa Cítrica na Alimentação de Bovinos Leiteiros.** *Artigo Técnico ReHAgro*, 2004.

CHAUHAN, S. K.; TYAGI, S. M.; SINGH, D. **Pectinolytic liquefaction of apricot, plums and mango pulps for juice extraction.** *Int. J. Food Properties*. 4 (1) 103-109. (2001).

COSTA, J. A. V.; COLLA, E.; MAGAGNIN, G.; DOS SANTOS, L. O.; VENDRUSCOLO, M.; BERTOLIN, T. E. **Simultaneous Amyloglucosidase and Exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation.** *Brazilian Archives Biol Technol.* 50 (5) 759-766. (2007).

COULSON, J. M.; RICHARDSON, J. F. **Ingeniería Química. Tomo II, Capítulo 10. Lixiviación.** Ed: Editorial Reverté S. A. España. (1981).

COUTO, S. R.; SAN ROMÁN, M. A. **Application of solid-state fermentation to food industry—A review.** *Journal of Food Engineering* 76 291–302. (2006).

COWIESON, A. J.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M. **Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition.** *Nutrition Research Reviews* 19 (1) 90-103. (2006).

CÚNEO, F.; AMAYA-FARFAN, J.; CARRAZO, F. **Distribuição dos fitatos em farelos de arroz estabilizado e tratado com fitase exógena.** *Ciê. Tecnol Alim vol. 12 n. 1. Technol. Aliment.* vol.20 n.1 Campinas. (2000).

DEKKER, R.F.; RICHARDS, G. N. **Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action.** *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32: 277-352, 1976.

DING, C. H.; JIANG, Z. Q.; LI, X. T.; LI, L. T.; KUSAKABE, I. **High activity xylanase production by *Streptomyces olivaceoviridis* E-86.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 7–10. (2004).

DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid Substrate Cultivation.** En: *Elsevier Science Publishers LTD.* Ed: Crown House, Linton Road, Barking, Essex, England: 466 (1992).

DOMENECH LÓPEZ, F. **Obtención de un biopreparado a partir de *Metarhizium anisopliae* por fermentación en estado sólido para su empleo como control biológico de insectos en la agricultura.** Tesis de Doctorado. Ciudad de la Habana, Cuba, 2000.

DOURMAD, J. Y.; JONDREVILLE, C. **Impact of nutrition on nitrogen, phosphorus, Cu and Zn in pig manure, and on emissions of ammonia and odours.** *Livestock Science* 112: 192–198. (2007).

DURAND, A.; DE LA BROISE, D. AND BLACHERE, H. **Laboratory scale bioreactor for solid state processes.** *J. Biotechnol.* 8: 59-66. (1988).

DVORAKOVÁ, J. **Phytase: Sources, preparation and exploitation.** *Folia Microbiol.* 43 (4) 323-328. (1998).

EBUNE, A.; AL-ASHEH, S.; DUVNJAK, Z. **Effects of phosphate, surfactants and glucose on phytase production and hydrolysis of phytic acid in canola meal by *Aspergillus ficuum* during solid-state fermentation.** *Bioresour Technol* 54, 241–247. (1995).

ECHEVARRÍA, J.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; BECHSTEDT, W.; SIERRA, N.; RODRÍGUEZ, F. J.; DELGADO, G.; DANIEL, A.; MARTÍNEZ, O. **Efecto del tamaño de la partícula, la aireación y la temperatura en la fermentación en estado sólido de cáscara cítrica.** *Interferón y Biotecnología* 4 (2) 157-163. (1987).

ECHEVARRÍA, J.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; BECHSTEDT, W.; SIERRA, N.; RODRÍGUEZ, F. J.; DELGADO, G. **Influencia del contenido de humedad en una fermentación en estado sólido en sistemas estáticos y en movimiento.** *Memorias XI Conf. Química de la Universidad de Oriente y II Congreso de la Soc. Cubana de Química.* Libro I. pp. 188-191. Universidad de Oriente, Cuba. (1985).

EL-BATAL, A.I.; KAREM, H. A. **Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation.** *Food Res Intern* 34, 715–720. (2001).

