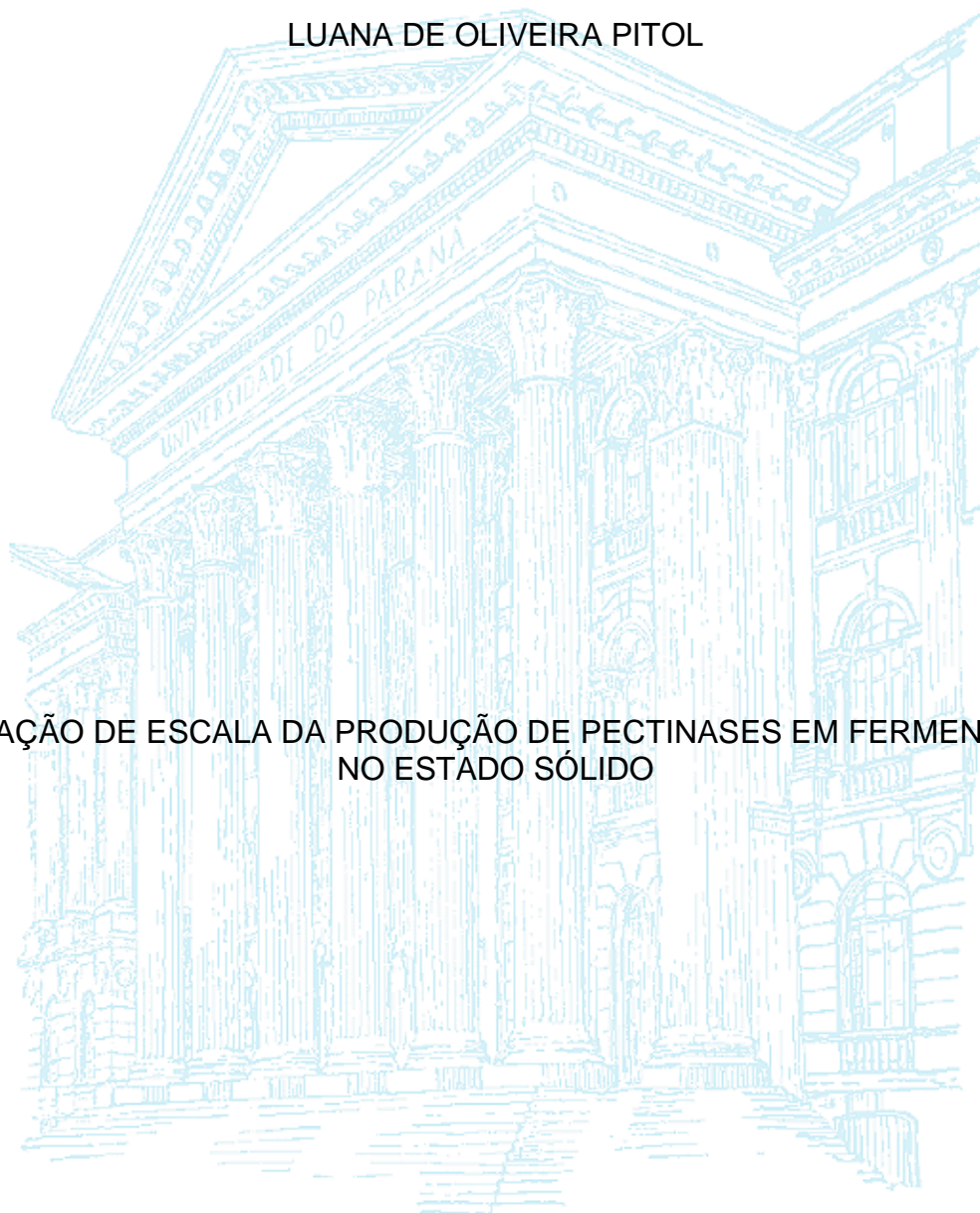


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA DE OLIVEIRA PITOL



AMPLIAÇÃO DE ESCALA DA PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FERMENTAÇÃO  
NO ESTADO SÓLIDO

CURITIBA  
2014

LUANA DE OLIVEIRA PITOL

AMPLIAÇÃO DE ESCALA DA PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FERMENTAÇÃO  
NO ESTADO SÓLIDO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell

CURITIBA  
2014



## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro de 2014, no Auditório Superior do Prédio de Engenharia Química no Centro Politécnico – UFPR foi instalada pelo Dr. David Alexander Mitchell, professor do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, a Banca Examinadora para a quinquagésima nona defesa de dissertação de mestrado na área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos. Estiveram presentes no ato, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo à determinação do colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, foi constituída pelos professores doutores: David Alexander Mitchell (PPGEQ/UFPR), Fernando Augusto Pedersen Voll (PPGEQ/UFPR) e Gisella Maria Zanin (DEQ/UEM). Às 09h30min, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Luana de Oliveira Pitol** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “*Ampliação de escala de produção de pectinase em fermentação no estado sólido*”. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes. Tendo em vista a dissertação e a arguição, a banca decidiu pela aprovação da candidata, (de acordo com a determinação dos artigos 68º e 69º da Resolução 65/09 – CEPE/UFPR de 30.10.2009).

Curitiba, 26 de fevereiro de 2014.

Prof. Dr. David Alexander Mitchell  
(PPGEQ/UFPR) – Orientador

Prof. Dr. Fernando Augusto Pedersen Voll  
(PPGEQ/UFPR) – Membro Titular Interno

Profª. Dra. Gisella Maria Zanin  
(DEQ/UEM) – Membro Externo

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, Benigna e Antonio, por todo o amor e pelo apoio em todas as minhas decisões.

Ao meu marido Leonardo, pelo companheirismo, pela paciência e pela motivação.

Ao meu orientador David Mitchell, pela orientação, pelo conhecimento transmitido e pela oportunidade.

À professora Nadia Krieger, pela ajuda e pelos conselhos.

À Alessandra Biz, pelo conhecimento transmitido e por toda a ajuda nos experimentos.

Ao Edgar, ao Wellington e especialmente à Maura pela companhia nas noites mal dormidas no biorreator piloto.

Aos alunos de iniciação científica Diogo, Eduardo e Martina.

A todos os colegas do LTEB e do LTEF.

Aos professores do PPGEQ, pelo conhecimento transmitido e à Cintya, pela ajuda nas questões burocráticas.

Aos membros da banca, professor Fernando Augusto Pedersen Voll e professora Gisella Maria Zanin.

À UFPR.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.



## RESUMO

As pectinases têm o potencial de serem utilizadas em biorefinarias de polpa cítrica para hidrolisar a pectina a ácido D-galacturônico, um precursor de vários intermediários químicos úteis. Contudo, as pectinases comerciais são caras. A produção de pectinases em fermentação em estado sólido (FES) é uma estratégia para minimizar os custos, no entanto, os estudos disponíveis na literatura estão limitados a escala de laboratório. O objetivo do presente trabalho foi realizar a ampliação de escala da produção de pectinases em FES, da escala laboratorial até a escala piloto. O trabalho foi realizado em três etapas: (1) otimização das condições de cultivo em frascos Erlenmeyer, (2) cultivos em biorreator de colunas e (3) cultivos em biorreator piloto. Foram utilizadas duas combinações de substrato e cepas, farelo de trigo e bagaço de cana para *Aspergillus niger* e bagaço de laranja e bagaço de cana para *Aspergillus oryzae*. Com a otimização das condições de cultivo, foi possível obter atividades pectinolíticas de 30 U g-sólido-seco<sup>-1</sup> para *A. oryzae* e 31 U g-sólido-seco<sup>-1</sup>, para *A. niger*. Estas atividades são 100% e 24% maiores do que as atividades obtidas nas condições de cultivo que eram usadas para as respectivas cepas antes do estudo de otimização. Os cultivos em biorreatores foram realizados em um biorreator de colunas contendo 12 g de substrato seco e em um biorreator de leito fixo em escala piloto contendo 20-30 kg de substrato seco. Ambos receberam aeração com ar saturado a 30°C e em ambos foram monitorados o consumo de O<sub>2</sub> e a produção de pectinases. No biorreator de colunas, para *A. oryzae*, foi obtida uma atividade pectinolítica de 45 U g-sólido-seco<sup>-1</sup>, em 24 h, que corresponde a uma produtividade de 1,87 U g-sólido-seco<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. Para *A. niger* foi obtida uma atividade pectinolítica de 33 U g-sólido-seco<sup>-1</sup>, em 24 h, mas a produtividade máxima, de 1,95 U g-sólido-seco<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, ocorreu em 16 h. O valor máximo de consumo de O<sub>2</sub> para *A. oryzae* foi de 145 μmol h<sup>-1</sup> g-sólido-seco<sup>-1</sup>, em 26 h, e para *A. niger* foi de 540 μmol h<sup>-1</sup> g-sólido-seco<sup>-1</sup>, em 16 h. Estes valores correspondem a velocidades de produção de calor metabólico de 21×10<sup>-3</sup> e 78×10<sup>-3</sup> W g-sólido-seco<sup>-1</sup>, respectivamente. Os cultivos no biorreator piloto foram realizados com *A. niger*. A produção de pectinases foi semelhante àquele obtida no biorreator de colunas. Em um cultivo realizado com farelo de trigo, com um leito de 23 cm de altura, os valores máximos obtidos foram 29 U g-sólido-seco<sup>-1</sup>, em 24 h, para a atividade pectinolítica e 1,18 U g-sólido-seco<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, em 16 h, para a produtividade. O valor máximo para o consumo de O<sub>2</sub>, ocorreu em 16 h e foi de 607 μmol h<sup>-1</sup> g-sólido-seco<sup>-1</sup>, e corresponde a uma produção de calor metabólico de 87×10<sup>-3</sup> W g-sólido-seco<sup>-1</sup>. No entanto, neste cultivo o leito compactou. Um cultivo realizado com farelo de trigo e bagaço de cana (90%:10%, por massa), com um leito de 40 cm de altura, propiciou valores máximos de 25 U g-sólido-seco<sup>-1</sup>, em 14 h, para a atividade pectinolítica e 1,81 U g-sólido-seco<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, também em 14 h, para a produtividade. Nas primeiras 14 h não houve compactação do leito e a temperatura máxima atingida no leito foi de 35°C. Desta maneira, a estratégia proposta neste trabalho para a ampliação da escala do processo de produção de pectinases por fermentação no estado sólido foi de manter a altura do leito em 40 cm e aumentar a largura do leito para vários metros.

Palavras-chave: Pectinases. Fermentação no estado sólido. Biorreator de leito fixo. Aumento de escala.

## ABSTRACT

Pectinases have the potential to be used in citrus waste biorefineries to hydrolyze pectin to D-galacturonic acid, a precursor of several useful chemical intermediates. However, pectinases are expensive. One strategy for minimizing costs is to produce the pectinases by solid-state fermentation (SSF), however, studies have been limited to laboratory scale. The aim of the present work was to scale-up an SSF process for pectinase production from laboratory scale to pilot scale. The work was carried out in three steps: (1) optimization of culture conditions in flasks, (2) cultivation in a column bioreactor and (3) cultivation in a pilot-scale bioreactor. Two combinations of substrate and strains were used, wheat bran and sugar cane bagasse for *Aspergillus niger* and orange bagasse and sugar cane bagasse for *Aspergillus oryzae*. With the optimization of culture conditions, it was possible to obtain pectinolytic activities of 30 U g-dry-solid<sup>-1</sup> for *A. oryzae* and 31 U g-dry-solid<sup>-1</sup> for *A. niger*. These values are 100% and 24% greater than the activities obtained using the culture conditions that were routinely used before the optimization. The fermentations in bioreactors were done in a column bioreactor containing 12 g dry substrate and a pilot-scale packed-bed bioreactor containing 20-30 kg of dry substrate. Both were aerated with air saturated at 30°C. Both pectinase production and O<sub>2</sub> consumption were monitored. In the column bioreactor, for *A. oryzae* the peak pectinolytic activity was 45 U g-dry-solid<sup>-1</sup>, in 24 h, which corresponds to a productivity of 1.87 U g-dry-solid<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. For *A. niger*, the peak pectinolytic activity was 33 U g-dry-solid<sup>-1</sup>, in 24 h, but the maximum productivity, of 1.95 U g-dry-solid<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, occurred at 16 h. The maximum O<sub>2</sub> uptake rates occurred at 26 h for *A. oryzae* and were 145 μmol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> and occurred at 16 h for *A. niger* and were 540 μmol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>. These values correspond to rates of metabolic heat production of 21×10<sup>-3</sup> and 78×10<sup>-3</sup> W g-dry-solid<sup>-1</sup>, respectively. The experiments in the pilot bioreactor were done with *A. niger*. The production of pectinases was similar to that obtained in the column bioreactor. In a fermentation done with wheat bran, using a bed height of 23 cm, the peak pectinolytic activity was 29 U g-dry-solid<sup>-1</sup>, at 24 h. Again, the maximum productivity, 1.18 U g-dry-solid<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, occurred at 16 h. The maximum O<sub>2</sub> uptake rates, at 16 h, was 607 μmol h<sup>-1</sup> g-dry-solid<sup>-1</sup>, which corresponds to a metabolic heat production of 87×10<sup>-3</sup> W g-dry-solids<sup>-1</sup>. However, in this fermentation the bed compacted. A fermentation done with wheat bran and sugarcane bagasse (90%:10%, by mass), with a bed height of 40 cm, gave maximum values of 25 U g-dry-solid<sup>-1</sup>, at 14 h, for the pectinolytic activity and 1.81 U g-dry-solid<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, also at 14 h, for the productivity. During the first 14 h, the bed did not compact and the maximum temperature obtained in the bed was 35°C. It was concluded that the process for pectinase production could be scaled-up by maintaining the bed height of 40 cm and increasing the bed diameter to several meters.

Key-words: Pectinases. Solid state fermentation. Packed-bed bioreactor. Scale-up.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MODELO DE ESTRUTURA PARA A MOLÉCULA DA PECTINA .....	18
FIGURA 2 – PERFIS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA, PECTINASE E XILANASE EM FES DE BAGAÇO DE LARANJA EMPREGANDO <i>A. niger</i> F3 EM UM BIORREATOR DE 2 kg .....	32
FIGURA 3 – A EVOLUÇÃO DO QUOCIENTE RESPIROMÉTRICO DE CRESCIMENTO DE <i>A. NIGER</i> F3 DURANTE FES DE BAGAÇO DE LARANJA EM UM BIORREATOR DE 2 kg .....	33
FIGURA 4 – BIORREATOR DE COLUNAS (1) ar comprimido; (2) regulador de pressão de ar; (3) filtro de ar; (4) distribuidor de ar; (5) umidificador; (6) colunas; (7) banho termostatzado; (8) saída de ar da coluna; (9) sensor de O <sub>2</sub> ; (10) software para aquisição de dados .....	43
FIGURA 5 – COLUNA ENCAIXADA NO UMIDIFICADOR DE AR CULTIVADA COM <i>A. oryzae</i> EM BAGAÇO DE LARANJA E BAGAÇO DE CANA .....	44
FIGURA 6 – BIORREATOR PILOTO .....	45
FIGURA 7 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DO BIORREATOR PILOTO .....	46
FIGURA 8 – DISPOSIÇÃO DOS TERMOPARES NO INTERIOR DO BIORREATOR (A) Disposição dos termopares ao longo do eixo horizontal (B) disposição dos termopares ao longo do eixo vertical .....	47
FIGURA 9 – LOCAIS DE RETIRADA DAS AMOSTRAS NO LEITO (A) desenho da vista superior do leito indicando os locais de coleta de amostras ao longo do eixo horizontal, (B) desenho da vista lateral do leito indicando os locais de coleta de amostras ao longo do eixo vertical e (C) desenho da vista lateral do biorreator indicando as frações da altura onde foram retiradas as amostras.....	51
FIGURA 10 – DIAGRAMA DE PARETO PARA <i>A. oryzae</i> .....	53
FIGURA 11 – GRÁFICOS DOS RESÍDUOS PARA <i>A. oryzae</i> (A) distribuição dos resíduos e (B) valores observados no experimento versus valores preditos pelo modelo. ....	54
FIGURA 12 – CURVAS DE CONTORNO E SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA <i>A. oryzae</i> (A) proporção de bagaço de laranja e sulfato de amônio, (B) concentração de sulfato de amônio e umidade e (C) umidade e proporção de bagaço de laranja. Em todas as superfícies o valor da terceira variável foi fixado no ponto central (0) .....	56
FIGURA 13 – DIAGRAMA DE PARETO PARA <i>A. niger</i> .....	58

FIGURA 14 – GRÁFICOS DOS RESÍDUOS PARA <i>A. niger</i> (A) distribuição dos resíduos e (B) valores observados no experimento versus valores preditos pelo modelo .....	59
FIGURA 15 – CURVAS DE CONTORNO E SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA <i>A. niger</i> (A) proporção de farelo de trigo e sulfato de amônio, (B) concentração de sulfato de amônio e umidade e (C) umidade e proporção de farelo de trigo. Em todas as superfícies o valor da terceira variável foi fixado no ponto central (0) .....	60
FIGURA 16 – PERFIL DE OUR E DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>A. oryzae</i> DURANTE A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR DE COLUNAS .....	61
FIGURA 17 – PERFIL DE OUR E DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DE <i>A. niger</i> DURANTE A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR DE COLUNAS .....	62
FIGURA 18 – PERFIL DE OUR E DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 100 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 23 cm.....	64
FIGURA 19 – TEMPERATURA DO LEITO EM DIFERENTES ALTURAS E ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 100 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 23 cm .....	65
FIGURA 20 – IMAGENS DO LEITO EM 26 HORAS DE CULTIVO (A) sólido fermentado e (B) superfície do leito.....	65
FIGURA 21 – TEMPERATURA DO AR DE ENTRADA E SAÍDA DO BIORREATOR PILOTO EM CULTIVO COM 100 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 23 cm .....	66
FIGURA 22 – ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm .....	67
FIGURA 23 – IMAGENS DO LEITO EM 26 HORAS DE CULTIVO (A) sólido fermentado e (B) superfície do leito.....	68
FIGURA 24 – TEMPERATURA DO LEITO EM DIFERENTES ALTURAS E ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm .....	68
FIGURA 25 – TEMPERATURA DO AR DE ENTRADA E SAÍDA DO BIORREATOR PILOTO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm .....	69



FIGURA 26 – UMIDADE NO TOPO DO LEITO DURANTE CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm.....	70
FIGURA 27 – ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO APÓS 26 HORAS EM DIFERENTES POSIÇÕES E ALTURAS DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm.....	71
FIGURA 28 – UMIDADE APÓS 26 HORAS EM DIFERENTES POSIÇÕES E ALTURAS DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm (A) eixo y de 0 a 70% de umidade (B) eixo y ampliado na região dos resultados .....	71
FIGURA 29 – ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm .....	73
FIGURA 30 – TEMPERATURA DO LEITO EM DIFERENTES ALTURAS E ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm .....	74
FIGURA 31 – TEMPERATURA DO AR DE ENTRADA E SAÍDA DO BIORREATOR PILOTO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm .....	74
FIGURA 32 - IMAGENS DO LEITO DURANTE O CULTIVO (A) em 12 horas de cultivo (B) em 14 horas de cultivo (C) em 16 horas de cultivo .....	75
FIGURA 33 – UMIDADE NO TOPO DO LEITO DURANTE CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm.....	76
FIGURA 34 – UMIDADES APÓS 26 HORAS EM DIFERENTES POSIÇÕES E ALTURAS DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm (A) eixo y de 0 a 70% de umidade (B) eixo y ampliado na região dos resultados .....	76
FIGURA 35 – ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO APÓS 26 HORAS EM DIFERENTES POSIÇÕES E ALTURAS DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm.....	77

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM FES EM ESCALA DE LABORATÓRIO (continua).....	25
TABELA 1 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM FES EM ESCALA DE LABORATÓRIO (continuação) .....	26
TABELA 1 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM FES EM ESCALA DE LABORATÓRIO (continuação) .....	27
TABELA 1 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM FES EM ESCALA DE LABORATÓRIO (conclusão) .....	28
TABELA 2 – MATRIZ DE PLANEJAMENTO DCCR .....	41
TABELA 3 – PARÂMETROS E NÍVEIS UTILIZADOS NOS PLANEJAMENTOS PARA <i>A. oryzae</i> E PARA <i>A. niger</i> .....	41
TABELA 4 – CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA <i>A. niger</i> E PARA <i>A. oryzae</i> EM BIORREATOR DE COLUNAS .....	43
TABELA 5 – CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA <i>A. niger</i> EM BIORREATOR PILOTO NOS TRÊS CULTIVOS REALIZADOS .....	50
TABELA 6 – MATRIZ DO DCCR PARA <i>A. oryzae</i> .....	53
TABELA 7 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO PARA <i>A. oryzae</i> ...	54
TABELA 8 – MATRIZ DO DCCR PARA <i>A. niger</i> .....	57
TABELA 9 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO PARA <i>A. niger</i> .....	59
TABELA 10 – RESULTADOS DE ATIVIDADE E PRODUTIVIDADE PECTINOLÍTICA OBTIDOS NOS CULTIVOS EM BIORREATOR DE COLUNAS E EM BIORREATOR PILOTO.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

UFPR	–	Universidade Federal do Paraná
CNPq	–	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
VTT	–	Centro de Pesquisa Técnica da Finlândia (“Technical Research Centre of Finland”)
FES	–	Fermentação no estado sólido
FS	–	Fermentação submersa
FDCA	–	Ácido 2,5 furandicarboxílico
BDA	–	Batata dextrose ágar
DNS	–	Ácido 3,5 dinitrosalisílico
OUR	–	Velocidade de consumo de oxigênio (“oxygen uptake rate”)
NPDEAS	–	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 BIORREFINARIAS DE POLPA CÍTRICA .....	15
2.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO A PARTIR DE PECTINA .....	17
2.3 PECTINASES .....	19
2.4 FES PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES .....	19
2.4.1 Biorreatores de Fermentação em Estado sólido .....	20
2.4.1.1 Biorreator sem aeração forçada e sem agitação ou com agitação ocasional .....	21
2.4.1.2 Biorreator sem aeração forçada e com agitação contínua .....	21
2.4.1.3 Biorreator com aeração forçada e com agitação contínua .....	22
2.4.1.4 Biorreator com aeração forçada e sem agitação ou com agitação intermitente .....	22
2.4.2 Aumento de escala em biorreatores de leito fixo .....	23
2.5 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FES EM ESCALA LABORATORIAL .....	24
2.6 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FES EM ESCALA PILOTO .....	29
2.6.1 Trabalho com biorreator do tipo leito fixo .....	29
2.6.2 Trabalho com biorreator do tipo tambor horizontal .....	30
2.6.2.1 Falta de informações sobre o funcionamento do biorreator .....	30
2.6.2.2 Falta de comprovação experimental com relação à melhor intensidade de fluxo de ar obtida .....	31
2.6.2.3 Resultados incoerentes com relação à velocidade de produção de pectinase e à quantidade de biomassa produzida .....	31
2.6.2.4 Resultados incoerentes do quociente respiratório .....	32
2.6.2.5 Interpretações insatisfatórias dos parâmetros cinéticos relacionados à FES .....	32
2.6.3 Trabalho com biorreator do tipo “ <i>Gas Double-Dynamic</i> ” .....	33
<b>3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 JUSTIFICATIVA .....	35
3.2 OBJETIVOS .....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 MICRO-ORGANISMOS .....	36
4.2 MANUTENÇÃO DAS CEPAS .....	36

4.3 PROCEDIMENTOS GERAIS .....	36
4.3.1 Substratos.....	36
4.3.2 Preparo do inóculo.....	37
4.3.3 Extração.....	37
4.3.4 Determinação da atividade pectinolítica .....	37
4.3.5 Determinação da umidade .....	38
4.3.6 Determinação da velocidade de consumo de oxigênio.....	38
4.3.7 Determinação do erro padrão da média .....	39
4.4 CULTIVOS EM FRASCOS ERLLENMEYER.....	40
4.4.1 Delineamento composto central rotacional .....	40
4.4.2 Cultivos em frascos Erlenmeyer .....	41
4.5 BIORREATOR DE COLUNAS .....	42
4.5.1 Descrição do biorreator de colunas .....	42
4.5.2 Cultivos em biorreator de colunas.....	43
4.6 CULTIVOS NO BIORREATOR PILOTO .....	44
4.6.1 Descrição do Biorreator piloto.....	45
4.6.2 Condições operacionais dos cultivos .....	47
4.6.3 Calibração dos termopares.....	48
4.6.4 Calibração do analisador de gases.....	48
4.6.5 Limpeza do biorreator e do sistema de umidificação .....	48
4.6.6 Preparo do inóculo para a escala piloto.....	49
4.6.7 Cultivos no biorreator piloto .....	49
4.6.8 Amostras.....	50
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	52
5.1.1 Otimização das condições de cultivo para <i>Aspergillus oryzae</i> .....	52
5.1.2 Otimização das condições de cultivo para <i>Aspergillus niger</i> .....	57
5.2 CULTIVOS NO BIORREATOR DE COLUNAS .....	61
5.3 CULTIVOS NO BIORREATOR PILOTO .....	63
5.3.1 Primeiro cultivo no biorreator piloto.....	63
5.3.2 Segundo cultivo no biorreator piloto.....	66
5.3.3 Terceiro cultivo no biorreator piloto.....	72
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	78

<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>7 PROPOSTAS FUTURAS.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho é parte integrante de um projeto de cooperação que envolve o Laboratório de Tecnologia Fermentativa e Enzimática do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR e o centro de pesquisa VTT da Finlândia (Technical Research Centre of Finland). Este projeto de cooperação tem como objetivo principal a produção de ácido D-galacturônico e seus derivados a partir da hidrólise da pectina presente no bagaço de laranja para a implantação em uma biorrefinaria de polpa cítrica.

