

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANELIZE TEREZINHA JUNG FINKLER

ESTUDO DA AGITAÇÃO INTERMITENTE NA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM ESCALA PILOTO

CURITIBA

2016

ANELIZE TEREZINHA JUNG FINKLER

ESTUDO DA AGITAÇÃO INTERMITENTE NA PRODUÇÃO DE PECTINASES POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO EM ESCALA PILOTO

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

2016

Finkler, Anelize Terezinha Jung

Estudo da agitação intermitente na produção de pectinases por fermentação em estado sólido em escala piloto / Anelize Terezinha Jung Finkler. – Curitiba, 2016.

72 f. : il.; tabs.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Orientador: David Alexander Mitchell

Bibliografia: p. 66-72

1. Fermentação. 2. Biorreatores. 3. Pectinase. I. Mitchell, David Alexander. II. Título.

CDD 660.28449



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Setor de Tecnologia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos trinta dias do mês de março de 2016, no Auditório Inferior do Prédio da 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 **nonagésima** 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), Luiz Fernando de Lima Luz Júnior (PPGEQ/UFPR) e Wellington Balmant (NPDEAS/UFPR). Às 09h00, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Anelize Terezinha Jung Finkler** a fazer a apresentação da dissertação de mestrado intitulada “*Estudo da agitação intermitente na produção de pectinases por fermentação em estado sólido em escala piloto*”. 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, 30 de março de 2016.

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

Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Júnior
(PPGEQ/UFPR) – Membro Interno

Prof. Dr. Wellington Balmant
(NPDEAS/UFPR) – Membro Externo

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Eloise e Narcizo, pelo amor e dedicação, por acreditarem nesse sonho e por serem minha maior referência e meu porto seguro.

Ao meu marido Luiz, que saiu da zona de conforto e encarou esse desafio ao meu lado, com muita paciência e companheirismo.

Ao meu irmão Lucas pelo apoio e amizade.

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

À professora Nadia Krieger, por toda ajuda e pelos conselhos.

À Alessandra Biz e à Luana de Oliveira Pitol, pelo conhecimento transmitido, por toda a ajuda nos experimentos, por encarar tantas noites mal dormidas no biorreator piloto e pela amizade.

Aos alunos de iniciação científica, Amanda, Bruna e Henrique.

À Aline Pereira, à Maura e ao Gerson pelo conhecimento transmitido, pelo apoio moral, por toda ajuda e pela amizade.

À professora Regina Jorge pelo convite para a seleção de mestrado.

À Rubine Ihabuinski pelo apoio durante a mudança para Curitiba e pela amizade.

À Diana Vélez, Juliana Werneck, Luana Almeida, Mariana Gipiela, Priscila Zorzenão pelos estudos compartilhados, pelos cafés e pela amizade.

A todos os colegas do LTEB e do LTEF.

A todos os colegas da turma de mestrado por me receberem tão bem em Curitiba e por toda a ajuda nas disciplinas.

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

Aos membros da banca, professores Luiz Fernando de Lima Luz Júnior e Wellington Balmant.

À UFPR.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Que a estrada se erga ao seu encontro,
Que o vento esteja sempre às suas costas,
Que o sol brilhe quente sobre a sua face,
Que a chuva caia suave sobre os seus campos,
E até que nos encontremos de novo,
Que Deus lhe guarde na palma de sua mão!

Benção Irlandesa

RESUMO

A fermentação em estado sólido (FES) tem o potencial de ser utilizada para a produção de pectinases, que poderiam então ser utilizadas para a sacarificação de pectina em biorrefinarias de polpa cítrica. Em um estudo recente da produção de pectinases por *Aspergillus niger* em biorreator de leito fixo em escala piloto, foram reportados problemas com a aglomeração de partículas e encolhimento do leito. Isto provocou a formação de caminhos preferenciais, levando ao superaquecimento em regiões localizadas do leito e à falta de uniformidade da atividade pectinolítica no final do cultivo. No presente trabalho, foi investigada a utilização da agitação intermitente como uma estratégia para prevenir a aglomeração e, assim, melhorar o desempenho em um biorreator de leito fixo para a produção de pectinases. Foram comparados três regimes de agitação com um substrato que consiste da mistura de 27 kg de farelo de trigo e 3 kg de bagaço de cana de açúcar: uma única agitação (10 h), três agitações (8, 10 e 12 h) e cinco agitações (a cada 2 h de 8 a 16 h). Foi obtida boa uniformidade na atividade pectinolítica após um evento de agitação, mas se o leito ficar sem agitação por períodos em torno de 10 h, o problema da aglomeração tende a retornar, o que pode levar a perda da uniformidade. O regime com o melhor desempenho foi um cultivo de 20 h com três agitações. A aglomeração não ocorreu e, como resultado, a temperatura do leito foi mantida na faixa de 30 a 35°C, que é favorável ao crescimento de *A. niger*. Através desse controle da temperatura, é possível promover a homogeneidade da atividade pectinolítica, com níveis uniformes ao longo de toda a extensão do leito no momento da colheita. Para 15 amostras retiradas a partir de diferentes posições na vertical e na horizontal do leito no final desse cultivo, a atividade pectinolítica média foi de 22 U g⁻¹, com desvio padrão da amostra de 2 U g⁻¹. Conclui-se que a utilização de biorreatores de leito fixo com agitação intermitente é uma estratégia promissora para a produção de pectinases em FES.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido. Biorreator de leito fixo. *Aspergillus niger*. Agitação intermitente. Pectinases. Uniformidade do produto.