EL KHOURY, A.; RIZK, T.; LTEIF, R.; AZOURI, H.; DELIA, M.; LEBRIHI, A. **Occurrence of Ochratoxin A- and Aflatoxin B1-Producing Fungi in Lebanese Grapes and Ochratoxin A Content in Musts and Finished Wines during 2004.** *J. Agric Food Chem* 54 (23), pp 8977–8982. (2006).

FADEL, M. **High-level xylanase production from sorghum flour by a newly isolate of *Trichoderma harzianum* cultivated under solid state fermentation.** *Annals of Microbiology* 51, 61-78. (2001).

FÁGÁIN, C. O. **Understanding and increasing protein stability.** *Biochimica and Biophysica Acta* 1252: 1-14. (1995).

FANG, H. Y.; CHANGA, S. M.; HSIEH, M. C.; FANG, T. J. **Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 49 36–42. (2007).

FAVELA-TORRES, E.; VOLKE-SEPÚLVEDA, T.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. **Production of hydrolytic depolymerising pectinases.** *Food Technol Biotechnol* 44 (2):221–227. (2006).

FEGEROS, K.; ZERVAS, G.; STAMOULI, S.; APOSTOLAKI, E. **Nutritive Value of Dried Citrus Pulp and Its Effect on Milk Yield and Milk Composition of Lactating Ewes.** *Journal of Dairy Science* Vol. 78 No. 5 1116-1121. (1995).

FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. **Pectic Enzymes.** Capítulo 3, pp. 131-182. En: *Microbial Enzymes and Biotechnology.* Ed. W. M. Fogarty. Applied Science Publishers Ltd. Essex. Gran Bretaña. (1983).

GARCIA, D.; ORTÉGA, F.; MARTY, J. **Kinetics of thermal inactivation of horseradish peroxidase: stabilizing effect of methoxypoly(ethylene glycol).** *Biotechnology and Applied Biochemistry* 27 (1): 49–54. (1998).

GARGOVA, S.; SARIYSKA, M. **Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase.** *Enzyme and Microbial Technology* 32 231–235. (2003).

GIOVANNOZZI, S. G.; D'ANNIBALE, A.; CRESTINI, C. **Solid estate fermentation of wheat straw for paper production.** In Roussos, S.; Lonsane B. K.; Raimbault M. and Viniegra-González, G. Eds. *Advances in Solid State Fermentetion* Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 8: 539 – 542. (1997).

GOMES DA SILVA, L.; TRUGO, L. C.; TERZI, S. C.; COURI, S. **Low phytate lupin flour based biomass obtained by fermentation with a mutant of *Aspergillus niger*.** *Process Biochemistry* 40 951–954. (2005).

GREINER, R.; FAROUK, A. E. **Purification and characterization of a bacterial phytase whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement.** *The Protein Journal* 26 (7) 467-474. (2007).

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V.C.; ZANOELO, F.F.; AQUINO, M. M.; JUNIOR, A. B. E.; POLIZELI, M. L. **Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest.** *Brazilian Journal of Microbiology* 37:474-480. (2006).

HAEFNER, S.; KNIETSCH A.; SCHOLTEN, E.; BRAUN, J.; LOHSCHIEDT, M.; ZELDER, O. **Biotechnological production and applications of phytases.** *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 588–597. (2005).

HARTER-DENIS, J. **Biotechnology in the feed industry.** *Proc. Alltech's 15th Annual Symposium.* Ed. T.P. Lyons y K.A. Jacques. Nottingham University Press. pp: 511-522. (1999)

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. **Extraction optimization of xylanases obtained by solid-state cultivation of *Bacillus circulans* BL53.** *Process Biochem.* 40 (8): 2891-1895. (2005).

HESELTIME C. W. (1972). “**Solid State Fermentations**”. *Biotechnol. and Bioeng.* 14: 517 – 532.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. **Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi.** *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 175–186. (2004).

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. **Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review.** *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 409–418. (2002).

IYER, P.A.; ANANTHANARAYAN, L. **Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment.** *Process Biochemistry* 43: 1019-1032, (2008).

JONGBLOED, A. W.; VAN DER KLIS, J. D.; KEMME, P. A.; VERSTEEGH, H. A. J.; MROZ, Z. *Proc. 47th European Association for Animal Production (EAAP)*, Lillehammer, Austria. pp: 1-17. (1996).