O estabelecimento de um processo para a conversão de pectina cítrica em ácido D-galacturônico e seus derivados é especialmente importante ao Brasil, devido à grande produção de bagaço de laranja pela indústria de suco de laranja. O ácido D-galacturônico é o principal monossacarídeo constituinte da pectina presente no bagaço de laranja. Pode ser recuperado e comercializado diretamente para a utilização na indústria química e de alimentos, ou pode ser utilizado como precursor de compostos químicos de alto valor agregado e com aplicações industriais importantes (RICHARD e HILDITCH, 2009).

O projeto de cooperação abordará duas estratégias para a produção de ácido D-galacturônico e seus derivados a partir da pectina, a hidrólise enzimática clássica e o desenvolvimento de rotas inovadoras com cepas recombinantes. Este trabalho se insere na primeira estratégia, onde será necessária a produção de pectinases para a realização da hidrólise enzimática. As pectinases comerciais, que são produzidas em fermentação submersa, têm um alto custo (R\$19,80/g) (SIGMA, 2013) que pode inviabilizar economicamente este processo. A fermentação em estado sólido (FES) é uma alternativa para a produção de pectinases, pois possibilita a utilização de resíduos agroindustriais que são abundantes e de baixo custo.

Neste cenário, o presente trabalho pretende dar base para o estabelecimento, no futuro, de um processo em escala comercial da fermentação em estado sólido para a produção de pectinases. Este processo seria uma parte integral de uma biorrefinaria de polpa cítrica.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão está organizada de modo a cumprir três objetivos. O primeiro objetivo é apresentar a biorrefinaria de polpa cítrica, que possibilita a obtenção do ácido D-galacturônico a partir da hidrólise enzimática da pectina pelas pectinases. O segundo objetivo é aprofundar o conhecimento sobre a produção de pectinases em fermentação em estado sólido, uma técnica que tem um bom potencial para a produção de pectinases. Por fim, o terceiro objetivo é de apresentar os trabalhos disponíveis na literatura sobre a produção de pectinases em fermentação no estado sólido em escala de bancada e piloto.

### 2.1 BIORREFINARIAS DE POLPA CÍTRICA

Os resíduos ricos em pectina, como a polpa cítrica, que é uma mistura das cascas, das sementes e do bagaço, são uma fonte de biomassa renovável, abundante e de baixo custo (R\$30,00/ton) (MFRURAL, 2014) e têm o potencial de serem utilizados como biomassa em uma biorrefinaria.

A produção mundial de laranjas em 2011 foi de  $63 \times 10^6$  toneladas (FAOSTAT, 2011), e o Brasil, um dos maiores produtores mundiais, produziu  $18 \times 10^6$  toneladas (EMBRAPA, 2011). Do total produzido no Brasil, 70% são destinados à produção de suco concentrado de laranja (REVISTA RURAL, 2000), o que gera uma grande quantidade de resíduos. Atualmente, somente uma parte destes resíduos é utilizada para alimentação animal, devido às dificuldades de armazenamento e ao elevado custo de secagem. O restante da polpa é simplesmente descartado no meio ambiente, o que pode causar diversos problemas ambientais. Por isso, se torna muito importante encontrar maneiras de agregar valor a este resíduo.

Uma biorrefinaria de polpa cítrica pode fornecer produtos de alto valor agregado, tais como pectina, enzimas, proteínas microbianas, D-limoneno e outros óleos essenciais (POURBAFRANI *et al.*, 2010; LOPEZ, LI e THOMPSON, 2010). Além disso, é possível obter açúcares resultantes da hidrólise total da pectina, principalmente o ácido D-galacturônico (RICHARD e HILDITCH, 2009).

O ácido D-galacturônico corresponde a até 20% do total de sólidos do hidrolisado de polpa cítrica (massa seca) (GROHMANN, CAMERON e BUSLIG, 1994) e a até 74% (m/m) da pectina de polpa cítrica (SIGMA, 2013). Pode ser recuperado e comercializado diretamente para a utilização na indústria alimentícia, como agente acidificante, e na indústria química, como agente tensioativo. Além disso, este açúcar pode ser utilizado como precursor de compostos químicos de alto valor agregado e com aplicações industriais importantes, tais como o ácido múxico (ácido meso-galactárico) e o ácido L-galactônico (RICHARD e HILDITCH, 2009; MOJZITA *et al.*, 2010).

O ácido múxico pode ser obtido por síntese química ou enzimática. No entanto, a síntese química não é atrativa, pois envolve a oxidação da D-galactose com ácido nítrico e produz efluentes tóxicos. O ácido múxico pode ser utilizado como fermento químico, como substituinte do ácido tartárico em refrigerantes e como material de partida para a síntese química do ácido 2,5 furandicarboxílico (FDCA). O FDCA é um dos doze compostos químicos de maior valor agregado produzidos a partir de biomassa (*Top Value-Added Chemicals from Biomass*) (EERE, 2004). Além disso, tem grande potencial de substituir o ácido tereftálico como monômero para a produção de poliésteres.

O ácido L-galactônico é pouco utilizado devido ao seu alto custo de produção. No entanto, se sua produção pela hidrólise de biomassa rica em pectina for viabilizada, poderá ser utilizado em diversas aplicações. Este composto tem propriedades similares às do ácido D-glucônico, que é atualmente aplicado como aditivo em cosméticos, como acidulante em alimentos, como agente quelante em produtos de limpeza e como aditivo retardador na formulação de concreto (RICHARD e HILDITCH, 2009).

## 2.2 PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO A PARTIR DE PECTINA

A pectina é um polissacarídeo natural complexo, negativamente carregado, ácido e amplamente polidisperso. Na polpa cítrica, representa de 12 a 28% do seu peso seco (KASHYAP *et al.*, 2001).

De um modo geral, a pectina é constituída por regiões lisas, denominadas homogalacturonanas e por regiões ramificadas, que podem ser do tipo ramnogalacturonanas I e II (FIGURA 1). As homogalacturonanas são cadeias lineares de resíduos de ácido D-galacturônico unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). As ramnogalacturonanas I consistem de uma cadeia principal de unidades alternadas de ácido D-galacturônico ligadas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) e ramnose ligadas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2), a qual se ligam cadeias laterais de arabinose e galactose. Já as ramnogalacturonanas II são os segmentos estruturalmente mais complexos e consistem de um esqueleto de homogalacturonana de no mínimo oito resíduos, com cadeias laterais de até 12 diferentes tipos de açúcares, alguns muito raros como apiose, ácido acérico, ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico e ácido 3-deoxi-mano-2-octulosônico (RIDLEY, O'NIEL e MOHNEN, 2001; SAKAI *et al.*, 1992; JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005).

Os grupos carboxilas das unidades de ácido D-galacturônico podem estar esterificados com o metanol e os grupos hidroxilas podem estar esterificados com ácido acético, onde a porcentagem dos grupos esterificados é expressa como grau de metilação ou acetilação, respectivamente (YAPO *et al.*, 2007; MESBAHI, JAMALIAN e FARAHNAKY, 2005).

Pectinas podem ser hidrolisadas a ácido D-galacturônico por aquecimento em ácidos minerais ou por tratamento com pectinases. A hidrólise enzimática da pectina dentro da polpa cítrica, sem uma prévia extração, é dificultada pela presença de celulose e hemicelulose (GROHMAN, CAMERON e BUSLIG, 1995). Um processo de digestão puramente enzimática da polpa cítrica, portanto, precisa de uma mistura de celulases, xilanases, pectinases e beta-glucosidases, mas mesmo assim, a velocidade de hidrólise da pectina é relativamente lenta.

No que diz respeito ao aquecimento com ácidos minerais para hidrólise da pectina, a cadeia poligalacturônica é bastante resistente à hidrólise ácida. Assim, condições (temperatura, tempo e concentração de ácido) que são suficientemente

altas para hidrolisar a cadeia polissacarídica também degradam o ácido D-galacturônico liberado, de tal maneira que o rendimento final de ácido D-galacturônico é baixo (GARNA *et al.*, 2006; TALEBNIA *et al.*, 2008).

A melhor estratégia para hidrolisar a pectina presente na casca de laranja para ácido D-galacturônico envolve duas etapas. A primeira etapa é uma pré-hidrólise com ácido mineral diluído, que degrada a hemicelulose presente nas cascas, e auxilia na liberação da pectina. A segunda etapa envolve a hidrólise enzimática da pectina com a utilização de pectinases (GROHMAN, CAMERON e BUSLIG, 1995). Entretanto, a utilização de pectinases ainda é limitada, devido ao alto custo das pectinases comerciais atualmente disponíveis (POURBAFRANI *et al.*, 2010).

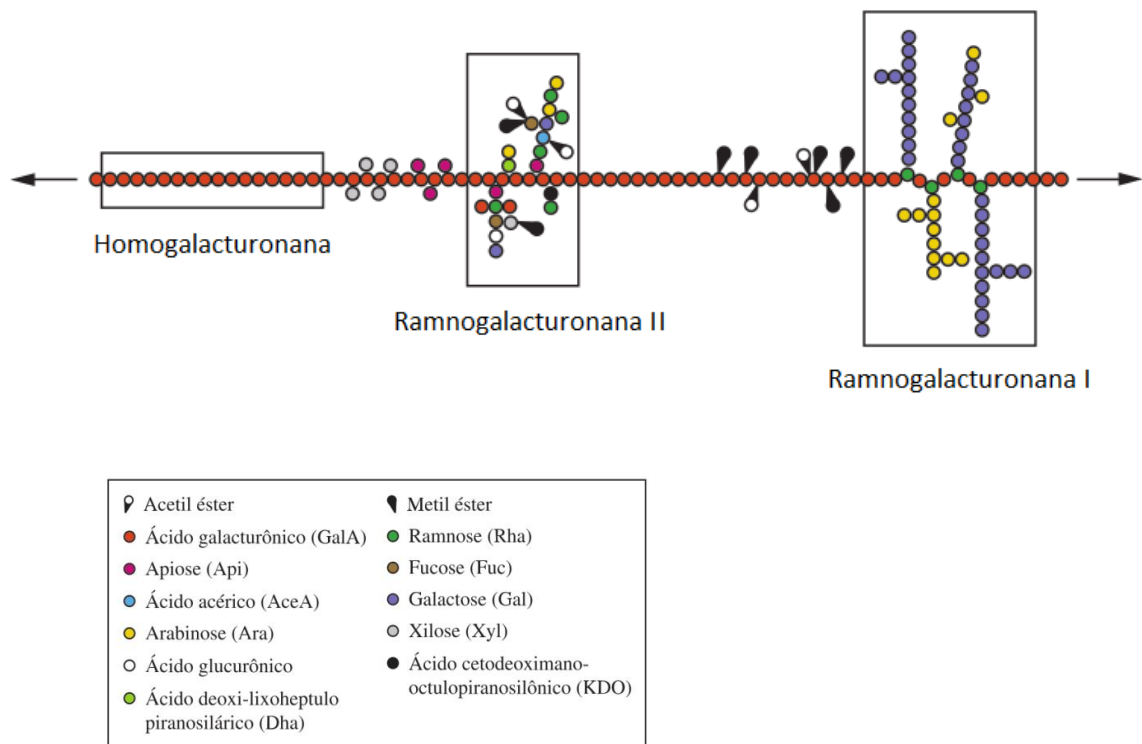


FIGURA 1 – MODELO DE ESTRUTURA PARA A MOLÉCULA DA PECTINA  
 FONTE: ADAPTADO DE CANTERI *et al.* (2012)

## 2.3 PECTINASES

Pectinases representam um grupo heterogêneo de enzimas capazes de degradar a estrutura complexa da pectina, por meio de reações de despolimerização e desesterificação.

As despolimerases quebram as ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1→4) nas cadeias de ácido poligalacturônico das substâncias pécticas. Existem dois tipos de despolimerase, as hidrolases e as liases. As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases (UENOJO e PASTORE, 2007) e podem ser subdivididas por sua atuação "endo" ou "exo" na cadeia poligalacturônica. Já as liases clivam a cadeia poligalacturônica pela  $\beta$ -eliminação e produzem um produto com uma insaturação (ALKORTA *et al.*, 1997).

As esterases, por sua vez, catalisam a desesterificação de ligações metil-ésteres e acetil-ésteres, que são muito abundantes na pectina cítrica, que tem grau de esterificação entre 65 e 75% (KOPECNY e HODROVÁ, 1995; SILLEY, 1985). Existem dois tipos de esterases, as pectina metil esterases e as pectina acetil esterases. As pectina metil esterases catalisam a desesterificação de ligações metil-éster nos resíduos de ácido D-galacturônico e geram o ácido péctico (pectina sem o grupo metil) e o metanol. Por sua vez, as pectina acetil esterases catalisam a desesterificação de ligações acetil-éster nos resíduos de ácido D-galacturônico e geram o ácido péctico e acetato (PEDROLLI *et al.*, 2009).

## 2.4 FES PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES

As pectinases são comercialmente disponíveis e suas vendas correspondem a aproximadamente 25% das vendas globais do mercado de enzimas (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005). São amplamente utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação dos sucos, no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas, na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais, na fermentação de chá, café e cacau, na



extração de óleos vegetais e no tratamento e degomagem de fibras naturais para as indústrias têxteis e de papeis (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005).

Pectinases podem ser produzidas em fermentação submersa (FS) ou em fermentação no estado sólido (FES), sendo que as pectinases comerciais são produzidas em fermentação submersa a partir de fungos, em particular do gênero *Aspergillus* (ALKORTA *et al.*, 1997). Entretanto, a FES apresenta vantagens em relação a FS, pois tem o potencial de reduzir os custos de produção, além de resultar em uma maior produtividade de pectinases (SOLIS-PEREYRA *et al.*, 1993).

A FES é definida pelo crescimento de um micro-organismo em um substrato sólido e úmido, na ausência de água livre e com o espaço entre as partículas preenchido por uma fase gasosa contínua (MITCHELL, KRIEGER e BEROVIČ, 2006). O substrato sólido atua como um ancoradouro para o micro-organismo e pode atuar também como fonte de carbono, nitrogênio, minerais, água e outros nutrientes.

Uma das principais vantagens da utilização da FES para a produção de pectinases é a possibilidade de utilização de resíduos da agroindústria como matéria-prima, pois estes substratos normalmente são abundantes e de baixo custo (SINGHANIA *et al.*, 2009). Além disso, a FES geralmente resulta em uma maior produtividade volumétrica, devido ao meio mais concentrado, o que implica em menores volumes de trabalho dos biorreatores, menores custos de recuperação do produto e a significativa redução do volume de efluentes (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

#### 2.4.1 Biorreatores de Fermentação em Estado sólido

Os biorreatores de FES podem ser classificados em quatro tipos, de acordo com seu regime de agitação e aeração (MITCHELL, KRIEGER e BEROVIČ, 2006).

#### 2.4.1.1 Biorreator sem aeração forçada e sem agitação ou com agitação ocasional

O primeiro tipo de biorreator opera sem aeração forçada e sem agitação ou com agitação ocasional. Nesta classe, encontra-se o biorreator de bandeja, que consiste de uma câmara que contém varias bandejas empilhadas e espaçadas umas das outras. Cada bandeja recebe uma pequena quantidade de substrato para que a espessura do leito não passe de alguns centímetros, pois, como não possui aeração forçada, a transferência de massa é limitada à difusão e a transferência de calor é limitada à condução. Nas bandejas, quando tem agitação ocasional, normalmente é realizada manualmente.

A produção em larga escala utilizando este tipo de biorreator requer uma área operacional grande, uma vez que é necessário utilizar um grande número de bandejas. Além disso, o processo não permite a manipulação mecânica e necessita de trabalho intensivo, tornando o processo inviável devido ao alto custo de mão de obra.

#### 2.4.1.2 Biorreator sem aeração forçada e com agitação contínua

O formato mais comum do biorreator sem aeração forçada e com agitação contínua é o de um tambor deitado na horizontal. Conforme o tipo de agitação, os biorreatores são divididos em tambores rotativos, onde o biorreator gira ao redor do eixo central, e tambores agitados, onde o biorreator permanece estático enquanto misturadores instalados no interior do cilindro movimentam-se para agitar o leito. Uma parte do biorreator é preenchida com substrato e a aeração, que não é forçada, ocorre somente no *headspace*, que é a fase gasosa superior ao leito do biorreator. A agitação tem o objetivo de promover as transferências de massa e calor entre o *headspace* e o leito e permitir a homogeneização do substrato. No entanto, a agitação excessiva pode danificar o micro-organismo, fazendo com que muitas culturas de fungos não se desenvolvam bem neste tipo de biorreator (PANDEY *et al.*, 2001).

#### 2.4.1.3 Biorreator com aeração forçada e com agitação contínua

Os biorreatores com aeração forçada e com agitação podem possuir agitação mecânica semelhante aos tambores horizontais ou podem ser do tipo leito fluidizado, onde a mistura é realizada através da movimentação de ar. Nos biorreatores com agitação mecânica, o sólido permanece sobre uma base perfurada através de qual o ar será injetado enquanto o leito é agitado. Já nos biorreatores de leito fluidizado, as partículas ficam em suspensão, devido à alta velocidade do ar injetado.

Devido às altas velocidades de aeração, os biorreatores de leito fluidizado são eficientes na remoção do calor metabólico das partículas sólidas. No entanto, a utilização deste tipo de biorreator em larga escala pode não ser economicamente viável, devido aos elevados custos operacionais.

#### 2.4.1.4 Biorreator com aeração forçada e sem agitação ou com agitação intermitente

A última classe de biorreatores inclui biorreatores com aeração forçada e sem agitação ou com agitação intermitente. Estes biorreatores podem ser do tipo leito fixo, onde o leito permanece estático durante toda a fermentação ou pode ser do tipo leito fixo com agitação intermitente, onde o biorreator opera como leito fixo na maior parte do tempo, mas o leito sofre agitação ocasional. O emprego de agitação intermitente permite o reassentamento do leito quando necessário. Este tipo de operação pode ser usado com aqueles fungos que toleram eventos infrequentes de agitação.

Com este tipo de biorreator, é possível usar leitos maiores do que aqueles usados nos biorreatores sem aeração forçada, em virtude da maior disponibilidade de  $O_2$  e da remoção mais eficiente de calor por convecção e evaporação. Com isso, é possível obter uma maior produtividade volumétrica, tornando este tipo de biorreator interessante para o aumento de escala.

#### 2.4.2 Aumento de escala em biorreatores de leito fixo

A escassez de critérios de aumento de escala bem fundamentados é um dos maiores desafios para a aplicação industrial da FES (MITCHELL *et al.*, 2000). Apesar de métodos para *scale-up* em FS estarem bem desenvolvidos (PANDEY *et al.*, 2001), estes métodos não podem ser aplicados diretamente aos biorreatores de FES, devido às diferenças nos fenômenos limitantes: Enquanto para a FS o fenômeno limitante é a transferência de O<sub>2</sub> através da interface gás-líquido, na FES o fenômeno limitante é a transferência de calor (MITCHELL *et al.*, 1999).

Devido à importância da transferência de calor, um dos principais problemas a serem superados no aumento de escala de um biorreator de FES é o aumento da temperatura do leito. Em biorreatores de leito fixo de escala laboratorial, onde o largura e a altura do leito são pequenos, a aeração forçada e a condução pelas paredes já são suficientes para controlar a temperatura. Já em maiores escalas, onde a largura e a altura do leito são maiores, a condução pelas paredes é desprezível e o controle é feito somente pela aeração forçada (WEBER *et al.*, 2002). A aeração forçada, apesar de ajudar no controle da temperatura, pode provocar a secagem do leito. Mesmo que o ar entre no leito saturado com água, conforme o ar atravessa o leito, o mecanismo de convecção eleva sua temperatura e, conseqüentemente, aumenta sua capacidade de carregar água (VON MEIEN e MITCHELL, 2002).

As variáveis operacionais de um biorreator de leito fixo são o fluxo, a temperatura e a umidade do ar de entrada. Estas variáveis devem ser manipuladas a fim de garantir o suprimento adequado de O<sub>2</sub>, minimizar o aumento de temperatura e manter a atividade de água próxima do ótimo (MITCHELL *et al.*, 2000).

Quanto maior é o tamanho do leito, maior será a distância que o ar terá que percorrer dentro do leito. Portanto, se todos os outros fatores se mantêm iguais, maior será a temperatura na região do topo do leito. O leito não deve ser tão alto para que as temperaturas no topo do leito não alcancem valores que prejudiquem o crescimento do micro-organismo (MITCHELL *et al.*, 1999).

Uma estratégia que foi proposta para a ampliação de escala de biorreatores de leito fixo é de manter constante a razão  $V_z/H$ , ou seja, a velocidade superficial do

ar por altura do leito. Entretanto, há um limite, uma vez que uma alta velocidade de ar pode fluidizar o leito (MITCHELL, KRIEGER e BEROVIČ, 2006).

Também, nos últimos 20 anos, vários modelos matemáticos foram desenvolvidos com o intuito de guiar o processo de aumento de escala. Estes modelos descrevem os processos de transferência de calor e massa em biorreatores do leito fixo e podem fornecer informações sobre a operação do biorreator e de como controlar as variáveis operacionais para que fiquem perto de seus valores ótimos (MITCHELL, VON MEIEN e KRIEGER, 2003).

O modelo mais avançado é o de von Meien e Mitchell (2002), que descreve um biorreator de leito fixo com agitação intermitente. É um modelo de duas fases, ou seja, considera a situação de não-equilíbrio entre a fase sólida e a fase gasosa. Descreve os balanços de massa e energia da fase sólida e da fase gasosa na direção axial. Apesar de potencialmente ser uma boa ferramenta para guiar o aumento de escala, a aplicação deste modelo ainda possui algumas limitações tais como: a descrição da cinética ainda é limitada, os coeficientes de transferência de calor e massa e a atividade de água do sólido são referentes a um substrato específico e a isoterma para a matéria sólida não leva em conta a presença da biomassa.

## 2.5 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FES EM ESCALA LABORATORIAL

Pectinases têm sido produzidas em FES utilizando diversos resíduos da agroindústria e diferentes tipos de microrganismo em escala de laboratório (TABELA 1). Os fungos filamentosos mesófilos são os micro-organismos mais utilizados, devido à sua grande capacidade de crescimento em atividades de água relativamente baixas, com um valor mínimo de atividade de água de 0,7 (ANUPAMA E RAVINDRA, 2000; PINTO *et al.*, 2006). Dentre os fungos filamentosos mais utilizados destaca-se o gênero *Aspergillus*, principalmente da espécie *A. niger*.

TABELA 1 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM FES EM ESCALA DE LABORATÓRIO

MICRO-ORGANISMO	SUBSTRATO	COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE UMIDIFICAÇÃO	CONDIÇÕES DE CULTIVO	SISTEMA DE CULTIVO	ATIVIDADE PECTINOLÍTICA* (U g-sólido-seco <sup>-1</sup> )	PRODUTIVIDADE PECTINOLÍTICA* (U g-sólido-seco <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	REFERÊNCIA
<i>Aspergillus niger</i> CH4	Farelo de trigo (70%) e bagaço de cana (30%)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,3%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,3%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5%, KCl 1,0%, FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,09%	pH: - Umidade: 70% T: 30°C t: 24 h	Frascos Erlenmeyer	10,7	0,5	BIZ (2012)
<i>Aspergillus oryzae</i> CPQBA 394-12 DRM 01	Bagaço de laranja lavado (70%) e bagaço de cana (30%)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,3%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,3%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5%, KCl 1,0%, FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,09%	pH: - Umidade: 70% T: 30°C t: 24 h	Frascos Erlenmeyer	17,6	0,7	BIZ (2012)
<i>Aspergillus sojae</i> ATCC 20235	Farelo de trigo (70%) e pó de casca de laranja (30%)	NaCl 0,5%, KCl 0,5%, FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,0015%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,006%, MgSO <sub>4</sub> 0,005%, CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 0,0012%, MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 0,0015%	pH: - Umidade: 120% T: - t: 120 h	Frascos Erlenmeyer	33,4	0,3	HEERD <i>et al.</i> (2012)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	Bagaço de cana (20%), farelo de trigo (40%) e bagaço de laranja (40%)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1%	pH: - Umidade: 70% T: 45°C t: 48 h	Frascos Erlenmeyer	108	2	MARTIN <i>et al.</i> (2010)
<i>Aspergillus niger</i> CH4	Bagaço de laranja (90%) e bagaço de cana (10%)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,3%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,3%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5%, KCl 1%, FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,009%	pH: - Umidade: 85% T: 30°C t: 24 h	Frascos Erlenmeyer	12	0,5	BARON (2010)

continua

\* Não é possível a comparação dos valores de atividade e produtividade pectinolítica, pois os métodos usados para determinar as atividades são diferentes.