ABSTRACT

Solid-state fermentation (SSF) has the potential to be used for the production of pectinases, which could then be used for the saccharification of pectin in citrus waste biorefineries. In a recent study of production of pectinases by *Aspergillus niger* in a pilot-scale packed-bed bioreactor, we encountered problems with the agglomeration of particles and shrinkage of the substrate bed. This led to the creation of preferential flow paths, with overheating in localized regions of the bed and a lack of uniformity of pectinase levels at the end of the fermentation. In the current work, we investigated the use of intermittent agitation as a strategy for preventing agglomeration and thereby improving the performance of our pilot-scale packed-bed bioreactor. We compared three agitation regimes with a substrate mixture consisting of 27 kg of wheat bran and 3 kg of sugarcane bagasse: a single agitation (10 h), three agitations (at 8, 10 and 12 h) and five agitations (every 2 h from 8 to 16 h). Good uniformity of pectinase activity in the bed was achieved after an agitation event, but if the bed was left unmixed for periods of around 10 h, the agglomeration problems tended to return, with subsequent loss of uniformity. The best regime was that with three agitations. Agglomeration did not occur and, as a result, the bed temperature was maintained in the range of 30 to 35°C, which is favorable for growth of *A. niger*. Harvesting would be at 20 h, when the pectinase levels were relatively uniform within the bed: For 15 samples removed from different vertical and horizontal positions of the bed at this time, the average pectinase activity was 22 U g⁻¹ and a sample standard deviation of 2 U g⁻¹. We conclude that use of intermittently-mixed packed-bed bioreactors is a promising strategy for producing pectinases in SSF.

Key-words: Solid-state fermentation. Packed-bed bioreactor. *Aspergillus niger*. Intermittent agitation. Pectinases. Product uniformity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA TEÓRICO DE UMA BIORREFINARIA DE POLPA CÍTRICA.....	19
FIGURA 2 – MODELO DE ESTRUTURA PARA A MOLÉCULA DE PECTINA. (A) VISÃO GERAL MOSTRANDO AS RAMIFICAÇÕES RAMNOGALACTURONANAS I E II. (B) HOMOGALACTURONANA MOSTRANDO O ÁCIDO D-GALACTURÔNICO COM GRUPOS CARBOXÍLICOS METILADOS DESTACADOS EM VERMELHO.....	21
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DAS PECTINASES NA ESTRUTURA DA PECTINA.....	23
FIGURA 4 – DIAGRAMA DO EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA A TÉCNICA ASF	25
FIGURA 5 – (A) DIAGRAMA DO FLUXO DE AR NO INTERIOR DO BIORREATOR GDD (B) IMAGEM DO ASPECTO EXTERNO DO EQUIPAMENTO....	27
FIGURA 6 – BIORREATOR PILOTO	29
FIGURA 7 – BIORREATOR DE LEITO FIXO COM AERAÇÃO FORÇADA	32
FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA AGITAÇÃO INTERMITENTE EM FES. (A) NO INÍCIO DO CULTIVO (B) APÓS CRESCIMENTO DAS HIFAS AÉREAS (C) APÓS EVENTO DE AGITAÇÃO.....	33
FIGURA 9 – BIORREATOR PILOTO. (A) VISÃO GERAL DO BIORREATOR E DO SISTEMA DE AERAÇÃO. (B) DETALHES DE PROJETO DO BIORREATOR DE LEITO FIXO DE ESCALA PILOTO. (C) LOCAIS DE RETIRADA DAS AMOSTRAS NO LEITO NO FINAL DO CULTIVO PARA MAPEAMENTO DO LEITO....	40
FIGURA 10 – PERFIS DE TEMPERATURAS TEMPORAIS DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX- O_{26}	48
FIGURA 11 – PERFIS DE TEMPERATURAS TEMPORAIS DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX- O_{20}	49

FIGURA 12 – EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO SOBRE O PERFIL DE TEMPERATURA TEMPORAL DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX-1 ₂₆	50
FIGURA 13 – IMAGEM DO LEITO DE MIX-1 ₂₆ NO FINAL DO CULTIVO	50
FIGURA 14 – EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO SOBRE O PERFIL DE TEMPERATURA TEMPORAL DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX-3 ₂₆	51
FIGURA 15 – EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO SOBRE O PERFIL DE TEMPERATURA TEMPORAL DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX-5 ₂₆	51
FIGURA 16 – IMAGEM DO LEITO AGLOMERADO NO TERMOPAR NA ALTURA DE 5 CM DE LEITO NO FINAL DO CULTIVO MIX-5 ₂₆	52
FIGURA 17 - PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-0 ₂₆	53
FIGURA 18 - PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-0 ₂₀	53
FIGURA 19 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-1 ₂₆ ..	54
FIGURA 20 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-5 ₂₆ ..	54
FIGURA 21 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-3 ₂₀ ..	55
FIGURA 22 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-3 ₂₆ ..	56
FIGURA 23 - A UNIFORMIDADE DAS ATIVIDADES PECTINOLÍTICAS AO LONGO DO EIXO VERTICAL DO LEITO	57

FIGURA 24 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-3.....	59
FIGURA 25 - PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-0	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS SISTEMAS DE FES PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES DA LITERATURA	26
TABELA 2 - CULTIVOS NO BIORREATOR PILOTO PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES COM EVENTOS DE AGITAÇÃO INTERMITENTE	44

LISTA DE ABREVIATURAS

UFPR – Universidade Federal do Paraná

VTT – Centro de Pesquisa Técnica da Finlândia (Technical Research Centre of Finland)

FES – Fermentação em estado sólido

FCOJ – Suco de laranja concentrado congelado (Frozen Concentrate Orange Juice)

FDCA – Ácido 2,5 furandicarboxílico

PET – Tereftalato de polietileno

PBT – Tereftalato de polibutileno

ASF – Fermentação em substrato absorvido (Absorbed Substrate Fermentation)

GDD – Dinâmica de gás duplo (Gas Double-Dynamic)