KANG, S. W.; PARK, Y .S.; LEE, J. S.; HONG, S. I.; KIM, S. W. **Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass.** *Bioresource Technology* 91 153–156. (2004).

KIM, J.C.; SANDS, J. S.; MULLAN, B. P.; PLUSKE, J. R. **Performance and total-tract digestibility responses to exogenous xylanase and phytase in diets for growing pigs.** *Animal Feed Science and Technology* 142 163–172. (2008).

KOCHER, A.; CHOCT, M.; PORTER, M. D.; BROZ, J. **Effects of feed enzymes on nutritive value on soyabean meal fed to broilers.** *British Poultry Science* 43; 54-63 (2002).

LEEuw, J. A.; BOLHUIS, J. E.; BOSCH, G.; GERRITS, W. J. J. **Effects of dietary fibre on behaviour and satiety in pigs.** *Proceedings of the Nutrition Society* 67, 334–342. (2008).

LEI, X. G.; PORRES, M. Review: **Phytase enzymology, applications, and biotechnology.** *Biotechnology Letters* 25: 1787–1794. (2003).

LEmos, J. L. S.; PEREIRA, N. **Influence of some sugars on xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation.** *Braz Arch Biol Technol* 45 (4) 431-437. (2002).

LI, Y.; LIU, Z.; ZHAO, H.; XUC, Y.; CUI, F. **Statistical optimization of xylanase production from new isolated *Penicillium oxalicum* ZH-30 in submerged fermentation.** *Biochemical Engineering Journal* 34 82–86. (2007).

LOERA, Q.; AGUIRRE, J.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. **Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus niger* overproducing mutants.** *Enz. Microbiol. Technol.* 25: 103-108. (1999).

LOPES, D. H. J.; SOLA-PENNA, M. **Urea Increases Tolerance of Yeast Inorganic Pyrophosphatase Activity to Ethanol: The Other Side of Urea Interaction with Proteins.** *Arch. Biochem. Biophys.* 394, 61-66. (2001)

LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GHILDYAL, N. P.; KRISHNAIAIH, M. M. **Review: Scale-up strategies for solid state fermentation systems.** *Process Biochemistry* 27: 259-273. (1992).

LOWRY, O. H.; FARR, A. L.; ROSEBROUG, N. J.; RANDALL, R. J. **Protein measurement with folin-phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193: 265-271 (1951).

MACIEL, G. M.; DE SOUZA-VANDENBERGHE, L. P.; HAMINIUK, CH. W. I.; FENDRICH, R. C.; DELLA-BIANCA, B. E.; DA-SILVA-BRANDALIZE, T. Q.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. **Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs.** *Food Technology and Biotechnology* 46 (2): 183-189. (2008).

MACIEL, G. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja.** *Dissertação de Mestrado.* Divisão de Bioengenharia e Biotecnologia, UFPR, (2006).

MAMMA, D.; KOURTOGLOU, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. **Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry.** *Bioresource Technology* 99: 2373–2383. (2008).

MARTIN, J. A.; MURPHY, R. A.; POWER, R. F. G. **Cloning and expression of fungal phytases in genetically modified strains of *Aspergillus awamori*.** *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 568–576. (2003).

MILLER, G. L. **Use of dinitrisosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars.** *Analyt.*, 31: 426-428. (1959).

MINKEVICH, I. G.; EROSHIN, V. K. **Production and heat generation of a fermentation under oxygen limitation.** *Folia Microbiológica.* 18: 376-385. (1973).

MOEHN, S.; ATAKORA, J. K. A.; SANDS, J.; BALL, R. O. **Effect of phytase-xylanase supplementation to wheat-based diets on energy metabolism in growing–finishing pigs fed ad libitum.** *Livestock Science* 109 271–274. (2007).

MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology.** Vol. 2. Editor-in-chief: M. Moo-Young. Wiley Interscience, N. Y. (1985).

Mudgett, R. E. (1986). **Solid State Fermentation.** *En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Ed: Demain .M^o Graw Hill, NewYork, Londres, Paris.7: 66-83.

MULLANEY, E. J.; ULLAH, A. H. J. **The term phytase comprises several different classes of enzymes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 312 (2003) 179–184. (2003).

NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; ATTHASAMPUNNA, P.; TAGUCHI, H. **Control of water content in a solid state cultura of *Aspergillus oryzae*.** *J. Ferment. Technol* 62 (5) 453-459. (1984).