TABELA 1 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM FES EM ESCALA DE LABORATÓRIO

continuação

MICRO-ORGANISMO	SUBSTRATO	COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE UMIDIFICAÇÃO	CONDIÇÕES DE CULTIVO	SISTEMA DE CULTIVO	ATIVIDADE PECTINOLÍTICA* (U g-sólido-seco <sup>-1</sup> )	PRODUTIVIDADE PECTINOLÍTICA* (U g-sólido-seco <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	REFERÊNCIA
<i>Fusarium moliniforme</i>	Casca de manga	Peptona 1%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> 0,6%, MgSO <sub>4</sub> 0,05%, ZnSO <sub>4</sub> 0,06%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,4%	pH: nc Umidade: 58% T: 30°C t: 120 horas	Frascos Erlenmeyer	43,2	0,4	KUMAR <i>et al.</i> (2010)
<i>Aspergillus niger</i> Ege-K-730	Farelo de trigo	não utilizou	pH: - Umidade: 60% T: 30°C t: 48 h	Frascos Erlenmeyer	390	8	TASKIN <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus niger</i> BTL	Casca de laranja livre de sólidos solúveis	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,3%, CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,05% MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,05%	pH: 5 Umidade: 90% T: 30°C t: -	Frascos Erlenmeyer	135	-	MAMMA <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus niger</i> DMF 27	Cabeça de girassol seca sem sementes	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,5%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5% e FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,0005%	pH: - Umidade: 60% T: 30°C t: 96 h	Garrafas de vidro	10,1	0,1	PATIL <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus niger</i> A2.26	Farelo de trigo	Dextrose 13,87%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 9,27%	pH: 6,5 Umidade: 61% T: 30°C; t1: 30 h T: 27°C; t2: 42 h		36,3	0,5	DEBING <i>et al.</i> (2006)

continua

\* Não é possível a comparação dos valores de atividade e produtividade pectinolítica, pois os métodos usados para determinar as atividades são diferentes.

TABELA 1 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM FES EM ESCALA DE LABORATÓRIO

continuação

MICRO-ORGANISMO	SUBSTRATO	COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE UMIDIFICAÇÃO	CONDIÇÕES DE CULTIVO	SISTEMA DE CULTIVO	ATIVIDADE PECTINOLÍTICA* (U g-sólido-seco <sup>-1</sup> )	PRODUTIVIDADE PECTINOLÍTICA* (U g-sólido-seco <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	REFERÊNCIA
<i>Aspergillus fumigatus</i> MTCC 4163	Farelo de trigo	Extrato de levedura 5%, sacarose 5%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5%	pH: 5 Umidade: 60% T: 50°C t: 72 h	Frascos Erlenmeyer	1270	18	PHUTELA <i>et al.</i> (2005)
<i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	Farelo de trigo (50%) e polpa cítrica (50%)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,1%	pH: - Umidade: 80% T: 28°C t: 336 h	Frascos Erlenmeyer	71,2	0,2	SILVA <i>et al.</i> (2005)
<i>Aspergillus awamori</i>	Bagaço de uva	não utilizou	pH: nc Umidade: 60% T: 30°C t: 24 horas	Placas de Petri	25	1	BOTELLA <i>et al.</i> (2005)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 179-5	Bagaço de cana (30%) e polpa cítrica (70%)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,1%, NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1%	pH: nc Umidade: 67% T: 50°C t: 96 horas	Frascos Erlenmeyer	40	0,4	MARTINS <i>et al.</i> (2002)
<i>Thermoascus aurantiacus</i> 179-5	Farelo de trigo	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,1%, NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1%	pH: nc Umidade: 67% T: 50°C t: 96 horas	Frascos Erlenmeyer	43	0,4	MARTINS <i>et al.</i> (2002)

continua

\* Não é possível a comparação dos valores de atividade e produtividade pectinolítica, pois os métodos usados para determinar as atividades são diferentes.

TABELA 1 - PRODUÇÃO DE PECTINASES POR FUNGOS FILAMENTOS EM FES EM ESCALA DE LABORATÓRIO

continuação e conclusão

MICRO-ORGANISMO	SUBSTRATO	COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO DE UMIDIFICAÇÃO	CONDIÇÕES DE CULTIVO	SISTEMA DE CULTIVO	ATIVIDADE PECTINOLÍTICA* (U g-sólido-seco <sup>-1</sup> )	PRODUTIVIDADE PECTINOLÍTICA* (U g-sólido-seco <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	REFERÊNCIA
<i>Aspergillus awamori</i>	Grãos de trigo moídos	não utilizou	pH: nc Umidade: 60% T: 30°C t: 48 horas	Placas de Petri	9,6	0,2	BLANDINO <i>et al.</i> (2002)
<i>Aspergillus carbonarius</i> CFTRI 1047	Farelo de trigo	não utilizou	pH: - Umidade: 60% T: 30°C t: 77 h	Frascos Erlenmeyer	480	6	SINGH <i>et al.</i> (1999)
<i>Aspergillus niger</i> CH4	Bagaço de cana	Pectina 5,5%, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4,5%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,3%, FeSO <sub>4</sub> 0,1%, MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,7%, uréia 1,1%, glucose 7%	pH: 4,5 Umidade: 70% T: 35°C t: 48 horas	Biorreator de colunas com aeração	38	0,8	SOLIS-PEREYRA <i>et al.</i> (1993)

\* Não é possível a comparação dos valores de atividade e produtividade pectinolítica, pois os métodos usados para determinar as atividades são diferentes.

## 2.6 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FES EM ESCALA PILOTO

Embora existam diversas pesquisas para produção de pectinases em FES em escala de bancada, existem apenas três trabalhos na literatura sobre a produção destas enzimas em escala piloto.

Não é possível comparar as atividades pectinolíticas obtidas nestes trabalhos entre si, pois os métodos utilizados pelos três grupos para determinar a atividade são diferentes. De fato, nem é possível avaliar se as fermentações foram eficientes em produzir pectinases.

### 2.6.1 Trabalho com biorreator do tipo leito fixo

No trabalho desenvolvido por Huerta *et al.* (1994), foi utilizado um biorreator de leito fixo de volume total de 130 L (0,5 × 0,4 × 0,65 m) e com capacidade para 10-25 kg de substrato seco. A produção de pectinases por *Aspergillus niger* foi realizada utilizando uma técnica denominada ASF (“*Absorbed Substrate Fermentation*”). Esta técnica é um tipo específico de FES que utiliza um suporte para a absorção de uma solução de nutrientes. O suporte utilizado foi o bagaço de cana e a solução de nutrientes era composta de sacarose e pectina refinada. Ar foi injetado através do leito a  $4 \times 10^{-4} \text{ m}^3 \text{ g-sólido-seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Os autores relataram que não houve problemas de aumento da temperatura no leito durante o cultivo e que problemas de transferência de calor e massa normalmente encontrados em FES foram eliminados, devido à elevada porosidade do bagaço de cana utilizado como suporte inerte. No entanto, não há dados experimentais de temperatura que possam comprovar esta afirmação e não há informações sobre a porosidade e a altura do leito utilizado. Os autores obtiveram uma atividade pectinolítica, medida pelo método viscosimétrico, de 1580 U g-sólido-seco<sup>-1</sup>.

Apesar de ser uma técnica conveniente, uma vez que o meio de cultura, a água, os nutrientes e os indutores específicos podem ser variados de acordo com as

concentrações requeridas, esse processo não é economicamente viável em grande escala por utilizar compostos refinados de alto valor agregado.

### 2.6.2 Trabalho com biorreator do tipo tambor horizontal

Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) utilizou um biorreator do tipo tambor horizontal com aeração forçada, carregado com 800 g de substrato seco. Foi avaliada a possibilidade de produzir pectinases e xilanases por *Aspergillus niger* em bagaço de laranja com 60% de umidade.

O artigo apresenta diversas falhas, o que torna difícil a utilização dos resultados em um aumento de escala. As cinco falhas mais importantes são a falta de informações sobre o funcionamento do biorreator, a falta de comprovação experimental com relação à melhor intensidade de fluxo de ar obtida, resultados incoerentes com relação à velocidade de produção de pectinase e à quantidade de biomassa produzida, resultados incoerentes do quociente respiratório e resultados e interpretações insatisfatórias dos parâmetros cinéticos relacionados a FES. Estas falhas serão discutidas separadamente a seguir.

#### 2.6.2.1 Falta de informações sobre o funcionamento do biorreator

Os autores relatam que o sistema funciona como um biorreator do tipo tambor horizontal, com o sistema de aeração ligado a sensores para analisar a composição do gás de saída, especificamente as concentrações de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Entretanto, não há informações sobre as dimensões do biorreator, sobre qual o tipo de agitador utilizado e se houve agitação durante o cultivo. Além disso, não há informações sobre a maneira que o ar entra no leito e se o substrato está sobre uma base perfurada e qual é a disposição espacial dos furos.

### 2.6.2.2 Falta de comprovação experimental com relação à melhor intensidade de fluxo de ar obtida

Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) testaram diferentes “intensidades de fluxo de ar”, com o objetivo de otimizar a produção das enzimas. O termo foi usado para denotar a vazão por massa de sólido seco. A melhor intensidade de fluxo de ar obtida foi de  $6 \times 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ g-sólido-seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e propiciou uma atividade pectinolítica de  $265 \text{ U g-substrato-seco}^{-1}$ , medida pela liberação de açúcares redutores, com incubação em  $50^\circ\text{C}$  por 15 min.

. Esta intensidade de fluxo de ar, segundo os autores, poderá ser utilizada para qualquer escala de trabalho, sendo um fluxo suficiente para o controle da temperatura do leito, para o fornecimento de  $\text{O}_2$  e para o crescimento do micro-organismo. Entretanto, eles não comprovaram, nem experimentalmente, nem teroricamente, que esta intensidade de fluxo de ar seria suficiente para evitar o superaquecimento do leito em escalas maiores.

### 2.6.2.3 Resultados incoerentes com relação à velocidade de produção de pectinase e à quantidade de biomassa produzida

Embora Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) afirmem que a maior velocidade de produção de pectinases ocorre no tempo de 72 h, baseado no gráfico mostrado (FIGURA 2), uma análise da tangente à curva mostra que a velocidade de produção no tempo de 48 h é maior.

Também, foram obtidos valores muito altos de produção de biomassa. O biorreator inicialmente continha 2 kg de material úmido com 60% de umidade, o que corresponde a 800 g de material seco no bioreactor. Com uma produção de biomassa de 520 g, conforme apresentado pelo gráfico, obter-se-ia um coeficiente de rendimento de  $0,65 \text{ (g-biomassa g-substrato}^{-1})$ , caso fosse considerado 100% de utilização do substrato. Este seria um valor de rendimento muito alto para a utilização de carboidratos como substratos.

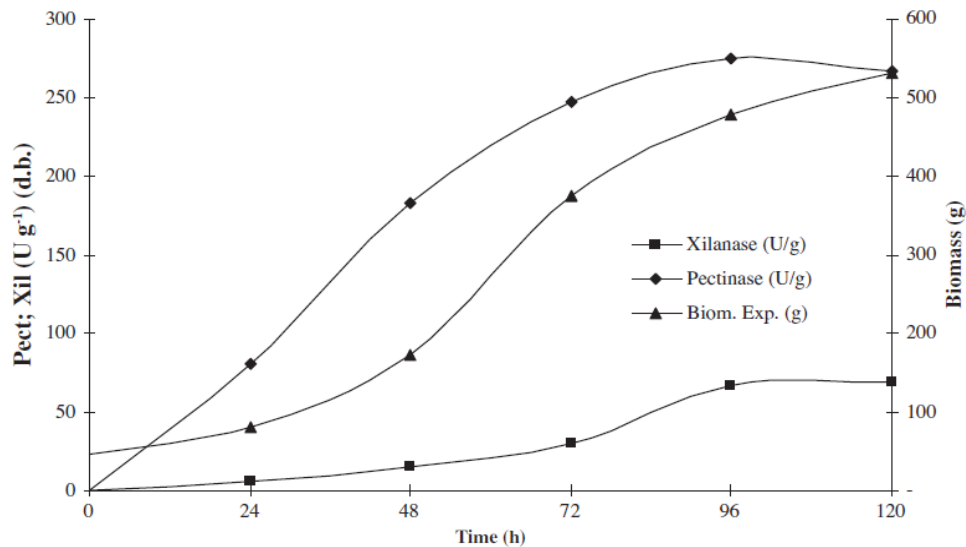


FIGURA 2 – PERFIS DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA, PECTINASE E XILANASE EM FES DE BAGAÇO DE LARANJA EMPREGANDO *A. niger* F3 EM UM BIORREATOR DE 2 kg  
 FONTE: RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ *et al.* (2011)

#### 2.6.2.4 Resultados incoerentes do quociente respiratório

A análise do quociente respiratório (QR) apresentada no artigo mostrou que o processo de fermentação com o substrato complexo, bagaço de laranja, apresenta diferentes fases (RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Ocorre uma fase lag até 20 h de cultivo, seguida por um rápido aumento do QR até  $1 \text{ mol-CO}_2 \text{ mol-O}_2^{-1}$ , e a partir de 48 h, o QR diminui até o final do cultivo para valores abaixo de 1 (FIGURA 3). Como a casca de laranja contém muitos carboidratos, na oxidação completa deste substrato, seria esperado um QR em torno de 1. No entanto, durante uma grande parte da fermentação o valor foi bem menor do que isto e os autores não fazem nenhum comentário a respeito destes resultados para o quociente respiratório.

#### 2.6.2.5 Interpretações insatisfatórias dos parâmetros cinéticos relacionados à FES

As interpretações dos parâmetros cinéticos relacionados à FES, que foram obtidos por Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) através das seguintes equações,

$$\frac{dO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{x/o}} \frac{dX}{dt} + mX \quad (1)$$

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

apresentam alguns problemas. O primeiro problema é que a estratégia matemática usada para obter as estimativas da biomassa não foi validada, já que ela se baseia no resultado experimental incoerente do coeficiente de rendimento discutido na seção anterior. O segundo problema é que as interpretações dos valores obtidos para os parâmetros encontrados vão além do que foi comprovado experimentalmente.

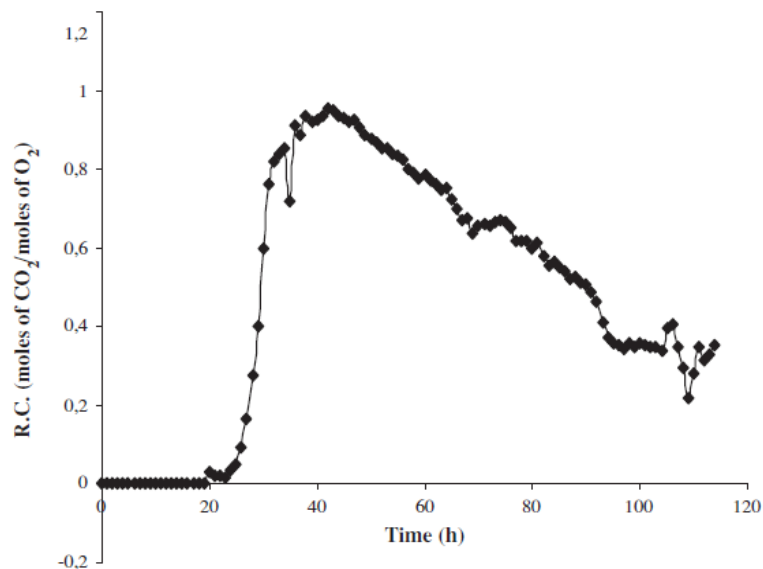


FIGURA 3 – A EVOLUÇÃO DO QUOCIENTE RESPIROMÉTRICO DE CRESCIMENTO DE *A. NIGER* F3 DURANTE FES DE BAGAÇO DE LARANJA EM UM BIORREATOR DE 2 kg  
 FONTE: RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ *et al.* (2011)

### 2.6.3 Trabalho com biorreator do tipo “Gas Double-Dynamic”

He e Chen (2013) desenvolveram um biorreator piloto do tipo “Gas Double-Dynamic” (GDD) de volume total de 800 litros, com capacidade para 15 kg de substrato seco. O biorreator GDD funciona como um biorreator de bandejas, porém



com ciclos de pressurização e despressurização de ar estéril, além da circulação interna de ar.

He e Chen (2013) afirmaram que os ciclos de pressurização e despressurização do ar poderiam substituir os mecanismos tradicionais de mistura, porque promovem a evaporação e o arrefecimento do leite. O fornecimento de O<sub>2</sub> dentro do substrato também poderia ser facilitado. Além disso, os ciclos podem ser alterados de acordo com as diferentes velocidades de produção de calor metabólico durante as diferentes fases da fermentação.

Em um experimento de produção de pectinases, foi utilizado *Aspergillus niger* AS3.3289 inoculado em um substrato contendo 90% de farelo de trigo, 5% de farelo de arroz, 2% de casca de laranja em pó e 3% de farinha de milho. O ciclo de pressão utilizado foi de 0,07 MPa por 2 minutos seguido por 0,015 MPa por 58 minutos.

A atividade pectinolítica obtida no biorreator GDD foi de 17000 U g-substrato-seco<sup>-1</sup>, medida pela liberação de açúcares redutores, com incubação a 50°C por 30 min. Esta atividade foi 1,83 vezes maior do que a atividade pectinolítica obtida num biorreator de bandeja tradicional. Além disso, a variação de temperatura no leite no biorreator GDD foi menor, sendo de 1,33°C no biorreator GDD e de 4,83°C em biorreator de bandeja. Entretanto, não são apresentadas no artigo as condições em que foi realizado o ensaio no biorreator de bandeja, tais como a quantidade de substrato e a altura do leite. Sabe-se apenas que foi realizado em frascos. De fato, foi incoerente fazer a comparação com um biorreator de bandejas, que reconhecidamente sofre de limitações severas na transferência de massa e calor.

He e Chen (2013) listaram algumas desvantagens do biorreator GDD, principalmente na escala industrial. Entre elas há a baixa produtividade volumétrica, uma vez que é necessário um biorreator de 800 L para o cultivo de somente 15 kg de substrato seco. Outras desvantagens são o alto consumo de energia, a perda rápida de umidade e o alto risco de contaminação. Além disso, o custo de mão de obra tornaria este processo economicamente inviável, uma vez que o seu funcionamento é semelhante ao biorreator de bandeja e, portanto, requer mão de obra intensiva.

### 3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

#### 3.1 JUSTIFICATIVA

A FES pode permitir uma alta produtividade na produção de vários metabólitos, porém, sua aplicação comercial é limitada devido às dificuldades no projeto e operação de biorreatores em larga escala. No caso específico da produção de pectinases por esta técnica, poucos trabalhos foram realizados em escalas que utilizam mais do que 1 kg de substrato.

Conforme descrito na seção anterior, os trabalhos em maiores escalas não fornecem informações que possam ser usadas para guiar o escalonamento deste processo, nem de escala de bancada para escala piloto e menos ainda de escala piloto para escala industrial.

#### 3.2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi de realizar a ampliação de escala da produção de pectinases em FES, da escala laboratorial até a escala piloto, sendo os objetivos específicos:

- Otimizar as condições de cultivo em frascos Erlenmeyer;
- Obter dados de velocidade de consumo de oxigênio e de produção de pectinases em biorreator de colunas;
- Realizar cultivos em biorreator de escala piloto.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram os fungos filamentosos *Aspergillus niger* CH4 e *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01. A linhagem *A. niger* CH4 foi cedida pelo Prof. Dr. Jesus Cordova, da Universidad de Guadalajara, México e a linhagem *A. oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01 foi isolada por Biz (2012), a partir da casca do maracujá.

### 4.2 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Para manutenção, as culturas estoque foram repicadas em meio batata dextrose ágar (BDA) e incubados a 30 °C durante três dias. Após este período, os esporos foram armazenados a 4°C, por até três meses, antes de um novo repique. Além disso, foram coletados esporos de cada linhagem com uma solução estéril de glicerol 15% (v/v) para a manutenção a -20°C.

### 4.3 PROCEDIMENTOS GERAIS

#### 4.3.1 Substratos

Foram utilizados como substratos os resíduos agroindustriais bagaço de laranja, farelo de trigo e bagaço de cana.

O bagaço de laranja, proveniente da extração do suco, foi fornecido pela Cooperativa agroindustrial Corol de Rolândia-PR, o farelo de trigo foi fornecido pela

Anaconda Industrial e Agrícola de Cereais S.A. de Curitiba-PR e o bagaço de cana foi fornecido pela Indústria Melhoramentos de Jussara-PR.

O bagaço de cana foi peneirado para obtenção de partículas entre 1 e 1,7 mm e o bagaço de laranja foi seco em estufa de circulação de ar a 70°C por 48 h e triturado em moinho de facas, utilizando peneira de 6 mm.

#### 4.3.2 Preparo do inóculo

Para o preparo da suspensão de esporos, as cepas foram crescidas em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BDA, durante 3 dias em estufa a 30°C. A coleta dos esporos foi feita com a adição de 40 mL de água destilada estéril e com a raspagem do micélio com um bastão de vidro. A suspensão de esporos foi filtrada para remover resíduos de meio e micélio através de um funil recoberto com tecido perfurado (tule). A determinação do número de esporos por mL no filtrado foi feita por contagem em Câmara de Neubauer.

#### 4.3.3 Extração

O extrato bruto dos sólidos fermentados foi obtido adicionando-se, a cada 1 g de substrato seco, 20 mL de tampão acetato (200 mM, pH 4,5). A extração foi feita a 180 rpm e 30°C, por 30 min.

#### 4.3.4 Determinação da atividade pectinolítica

A liberação de açúcares redutores foi analisada utilizando o método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959), conforme as modificações de Embrapa (2009). Foi utilizada uma curva-padrão de ácido D-galacturônico variando de 0 a 2 g L<sup>-1</sup>. Para os ensaios enzimáticos, 0,25 mL de extrato bruto foram incubados

com 0,25 mL de solução de 1% de pectina cítrica (m/v) (Sigma, 75% de metilação), por 20 min a 30°C. Após a incubação, foram adicionados 0,5 mL do reagente de DNS e a mistura foi fervida por 5 min. A mistura foi transferida para um banho de gelo e foram adicionados 4 mL de água destilada. Como controle, foi utilizado um ensaio onde foi adicionada a solução de substrato apenas após a incubação. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Todos os ensaios foram feitos em triplicata. A atividade pectinolítica foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de ácido D-galacturônico liberado por minuto (U), por grama de substrato sólido seco.

#### 4.3.5 Determinação da umidade

A umidade foi determinada em uma balança de infravermelho (Gehaka), utilizando 3,0 g de amostra. A temperatura utilizada foi de 105°C e a medida foi programada para terminar quando a variação entre leituras de massa subsequentes fosse menor que 0,2% em 15 s. A umidade é dada em % m/m, base úmida.

#### 4.3.6 Determinação da velocidade de consumo de oxigênio

A velocidade de consumo de oxigênio (“oxygen uptake rate”, OUR,  $\mu\text{mol-O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) foi calculada como segue:

$$\text{OUR} = \frac{V(C_{\text{in}} - C_{\text{out}})}{M} \quad (3)$$

onde:

$V$  = Vazão volumétrica de ar seco ( $\text{m}^3 \text{ h}^{-1}$ )

$C_{\text{in}}$  = Fração molar de oxigênio no ar seco da entrada ( $\mu\text{mol-O}_2 \mu\text{mol-ar-seco}^{-1}$ )

$C_{\text{out}}$  = Fração molar de oxigênio no ar seco da saída ( $\mu\text{mol-O}_2 \mu\text{mol-ar-seco}^{-1}$ )

$M$  = Massa de substrato sólido seco no biorreator (g)

Para a obtenção de OUR em  $\mu\text{mol-O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , a vazão volumétrica de ar seco (V) foi transformada em vazão molar de ar seco (n,  $\mu\text{mol-ar-seco h}^{-1}$ ):

$$n = \frac{P V}{R T} f \quad (4)$$

onde:

P = Pressão em Curitiba (Pa)

R = Constante universal dos gases ( $8,314 \text{ m}^3 \text{ Pa K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ )

T = Temperatura (K)

f = fator de conversão de mol para  $\mu\text{mol}$  ( $10^6$ )

#### 4.3.7 Determinação do erro padrão da média

O erro padrão da média mede a precisão da média amostral e foi calculado como segue:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

onde:

s = desvio padrão

n = tamanho da amostra

O desvio padrão (s) foi calculado pela fórmula:

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (6)$$

#### 4.4 CULTIVOS EM FRASCOS ERLLENMEYER

Neste trabalho, foram utilizadas condições identificadas por Biz (2012). No seu trabalho, foram identificadas duas combinações de substrato e cepas que apresentaram as melhores atividades pectinolíticas, sendo elas: (1) Farelo de trigo e bagaço de cana para *Aspergillus niger* CH4 e (2) Bagaço de laranja e bagaço de cana para *Aspergillus oryzae* CPQBA 394-12 DRM 01.