BTR – Biorreator do tipo tambor rotativo

C/D/C – agitação contínua/ sem agitação/ agitação contínua

D/C/D – sem agitação/ agitação contínua/ sem agitação

BDA – Batata dextrose ágar

DNS – Ácido 3,5 dinitrosalicílico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 BIORREFINARIAS DE POLPA CÍTRICA	17
2.2 HIDRÓLISE DA PECTINA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO	20
2.3 PECTINASES.....	22
2.4 FES PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES	23
2.5 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM ESCALA PILOTO	24
2.6 FES E UNIFORMIDADE	30
2.7 FES E AGITAÇÃO	33
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA	39
4.2 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA CULTIVO NO BIORREATOR PILOTO	39
4.2.1 Substratos	39
4.2.2 Descrição do biorreator piloto.....	39
4.2.3 Checagem dos termopares	41
4.2.4 Limpeza do biorreator e do sistema de umidificação	42
4.2.5 Preparo do pré-inóculo em BDA.....	42
4.2.6 Preparo do inóculo para a escala piloto	43
4.2.7 Cultivos no biorreator piloto.....	43
4.2.8 Amostragens	45
4.2.9 Determinação da umidade	45
4.2.10 Extração	45
4.2.11 Determinação da atividade pectinolítica	46
4.2.12 Determinação do desvio padrão da amostra	46
5 RESULTADOS	47
5.1 PERFIS DE TEMPERATURA DO LEITO.....	48
5.2 PERFIS TEMPORAIS DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E DE UMIDADE NO TOPO DO LEITO	52
5.3 UNIFORMIDADE DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO LEITO	56

5.4 REPRODUTIBILIDADE DOS CULTIVOS	58
6 DISCUSSÃO	60
6.1 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FES EM ESCALA PILOTO	60
6.2 REGIMES DE AGITAÇÃO E UNIFORMIDADE EM BIORREATORES DE FES.	61
7 CONCLUSÕES	64
8 PROPOSTAS FUTURAS.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho aborda a produção de pectinases por fermentação em estado sólido (FES). Já existem pectinases produzidas em larga escala e vendidas comercialmente. A produção dessas enzimas é realizada por fermentação submersa, porém seus custos são elevados. A FES apresenta potencial de ser uma alternativa viável, pois utiliza resíduos agroindustriais que, em geral, apresentam grande disponibilidade e baixo custo (SINGHANIA *et al.*, 2009). Adicionalmente, a FES pode viabilizar maior produtividade de enzimas em menores volumes de trabalho dos biorreatores, reduzindo a quantidade de efluentes e os custos para recuperação do produto (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000). Entretanto, a ocorrência de gradientes de temperatura e umidade através do leito em FES ocasiona falta de uniformidade das condições de cultivo e prejudica o desempenho do sistema. Dessa maneira, são necessárias estratégias de projeto e de operação para diminuição desses gradientes de temperatura, as quais podem permitir o controle das condições em todo o leito a fim de minimizar os desvios e, conseqüentemente promover alta produtividade de produtos microbianos uniformemente no leito (MITCHELL *et al.*, 2011).

Esta dissertação de mestrado faz parte de um projeto de colaboração entre 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). Esse projeto de colaboração tem como objetivo desenvolver tecnologias apropriadas para a implantação em biorrefinarias, com foco principal de produzir ácido D-galacturônico e seus derivados a partir da polpa cítrica. A polpa cítrica é composta de cascas, células e sementes e é um resíduo proveniente do processamento da laranja *in natura* para produção de suco concentrado. Uma biorrefinaria integra processos para a conversão de biomassa de resíduos em biocombustíveis, energia e produtos. Ao produzir múltiplos produtos, uma biorrefinaria pode aproveitar todos os componentes da biomassa e seus intermediários, e, desta maneira, maximizar o valor obtido a partir da biomassa. Para obter ácido D-galacturônico a partir da polpa cítrica, é necessário hidrolisar a pectina presente na polpa. Esta hidrólise tem que ser feita enzimaticamente, uma vez que a hidrólise ácida de pectina leva à destruição de uma proporção significativa do ácido

D-galacturônico liberado. A hidrólise enzimática de pectina requer pectinases de baixo custo.

Pitol *et al.* (2016) recentemente estudaram a produção de pectinases por FES em escala piloto. O biorreator foi operado com aeração forçada. O leite permaneceu estático durante o cultivo e ocorreu a compactação e o encolhimento do leite, devido à formação de aglomerados de partículas de substrato pelo crescimento das hifas aéreas do fungo filamentososo, produzindo frestas entre o leite e a parede do biorreator. Em consequência disso, o ar passou através dessas frestas e não através do leite, levando a um superaquecimento geral no leite e resultando na heterogeneidade das atividades pectinolíticas medidas em diferentes pontos do leite.

Este trabalho pretende elucidar os efeitos da utilização da agitação intermitente para minimizar os gradientes de temperatura do leite, evitar a formação de caminhos preferenciais ao fluxo de ar, e, assim, garantir uniformidade de formação de produto através do leite de FES em escala piloto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão, primeiro serão informados o cenário mundial e nacional das biorrefinarias de polpa cítrica e a utilização da hidrólise enzimática da pectina para produção de ácido D-galacturônico e outros intermediários químicos. Segundo, serão apresentados o conceito de pectinases e suas aplicações. Terceiro, serão revisados os trabalhos sobre produção de pectinases por FES em escala piloto, ou seja, em escalas iguais ou maiores que 1 kg de substrato úmido. Quarto, serão apresentados trabalhos que abordam problemas de FES com o aumento de escala, entre eles gradientes de temperatura e falta de uniformidade de produto no leito de FES. Por fim, serão apresentados trabalhos sobre a utilização da agitação intermitente para minimizar os problemas de gradiente de temperatura e não uniformidade que ocorrem em FES em escala piloto.

2.1 BIORREFINARIAS DE POLPA CÍTRICA

A polpa cítrica é um resíduo agroindustrial composto de cascas, células e sementes, proveniente das indústrias produtoras de suco de laranja. O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, com a safra 2015/16 estimada em 11,4 milhões de toneladas de laranja *in natura* (CITRUSBR, 2016). Desse total produzido, 10,2 milhões de toneladas serão destinados ao processamento que resultará em 888.452 toneladas de suco de laranja concentrado congelado equivalente a 66°Brix (FCOJ = Frozen Concentrate Orange Juice) (CITRUSBR, 2016). A produção de polpa cítrica no Brasil pode ser calculada em 5,6 milhões de toneladas úmida, considerando que o suco é extraído a 10,5 °BRIX e que em torno de 55% do peso úmido da laranja processada é resíduo. A utilização desta polpa cítrica é limitada pela dificuldade no armazenamento, pois degrada rapidamente. Para fins de armazenagem é necessário realizar a secagem da polpa cítrica, o que envolve altos custos. A secagem da polpa cítrica pode ser viabilizada pela busca de novas formas de agregar valor a esse resíduo.