NASCIMENTO, R. P.; MARQUES, S.; ALVES, L.; GIRIO, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; SAGRAMENTO, D. R.; DA SILVA BOM, E. P.; COELHO, R. R. R. **A novel strain of *Streptomyces malaysiensis* isolated from Brazilian soil produces high endo-*b*-1,4-xylanase titres.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 879–881, 2003. 879. (2003).

OH, B.C.; CHOI, W. C.; PARK, S.; KIM, Y.O.; OH, T. K. **Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases.** *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 362–372. (2004).

ORIOLE, E.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA, G. **Water activity in the Solid State Fermentation of Cassava Starch by *Aspergillus niger*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 498 – 503. (1988).

ORTIZ-COSTA, S.; SORENSON, M. M.; SOLA-PENNA; M. **Counteracting effects of urea and methylamines in function and structure of skeletal muscle myosin.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 408(2): 272-278 (2002).

PANDEY A.; G., SOCCOL, C. R.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; NIGAM, P. **Solid State Fermentation in Biotechnology. Fundamentals and Applications.** 221 pp. *Ed. Asiatech Publishers Inc., New Delhi.* (2001a).

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; SOCCOL, V. T. **Production, purification and properties of microbial phytases.** *Bioresource Technology* 77 pp. 203-214. (2001b).

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes.** *Current Science* 77 (1) 149-162. (1999).

QUINTERO, R. **Ingeniería Bioquímica. Teoría y aplicaciones.** Ed. Alhambra Universidad Mexicana. México DF. (1993).

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; ENDO, A. S. **Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse.** *Brazilian J. Microbiol.* 33: 67-72. (2002).

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E. **Estudio de la lixiviación de la enzima polimetilgalacturonasa obtenida en un proceso de fermentación en estado sólido.** *Tesis de Maestría.* Instituto Superior Politécnico José Antonio Echevarría. La Habana. Cuba. (2004).

RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; LEON, M.; DELGADO, G.; BUENO, G.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; AGUILAR, L. **Influencia del inóculo en producción de enzimas por fermentación sólida.** *Memorias de Diversificación 2002, ICIDCA, v. 2,* p. 231-233, 2002.

RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E. **Factors affecting solid state fermentation.** Em: *Current Developments in Solid State Fermentation, Ch. 3.* Pandey, Soccol, Larroche Eds. Asiatech Publishers, Inc., New Dehli. (2007a).

RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A., SOCCOL C. R., PANDEY A., RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ D. E. **Kinetics of solid state fermentation.** Em: *Current Developments in Solid State Fermentation. Ch. 4.* Pandey, Soccol, Larroche Eds. Asiatech Publishers, Inc., New Dehli. (2007b).

RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; TORRES A.; ECHEVARRÍA, J.; SAURA, G. **Energy balance in solid state fermentation processes.** *Acta Biotechnologica* 11 (1): 9-14. (1991).

RUEGGER, M. J. S. **Atividade enzimática e produção de ácido α -Linolênico por fungos filamentosos isolados do solo, da estação ecológica de Juréia Itatins, SP.** *Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, SP.* (2001).

SATO, K.; YOSHIZAWA, K. **Growth and growth estimation of *Saccharomyces cerevisiae* in solid state ethanol fermentation.** *J. Ferment. Technol.* 66: 667 –673. (1988).

SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRENK, A.; VAINSTEIN, M. H. **Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.** *Process Biochemistry* 40: 321-326. (2005).

SKELLAND, A. H. P. **Non Newtonian flow and heat transfer.** Ed. Revolución, La Habana, Cuba. (1970).

SCHMID, R.D. **Stabilied Soluble Enzymes.** *Adv. Biochem. Eng.* 12: 41-118. (1979).

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. **On the safety of *Aspergillus niger* – a review.** *Appl Microbiol Biotechnol* 59:426–435. (2002).

SCHWEITZER, PH. A. **Hanbook of separations techniques for chemical engineers, 3rd Edition.** Mac-Graw Hill, NY. (1997).

SHARMA, D.C.; SATYANARAYANA, T. **A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods.** *Bioresource Technology* 97 727–733. (2006).