##### 4.4.1 Delineamento composto central rotacional

Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), utilizando a metodologia de superfície de resposta para avaliar a influência conjunta das variáveis umidade ( $X_1$ ), concentração de sulfato de amônio ( $X_2$ ) e proporção de cada substrato ( $X_3$ ) na resposta atividade pectinolítica.

No delineamento, foi utilizado um planejamento  $2^3$  com adição de 6 pontos axiais (+1,68 e -1,68) e 3 pontos centrais (0), totalizando 17 experimentos (TABELA 2). O delineamento experimental foi realizado em duplicata.

Na TABELA 3, são mostrados os níveis reais e codificados das variáveis estudadas para *A. niger* e *A. oryzae*.

Os resultados foram analisados pelo software *Statistica* versão 10 (StatsoftTM), onde os efeitos das variáveis e os respectivos erros foram calculados a um limite de confiança de 95%. Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e o cálculo dos valores de F do Teste de Fisher, para a avaliação da significância do modelo. As Curvas de Contorno e as Superfícies de Respostas foram obtidas para a definição das faixas ótimas operacionais de cada variável.

TABELA 2 – MATRIZ DE PLANEJAMENTO DCCR

ENSAIOS	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	+1	-1	-1
2	-1	-1	-1
3	+1	+1	-1
4	-1	+1	-1
5	+1	-1	+1
6	-1	-1	+1
7	+1	+1	+1
8	-1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11		-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

TABELA 3 – PARÂMETROS E NÍVEIS UTILIZADOS NOS PLANEJAMENTOS PARA *A. oryzae* E PARA *A. niger*

VARIÁVEL	(-1,68)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,68)
<b><i>Aspergillus oryzae</i></b>					
X <sub>1</sub> : Umidade (% m/m, base úmida)	61,6	65	70	75	78,4
X <sub>2</sub> : (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% m/m)*	2,55	3,3	4,4	5,5	6,25
X <sub>3</sub> : Bagaço de Laranja (% m/m)	51,6	55	60	65	68,4
<b><i>Aspergillus niger</i></b>					
X <sub>1</sub> : Umidade (% m/m, base úmida)	61,6	65	70	75	78,4
X <sub>2</sub> : (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% m/m)*	0	0,88	2,2	3,52	4,4
X <sub>3</sub> : Farelo de trigo (% m/m)	66,2	73	83	93	100

\* A concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é dada em relação à quantidade de substrato seco.

#### 4.4.2 Cultivos em frascos Erlenmeyer

Foram colocados 5 g de substrato seco, na composição definida no planejamento DCCR, em cada frasco Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram arrolhados com tampão de algodão, e esterilizados em autoclave (120°C por



15 min). A suspensão de esporos foi adicionada ao substrato estéril no volume necessário para atingir a concentração adequada de esporos ( $10^7$  esporos por grama de substrato seco) e, a seguir, foi feita a adição da solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , de modo que a umidade inicial do substrato e a concentração de sulfato de amônio atingissem o valor estipulado no planejamento. O substrato inoculado e umidificado foi misturado com um bastão de vidro. Os frascos foram incubados em estufa a  $30^\circ\text{C}$  por 18 h. A extração e a determinação da atividade pectinolítica foram realizadas conforme descrito nas seções 4.3.3 e 4.4.4.

Também foram realizadas cinco repetições de um cultivo padrão, que representa as condições de cultivo que eram usadas rotineiramente no laboratório para produzir pectinases por *A. oryzae* e *A. niger* (BIZ, 2012). As condições utilizadas foram: 70% de umidade, solução salina composta de (em % m/v)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,3,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5, KCl 1,0,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,09 e substrato composto de 70% de bagaço de laranja e 30% de bagaço de cana para *A. oryzae* e 70% de farelo de trigo e 30% de bagaço de cana para *A. niger*.

## 4.5 BIORREATOR DE COLUNAS

### 4.5.1 Descrição do biorreator de colunas

O biorreator de colunas encontra-se nas instalações do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise, localizado no prédio do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Auto-Sustentável (NPDEAS), na Universidade Federal do Paraná (UFPR). Este sistema consiste em um banho termostaticado, onde ficam submersas colunas de vidro de 20 cm de altura por 4 cm de diâmetro interno, com capacidade para 10-20 g de substrato seco (FIGURA 4). Ar úmido é forçado pela parte inferior da coluna. Na saída da coluna, o ar é seco pela passagem em coluna de sílica e analisado por um sensor de  $\text{O}_2$  CI-6562 (PASCO Scientific), que está conectado a uma interface ScienceWorkshop 750. O software DataStudio (PASCO Scientific) é utilizado para a coleta e registro dos dados.

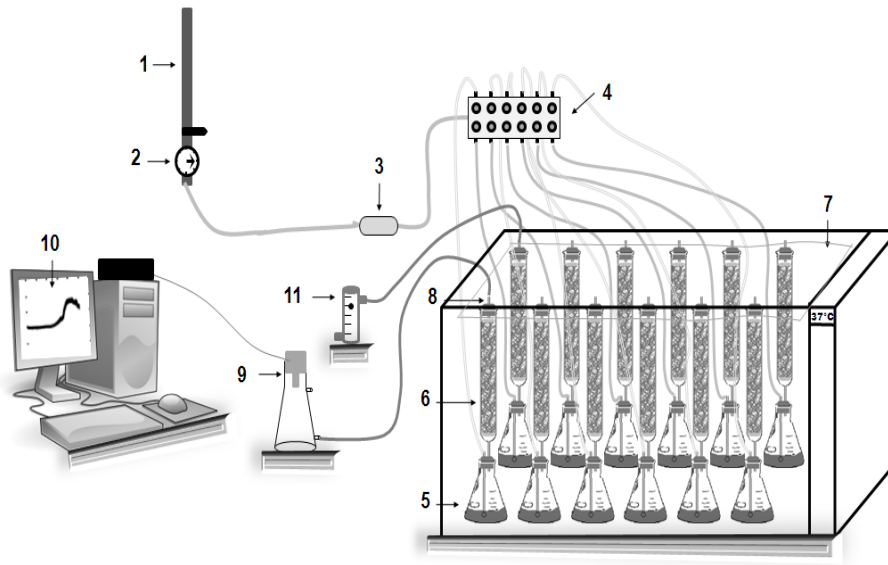


FIGURA 4 – BIORREATOR DE COLUNAS (1) ar comprimido; (2) regulador de pressão de ar; (3) filtro de ar; (4) distribuidor de ar; (5) umidificador; (6) colunas; (7) banho termostatizado; (8) saída de ar da coluna; (9) sensor de O<sub>2</sub>; (10) software para aquisição de dados  
 FONTE: SLIVINSKI (2012)

#### 4.5.2 Cultivos em biorreator de colunas

A TABELA 4 mostra as condições utilizadas nos cultivos feitos no biorreator de colunas com *A. niger* e com *A. oryzae*.

TABELA 4 – CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA *A. niger* E PARA *A. oryzae* EM BIORREATOR DE COLUNAS

CONDIÇÕES DE CULTIVO	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
Umidade (%m/m, base úmida)	61,6	78,4
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% m/m)*	4,4	3,48
Substrato	100% Farelo de trigo	51,6% bagaço de laranja e 48,4% bagaço de cana

\* A concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é dada em relação à quantidade de substrato seco.

Porções de 12 g de substrato foram autoclavadas (15 min, 120°C) e inoculadas com uma suspensão de esporos com uma concentração de esporos suficiente para dar 10<sup>7</sup> esporos por grama de substrato seco. Foi adicionada, ao substrato, solução contendo (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, suficiente para ajustar a umidade e a

concentração de sulfato de amônio para os valores desejados. As colunas de vidro foram preenchidas com o substrato (FIGURA 5) e afixadas no banho maria termostaticado do biorreator de colunas. O cultivo ocorreu a 30°C, com fornecimento de ar saturado com vapor de água na vazão de 100 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup> para cada coluna.

O consumo de O<sub>2</sub> foi monitorado continuamente durante os cultivos. Para a retirada de amostra, foi sacrificada uma coluna para cada tempo de cultivo e a extração, a determinação da atividade pectinolítica e a determinação da umidade foram realizadas conforme descrito nas seções 4.3.3, 4.3.4 e 4.3.5.



FIGURA 5 – COLUNA ENCAIXADA NO UMIDIFICADOR DE AR CULTIVADA COM *A. oryzae* EM BAGAÇO DE LARANJA E BAGAÇO DE CANA  
FONTE: A AUTORA

#### 4.6 CULTIVOS NO BIORREATOR PILOTO

Foram realizados três cultivos em biorreator piloto utilizando *A. niger*, com diferenças na composição do substrato sólido e na altura do leito.

#### 4.6.1 Descrição do Biorreator piloto

O biorreator tem capacidade para um leito de 200 L e está localizado na Usina Piloto A, do Setor de Tecnologia da UFPR. Consiste em um cilindro de aço inox AISI 306, onde o substrato fica sobre uma base retangular perfurada, com furos de 1 mm. O ar é injetado abaixo da base e flui no sentido do fundo para o topo do leito (FIGURA 6).

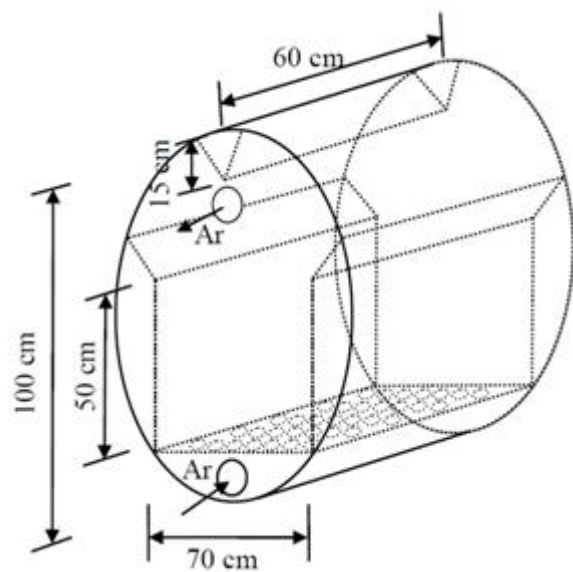


FIGURA 6 – BIORREATOR PILOTO  
 FONTE: BARGA (2007)

O biorreator pode permanecer estático e, portanto, pode funcionar como biorreator de leito fixo, ou pode ser agitado intermitentemente, por meio da rotação ao redor do seu próprio eixo, com auxílio de um motor de velocidade controlável.

Na FIGURA 7 é apresentado um esquema de funcionamento do biorreator. A aeração é realizada através de um soprador que capta o ar do lado externo do prédio. A vazão é controlada através de uma válvula e registrada por um medidor de vazão. O ar é, então, filtrado por um sistema de lã de vidro seguido de microfiltro pregueado com poros de 0,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro antes de chegar ao sistema de umidificação.

O sistema de umidificação é composto por duas caixas de água, de 1200 L cada, e uma torre de umidificação. Uma das caixas é mantida na temperatura ótima de cultivo (30°C), enquanto a outra é mantida em uma temperatura mais baixa (20 a

25°C). Nos dois banhos, o aquecimento da água é feito por duas resistências de 1500 W e controlado por termostato. Conforme a necessidade do processo, é possível controlar qual das caixas alimentará a torre de umidificação pelo acionamento da bomba 1 ou da bomba 2. A bomba transfere a água da caixa selecionada para o topo da torre de umidificação, na qual o ar passa em contracorrente.

O ar sai do topo da torre de umidificação, com umidade relativa aproximada de 99% e temperatura semelhante a da água da caixa selecionada (ou seja, cuja bomba foi acionada). O ar é direcionado para o fundo do biorreator e, após atravessar o leito e sair do biorreator, é encaminhado para a lavadora de gases, que contém uma solução de água e hipoclorito de sódio 10% (v/v).

Uma fração do ar de saída do biorreator é enviada para a análise de oxigênio por um analisador de gases EX-2000 (New Brunswick Scientific), através de um sensor de óxido de zircônia com capacidade de leitura de concentração de  $O_2$  de 0% até 25%.

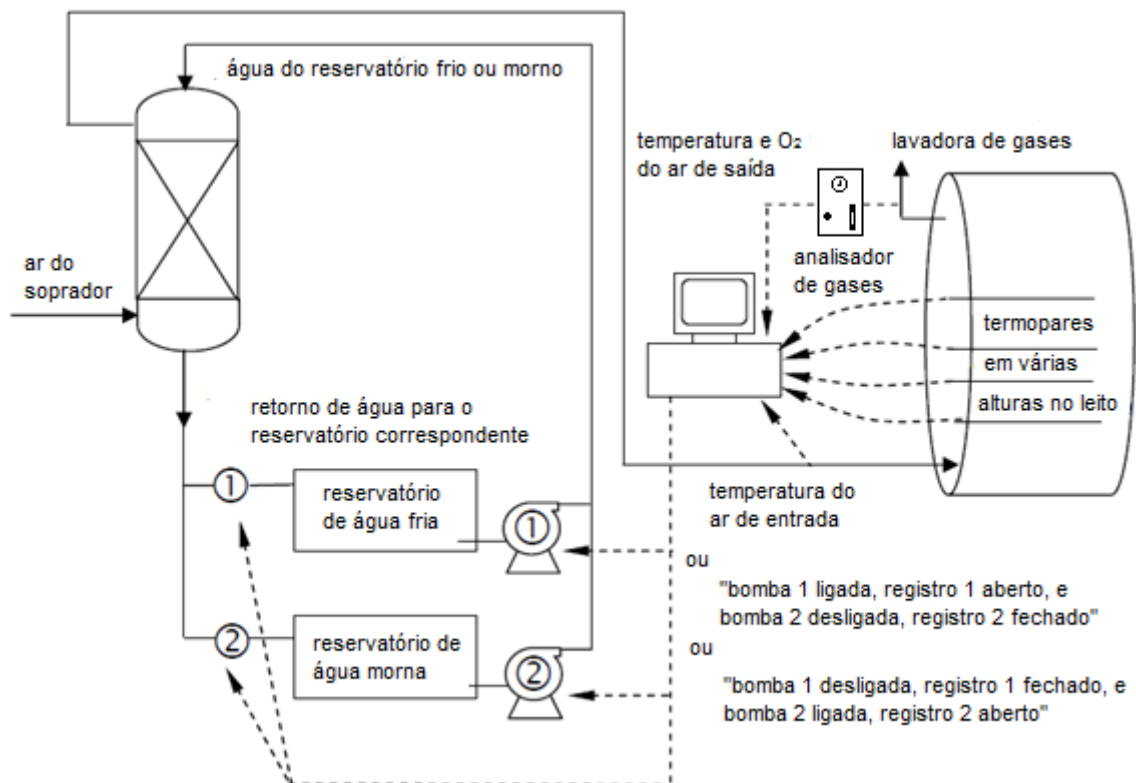


FIGURA 7 – ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DO BIORREATOR PILOTO

Para a medição da temperatura, o biorreator possui quatro pontos de medição instalados nas alturas de 5, 18, 33 e 46 cm ao longo do eixo vertical. Cada ponto deste contém quatro termopares do tipo T que foram dispostos horizontalmente, um seguido do outro, ao longo do biorreator (FIGURA 8). O biorreator possui também termopares posicionados na entrada e na saída do ar.

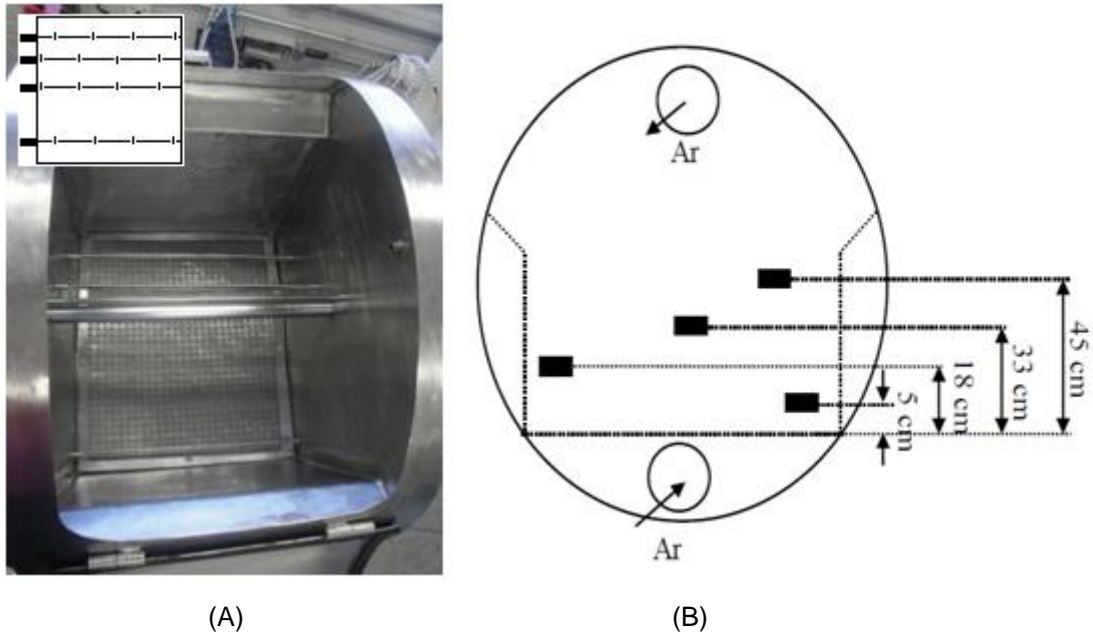


FIGURA 8 – DISPOSIÇÃO DOS TERMOPARES NO INTERIOR DO BIORREATOR (A) Disposição dos termopares ao longo do eixo horizontal (B) disposição dos termopares ao longo do eixo vertical  
 FONTE: BARGA (2007)

#### 4.6.2 Condições operacionais dos cultivos

O biorreator permaneceu estático e com aeração forçada durante todos os cultivos. A temperatura do ar na entrada do biorreator e a temperatura do banho usado para alimentar a torre de umidificação foram mantidas constantes durante todo o cultivo, nos valores de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  e  $32 \pm 2^\circ\text{C}$ , respectivamente. Com isto, foi utilizada somente uma das caixas de água. A vazão do ar também foi mantida constante em  $150 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ , o que resulta em uma velocidade superficial do ar de  $0,1 \text{ m s}^{-1}$ .

#### 4.6.3 Calibração dos termopares

No procedimento de calibração, os módulos de transmissão de dados foram ligados com 30 min de antecedência para o equilíbrio dos componentes. Em seguida, o biorreator foi preenchido com água e a temperatura verificada com termômetro de mercúrio. O valor lido foi comparado com o apresentado pelo programa Bio2fase, elaborado no *software Labview* (National Instruments) por Barga (2007). O valor da diferença entre a temperatura da água medida no termômetro e a temperatura registrada pelo programa foi inserida no programa como fator de correção.

#### 4.6.4 Calibração do analisador de gases

A calibração do sensor de oxigênio foi realizada com ar atmosférico da parte externa do prédio (20,9%). O equipamento foi ligado 30 min antes da calibração com vazão entre 0,5 e 1,0 L min<sup>-1</sup>. Após este período, foi verificado se a medida apresentada no *software Labview* era igual ao valor da concentração de oxigênio no ar atmosférico. Caso fosse diferente, era realizado um ajuste no potenciômetro até a obtenção da concentração correta.

#### 4.6.5 Limpeza do biorreator e do sistema de umidificação

A limpeza do biorreator foi realizada com esponja e detergente neutro. Após o enxágue, foi utilizado o sanificante líquido Peracid (AEB Group), a base de ácido peracético e peróxido de hidrogênio, em uma solução 0,5% (v/v). Com a ajuda de um borrifador, o sanificante foi aplicado em toda a superfície e utensílios e, após 30 min, foi realizado um enxágue para a retirada dos resíduos do produto.

As caixas de água do sistema de umidificação foram limpas com detergente neutro e, após o enxágue, foi adicionado 1 L de solução de hipoclorito de sódio com

10% de cloro ativo em 1000 L de água. As bombas das caixas foram acionadas para a homogeneização da solução por 5 min e, em seguida, foram abertas as válvulas da torre de umidificação por uma hora para a circulação da solução.

#### 4.6.6 Preparo do inóculo para a escala piloto

Foram feitos cultivos, em FES, utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL, cada um com 10 g de substrato (massa seca). O substrato era composto de 70% farelo de trigo e 30% de bagaço de cana (por massa) e foi umedecido com água destilada estéril contendo 4,4% (m/m, baseado na massa de substrato seco) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , suficiente para obtenção de uma umidade de 50% (m/m, base úmida) e de um conteúdo de 4,4% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Estes cultivos foram inoculados com a suspensão de esporos descrita na seção 4.3.2, com uma concentração final de esporos no meio sólido de  $10^7$  esporos por grama de substrato seco. Os cultivos foram incubados a  $30^\circ\text{C}$  até que houvesse a esporulação (aproximadamente 7 dias). Os esporos do substrato fermentado foram ressuspensos em água destilada estéril e a suspensão de esporos foi filtrada para remover resíduos de substrato através de um funil recoberto com gase estéril. A determinação do número de esporos por mL foi feita pela contagem em Câmara de Neubauer.

#### 4.6.7 Cultivos no biorreator piloto

Os três cultivos realizados em biorreator piloto seguiram as condições apresentadas na TABELA 5. Para a realização destes cultivos, o substrato sólido, a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e o restante da água necessária para se obter a umidade requerida foram autoclavados em autoclave de 300 L (2 h,  $120^\circ\text{C}$ ). O substrato sólido foi autoclavado em lotes de 5 kg (massa seca) em sacos plásticos resistentes à autoclavagem. Após a autoclavagem, o substrato sólido, a água, a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e a solução de esporos com uma concentração de esporos suficiente para dar  $4 \times 10^{11}$  esporos por grama de substrato seco foram adicionadas ao



biorreator piloto. O biorreator foi mantido sob agitação durante 30 min, para a homogeneização do meio de cultivo. Após este período, a superfície do leito foi nivelada utilizando um rastelo, e o biorreator foi então fechado e o sistema de umidificação e circulação do ar acionados.

Durante os cultivos, foram monitorados continuamente o consumo de O<sub>2</sub>, as temperaturas em várias posições do leito e a temperatura do ar de entrada e saída. Como não houve diferença de temperatura na direção horizontal, a temperatura em cada altura do leito foi dada como a média dos quatro termopares dispostos horizontalmente. Foram removidas amostras, dos locais identificados na próxima seção, para determinação da atividade pectinolítica e da umidade do sólido. A obtenção do extrato bruto, a determinação da atividade pectinolítica do sólido, a determinação da umidade do sólido e a determinação da velocidade de consumo de O<sub>2</sub> foram realizadas conforme descrito nas seções 4.3.3, 4.3.4, 4.3.5 e 4.3.6, respectivamente.

TABELA 5 – CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA *A. niger* EM BIORREATOR PILOTO NOS TRÊS CULTIVOS REALIZADOS

CONDIÇÕES DE CULTIVO	1º CULTIVO	2º CULTIVO	3º CULTIVO
Umidade (% m/m, base úmida)	61,6	61,6	61,6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% m/m)*	4,4	4,4	4,4
Farelo de trigo (% m/m)	100	90	90
Bagaço de cana (% m/m)	0	10	10
Substrato sólido seco (kg)	20	20	30
Altura do leito (cm)	23	27	40

\* A concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é dada em relação à quantidade de substrato seco.

#### 4.6.8 Amostragens

Durante o cultivo, foram coletadas amostras da região superior do leito. No primeiro cultivo, foram retiradas amostras sem ordem definida na superfície do leito e no segundo e terceiro cultivo, a retirada de amostra seguiu a ordem C3, C1, C2 e C4 (FIGURA 9A), que se repetiu até o final do cultivo. No final do segundo e do terceiro cultivo, foram retiradas amostras de diferentes posições e alturas do leito, sendo

elas nas posições horizontais C1, C2, C3, C4 e C5 e nas posições verticais nas frações de altura 0,0 (base), 0,5 (meio) e 1,0 (topo) (FIGURA 9 A, B e C).