Recentemente, vários autores sugeriram a possibilidade de estabelecer biorrefinarias a fim de produzir vários produtos a partir da polpa cítrica, entre os quais: D-limoneno, pectina, etanol e biogás (FIGURA 1). O D-limoneno é um terpeno cítrico, que pode ser extraído da polpa cítrica por prensagem a frio, destilação a vapor ou extração com solvente. Possui diversas aplicações como aromatizante nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e química. A pectina é utilizada na indústria alimentícia como agente gelificante (RICHARD e HILDITCH, 2009). No entanto, considerando que a polpa cítrica possui 75% de umidade e que o potencial de extração da pectina é de 14,4% (m/m, pectina/polpa cítrica seca) (MAMMA, KOURTOGLOU e CHRISTAKOPOULOS, 2008), somente o Brasil poderia produzir 202 mil toneladas de pectina, quantidade muito maior que o mercado mundial de pectina, que é em torno de 48 mil toneladas/ano (BOMGARDNER, 2013). Portanto, seria mais interessante fazer a sacarificação da pectina para liberação do ácido D-galacturônico, que constitui mais de 75% da matriz polimérica da pectina (AXELOS e THIBAUT, 1991). O ácido D-galacturônico pode, então, ser convertido em compostos como o ácido galactárico e o ácido L-galactônico, que possuem várias aplicações comerciais e também apresentam potencial para atuar como precursores de outros produtos, tais como ácido ascórbico e bio-plásticos (RICHARD e HILDITCH, 2009; MOJZITA *et al.*, 2010; KUIVANEN, PENTILÄ e RICHARD, 2015). A produção de etanol a partir da polpa cítrica é um processo posterior à extração do D-limoneno e da pectina, com uma etapa de hidrólise enzimática da celulose e posterior fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* para utilização como biocombustível, dentre outras aplicações. O biogás poderia ser obtido através da digestão anaeróbia do resíduo da produção de etanol e utilizado para a produção do vapor necessário aos processos de extração do D-limoneno e de destilação do etanol produzido (LOHRASBI *et al.*, 2010; LOPEZ, LI e THOMPSON, 2010; POURBAFRANI *et al.*, 2010).

A conversão de ácido D-galacturônico a ácido galactárico é possível através da modificação do metabolismo de cepas de fungos filamentosos por técnicas de engenharia genética. O ácido galactárico pode ser utilizado em diversas aplicações como fermento químico, como substituinte do ácido cítrico em produtos farmacêuticos (efervescentes), aromatizante em sorvetes, bebidas e geleias, bem como agente quelante e em cosméticos para a pele (MOJZITA *et al.*, 2010). Também possui aplicações potenciais como produto de partida para síntese química

de outros produtos como o ácido 2,5 furandicarboxílico (FDCA), que é um bloco estrutural de partida para a produção de vários poliésteres alternativos ao tereftalato de polietileno (PET) e ao tereftalato de polibutileno (PBT) amplamente utilizados na fabricação de garrafas, tubos, tecidos. O FDCA foi classificado como um dos doze compostos químicos de maior valor agregado produzido a partir de biomassa no relatório *Top Value-Added Chemicals from Biomass* (WERPY e PETERSEN, 2004) elaborado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos da América.