SINGH, S.; RAMAKRISHNA, A. M.; RAO, A. G. A. **Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*.** *Process Biochem* 35: 411.417. (1999).

SOLA-PENNA, M.; MEYER-FERNANDES, J. R. **Stabilization against Thermal Inactivation Promoted by Sugars on Enzyme Structure and Function: Why Is Trehalose More Effective Than Other Sugars?** *Arch. Biochem. Biophys.* 360, 10–14. (1998).

SONI, S. K.; KHIRE J. M. **Production and partial characterization of two types of phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerge fermentation conditions.** *World J Microbiol Biotechnol* 23:1585–1593. (2007).

SPIER, M. R. **Development of a bioprocess to produce a new *Aspergillus niger* FS3 phytase: Studies of its purification and characterization.** *Tese de Doutorado.* Divisão de Bioengenharia e Biotecnologia, UFPR, 2008.

SUNG, H. G.; SHIN, H. T.; HA J .K.; LAI, H. L.; CHENG, K. J.; LEE, J. H. **Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley.** *Bioresource Technology* 96 1297–1303. (2005).

TAPINGKAE, W.; YACHAI, M.; VISESSANGUAN, W.; PONGTANYA, P.; PONGPIACHAN, P. **Influence of crude xylanase from *Aspergillus niger* FAS128 on the *in vitro* digestibility and production performance of piglets.** *Animal Feed Science and Technology* 140 125–138. (2008).

The Maryland Water Quality Improvement Act of 1998. Farm Business Management Update, October 1998.

TREYBAL, R. E. **Mass Transfer Operations.** *Ed. Revolucionaria.* Instituto del Libro. La Habana. Cuba. (1989).

VAN SOEST, P. J; ROBERTSON, J. B; LEWIS B. A. **Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition.** *J Dairy Sci* 74, 3583–3597. (1991)

VATS, P.; BANERJEE, U. C. **Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview.** *Enzyme and Microbial Technology* 35 3–14. (2004).

VATS, P.; SAHOO, D. K.; BANERJEE, U. C. **Production of Phytase (*myo*-Inositolhexakisphosphate Phosphohydrolase) by *Aspergillus niger* van Teighem in Laboratory-Scale Fermenter.** *Biotechnol. Prog.* 20, 737-743. (2004).

VIEIRA, W. B.; MOREIRA, L. R. S.; NETO, A. M.; FILHO, E. X. F. **Production and characterization of an enzyme complex from a new strain of *Clostridium thermocellum* with emphasis on its xylanase activity.** *Brazilian Journal of Microbiology* 38:237-242. (2007).

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. **Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, limitations and monitoring.** In Roussos, S.; Lonsane B. K.; Raimbault M. and Viniegra-González, G. Eds. *Advances in Solid State Fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 2: 5 – 22. (1997).

VRIES, R. P. **Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production.** *Appl Microbiol Biotechnol* 61:10–20. (2003).

WANG, X.; BAI, J.; LIANG, Y. **Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid-state fermentation.** *Appl Microbiol Biotechnol* 73:533–540. (2006).

Wiseman, A. (1975). **Industrial Practice with Enzymes.** Parte II. Capítulo 6, pp. 256. En: *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ed. Alan Wiseman. Ed. Ellis Horwood Limited. Sussex. Gran Bretaña.

XIONG, H.; TURUNEN, O.; PASTINEN, O.; LEISOLA, M.; VON WEYMARN, N. **Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* grown on L-arabinose and lactose or D-glucose mixtures.** *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 353–358. (2004).

YIN, Q. Q.; ZHENG, Q. H.; KANG, X.T. **Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism.** *Animal Feed Science and Technology* 132 (2007) 341–350. (2007).

ZOROV, I. N.; SINITSYN A. P.; KONDRATEVA E. G. **Effectiveness of Enzyme Preparations of Fodder in the Degradation of Nonstarch Polysaccharides from Grain Substrates.** *Applied Biochemistry and Microbiology* Vol. 42, No. 6, pp. 620–624. (2006).