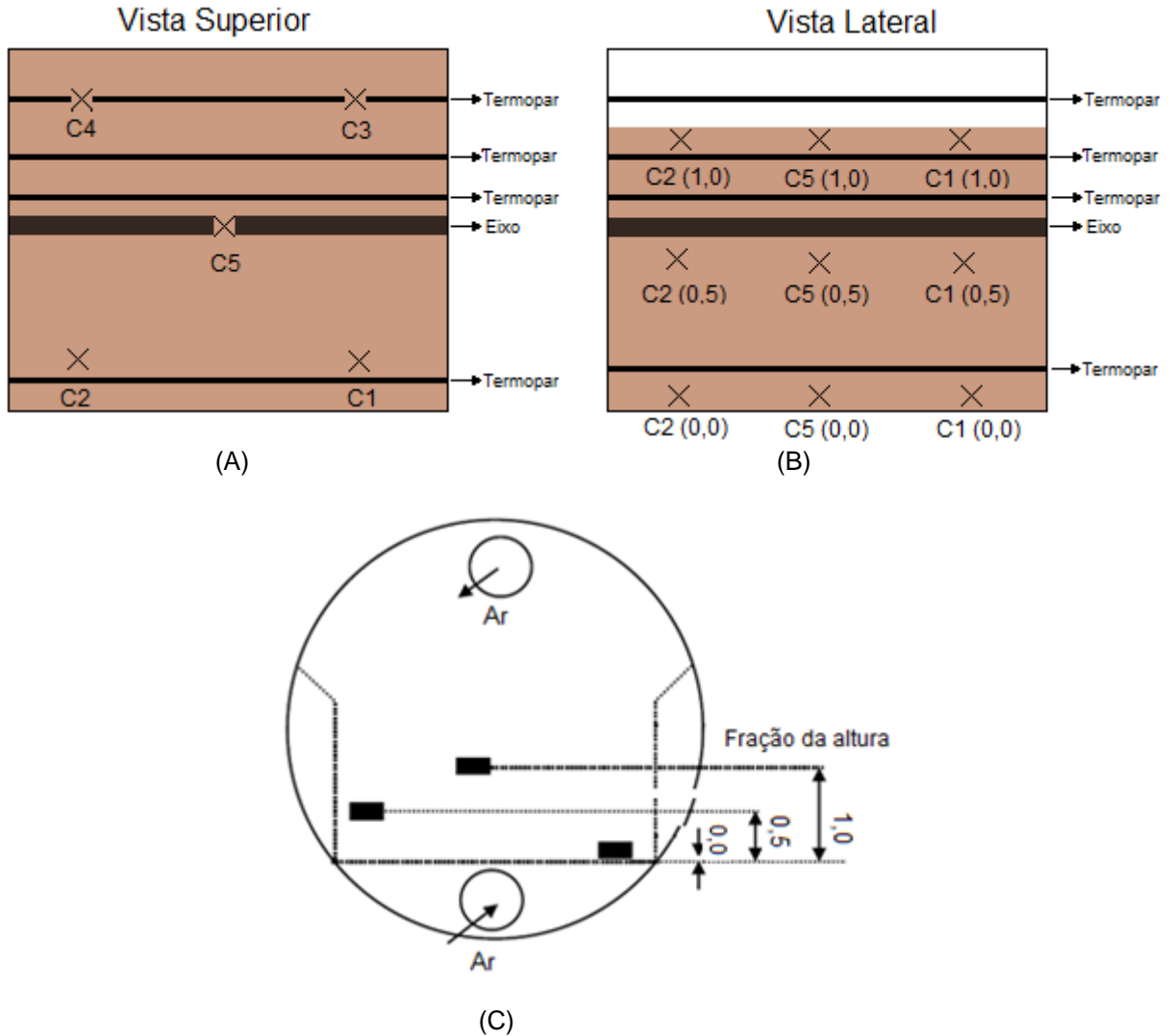


FIGURA 9 – LOCAIS DE RETIRADA DAS AMOSTRAS NO LEITO (A) desenho da vista superior do leito indicando os locais de coleta de amostras ao longo do eixo horizontal, (B) desenho da vista lateral do leito indicando os locais de coleta de amostras ao longo do eixo vertical e (C) desenho da vista lateral do biorreator indicando as frações da altura onde foram retiradas as amostras

FONTE: A AUTORA

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, os valores de atividade pectinolítica, de produtividade, de velocidade de consumo de oxigênio e de velocidade de produção de calor metabólico são dados por grama de substrato sólido seco.

### 5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

#### 5.1.1 Otimização das condições de cultivo para *Aspergillus oryzae*

No estudo de otimização das condições de cultivo para a produção de pectinases por *A. oryzae* em FES, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Foram estudados os efeitos das variáveis umidade inicial (% m/m, base úmida), concentração de sulfato de amônio (% m/m, substrato seco) e proporção de bagaço de laranja no substrato sólido sobre a resposta atividade pectinolítica (TABELA 6).

As atividades pectinolíticas obtidas variaram de 0,6 a 28,1 U g<sup>-1</sup> e as previsões do modelo ficaram próximos aos valores experimentais.

O diagrama de Pareto (FIGURA 10) mostra que somente os efeitos lineares foram significativos a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A variável que apresentou o maior efeito foi a umidade inicial, com um efeito positivo sobre a atividade pectinolítica. Já a concentração de sulfato de amônio e a proporção de bagaço de laranja apresentaram efeitos negativos, ou seja, quanto maior os seus níveis, menor é a atividade pectinolítica.

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, foi obtida a equação linear que descreve a resposta:

$$Y = -35,12 + 1,20X_1 - 0,92X_2 - 0,54X_3 \quad (7)$$

onde Y é a atividade pectinolítica ( $U\ g^{-1}$ ) e  $X_1$ ,  $X_2$ , e  $X_3$  são os valores decodificados para as variáveis umidade, concentração de sulfato de amônio e proporção de bagaço de laranja, respectivamente.

TABELA 6 – MATRIZ DO DCCR PARA *A. oryzae*

ENSAIOS	$X_1$ UMIDADE (% m/m)*	$X_2$ ( $NH_4$ ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% m/m)*	$X_3$ BAGAÇO DE LARANJA (%m/m)*	CULTIVO 1 ATIVIDADE ( $U\ g^{-1}$ )	CULTIVO 2 ATIVIDADE ( $U\ g^{-1}$ )	ATIVIDADE PREDITA PELO MODELO ( $U\ g^{-1}$ )
1	65 (-1)	3,3 (-1)	55 (-1)	11,3	14,4	10,6
2	75 (1)	3,3 (-1)	55 (-1)	22,2	17,5	22,7
3	65 (-1)	5,5 (1)	55 (-1)	8,8	6,8	8,6
4	75 (1)	5,5 (1)	55 (-1)	24,5	23,6	20,7
5	65 (-1)	3,3 (-1)	65 (1)	5,5	6,0	5,3
6	75 (1)	3,3 (-1)	65 (1)	16,8	17,5	17,3
7	65 (-1)	5,5 (1)	65 (1)	2,6	3,6	3,2
8	75 (1)	5,5 (1)	65 (1)	14,6	14,2	15,3
9	61,6 (-1,68)	4,4 (0)	60 (0)	0,6	7,7	2,9
10	78,4 (+1,68)	4,4 (0)	60 (0)	23,4	28,1	23,1
11	70 (0)	2,55 (-1,68)	60 (0)	16,2	14,0	14,7
12	70 (0)	6,25 (+1,68)	60 (0)	10,6	10,5	11,3
13	70 (0)	4,4 (0)	51,6 (-1,68)	14,0	15,7	17,5
14	70 (0)	4,4 (0)	68,4 (+1,68)	8,0	6,9	8,5
15	70 (0)	4,4 (0)	60 (0)	8,6	16,7	13,0
16	70 (0)	4,4 (0)	60 (0)	12,4	15,9	13,0
17	70 (0)	4,4 (0)	60 (0)	11,8	10,0	13,0

\* os valores codificados destas variáveis são dados entre parênteses

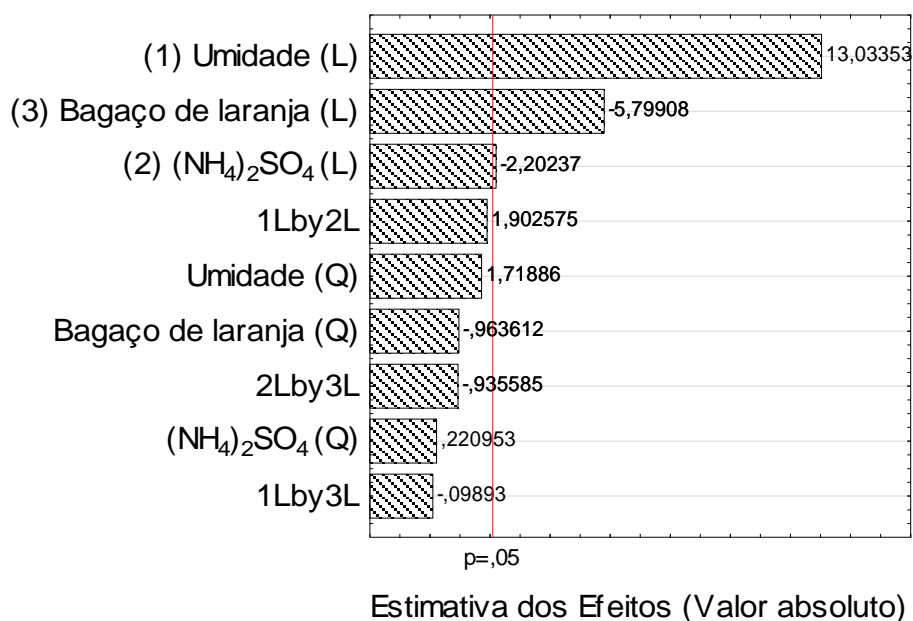


FIGURA 10 – DIAGRAMA DE PARETO PARA *A. oryzae*

O gráfico da distribuição dos resíduos (FIGURA 11A) mostra que os desvios estão distribuídos aleatoriamente. No gráfico dos valores observados versus os valores preditos (FIGURA 11B), os pontos estão próximos da reta diagonal, o que sugere que houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

A análise de variância (ANOVA) (TABELA 7) mostra que o modelo foi significativo a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), ou seja, F calculado foi maior que F tabelado. Além disso, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o modelo foi de 0,86. Este valor indica que 86% da variância da resposta é descrita pelo modelo.

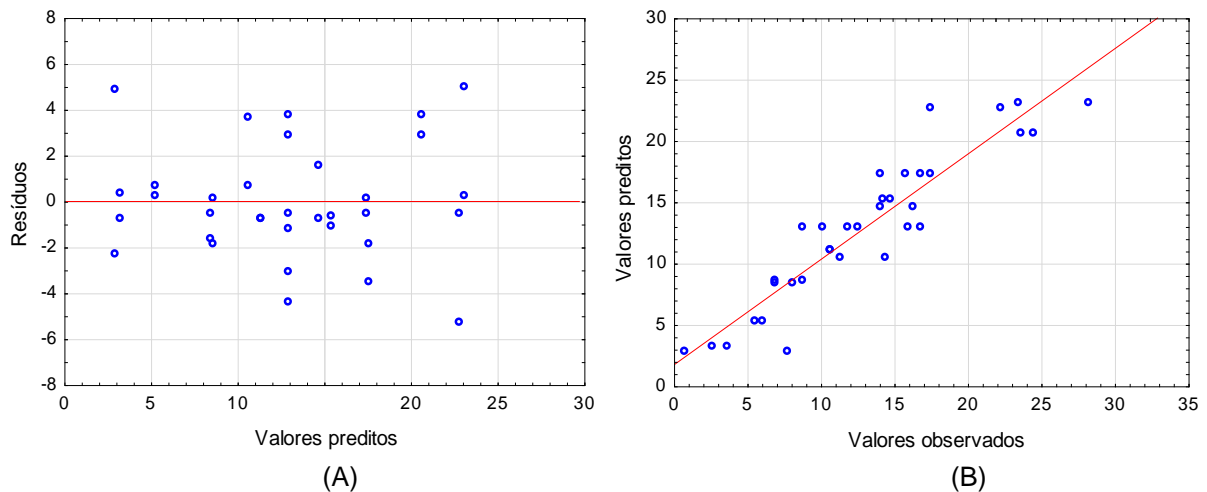


FIGURA 11 – GRÁFICOS DOS RESÍDUOS PARA *A. oryzae* (A) distribuição dos resíduos e (B) valores observados no experimento versus valores preditos pelo modelo.

TABELA 7 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO PARA *A. oryzae*

FATORES	SQ	GL	MÉDIA QUADRÁTICA	VALOR F CALC	VALOR F TAB	VALOR $p$
$X_1$ : Umidade (L)	989,872	1	989,872			0,000000
$X_2$ : $(NH_4)_2SO_4$ (L)	28,264	1	28,264			0,040189
$X_3$ : Bagaço de Laranja (L)	195,962	1	195,962			0,000014
Regressão (R)	1214,0984	3	404,699	61,023	2,92*	
Resíduos (r)	198,9566	30	6,632			
Falta de ajuste (FA)	88,241	11	8,022	1,063	2,34*	0,411213
Erro puro	110,716	19	5,827			
Total	1413,055	33	-			
$R^2$	0,859	-	-			

\*  $F_{\text{tab}}$  regressão (3,30);  $F_{\text{tab}}$  falta de ajuste (11,19)

Em função de o modelo ser preditivo e significativo, foi possível obter as superfícies de resposta e de contorno para a resposta atividade pectinolítica (FIGURA 12). As condições ótimas previstas pelo modelo para a produção de

pectinases são: 78,4% de umidade (m/m, base úmida), 3,48% (m/m, substrato seco) de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e substrato composto de 51,6% de bagaço de laranja e 48,4% de bagaço de cana. Nestas condições, o valor teórico para a atividade pectinolítica predito pelo modelo é de  $28,4 \text{ U g}^{-1}$ .

Para a validação do modelo, foi realizado um experimento nas condições otimizadas. O ensaio foi realizado com cinco repetições e a atividade média com o erro padrão da média obtida foi  $30 \pm 1 \text{ U g}^{-1}$ , que é próximo do valor predito pelo modelo. Este valor é o dobro do valor de  $15 \pm 1 \text{ U g}^{-1}$  obtido no cultivo padrão, que representa as condições de cultivo que eram usadas rotineiramente no laboratório para produzir pectinases por *A. oryzae*, antes deste estudo de otimização (BIZ, 2012).

A condição ótima para a umidade encontra-se no limite superior do planejamento (+1,68) e a proporção ótima de bagaço de laranja no limite inferior (-1,68). Isto indica que seria necessário um novo planejamento para tentar aumentar a produção de atividade pectinolítica ainda mais. Apesar de ser possível diminuir ainda mais a proporção de bagaço de laranja no meio, valores maiores do que 78,4% de umidade inicial acarretam na presença de água livre nos espaços entre as partículas do leite, o que torna o aumento deste valor inviável para FES. Portanto, optou-se por dar continuidade aos estudos de aumento de escala.

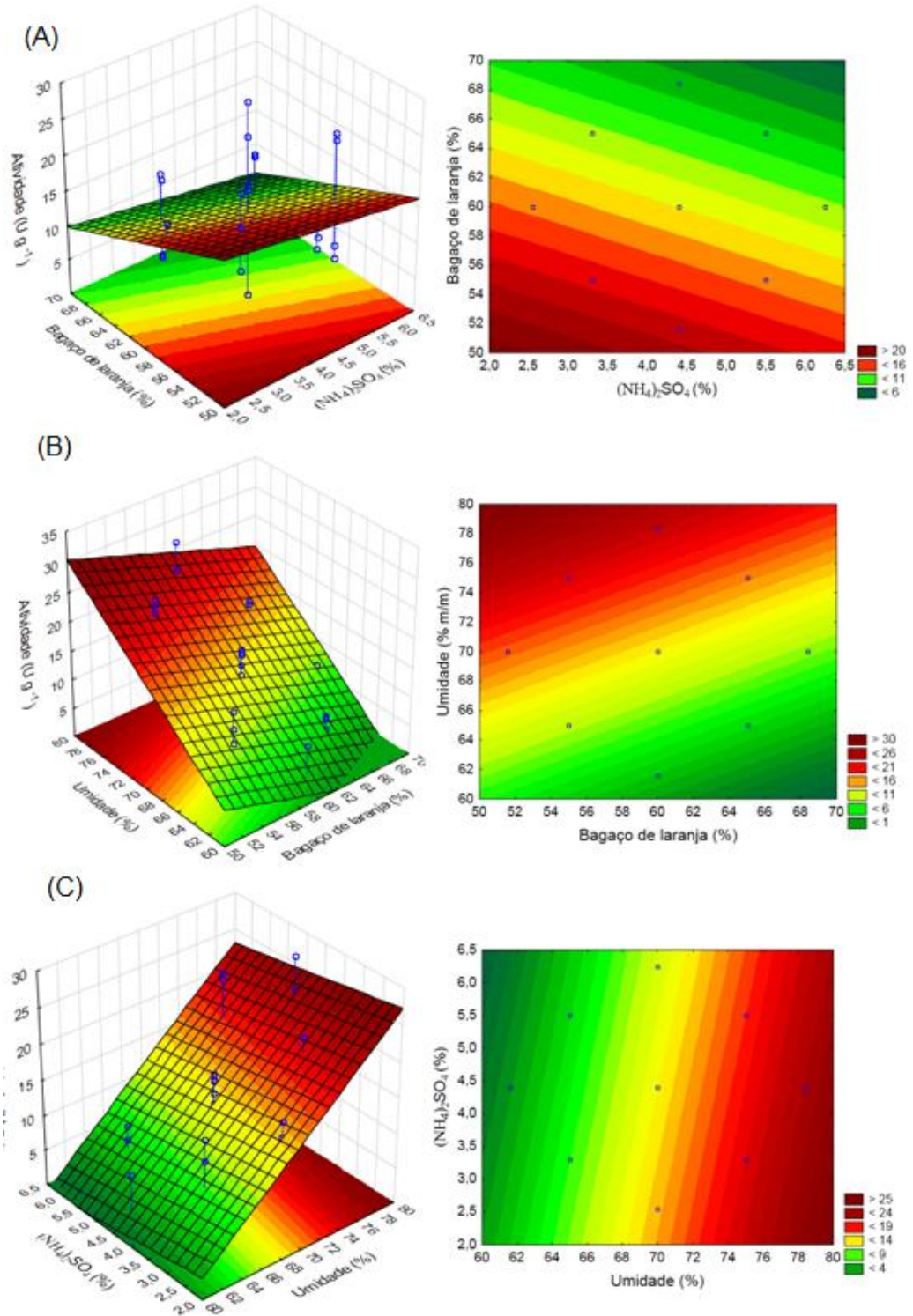


FIGURA 12 – CURVAS DE CONTOURO E SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA *A. oryzae* (A) proporção de bagaço de laranja e sulfato de amônio, (B) concentração de sulfato de amônio e umidade e (C) umidade e proporção de bagaço de laranja. Em todas as superfícies o valor da terceira variável foi fixado no ponto central (0)

### 5.1.2 Otimização das condições de cultivo para *Aspergillus niger*

No estudo de otimização das condições de cultivo para *A. niger*, foram estudados os efeitos das variáveis umidade inicial (% m/m, base úmida), concentração de sulfato de amônio (% m/m, substrato seco) e proporção de farelo de trigo no substrato sólido (TABELA 8).

A atividade pectinolítica obtida para *A. niger* foi semelhante à obtida para *A. oryzae* e apresentou menor variação, com atividade variando de 15,6 a 31,4 U g<sup>-1</sup>.

Todos os efeitos foram significativos a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), exceto os efeitos umidade quadrático, proporção de farelo de trigo quadrático e a interação entre a concentração de sulfato de amônio e a proporção de farelo de trigo (FIGURA 13). Para *A. niger*, assim como para *A. oryzae*, a variável que apresentou o maior efeito sobre a atividade pectinolítica foi a umidade inicial. No entanto, ao contrário de *A. oryzae*, a umidade apresentou um efeito negativo e a concentração de sulfato de amônio e a proporção de farelo de trigo apresentaram efeitos positivos.

TABELA 8 – MATRIZ DO DCCR PARA *A. niger*

ENSAIOS	X1 UMIDADE (% m/m)*	X2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% m/m)*	X3 FARELO DE TRIGO (% m/m)*	CULTIVO 1 ATIVIDADE (U g <sup>-1</sup> )	CULTIVO 2 ATIVIDADE (U g <sup>-1</sup> )	ATIVIDADE (U g <sup>-1</sup> ) PREVISTA PELO MODELO
1	65 (-1)	0,88 (-1)	73 (-1)	15,9	22,0	19,2
2	75 (1)	0,88 (-1)	73 (-1)	18,8	21,1	20,9
3	65 (-1)	3,52 (1)	73 (-1)	-	22,0	25,1
4	75 (1)	3,52 (1)	73 (-1)	19,8	25,7	20,8
5	65 (-1)	0,88 (-1)	93 (1)	23,0	23,3	24,5
6	75 (1)	0,88 (-1)	93 (1)	24,9	19,9	20,2
7	65 (-1)	3,52 (1)	93 (1)	31,4	29,6	30,3
8	75 (1)	3,52 (1)	93 (1)	19,8	19,5	20,1
9	61,6 (-1,68)	2,2 (0)	83 (0)	28,3	26,8	28,3
10	78,4 (+1,68)	2,2 (0)	83 (0)	17,9	15,6	21,1
11	70 (0)	0,0 (-1,68)	83 (0)	17,3	16,2	16,6
12	70 (0)	4,4 (+1,68)	83 (0)	22,3	20,3	21,4
13	70 (0)	2,2 (0)	66,2 (-1,68)	23,7	25,8	22,8
14	70 (0)	2,2 (0)	100 (+1,68)	27,3	28,2	26,6
15	70 (0)	2,2 (0)	83 (0)	27,1	22,1	24,7
16	70 (0)	2,2 (0)	83 (0)	29,2	27,2	24,7
17	70 (0)	2,2 (0)	83 (0)	25,3	21,5	24,7

\* os valores codificados destas variáveis são dados entre parênteses



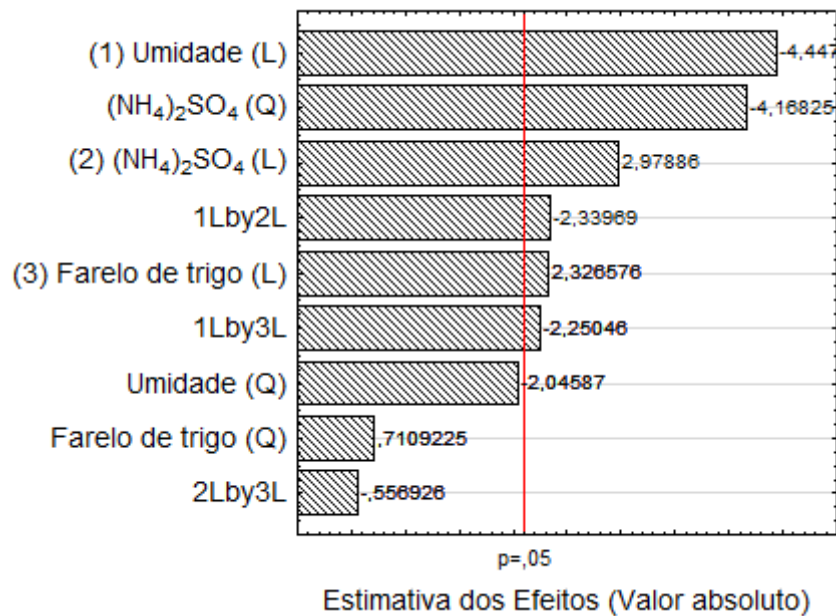


FIGURA 13 – DIAGRAMA DE PARETO PARA *A. niger*

Após a eliminação dos parâmetros não significativos, foi obtida a equação polinomial de segunda ordem que descreve a resposta atividade pectinolítica em função das variáveis estudadas:

$$Y = -168,57 + 2,51X_1 + 22,14X_2 + 2,17X_3 - 1,18X_2^2 - 0,23X_1X_2 - 0,003X_1X_3 \quad (8)$$

onde Y é a atividade pectinolítica e  $X_1$ ,  $X_2$ , e  $X_3$  são os valores decodificados para as variáveis umidade, concentração de sulfato de amônio e proporção de farelo de trigo, respectivamente.

No gráfico da distribuição dos resíduos (FIGURA 14A), os desvios estão distribuídos aleatoriamente. No entanto, os pontos no gráfico dos valores observados versus os valores preditos (FIGURA 14B), quando comparados com o gráfico obtido para *A. oryzae*, não estão tão próximos da reta diagonal, o que sugere que não houve um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

O modelo apresentou regressão significativa ao nível de 95% de confiança (TABELA 9). Porém, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de apenas 0,66.