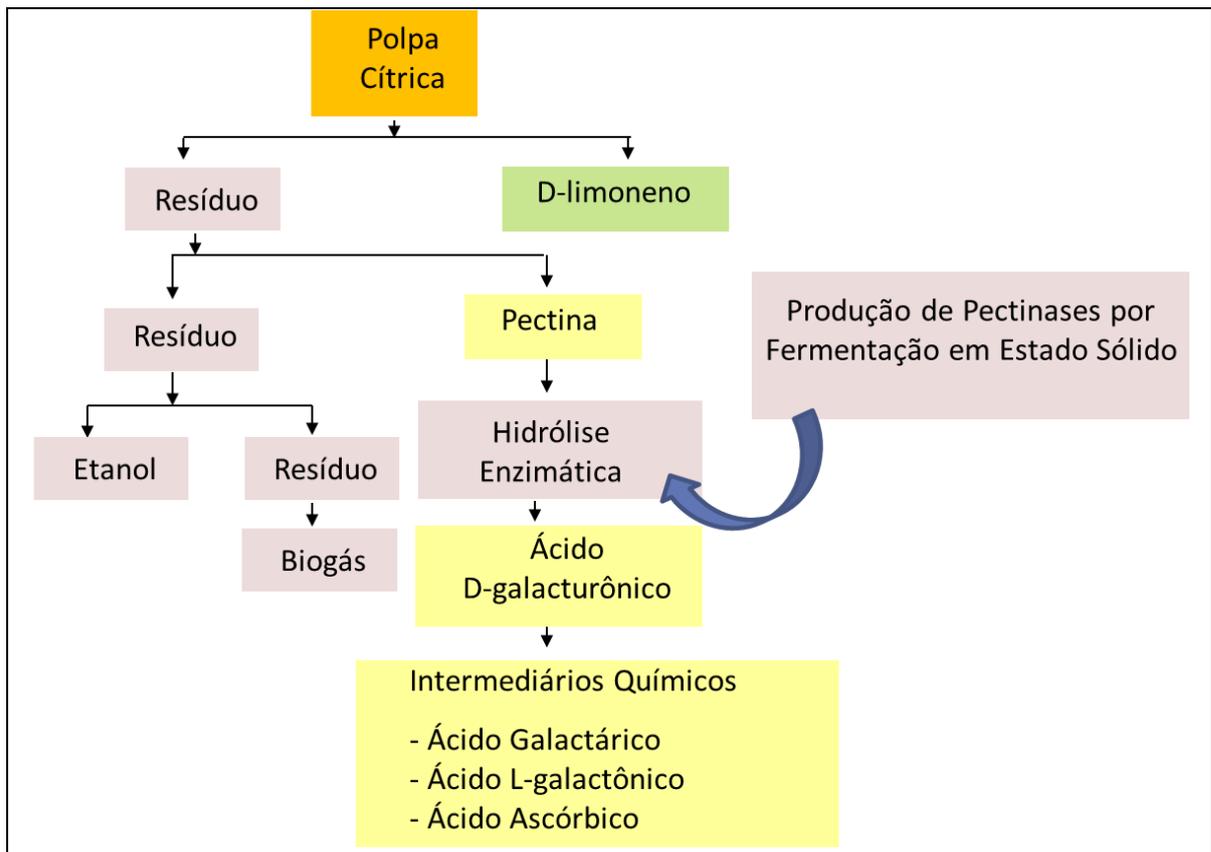


FIGURA 1 – FLUXOGRAMA TEÓRICO DE UMA BIORREFINARIA DE POLPA CÍTRICA
 FONTE: Adaptado de LOHRASBY *et al.* (2010) e LOPES, LI E THOMPSON, (2010)

O ácido L-galactônico é pouco utilizado, pois ainda não é produzido em larga escala. Com a implantação de biorrefinarias que viabilizem a hidrólise da pectina de polpa cítrica em ácido D-galacturônico, seria possível converter ácido D-galacturônico a ácido L-galactônico, por via redutiva, utilizando um fungo modificado através de técnicas de engenharia metabólica como um biocatalisador. O ácido L-galactônico poderia então ser utilizado como substituinte do ácido D-glucônico, já que possuem propriedades semelhantes. O ácido D-glucônico possui aplicações

comerciais como regulador de acidez em alimentos e agente quelante em produtos de limpeza (RICHARD e HILDITCH, 2009).

O ácido ascórbico, mais conhecido como vitamina C, é amplamente utilizado como antioxidante na indústria de alimentos, de bebidas e farmacêutica. A produção tradicional desse composto é feita por um processo de conversão química de D-glucose em ácido ascórbico em múltiplas etapas. Recentemente, Kuivanen, Pentilä e Richard (2015) sugeriram uma rota biossintética capaz de converter ácido D-galacturônico a ácido ascórbico em uma única etapa com bons rendimentos.

2.2 HIDRÓLISE DA PECTINA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO D-GALACTURÔNICO

A pectina é um polissacarídeo heterogêneo ácido complexo, carregado negativamente, com alto peso molecular. Está amplamente presente no reino vegetal, como principal componente da lamela média, responsável pela ligação entre as paredes primárias das células vegetais (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005). A polpa cítrica é rica em pectina, com teor de 15% em massa seca (POURBAFRANI *et al.*, 2010).

A pectina é formada por três grupos principais, a homogalacturonana, a ramnogalacturonana I e a ramnogalacturonana II, todos contendo ácido D-galacturônico em maior ou menor quantidade (FIGURA 2) (PEDROLLI *et al.*, 2009). A homogalacturonana é a cadeia linear principal, formadas por cadeias lineares de resíduos de ácido D-galacturônico agrupados por ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 4). Os grupos carboxilas da homogalacturonana podem ser parcialmente metil-esterificados, enquanto que os grupos hidroxilas podem ser acetil-esterificados em C-2 e C-3. A ramnogalacturonana I é uma família de polissacarídeos com uma cadeia principal formada pela repetição do dissacarídeo de ácido D-galacturônico ligado α -(1 \rightarrow 4), de ramnose ligados α -(1 \rightarrow 2) e unidades de galacturonato ligados β -(1 \rightarrow 4). As cadeias laterais do dissacarídeo podem ser substituídas por cadeias de oligossacarídeos neutros e ácidos e por resíduos de arabinose, galactose, arabinogalactose, xilose ou fucose nos carbonos C1 ou C2 (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005).

A ramnogalacturonana II é uma estrutura de alta complexidade, formada por uma cadeia linear de no mínimo oito resíduos de ácido D-galacturônico ligados α -(1 \rightarrow 4), com cadeias laterais conservadas que podem ser compostas de até doze tipos de monossacarídeos diferentes, incluindo ácido D-galacturônico e alguns açúcares incomuns, tais como o ácido acérico, a apiose, o ácido 2-ceto-3 deoxi-D-mano-octulosônico, o ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico, 2-O-metil-fucose e 2-O-metil-xilose (CANTERI *et al.*, 2012; YAPO *et al.*, 2007; MOHNEN, 2008).