9. Anexos

Anexo1. Análise Estatística para o Planejamento Fatorial 2²

ANOVA; Var.:PHYTASES; R-sqr=,06017; Adj:0, (new.sta)

2**(2-0) design; MS Pure Error=,0016491

DV: PHYTASES

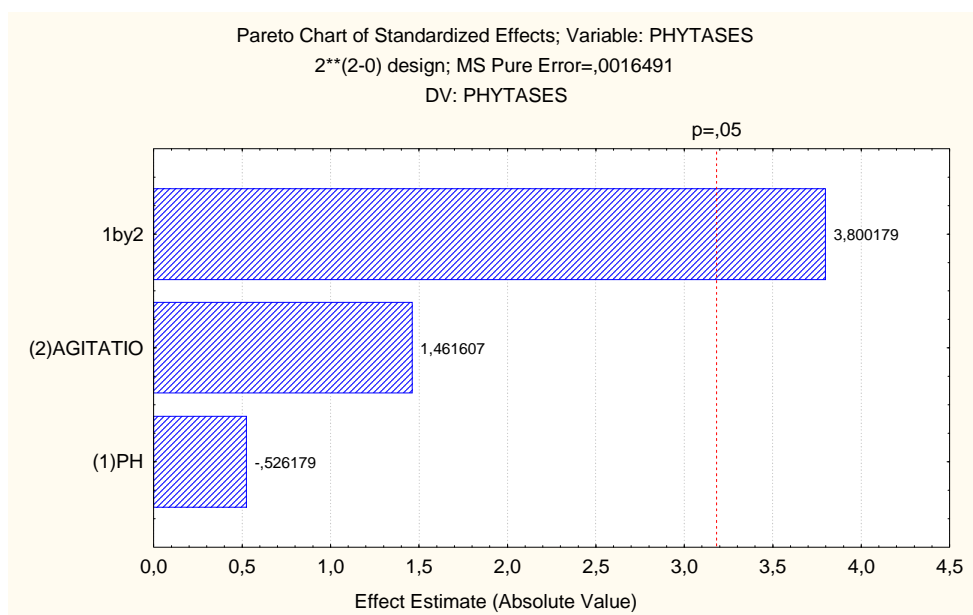
	SS	df	MS	F	p
(1)PH	0,000457	1	0,000457	0,2769	0,635184
(2)AGITATIO	0,003523	1	0,003523	2,1363	0,240004
1 by 2	0,023815	1	0,023815	14,4414	0,032001
Lack of Fit	0,429219	1	0,429219	260,2778	0,000518
Pure Error	0,004947	3	0,001649		
Total SS	0,461961	7			

Regr. Coefficients; Var.:PHYTASES; R-sqr=,06017; Adj:0,

2**(2-0) design; MS Pure Error=,0016491

DV: PHYTASES

	Regressn				-95,%	+95,%
	Coeff.	Std.Err	t(3)	p	Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	3,468809	,014357	241,6042	,0000	3,423118	3,514501
(1)PH	-,010684	,020304	-,5262	,635184	-,075302	,053934
(2)AGIT	,029677	,020304	1,4616	,240004	-,034941	,094295
1 by 2	,077160	,020304	3,8002	,032001	,012543	,141778



Anexo 2. Análise Estatística para o Desenho Composto Central

ANOVA; Var.:PHYTASES; R-sqr=,97724; Adj:,.95827 (new.sta)

2 factors, 1 Blocks, 12 Runs; MS Pure Error=,0016491

DV: PHYTASES

	SS	df	MS	F	p
PH (L)	,06274	1	,006274	,8045	,146201
PH (Q)	,486422	1	,486422	294,9656	,000430
AGITATIO(L)	,000000	1	,000000	,0001	,992250
AGITATIO(Q)	,250718	1	,250718	152,0353	,001149
1L by 2L	023815	1	,023815	14,4414	,032001
Lack of Fit	010251	3	,003417	2,0721	,282428
Pure Error	004947	3	,001649		
Total SS	,667702	11			