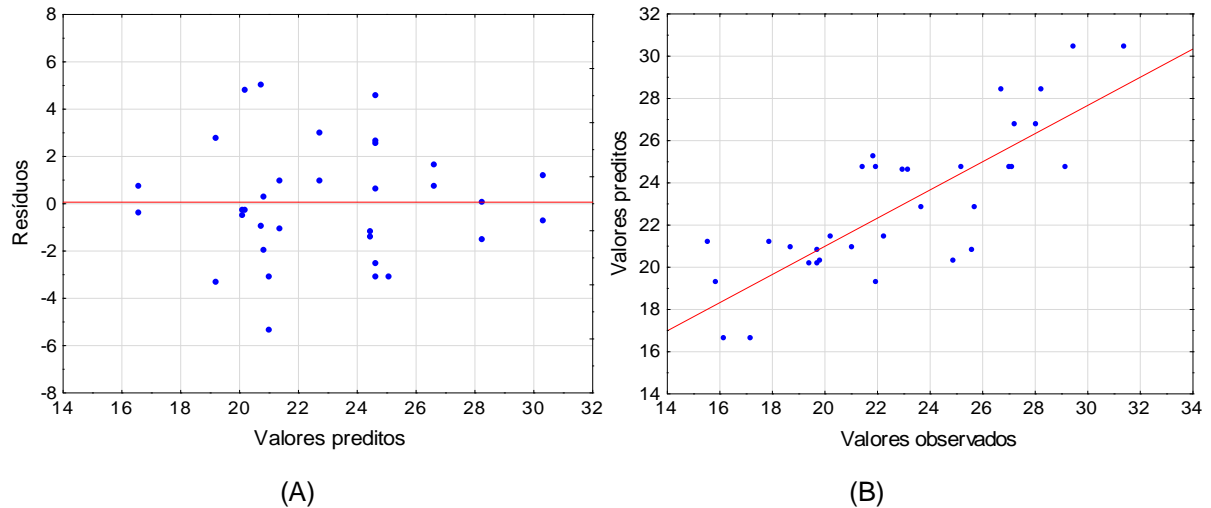


FIGURA 14 – GRÁFICOS DOS RESÍDUOS PARA *A. niger* (A) distribuição dos resíduos e (B) valores observados no experimento versus valores preditos pelo modelo

TABELA 9 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DO MODELO PARA *A. niger*

FATORES	SQ	GL	MÉDIA QUADRÁTICA	VALOR F CALC	VALOR F TAB	VALOR $p$
$X_1$ : Umidade (L)	120,316	1	120,316			0,000317
$X_2$ : $(NH_4)_2SO_4$ (L)	53,738	1	53,738			0,008269
$X_2$ : $(NH_4)_2SO_4$ (Q)	106,091	1	106,091			0,000578
$X_3$ : Farelo de Trigo (L)	34,143	1	34,143			0,029499
$X_1 X_2$	32,976	1	32,976			0,032053
$X_1 X_3$	31,895	1	31,895			0,034644
Regressão (R)	379,157	6	63,193	8,438	2,474*	
Resíduos (r)	194,714	26	7,489			
Falta de ajuste	84,784	8	10,598	1,7353	2,510*	0,157765
Erro puro	109,931	18	6,107			
Total	573,872	32	-			
$R^2$	0,6676	-	-			

\*  $F_{\text{tab}}$  regressão (6,26);  $F_{\text{tab}}$  falta de ajuste (8,18).

As curvas de contorno e as superfícies de respostas (FIGURA 15) mostram as regiões que resultam em uma maior atividade pectinolítica. As condições ótimas para a produção de pectinases por *A. niger* ficaram definidas como sendo: 61,6% de umidade (m/m, base úmida), 4,4 % de  $(NH_4)_2SO_4$  (m/m, substrato seco) e 100 % de farelo de trigo. Nestas condições, a atividade pectinolítica predita pelo modelo é de  $35,3 \text{ U g}^{-1}$ .

O modelo foi validado pela realização de um experimento, com cinco repetições, nas condições otimizadas. A atividade média, com o erro padrão da média, foi de  $31,4 \pm 0,3 \text{ U g}^{-1}$ . Embora este valor seja aproximadamente 10% abaixo do valor predito, foi possível obter um aumento de 24% na atividade pectinolítica se comparado ao cultivo padrão, que apresentou um valor de  $25,0 \pm 0,8 \text{ U g}^{-1}$ .

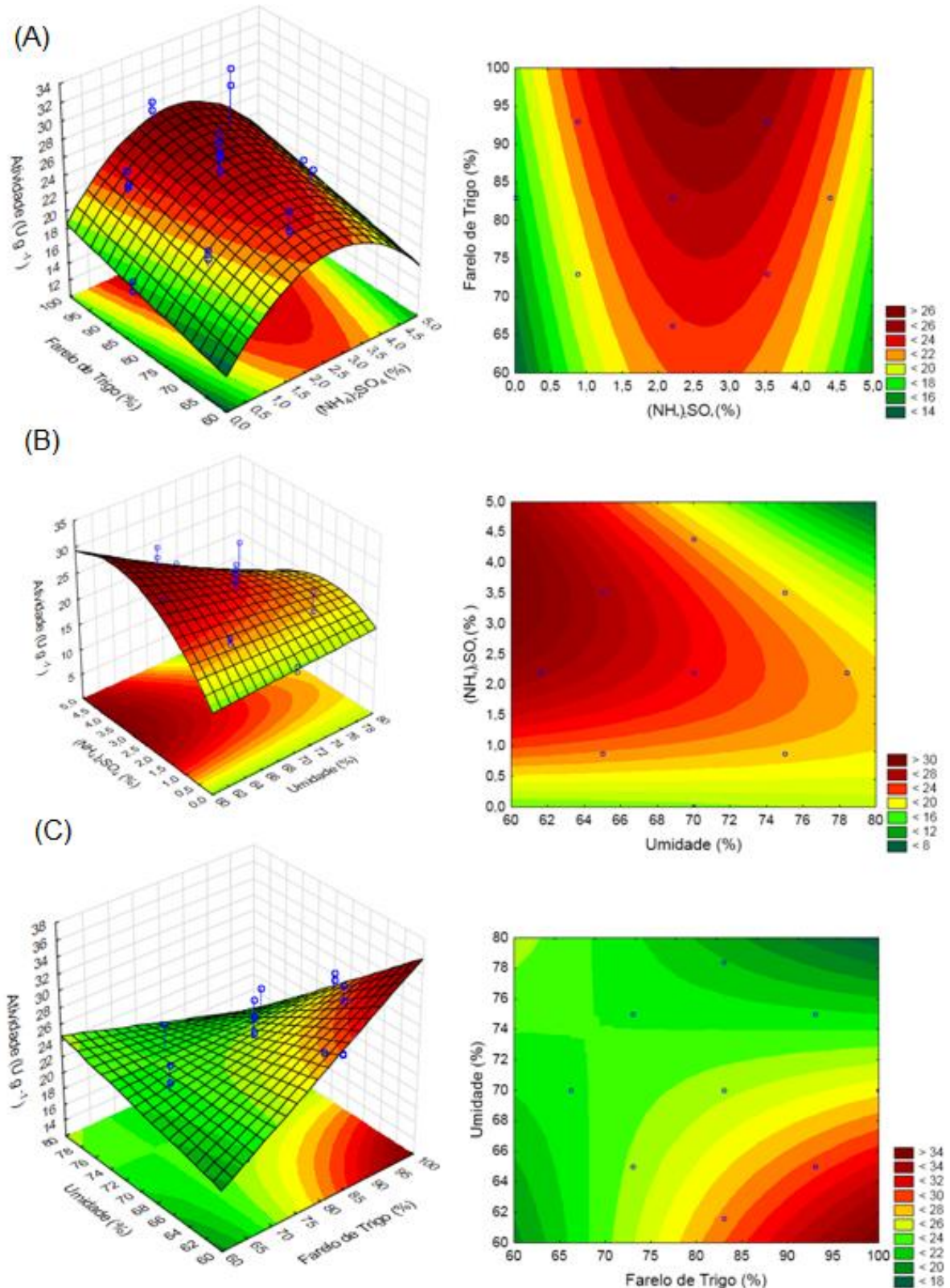


FIGURA 15 – CURVAS DE CONTORNO E SUPERFÍCIES DE RESPOSTA PARA *A. niger* (A) proporção de farelo de trigo e sulfato de amônio, (B) concentração de sulfato de amônio e umidade e (C) umidade e proporção de farelo de trigo. Em todas as superfícies o valor da terceira variável foi fixado no ponto central (0)

## 5.2 CULTIVOS NO BIORREATOR DE COLUNAS

Nos cultivos realizados no biorreator de colunas, foram utilizados os meios otimizados em frascos Erlenmeyer. Para *A. oryzae*, a atividade pectinolítica só ocorreu após 7 h de cultivo (FIGURA 16). Os perfis de velocidade de consumo de O<sub>2</sub> (OUR) e de produção de atividade pectinolítica aumentaram rapidamente no intervalo de 7 a 24 h. De 24 h até o final do cultivo a atividade atingiu um patamar e ficou entre 43 e 47 U g<sup>-1</sup>, sendo que produtividade máxima, de 1,87 U g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, ocorreu em 24 h. Já a OUR atingiu um pico de 145 μmol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> em 26 h e logo após começou a diminuir.

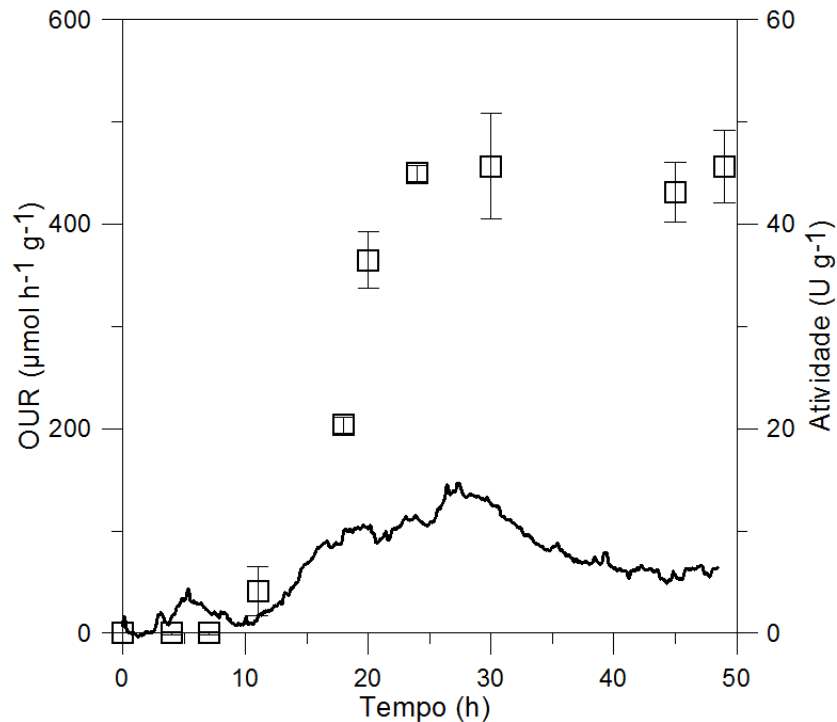


FIGURA 16 – PERFIL DE OUR E DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DE *A. oryzae* DURANTE A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR DE COLUNAS

\*As barras representam o erro padrão das médias

Legenda: (—) OUR (μmol h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>) (□) Atividade (U g<sup>-1</sup>)

Para *A. niger*, também não foi observada uma produção de atividade pectinolítica nas primeiras 7 h de cultivo (FIGURA 17). Os perfis de OUR e de produção de atividade pectinolítica também aumentaram rapidamente no mesmo intervalo de tempo, o que indica que, para ambos os fungos, a produção de

pectinase está relacionada com um aumento na atividade respiratória do cultivo. De 16 h até o final do cultivo, a atividade pectinolítica teve um aumento mais lento e ficou entre 29 e 34  $U\ g^{-1}$ . Já a OUR ficou razoavelmente constante de 16 h até 24 h, quando começou a diminuir. O maior valor de OUR obtido foi de  $540\ \mu\text{mol}\ h^{-1}\ g^{-1}$  em 16 h. A atividade pectinolítica em 18 h,  $30\ U\ g^{-1}$ , ficou próxima do valor encontrado na otimização em frascos Erlenmeyer, que foi de  $31\ U\ g^{-1}$  em 18 h. A produtividade máxima de atividade pectinolítica ocorreu mais cedo que para *A. oryzae*, em 15 h, e apresentou um valor de  $1,95\ U\ g^{-1}\ h^{-1}$ .

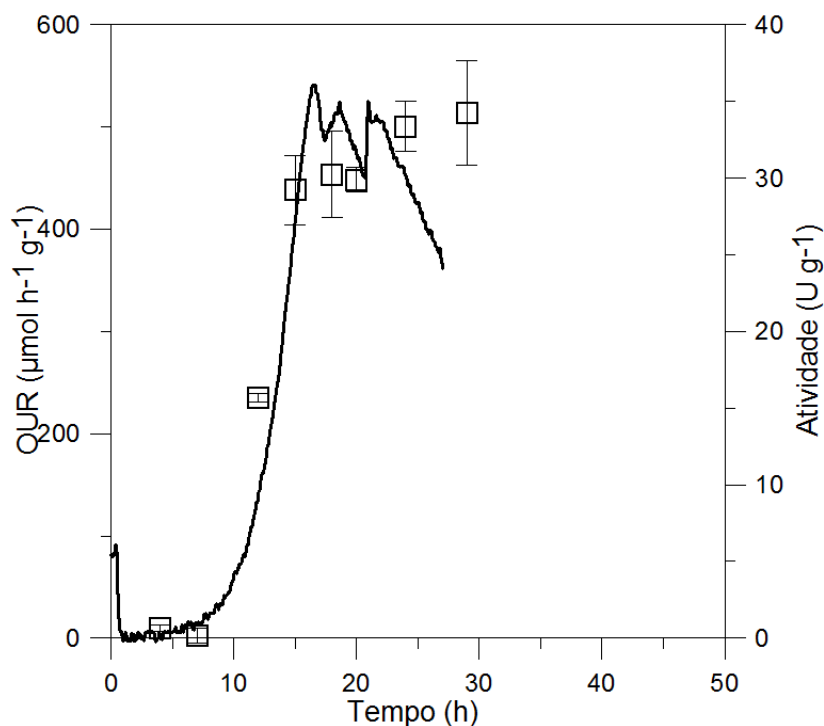


FIGURA 17 – PERFIL DE OUR E DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DE *A. niger* DURANTE A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM BIORREATOR DE COLUNAS

\*As barras representam o erro padrão das médias  
 Legenda: (—) OUR ( $\mu\text{mol}\ h^{-1}\ g^{-1}$ ) ( $\square$ ) Atividade ( $U\ g^{-1}$ )

Baseado em um fator de  $0,52\ J$  de calor metabólico produzido por  $\mu\text{mol}$  de  $O_2$  consumido (BAILEY e OLLIS, 1986), para *A. oryzae* a OUR máxima de  $145\ \mu\text{mol}\ h^{-1}\ g^{-1}$  corresponde a uma velocidade de produção de calor metabólico de  $21 \times 10^{-3}\ W\ g^{-1}$ , enquanto para *A. niger* a OUR máxima de  $540\ \mu\text{mol}\ h^{-1}\ g^{-1}$  corresponde a uma velocidade de produção de calor metabólico de  $78 \times 10^{-3}\ W\ g^{-1}$ .

### 5.3 CULTIVOS NO BIORREATOR PILOTO

Embora a atividade pectinolítica tenha sido maior para *A. oryzae*, a produtividade máxima obtida com *A. niger* ocorreu mais cedo e foi ligeiramente maior e, portanto, *A. niger* foi escolhido para os cultivos no biorreator piloto. Outras vantagens de *A. niger* são que, primeiro, é uma cepa que já se mostrou um bom produtor de pectinases em vários estudos (SOLIS-PEREYRA *et al.*, 1993; BARON, 2010; BIZ, 2012) e segundo, como é necessário uma grande quantidade de substrato para os cultivos no biorreator piloto, a aquisição e a preparação do substrato farelo de trigo é mais fácil, já que não necessita das operações de secagem, moagem e peneiramento.

#### 5.3.1 Primeiro cultivo no biorreator piloto

No primeiro cultivo realizado no biorreator piloto, foram utilizados 20 kg (massa seca) de farelo de trigo como substrato, que resultou em um leito de 23 cm de altura. Nas amostras removidas do topo do leito ao longo do cultivo, a atividade atingiu  $29 \text{ U g}^{-1}$  em 24 h de cultivo (FIGURA 18). Esta atividade é muito próxima da obtida em biorreator de colunas, que foi de  $33 \text{ U g}^{-1}$  em 24 h.

Apesar de não serem iguais, os comportamentos dos perfis no biorreator de colunas (FIGURA 17) e no biorreator piloto são razoavelmente semelhantes. Neste cultivo, tal como aconteceu no biorreator de colunas, a atividade pectinolítica e a OUR aumentaram rapidamente no intervalo de 7 a 14 h. Após este período, a OUR também ficou razoavelmente constante, no entanto, a atividade pectinolítica continuou a aumentar mais rapidamente do que no mesmo período no biorreator de colunas. Com isso, a produtividade neste cultivo no biorreator piloto não caiu após atingir um máximo e se manteve essencialmente constante em  $1,18 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de 16 h até ao final do cultivo.

O maior valor de OUR,  $607 \text{ } \mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , ocorreu em 16 h e corresponde a uma velocidade de produção de calor metabólico de  $87 \times 10^{-3} \text{ W g}^{-1}$ . Este resultado é

semelhante ao valor de  $78 \times 10^{-3} \text{ W g}^{-1}$  que foi obtido no biorreator de colunas, também em 16 h de cultivo.

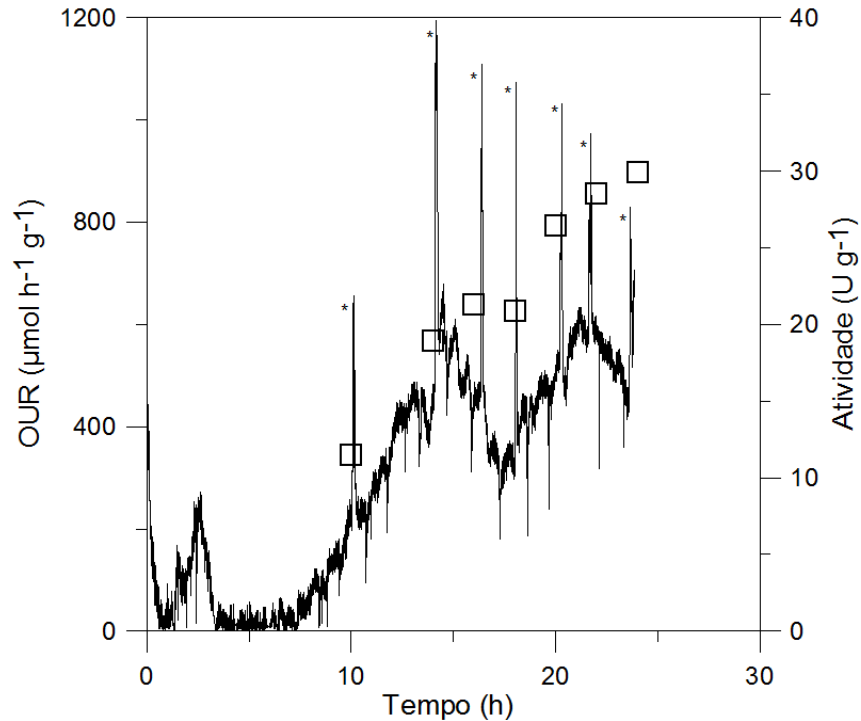


FIGURA 18 – PERFIL DE OUR E DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 100 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 23 cm

Legenda: (—) OUR ( $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) (□) Atividade ( $\text{U g}^{-1}$ )

\*Os picos agudos no gráfico de perfil de OUR ocorreram devido à abertura do biorreator para a retirada de amostra.

Em 16 h de cultivo, ocorreu um pico de temperatura em todas as alturas do leito, que corresponde com o momento do maior valor de OUR obtido (FIGURA 19).

O pico de temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$  que ocorreu em 22 h de cultivo, na altura de 18 cm dentro do leito, se deve a problemas de compactação que ocorreram principalmente nesta região do leito. Esta compactação impediu a passagem do ar pelo leito em si e provocou a formação de caminhos preferências entre a parede do biorreator e o leito (FIGURA 20). Como o ar não passou pelo leito, a temperatura do ar de saída em 22 h ( $30^{\circ}\text{C}$ ) ficou mais baixa do que o valor registrado no leito em 18 cm ( $36^{\circ}\text{C}$ ) (FIGURAS 19 e 21). Devido ao problema de compactação, decidiu-se adicionar bagaço de cana para agir como um agente de aeração do leito no próximo cultivo.



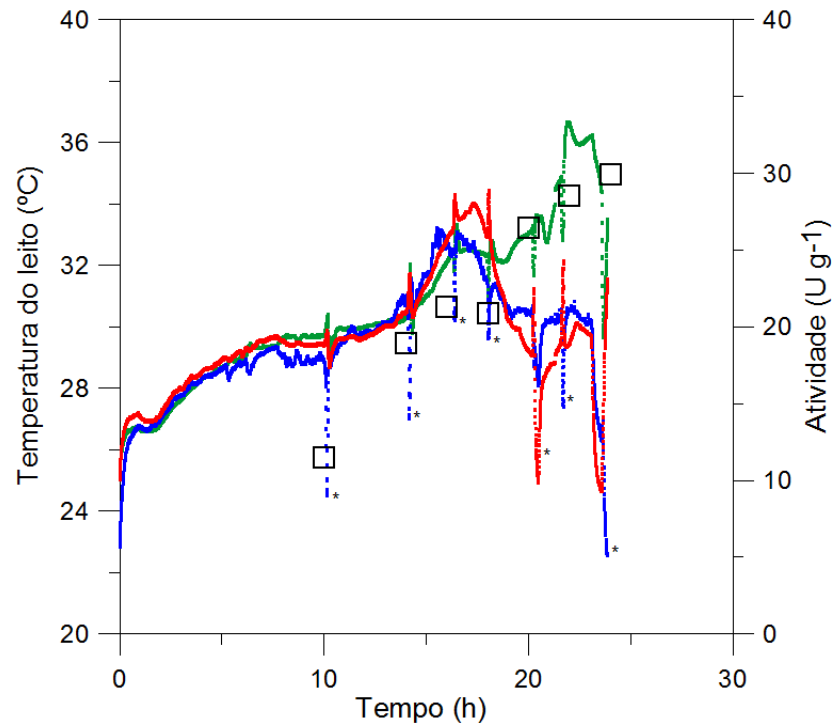


FIGURA 19 – TEMPERATURA DO LEITO EM DIFERENTES ALTURAS E ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 100 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 23 cm

Legenda: Temperatura (°C) (■) no interior do leito a 5 cm (■) no interior do leito a 18 cm (■) fora do leito a 33 cm e (□) Atividade pectinolítica de amostras retiradas no topo do leito ( $U\ g^{-1}$ )

\*Os picos agudos no gráfico de temperatura do leito ocorreram devido à abertura do biorreator para a retirada de amostra.



(A)

(B)

FIGURA 20 – IMAGENS DO LEITO EM 26 HORAS DE CULTIVO (A) sólido fermentado e (B) superfície do leito

A compactação do leito ocorreu depois de 16 h de cultivo. Portanto, as temperaturas medidas em 16 h dão uma idéia melhor da temperatura máxima que teria sido obtida, caso não tivesse ocorrido o problema de compactação. Em 16 h, a



temperatura máxima atingida foi de 34°C na altura do leito de 5 cm (FIGURA 19). A temperatura do ar de saída do leito em 16 h foi de 33°C (FIGURA 21) e foi a mesma do valor obtido no leito em 16 h na altura de 18 cm. Isto indica que o ar passou através do leito e que em 16 h ainda não havia caminhos preferenciais entre a parede do biorreator e o leito.

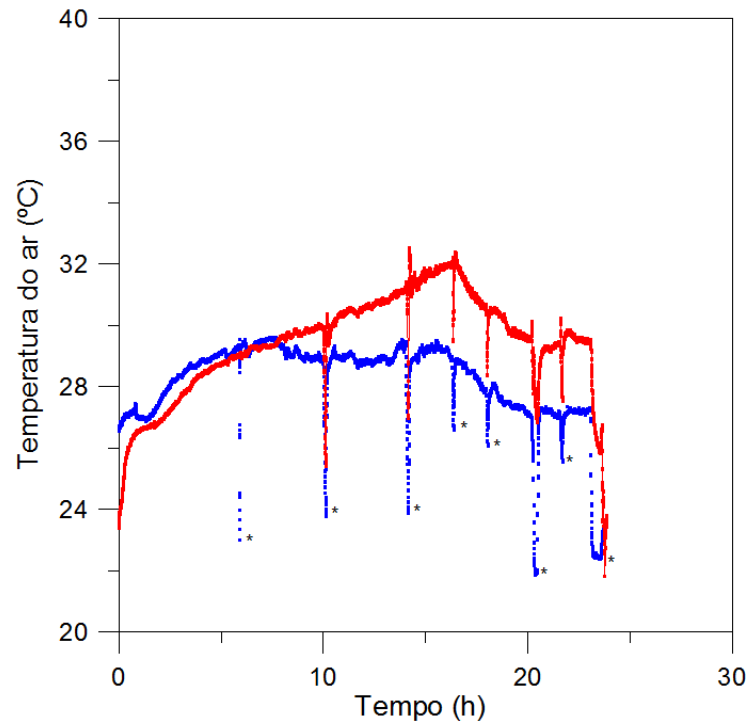


FIGURA 21 – TEMPERATURA DO AR DE ENTRADA E SAÍDA DO BIORREATOR PILOTO EM CULTIVO COM 100 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 23 cm

Legenda: Temperatura (°C) (■) do ar de entrada e (■) do ar de saída

\*Os picos agudos ocorreram devido à abertura do biorreator para a retirada de amostra.