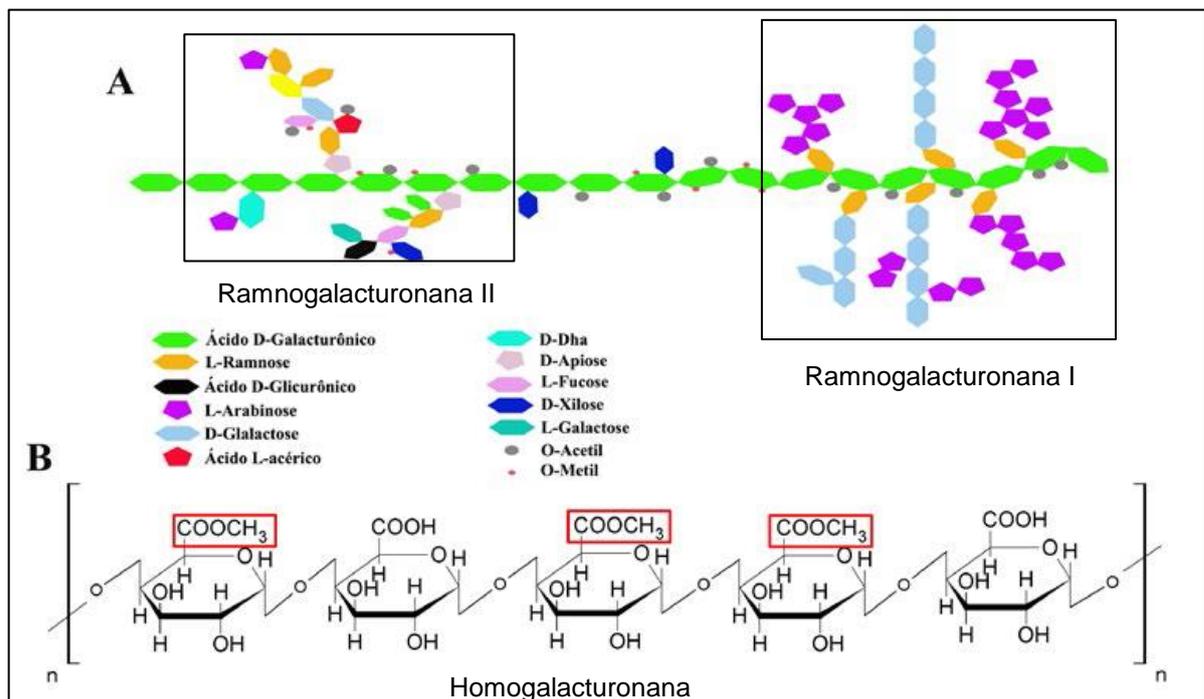


FIGURA 2 – MODELO DE ESTRUTURA PARA A MOLÉCULA DE PECTINA. (A) Visão geral mostrando as ramificações ramnogalacturonanas I e II. (B) Homogalacturonana mostrando o ácido D-galacturônico com grupos carboxílicos metilados destacados em vermelho.
 FONTE: FARIAS (2014)

Devido a essa complexidade desses três grupos principais que formam a estrutura da pectina, o processo de sacarificação pode ser realizado por duas vias: a hidrólise ácida ou a hidrólise enzimática. A hidrólise ácida necessita de alta concentração de ácido e de alta temperatura, além de prolongado tempo de reação para hidrolisar as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácido D-galacturônico. Essas condições extremas acabam por degradar uma porção significativa do ácido D-galacturônico liberado no processo de hidrólise e diminui o rendimento final de ácido D-galacturônico (BLAKE e RICHARDS, 1968).

A hidrólise enzimática é uma alternativa atraente, pois preserva as unidades do ácido D-galacturônico que são liberadas. Entretanto, a reação de hidrólise enzimática da pectina se torna lenta, se for realizada com alto teor de sólidos. Pode ser obtido um aumento da velocidade da hidrólise da pectina ao realizar um pré-tratamento com ácido diluído para solubilização da hemicelulose e celulose na polpa cítrica. A seguir, deve ser realizado o tratamento enzimático com uma solução mista de pectinases e celulases, para aumentar a liberação de glicose, frutose, ácido galacturônico, arabinose e galactose (GROHMAN, CAMERON e BUSLIG, 1995). De qualquer maneira, mesmo obtendo maior velocidade na reação, ao realizar o tratamento com ácido diluído seguido do tratamento enzimático, é essencial obter pectinases de baixo custo a fim de viabilizar a hidrólise enzimática.

2.3 PECTINASES

As pectinases formam um conjunto de enzimas capazes de degradar a estrutura heterogênea da pectina (FIGURA 3). Podem ser classificadas como enzimas despolimerizantes ou desesterificantes, de acordo com o ataque que realizam na molécula de pectina. As enzimas despolimerizantes podem ter ação endo ou exo, conforme a posição da cadeia do substrato degradada.

As despolimerases são responsáveis por catalisar a quebra das ligações glicosídicas presentes na pectina e são divididas em hidrolases e liases. As hidrolases catalisam a hidrólise das ligações α -(1 \rightarrow 4) e incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases. Já as liases quebram as ligações glicosídicas por β -eliminação, resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 da extremidade não-redutora do ácido D-galacturônico formado e incluem as pectina liases e as pectato liases (UENOJO e PASTORE, 2007; KASHYAP *et al.*, 2001).

As esterases são responsáveis pela desesterificação, ao catalisar a hidrólise dos grupos metil éster e dos grupos acetil éster. As pectina-metil-esterases hidrolisam as ligações metil éster próximo a um resíduo não esterificado de ácido D-galacturônico e liberam ácido péctico e metanol. As pectina-acetil-esterases

hidrolisam as ligações acetil éster, liberando ácido péctico e acetato (PEDROLLI *et al.*, 2009).