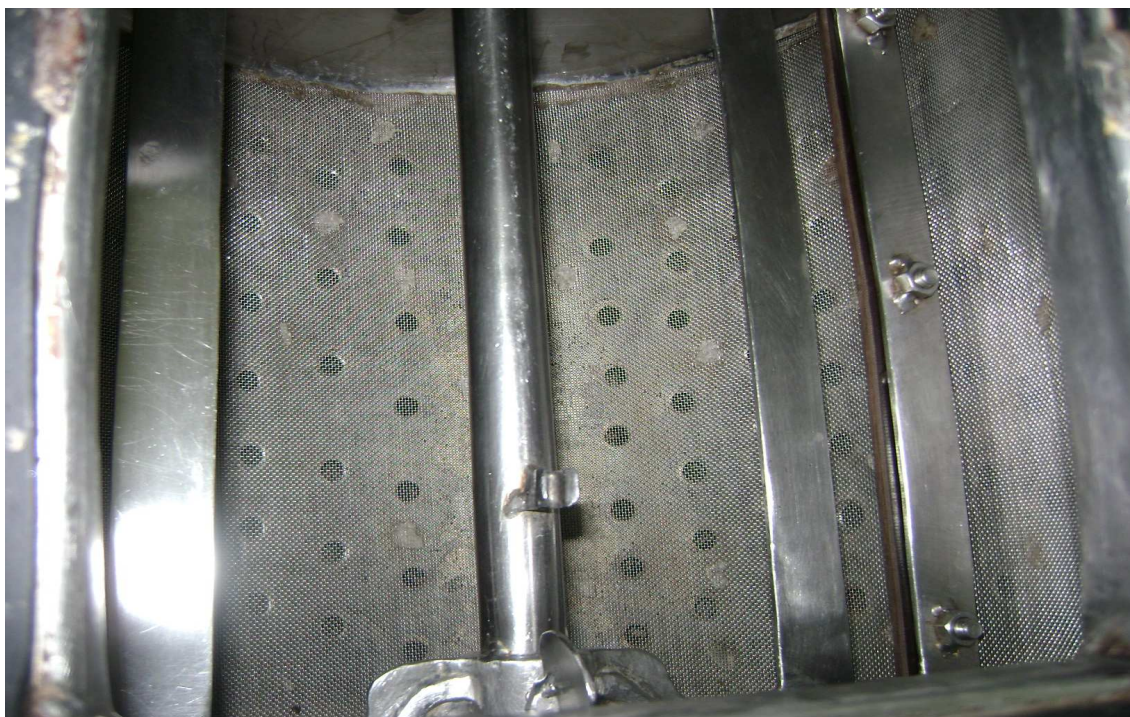
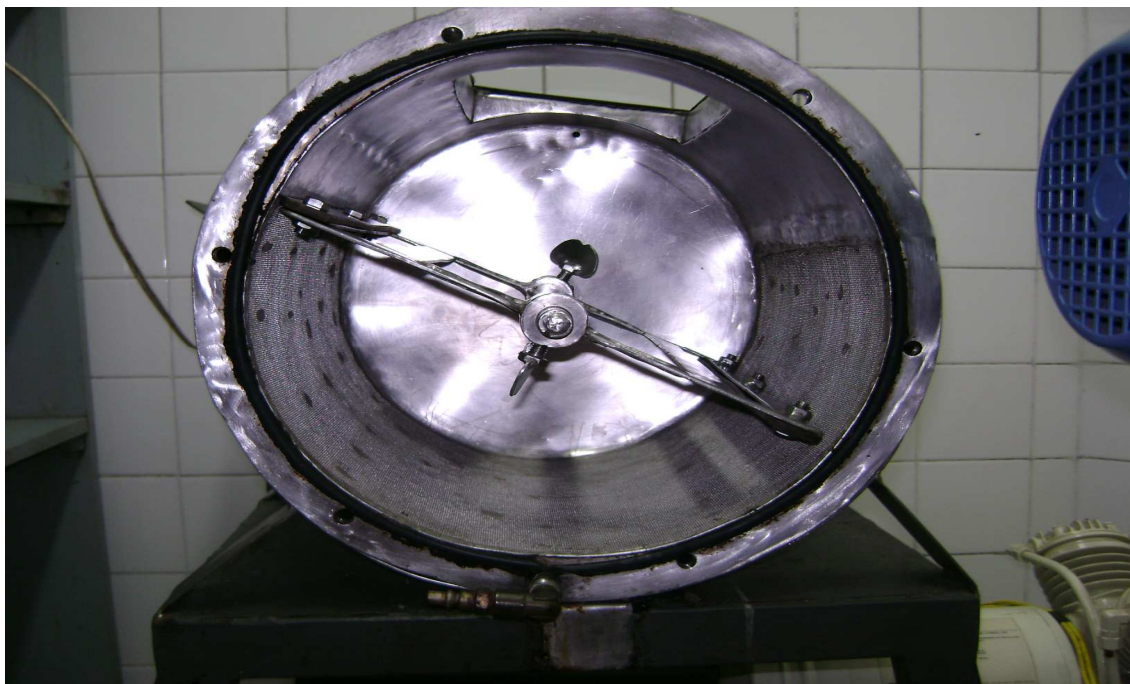
Regr. Coefficients; Var.:PHYTASES; R-sqr=,97724; Adj:,.95827