### 5.3.2 Segundo cultivo no biorreator piloto

No segundo cultivo, foram adicionados 10 % de bagaço de cana ao substrato, para tentar diminuir os problemas de compactação do leito relatados na seção anterior. Com isso, mesmo utilizando a mesma massa total de substrato seco, a altura do leito passou de 23 cm para 27 cm, devido à baixa densidade aparente do bagaço de cana.

A atividade pectinolítica máxima no topo do leito neste cultivo com esta mistura de bagaço de cana e farelo de trigo foi de 20 U g<sup>-1</sup> em 24 h (FIGURA 22).

Este valor foi menor do que o valor de  $29 \text{ U g}^{-1}$ , obtido em 24 h no primeiro cultivo no biorreator piloto com somente farelo de trigo. Este resultado é consistente com o resultado do planejamento fatorial relatado na seção 5.1.2, onde 100% de farelo de trigo propiciou uma atividade maior do que qualquer mistura de farelo de trigo com bagaço de cana.

A produtividade máxima aconteceu em 20 h de cultivo, e foi de  $0,9 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , valor bem abaixo do valor de  $1,95 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  obtido em 15 h no biorreator de colunas e um pouco abaixo do valor de  $1,18 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  obtido em 16 h no primeiro cultivo no biorreator piloto.

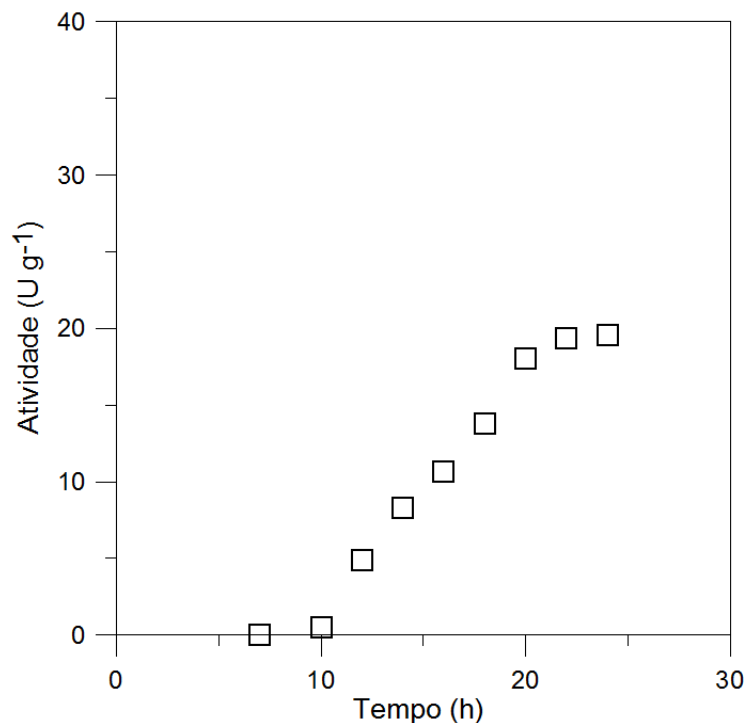


FIGURA 22 – ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm

A adição do bagaço de cana, apesar de ter causado uma diminuição da atividade pectinolítica, contribuiu para a diminuição da compactação (FIGURA 23A). Neste cultivo, não foi observado a formação de caminhos preferenciais do ar entre a parede do biorreator e o leito (FIGURA 23B). Com a diminuição da compactação do leito, o gradiente de temperatura ficou menor do que no primeiro experimento no biorreator piloto (FIGURA 24). Além disso, a temperatura do ar de saída do leito apresentou o mesmo perfil de temperatura em 18 cm de leito, o que indica que não

houve formação de caminhos preferenciais no leito e que o ar atravessou pelo leito durante todo o cultivo (FIGURA 25).



FIGURA 23 – IMAGENS DO LEITO EM 26 HORAS DE CULTIVO (A) sólido fermentado e (B) superfície do leito

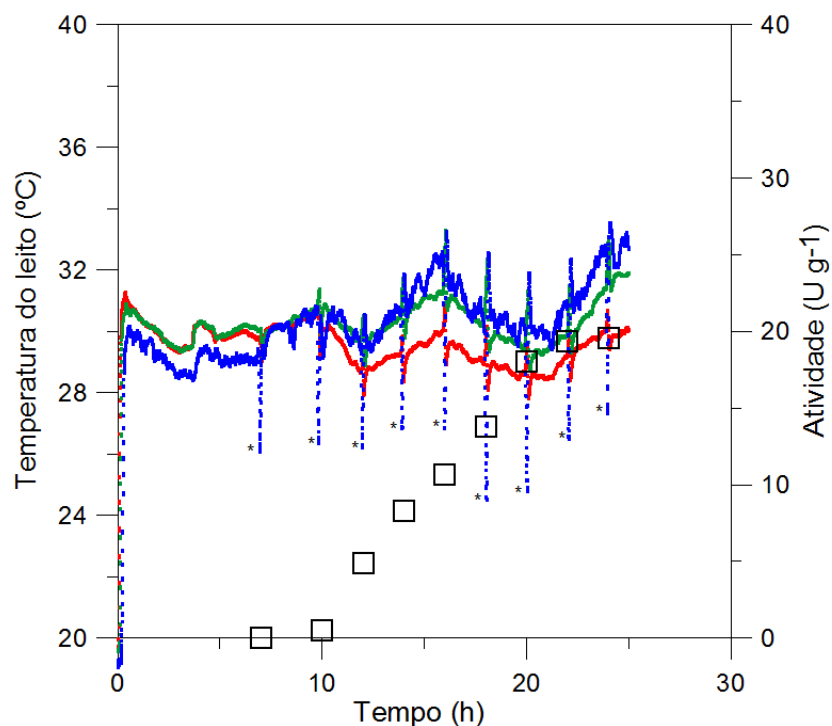


FIGURA 24 – TEMPERATURA DO LEITO EM DIFERENTES ALTURAS E ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm

Legenda: Temperatura (°C) (■) no interior do leito a 5 cm (■) no interior do leito a 18 cm (■) fora do leito a 33 cm e (□) Atividade pectinolítica de amostras retiradas no topo do leito ( $U\ g^{-1}$ )  
 \*Os picos agudos no perfil de temperatura do leito ocorreram devido à abertura do biorreator para a retirada de amostra.

Ocorreram dois picos de temperatura no leito ao longo do cultivo, em 16 h e em 24 h. Mesmo assim, a temperatura não atingiu valores muito altos, chegando a somente 32°C em 24 h na altura de 18 cm no leito. Esta temperatura não é prejudicial para a produção de pectinases por *A. niger*, que tolera temperaturas de até 35°C, sem que a produtividade seja afetada (BIZ, 2012).

A temperatura do ar de saída também apresentou picos em 16 h e 24 h de cultivo. Em 16 h, a diferença de temperatura entre o ar de entrada e o ar de saída foi de 3°C.

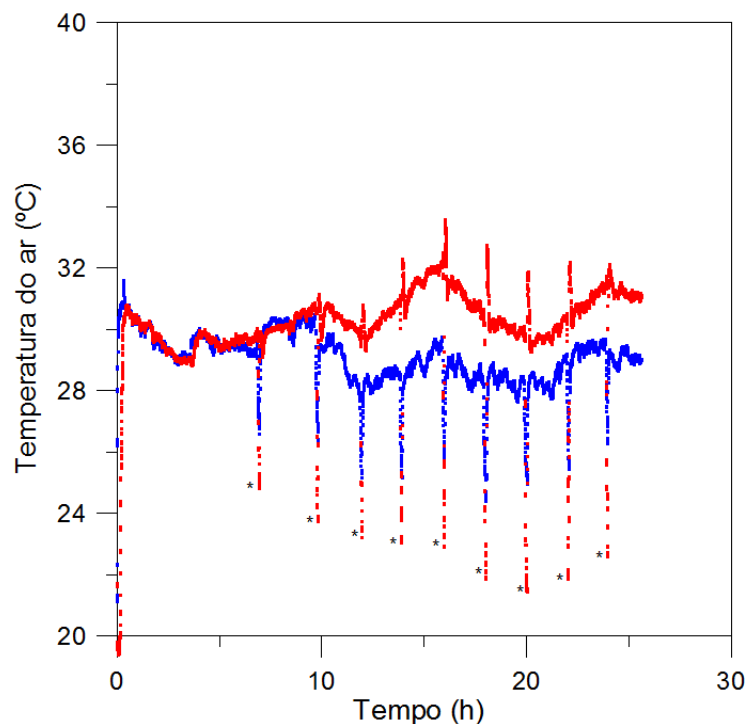


FIGURA 25 – TEMPERATURA DO AR DE ENTRADA E SAÍDA DO BIORREATOR PILOTO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm

Legenda: Temperatura (°C) (■) do ar de entrada e (■) do ar de saída

\*Os picos agudos ocorreram devido à abertura do biorreator para a retirada de amostra.

A umidade do substrato do topo do leito diminuiu durante o cultivo (FIGURA 26) e passou de um valor inicial de 62% (base úmida) para um valor final de 49%.

No final do cultivo, foram retiradas amostras de diferentes posições e alturas do leito, para a determinação da umidade e da atividade pectinolítica (FIGURAS 27 e 28). O leito apresentou uma boa homogeneidade com relação à atividade pectinolítica, que variou somente de 18 a 22 U g<sup>-1</sup>. A umidade variou em relação à altura do leito. Entre a base e o meio do leito houve uma diminuição da umidade, na base a umidade ficou entre 58 e 52% e no meio de 46 a 47%. Já entre o meio e o

topo do leito houve um aumento da umidade, sendo que no topo do leito a umidade ficou entre 47 e 54%.

A secagem do leito ocorre, mesmo que o ar que entra no leito esteja saturado, pois a transferência de calor metabólico para a fase gasosa aumenta a temperatura do ar, fazendo com que capacidade do ar de carregar água aumente. Como consequência, há transferência de água do sólido para a fase gasosa. Entretanto, a secagem não é uniforme nas diferentes alturas. Na base do biorreator, o ar que entra está saturado. Contudo, conforme apresentado na FIGURA 26, a partir de 10 h de cultivo, o aumento da temperatura foi maior na primeira metade do leito, próximo da base (5 cm) ao meio (18 cm), do que na segunda metade do leito, do meio (18 cm) ao topo (33 cm). Como a temperatura aumenta mais rapidamente na primeira metade, a força motriz para a evaporação é maior neste ponto, já que o aumento da capacidade do ar de carregar água, devido ao aumento de temperatura, é maior do que a velocidade de transferência de água para a fase gasosa. Já na segunda metade do leito, o aumento da temperatura axial é menos acentuado e a capacidade de transporte de água aumenta menos rapidamente. Com isto, a transferência de água para a fase gasosa também diminui, o que diminui a secagem do leito se comparado com as regiões do meio do leito.

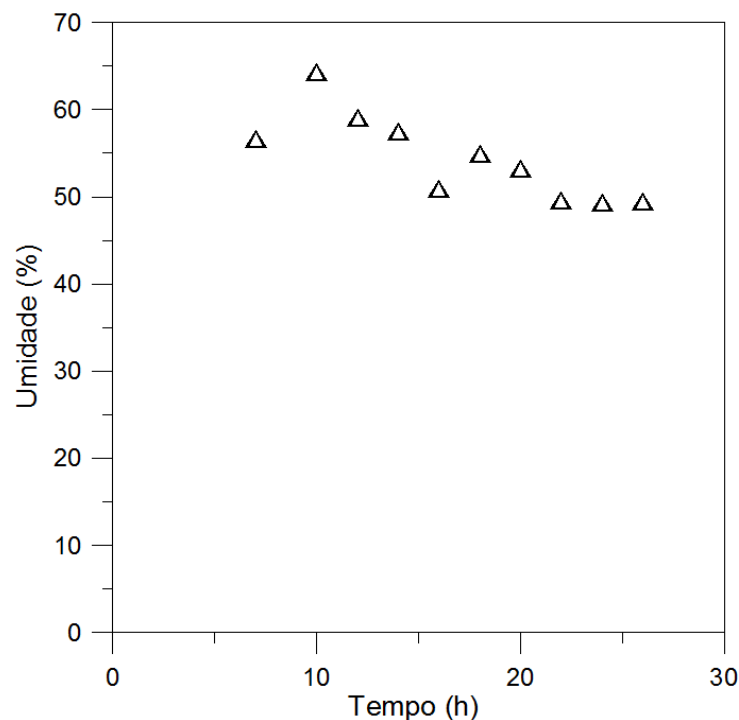


FIGURA 26 – UMIDADE NO TOPO DO LEITO DURANTE CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm

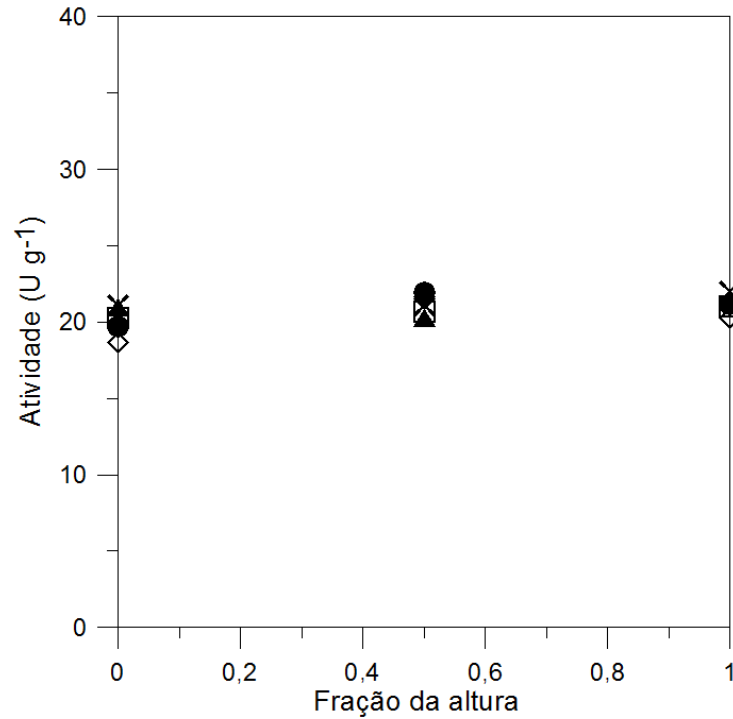
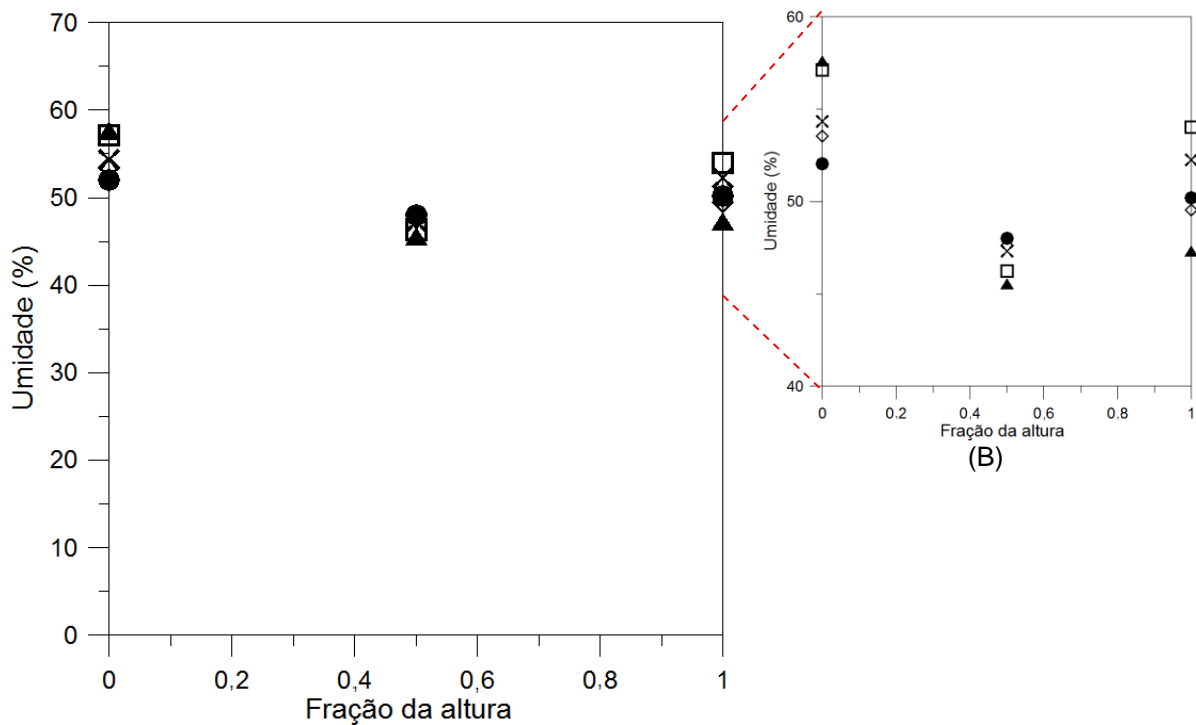


FIGURA 27 – ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO APÓS 26 HORAS EM DIFERENTES POSIÇÕES E ALTURAS DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm

Legenda: Posição (▲) C1 (□) C2 (●) C3 (◇) C4 (X) C5, conforme FIGURA 9.



(A)

FIGURA 28 – UMIDADE APÓS 26 HORAS EM DIFERENTES POSIÇÕES E ALTURAS DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 27 cm (A) eixo y de 0 a 70% de umidade (B) eixo y ampliado na região dos resultados

Legenda: Posição (▲) C1 (□) C2 (●) C3 (◇) C4 (X) C5, conforme FIGURA 9.

### 5.3.3 Terceiro cultivo no biorreator piloto

Com o objetivo de verificar a influência da altura do leito na produção de pectinases e na temperatura máxima alcançada durante o cultivo, foi realizado um cultivo com um aumento de 50% na quantidade de substrato seco, com relação ao segundo cultivo. Com isso, a altura do leito passou de 27 cm para 40 cm.

Como observado no biorreator de colunas, a atividade pectinolítica só ocorreu após 7 h de cultivo. A atividade pectinolítica máxima para amostras removidas no topo do leito foi de  $25 \text{ U g}^{-1}$  em 14 h (FIGURA 29). Após atingir este valor, as atividades medidas variaram significativamente até o final do cultivo. Esta grande variação não foi observada nos experimentos anteriores no biorreator piloto e nos cultivos realizados no biorreator de colunas. O motivo para esta variação na atividade pectinolítica pode ter sido a grande variação na temperatura do leito durante o cultivo (FIGURA 30). Após o primeiro pico de atividade pectinolítica houve também um pico de temperatura de  $43^\circ\text{C}$  no topo do leito. Em seguida houve uma diminuição da atividade pectinolítica: a alta temperatura pode ter interrompido o crescimento do micro-organismo e desnaturado as pectinases produzidas. Com a diminuição do crescimento, a produção de calor metabólico diminuiu e ocasionou uma diminuição da temperatura. Quando a temperatura voltou a atingir valores abaixo de  $35^\circ\text{C}$ , o micro-organismo voltou a produzir pectinases e a atividade pectinolítica começou a aumentar novamente.

A produtividade pectinolítica máxima no topo do leito foi de  $1,81 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , e também ocorreu em 14 h. Este valor de produtividade foi maior do que o encontrado no primeiro cultivo ( $1,18 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em 16 h), onde não houve a adição de bagaço de cana, e foi muito próximo ao valor obtido em biorreator de colunas ( $1,95 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em 15 h).

A temperatura do leito atingiu  $43^\circ\text{C}$  em 16 h de cultivo na altura de 33 cm (FIGURA 30). A temperatura em 33 cm foi  $5^\circ\text{C}$  maior que no meio do leito, em 18 cm, e  $13^\circ\text{C}$  maior que próximo à base do leito, em 5 cm. Próximo à base, a temperatura permaneceu próxima de  $30^\circ\text{C}$  e só aumentou após 22 h de cultivo. Em 14 h de cultivo, quando ocorreu a produtividade pectinolítica máxima, a temperatura máxima registrada no leito foi de  $35^\circ\text{C}$ , em 33 cm de leito.

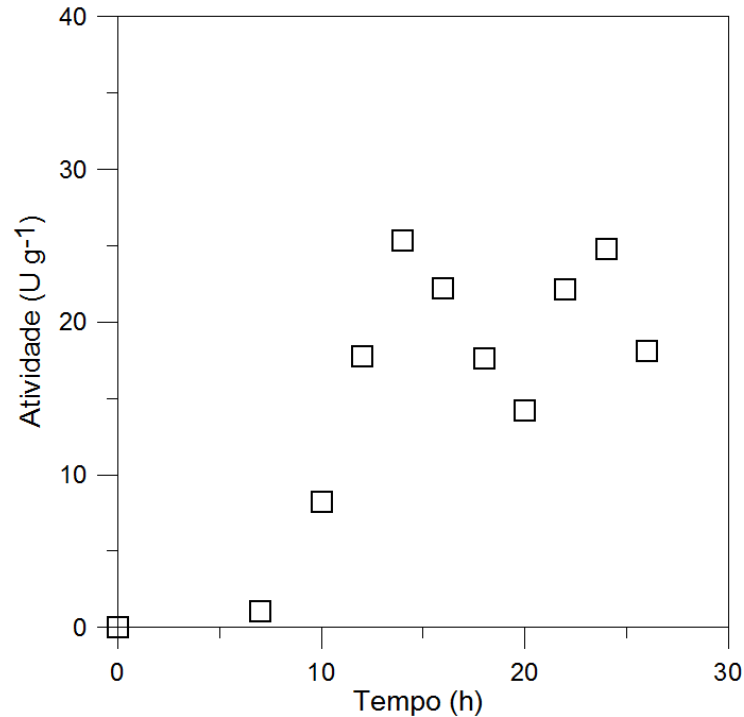


FIGURA 29 – ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm

A maior temperatura registrada no ar na saída do biorreator foi de 34°C e ocorreu em 16 h (FIGURA 31), o tempo em que também ocorreram as temperaturas mais altas no leito. No entanto, as temperaturas nas alturas do leito de 18 cm e 33 cm foram muito mais altas 37°C e 42°C, respectivamente (FIGURA 30). Após 12 h de cultivo começou a ocorrer a compactação do leito e a formação de caminhos preferenciais do ar entre a parede do biorreator e o leito (FIGURA 32). A compactação impediu a passagem do ar nesta região e causou o aumento de temperatura do leito. Como o ar não passou pelo leito e passou direto pela lateral do biorreator ele não sofreu um aumento de temperatura tão acentuado.



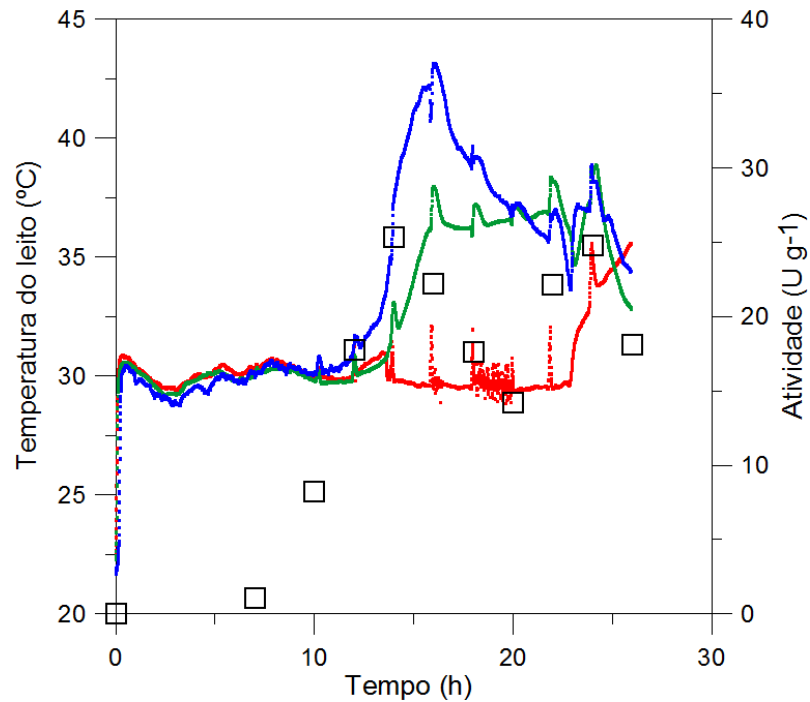


FIGURA 30 – TEMPERATURA DO LEITO EM DIFERENTES ALTURAS E ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO DO TOPO DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm

Legenda: Temperatura (°C) (■) no interior do leito a 5 cm (■) no interior do leito a 18 cm (■) no interior do leito a 33 cm e (□) Atividade pectinolítica de amostras retiradas no topo do leito ( $U\ g^{-1}$ )

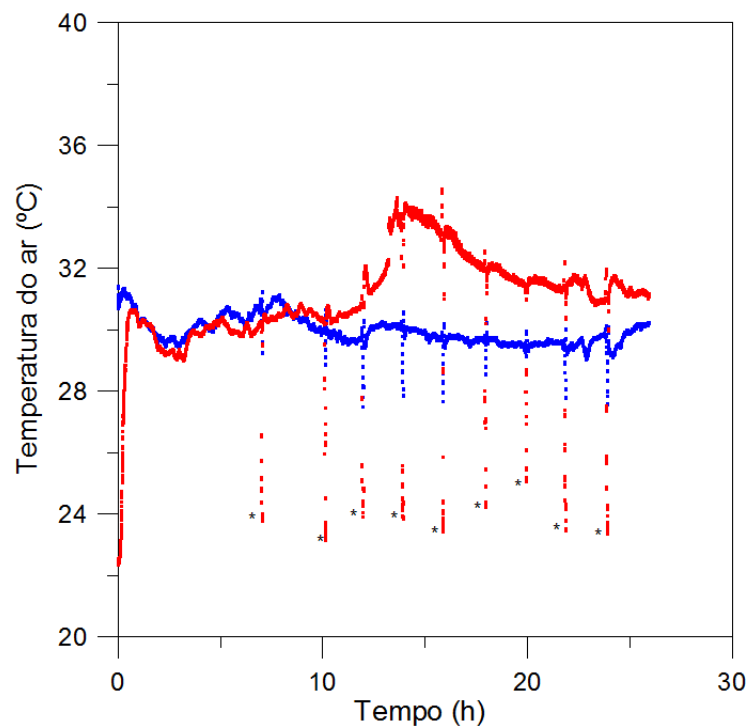


FIGURA 31 – TEMPERATURA DO AR DE ENTRADA E SAÍDA DO BIORREATOR PILOTO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm

Legenda: Temperatura (°C) (■) do ar de entrada e (■) do ar de saída

\*Os picos agudos ocorreram devido à abertura do biorreator para a retirada de amostra.