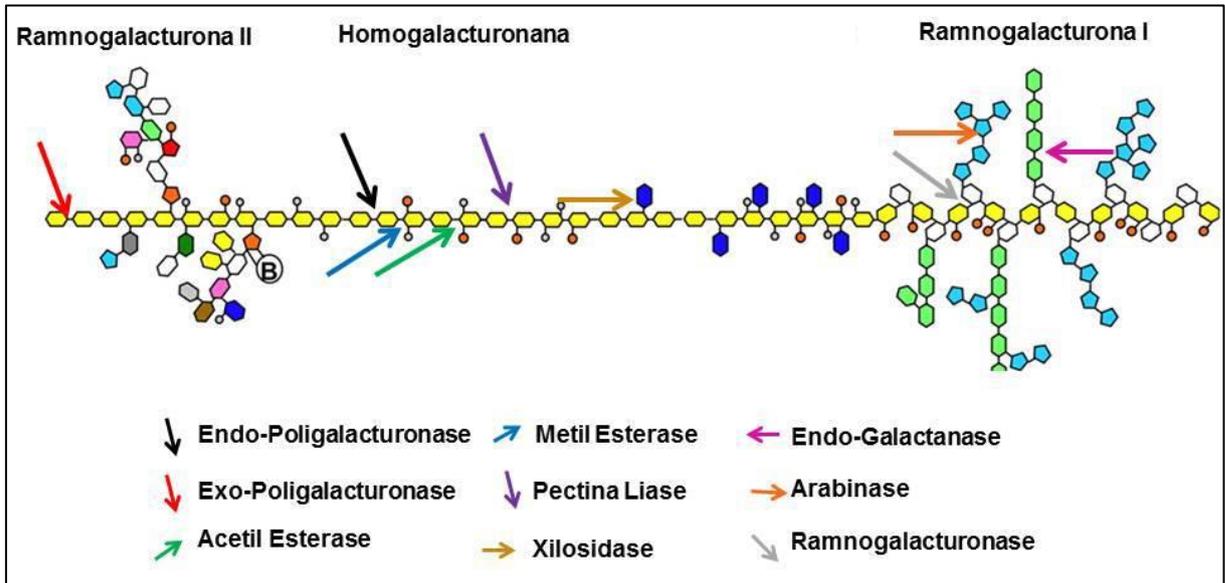


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO DAS PECTINASES NA ESTRUTURA DA PECTINA
 FONTE: FARIAS (2014)

2.4 FES PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES

As pectinases representam 25% do mercado mundial de enzimas (JAYANI, SAXENA e GUPTA, 2005). São produzidas em escala comercial por fermentação submersa com fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus* (SAKAI *et al.*, 1993).

Uma alternativa possível para a produção de pectinases de baixo custo é a utilização da FES (PITOL *et al.*, 2016). A FES consiste no crescimento de um micro-organismo em um substrato sólido úmido na ausência de água livre (LONSANE *et al.*, 1985) e com o espaço entre as partículas preenchido por uma fase gasosa contínua (MITCHELL, KRIEGER e BEROVIČ, 2006). O meio de FES é muito semelhante ao ambiente natural dos micro-organismos e, portanto, favorável ao crescimento e produção de metabólitos secundários de interesse, como enzimas, antibióticos, alcaloides, ácidos orgânicos, biopesticidas, biossurfactantes, biocombustíveis e aromatizantes. Outra vantagem é a possibilidade de utilização de

resíduos agroindustriais amplamente disponíveis e de baixo custo, o que pode viabilizar a produção de pectinases em FES e ajuda a destinar adequadamente esses resíduos, evitando problemas de poluição ambiental (SINGHANIA *et al.*, 2009). Além disso, a FES pode apresentar maior produtividade por volume de reator devido ao meio mais concentrado, o que implica em menores custos de capital e de operação, exigindo equipamentos mais simples. Dessa maneira, pode facilitar a recuperação do produto e reduzir a geração de efluentes (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000). A FES também pode permitir a utilização direta do sólido fermentado no meio reacional do processo posterior, eliminando a necessidade de uma etapa de recuperação e purificação do produto de interesse.

Em contrapartida, a produção de enzimas por FES é um processo dispendioso em relação ao tempo de crescimento dos micro-organismos e a dificuldade de homogeneizar o meio tanto pela quantidade de inóculo como para a distribuição de água. A ampliação da escala de FES ainda é pouco difundida devido às limitações de transferência de calor e massa. Em grandes quantidades de substrato a transferência de massa e calor ocorre somente por difusão, o que pode gerar gradientes de temperatura, prejudicar o crescimento do micro-organismo e degradar o produto formado no meio.

Embora a FES para produção de pectinases com o fungo filamentososo *Aspergillus niger* em escala de bancada tenha sido muito estudada nos últimos 20 anos (SOLIS-PEREYRA *et al.*, 1993; DEBING *et al.*, 2006; PATIL *et al.*, 2006; MAMMA, KOURTOGLOU e CHRISTAKOPOULOS, 2008; TASKIN *et al.*, 2008; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011), não há regras gerais para orientar a ampliação de escala de reatores de FES (MITCHELL *et al.*, 2011) e, portanto, é necessário ampliar os processos caso a caso.

2.5 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM ESCALA PILOTO

Apesar da importância das pectinases nas indústrias de alimentos, têxtil, de papel, entre outras, há apenas três trabalhos sobre produção de pectinases por FES em escala piloto, ou seja, com 1 kg ou mais de substrato sólido úmido: Huerta *et al.*

(1994), He e Chen (2013) e Pitol *et al.* (2016) (Tabela 1). Os três trabalhos utilizaram o fungo filamentoso *Aspergillus niger* cultivado em vários substratos diferentes.

No trabalho de Huerta *et al.* (1994), foi utilizado um biorreator do tipo Zymotis, composto de uma caixa retangular (0,50 × 0,40 × 0,65 m), com volume de 130 L e capacidade para 10-25 kg de substrato seco, e com dez placas de troca térmica no interior, espaçadas em 5 cm (FIGURA 4). O cultivo foi realizado utilizando a técnica ASF (“*Absorbed Substrate Fermentation*”) que envolve a utilização de um suporte inerte com a água e os nutrientes adsorvidos em quantidades apropriadas para o cultivo em FES. Huerta *et al.* (1994) utilizaram o bagaço de cana como suporte para uma solução nutriente contendo sacarose, pectina cítrica refinada, sulfato de amônia, fosfato de potássio monobásico e ureia. O sistema também contava com aeração forçada com vazão de $0,4 \text{ m}^3 \text{ g-sólido-seco}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Para controle da temperatura do leito, foi utilizado sistema de placas de trocadores de calor abastecidos por uma linha de água de um reservatório. Um termopar localizado no leito enviava a medida da temperatura para o controlador, que enviava um sinal para abertura ou fechamento das válvulas solenoides de água, de acordo com a necessidade de aquecimento ou refrigeração do leito, a fim de manter a temperatura em 35°C. A umidade e a temperatura do ar de entrada foram controladas utilizando uma torre de umidificação com isolamento para suprimento de ar saturado (HUERTA *et al.*, 1994).