2 factors, 1 Blocks, 12 Runs; MS Pure Error=,0016491

DV: PHYTASES

	Regressn			p	-95,%	+95,%
	Coeff.	Std.Err	t(3)		Cnf.Limt	Cnf.Limt
Mean/Interc.	3,700436	0,020304	182,2477 ,	000000	3,635818	3,765054
(1)PH (L)	-0,028006	0,014358	-1,9505 ,	,146201	-0,073701	,0017689
PH (Q)	-0,275746	0,016055	-17,1746	0,000430	-0,32684	-0,224650
AGIT (L)	0,000151	0,014358	0,0105	0,992250	-0,045540	0,045846
AGIT (Q)	-0,197968	0,016055	-12,3303	0,001149	-0,249064	-0,146872
1L by 2L	0,077160	0,020304	3,8002	0,032001	0,012543	0,141778

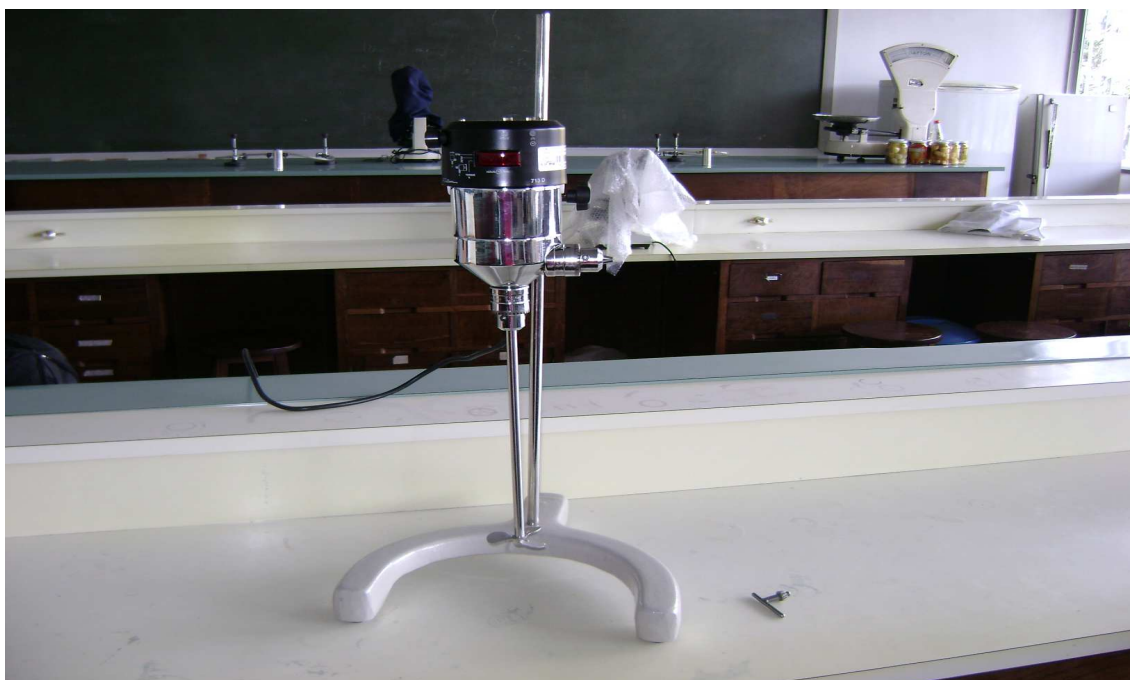
Anexo 3. Vista interior do fermentador de 5 kg.



Anexo 4. Vista da sala de fermentação em estado sólido.



Anexo 5. Agitador empregado para estudar a extração das enzimas.



Anexo 6. Frascos com as soluções para o estudo de conservação das enzimas.