FIGURA 32 - IMAGENS DO LEITO DURANTE O CULTIVO (A) em 12 horas de cultivo (B) em 14 horas de cultivo (C) em 16 horas de cultivo

A umidade do substrato do topo do leito diminuiu de um valor inicial de 62% (base úmida) para um valor de 56% no final do cultivo (FIGURA 33). Este valor final foi maior do que o valor final de 49% obtido no cultivo anterior. A secagem do leito foi menor neste cultivo, porque houve compactação do leito e o ar não estava passando no interior do leito para que ocorresse a secagem. O perfil de umidade como função de altura no leito foi semelhante àquele do segundo cultivo, onde foi observada uma diminuição entre o fundo e o meio, seguido por um aumento entre o meio e o topo (FIGURA 34). Como ocorreu no segundo cultivo, o aumento da temperatura foi maior na primeira metade do leito, próximo da base (5 cm) ao meio (18 cm), do que na segunda metade do leito, do meio (18 cm) ao topo (33 cm). Como o ar não estava atravessando o leito, mesmo que as diferenças entre as temperaturas da base ao meio e do meio ao topo tenham sido maiores do que as observadas no segundo cultivo, o perfil de umidade como função de altura no leito foi menos acentuado do que no segundo cultivo.

Devido ao gradiente de temperatura no leito, não houve uma homogeneidade do leito com relação à atividade pectinolítica no final do cultivo (FIGURA 35). A atividade foi maior na base do leito e atingiu um valor máximo de  $31 \text{ U g}^{-1}$ . Já no meio e no topo do leito, onde a temperatura foi mais alta, a atividade máxima foi de  $21 \text{ U g}^{-1}$ .

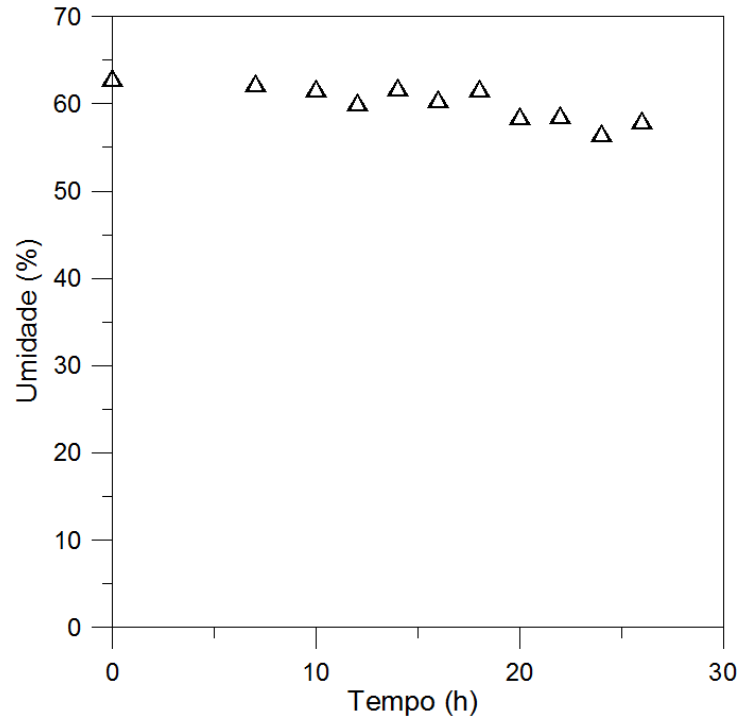


FIGURA 33 – UMIDADE NO TOPO DO LEITO DURANTE CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm

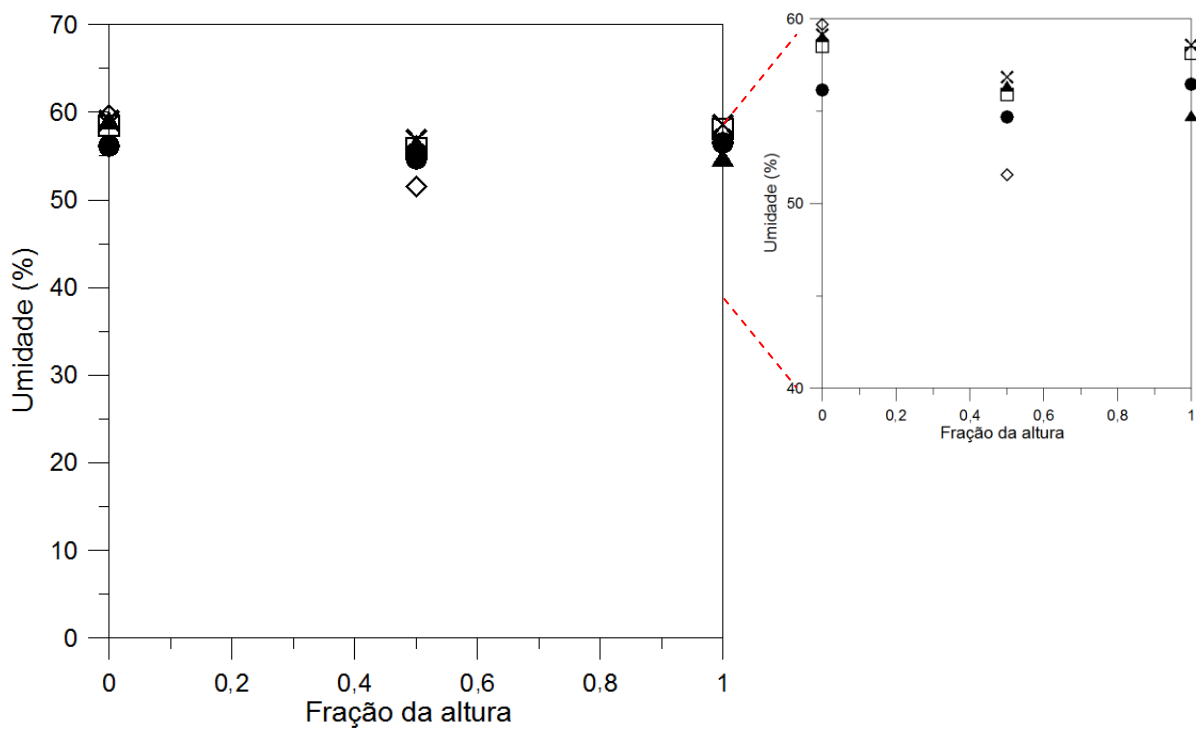


FIGURA 34 – UMIDADES APÓS 26 HORAS EM DIFERENTES POSIÇÕES E ALTURAS DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm (A) eixo y e de 0 a 70% de umidade (B) eixo y e ampliado na região dos resultados  
 Legenda: Posição (▲) C1 (□) C2 (●) C3 (◇) C4 (X) C5, conforme FIGURA 9.

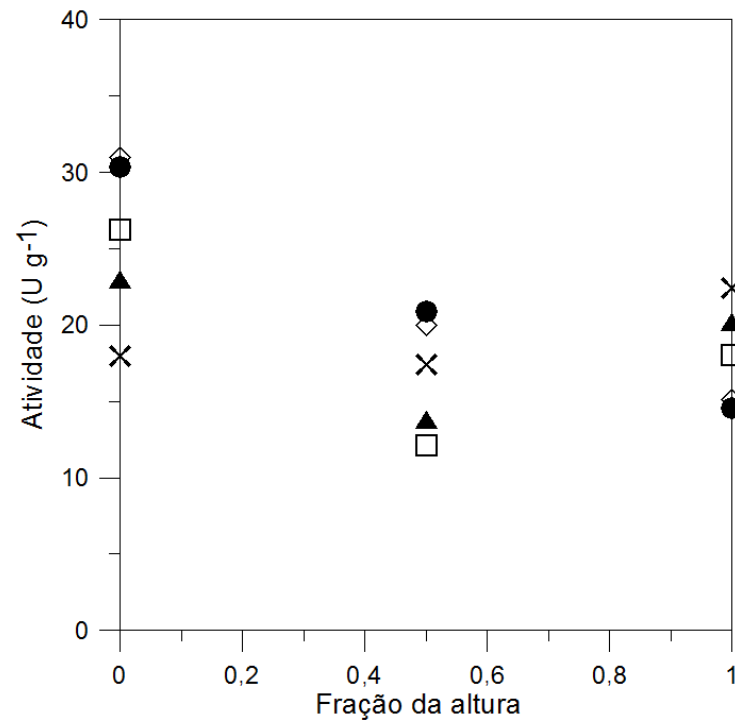


FIGURA 35 – ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO SÓLIDO FERMENTADO APÓS 26 HORAS EM DIFERENTES POSIÇÕES E ALTURAS DO LEITO EM CULTIVO COM 90 % DE FARELO DE TRIGO E ALTURA DE LEITO DE 40 cm  
Legenda: Posição (▲) C1 (□) C2 (●) C3 (◇) C4 (X) C5, conforme FIGURA 9.

## 5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível obter, em escala piloto, produtividades muito semelhantes das obtidas em escala laboratorial (TABELA 10). No biorreator de colunas a produtividade obtida foi de  $1,95 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em 15 h de cultivo e no biorreator piloto, no terceiro cultivo, a produtividade obtida foi de  $1,81 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  em 14 h. Este resultado leva à conclusão que seria possível construir um biorreator industrial com um leito fixo de vários metros de largura, mas com 40 cm de altura, e realizar a colheita em 14 h. A máxima temperatura esperada no leito não ultrapassaria  $35^\circ\text{C}$ , que foi a máxima temperatura observada nas primeiras 14 h no terceiro cultivo no biorreator piloto, que foi realizado com esta altura de leito. Esta temperatura não prejudica a produção de pectinases (BIZ, 2012).

TABELA 10 – RESULTADOS DE ATIVIDADE E PRODUTIVIDADE PECTINOLÍTICA OBTIDOS NOS CULTIVOS EM BIORREATOR DE COLUNAS E EM BIORREATOR PILOTO

	SUBSTRATO	ALTURA DO LEITO	ATIVIDADE PECTINOLÍTICA ( $\text{U g}^{-1}$ ) EM 24 h	PRODUTIVIDADE PECTINOLÍTICA MÁXIMA ( $\text{U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )
Biorreator de colunas	100 % Farelo de trigo	-	33	1,95 em 15 h
1º Cultivo piloto	100 % Farelo de trigo	23	29	1,18 em 16 h
2º Cultivo piloto	90 % Farelo de trigo e 10% de Bagaço de cana	27	20	0,90 em 20 h
3º Cultivo piloto	90 % Farelo de trigo e 10% de Bagaço de cana	40	25	1,81 em 14 h

Infelizmente, não é possível comparar as atividades e produtividades obtidas no presente trabalho com as da literatura, porque o ensaio utilizado para a determinação da atividade pectinolítica é diferente dos ensaios utilizados nos trabalhos prévios. De fato, não há um método padrão para a determinação de atividade pectinolítica. Mesmo no caso da determinação da atividade por liberação de açúcares redutores, os autores usam valores diferentes para variáveis como a concentração e o tipo de substrato utilizado (pectina ou ácido poligalacturônico), a

temperatura do ensaio e o tempo de incubação. Como foi mostrada por Biz (2012), a atividade pectinolítica relatada para o mesmo extrato bruto pode variar por uma ordem de magnitude, dependendo da combinação particular destas variáveis. De fato, devido à falta de padronização na literatura existente, não há nem como dizer com confiança qual dos estudos de produção de pectinases já realizados produziu a maior atividade pectinolítica.

Mesmo não sendo possível a comparação dos valores de atividade pectinolítica obtidos, o presente trabalho apresenta três vantagens importantes em relação aos estudos já publicados sobre a produção de pectinases em escala piloto:

- O meio utilizado neste trabalho utiliza um resíduo agroindustrial e não contém compostos refinados de alto valor agregado, como o utilizado por Huerta *et al.* (1994), que contém sacarose e pectina refinada.
- O tempo de cultivo para atingir a produtividade pectinolítica máxima, 14 h, é significativamente menor do que os tempos de 72 h e 96 h relatados nos trabalhos de Huerta *et al.* (1994) e He e Chen (2013), respectivamente. Apesar de Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) ter relatado o tempo de 72 h para alcançar uma produtividade máxima, conforme descrito na seção 2.6.2.3, o tempo na verdade seria de 48 h, que ainda é significativamente maior do que neste trabalho.
- O presente trabalho é o único que fornece uma estratégia confiável para operar um biorreator com várias toneladas de substrato. Uma vez que a altura do leito de 40 cm usada neste estudo já representa a altura do leito de biorreatores de leito fixo utilizados no processo industrial de produção de *koji* (SATO e SUDO, 1999), a ampliação de escala do processo desenvolvido neste trabalho envolveria somente um aumento na largura do leito. Desde que a vazão de ar por metro quadrado do leito seja mantida, o desempenho do leito será igual àquele obtido no biorreator piloto. Por sua vez, os trabalhos de Huerta *et al.* (1994), Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) e He e Chen (2013) não fornecem estratégias que assegurariam um bom desempenho com várias toneladas de substrato. Embora Rodríguez-Fernández *et al.* (2011) tenham sugerido que seria possível aumentar a escala do seu biorreator simplesmente mantendo o fluxo volumétrico de ar por quilograma de meio constante, eles usaram somente 2 kg de substrato e, portanto, não utilizaram a

altura do leite que seria necessária utilizar na escala industrial. Com isto, as dificuldades enfrentadas para controlar a temperatura no leite seriam maiores do que às enfrentadas com um leite de 2 kg.

## 6 CONCLUSÕES

A atividade pectinolítica e a atividade metabólica não foram afetadas pelo aumento de escala nos cultivos com *A. niger*. No biorreator de colunas foi obtida uma atividade pectinolítica de  $33 \text{ U g}^{-1}$ , em 24 h e a produtividade máxima, de  $1,95 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , ocorreu em 16 h. O valor máximo de consumo de  $\text{O}_2$  foi de  $540 \mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , em 16 h, e corresponde a uma velocidade de produção de calor metabólico de  $78 \times 10^{-3} \text{ W g}^{-1}$ . Já no primeiro cultivo no biorreator piloto, os valores máximos obtidos foram  $29 \text{ U g}^{-1}$ , em 24 h, para a atividade pectinolítica e  $1,18 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , em 16 h, para a produtividade. O valor máximo para o consumo de  $\text{O}_2$ , também ocorreu em 16 h e foi de  $607 \mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , e corresponde a uma produção de calor metabólico de  $87 \times 10^{-3} \text{ W g}^{-1}$ .

Este trabalho foi o único que forneceu uma estratégia confiável para operar um biorreator com várias toneladas de substrato. A maior altura de leito estudada neste trabalho foi de 40 cm, que já representa a altura do leito de biorreatores de leito fixo utilizados no processo industrial de *koji*. No cultivo com esta altura de leito a atividade pectinolítica máxima foi de  $25 \text{ U g}^{-1}$ , em 14 h, e a produtividade máxima de  $1,81 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , também ocorreu em 14 h. Nas primeiras 14 h não houve compactação do leito e a temperatura máxima atingida no leito foi de  $35^\circ\text{C}$ . Desta maneira, a estratégia proposta neste trabalho para o aumento de escala foi de manter a altura do leito em 40 cm e aumentar a largura do leito para vários metros.



## 7 PROPOSTAS FUTURAS

Apesar de já ter sido possível propor uma estratégia para o aumento de escala, ainda há a possibilidade de otimizar as variáveis disponíveis no biorreator piloto, tais como: a agitação intermitente e a vazão e a temperatura do ar de entrada. Com isso, pode ser possível aumentar ainda mais a altura do leito e a produtividade pectinolítica. Além disso, é necessário realizar uma análise de viabilidade econômica do processo, para avaliar a sua implantação em escala comercial.

## REFERÊNCIAS

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 21-28, 1997.

ANUPAMA; RAVINDRA, P. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnonology Advances**, v.18, p.459-479, 2000.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed.; McGraw Hill: New York, p. 500-507, 1986.

BARGA, M. C. Modelo de inferência para a determinação da umidade do leito de um biorreator piloto de fermentação no estado sólido. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007

BARON, A. Hidrólise de pectina para produção de ácido D-galacturônico como um intermediário chave em uma biorrefinaria: Produção de pectinases por fermentação em estado sólido. Relatório apresentado ao CNPq referente às atividades de Pós-Doutorado (PDJ/CNPq). Curitiba, abril de 2010.

BIZ, A. Produção de pectinases em fermentação no estado sólido para a obtenção de ácido galacturônico em biorrefinarias. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012

BLANDINO, A.; IQBALSIAH, T.; PANDIELLA, S. S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 164–169, 2002.

BOTELLA, C.; DE-ORY, I.; WEBB, C.; CANTERO, D.; BLANDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 100-106, 2005.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. D. P. Pectina: da matéria prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, p. 149–157, 2012.

DEBING, J.; PEIJUN, L.; STAGNITT, I. F.; XIANZHE, X.; LI, L. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 244-250, 2006.

EERE - Energy Efficiency and Renewable Energy (2004) Disponível em: <<http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf>>. Acesso em 03/12/2013.

EMBRAPA **Protocolos de análise para a polpa do açaí: um guia prático de consulta**. Embrapa Instrumentação Agropecuária. São Carlos, Brasil, 2009.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2011). Disponível em: <[http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Laranja\\_Brasil\\_2011.pdf](http://www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Laranja_Brasil_2011.pdf)>. Acesso em 10/12/2013.

FAOSTAT - The Statistics Division of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (2011). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em 10/01/2014

GARNA, H.; MABON, N.; NOTT, K.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Kinetic of the hydrolysis of pectin galacturonic acid chains and quantification by ionic chromatography. **Food Chemistry**, v. 96, p. 477-484, 2006.

GROHMAN, K.; CAMERON, R. G.; BUSLIG, B. S. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 45, p. 315-327, 1994.

GROHMAN, K.; CAMERON, R. G.; BUSLIG, B. S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 129-141, 1995.

HE, Q.; CHEN, H. Pilot-scale gas Double-dynamic solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p. 2916-2924, 2013.

HEERD, D.; YEGIN, S.; TARI, C.; FERNANDEZ-LAHORE, M. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: A comparative study. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 102-110, 2012.

HUERTA, S.; FAVELA, E.; LÓPEZ-ULIBARRI, R.; FONSECA, A.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Absorbed substrate fermentation for pectinase production with *Aspergillus niger*. **Biotechnology Techniques**, v. 8, p. 837-842, 1994.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KOPECNY, J.; HODROVA, B. Pectinolytic enzymes of anaerobic fungi. **Letters of Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 312-316, 1995.

KUMAR, S. Y.; VARAKUMAR, S.; REDDY, O. V. S. Production and optimization of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica*) peel using *Fusarium moniliforme* in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1973-1980, 2010.

LOPEZ, J. A. S.; LI, Q.; THOMPSON, I. P. Biorefinery of waste orange peel. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 63-69, 2010.

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

MARTIN, N.; GUEZ, M. A. U.; SETTE, L. D.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by a Brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solidstate and submerged fermentation. **Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 306-313, 2010.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E. Solid-state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 949-954, 2002.

MESBAHI, G.; JAMALIAN, J.; FARAHNAKY, A. A comparative study on functional properties of beet and citrus pectins in food systems. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 731-738, 2005.

MFRURAL – Mercado físico rural, 2014. Disponível em:  
< <http://comprar-vender.mfrural.com.br/detalhe/polpa-citrica-umida-121601.aspx> >. Acesso em 10/03/2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, D. A.; PANDEY, A.; SANGSURASAK, P.; KRIEGER, N. Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1-2, p. 167–178, 1999.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211–1225, 2000.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137–147, 2003.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. **Solid State Fermentation Bioreactors: Fundamental of Design and operation**. 1. ed. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2006.

MOJZITA, D.; WIEBE, M.; HILDITCH, S.; BOER, H.; PENTTILA, M.; RICHARD, P. Metabolic engineering of fungal strains for conversion of D-galacturonate to meso-galactarate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 169-175, 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. A. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J.; NIGAM, P. **Solid-State Fermentation in Biotechnology**. New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 2001.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 2054-2058, 2006.

PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMONA, E. C. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, n. 1, p. 9–18, 2009.

PHUTELLA, U.; DHUNA, V.; SANDHU, S.; CHADHA, B. S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 63-69, 2005.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v. 74, n. 724, p. 17-20, 2006.

POURBAFRANI, M.; FORGÁCS, G.; HORVÁTH, I. S.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Production of biofuels, limonene and pectin from citrus wastes. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4246–4250, 2010.

REVISTA RURAL. **Mercado - Laranja quer aumentar consumo doméstico**, 2000. Disponível em: <[http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2000/Artigos/rev33\\_mercado.htm](http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2000/Artigos/rev33_mercado.htm)>. Acesso em 020/10/2012.

RICHARD, P.; HILDITCH, S. D-galacturonic acid catabolism in microorganisms and its biotechnological relevance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 597-604, 2009.

RIDLEY, B. L.; O'NIEL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis and oligogalacturonid signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, D. E.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; DE CARVALHO, J. C.; STURM, W.; SOCCOL, C. R. The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10657–10662, 2011.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 231-94, 1992.

SATO, K.; SUDO, S. Small scale solid state fermentations. In: Demain, A.L., Davies, J.E. (Eds.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press, Washington, DC, p. 61–79, 1999.

SIGMA - especificação de produto: Pectina da casca de laranja. CAS Number 9000-69-5. Disponível em:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p9135?lang=pt&region=BR>  
 Acesso em 10/12/2013.

SIGMA – Catálogo de produto: Pectinase de *Aspergillus niger*. CAS Number 9032-75-1. Disponível em:  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/17389?lang=pt&region=BR>  
 Acesso em 10/03/2014.

SILLEY, P. A note on the pectinolytic enzymes of *Lachnospira multiparus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 58, n. 2, p. 145-149, 1985.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2885-2889, 2005.

SINGH, S. A.; RAMAKRISHNA, M.; RAO, A. G. A. Optimization of downstream parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. **Process Biochemistry**, v. 35, p.411-417, 1999.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SLIVINSKI, C. T. Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* ufpeda 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SOLIS-PEREYRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GUTI, M. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 36-41, 1993.

TALEBNIA, F.; POURBAFRANI, M.; LUNDIN, M.; TAHERZADEH, M. J. Optimization study of citrus waste saccharification by dilute acid hydrolysis. **Bioresources**, v. 3, p. 108-122, 2008.

TASKIN, E.; ELTEM, R.; SILVA, E. S.; SOUZA, J. V. B. Screening of *Aspergillus* strains isolated from vineyards for pectinase production. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 6, p. 5-7, 2008.

UENOJO, M.; PASTORE, M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VON MEIEN, O. F.; MITCHELL, D. A. A two-phase model for water and heat transfer within an intermittently-mixed solid-state fermentation bioreactor with forced aeration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, p. 416-428, 2002.

WEBER, F. J.; OOSTRA, J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Validation of a model for process development and scale-up of packed-bed solid-state bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, p. 381-393, 2002.

YAPO, B. M.; ROBER, C.; ETIENNE, I.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1356-1364, 2007.