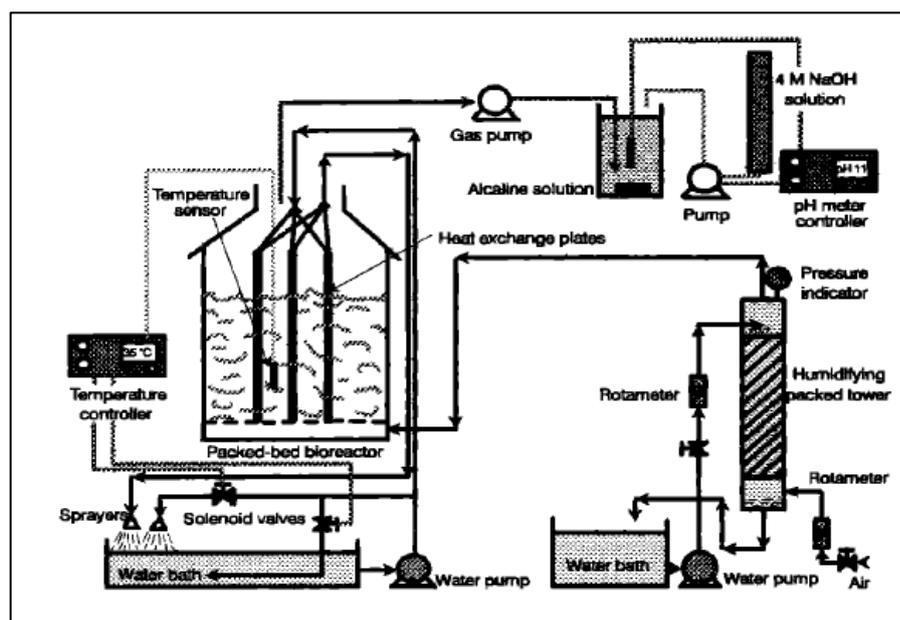


FIGURA 4 – DIAGRAMA DO EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA A TÉCNICA ASF
 FONTE: HUERTA *et al.* (1994)

Os autores declararam que os problemas de transferência de calor que em geral ocorrem em FES foram eliminados pela utilização do bagaço de cana como substrato inerte e do sistema de trocador de calor a placas no interior do leito. Mesmo que o controle de temperatura tenha sido eficiente, não foram apresentados os dados experimentais de monitoramento de temperatura em vários pontos do leito e da temperatura da água do trocador de calor a placas para comprovar essa afirmação sobre a eficiência do sistema. Também não foram fornecidas informações sobre a altura do leito, fator importante para determinar as estratégias para ampliação de escala. Apesar da técnica ASF se mostrar conveniente para variar as condições de cultivo, como a quantidade de água e os nutrientes de acordo com as necessidades exigidas, não é economicamente viável por utilizar compostos refinados de alto custo.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS SISTEMAS DE FES PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES DA LITERATURA

	BIORREATOR	SUBSTRATO	MASSA DE SUBSTRATO SECO	SISTEMA DE CONTROLE DE TEMPERATURA
Huerta <i>et al.</i> (1994)	Leito fixo V=130 L	Suporte bagaço de cana: sacarose e pectina refinados	10-25 kg	Trocador de calor a placas com água e aeração forçada
He e Chen (2013)	“Gas Double-Dynamic” V=800 L	Farelo de trigo + farelo de arroz + casca de laranja em pó + farinha de milho	15 kg	Ciclos de pressurização e despressurização de ar no interior do leito
Pitol <i>et al.</i> (2016)	Leito fixo V=200 L	Farelo de trigo com bagaço de cana	20-30 kg	Aeração forçada com ar saturado

FONTE: A AUTORA (2016)

He e Chen (2013) desenvolveram um biorreator piloto do tipo “Gas Double-Dynamic” (GDD) (FIGURA 5). O biorreator consiste em dois tanques cilíndricos horizontais interligados, cada um com dimensões de 1,70 m de comprimento e 0,55 m de diâmetro. O volume total dos dois cilindros é de 800 L, com capacidade para até 15 kg de substrato seco. No interior dos cilindros, há várias câmaras com bandejas (0,30 × 0,30 × 0,09 m) apoiadas em um suporte e sobrepostas. O

equipamento funciona como um biorreator de bandejas com ciclos de pressurização e despressurização de ar estéril, com circulação interna de ar.

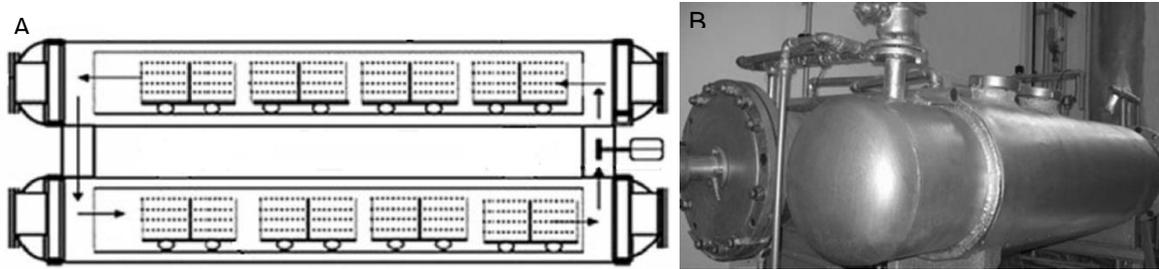


FIGURA 5 – (A) DIAGRAMA DO FLUXO DE AR NO INTERIOR DO BIORREATOR GDD (B) IMAGEM DO ASPECTO EXTERNO DO EQUIPAMENTO
 FONTE: HE e CHEN (2013)

Para a produção de pectinases, foi realizado um cultivo utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* AS3.3289 em substrato contendo 90% de farelo de trigo, 5% de farelo de arroz, 2% casca de laranja em pó e 3% de farinha de milho, umedecido com as soluções salinas de fosfato de potássio monobásico, sulfato de magnésio e sulfato de amônia. Os cultivos foram realizados em diferentes proporções líquido:sólido, na faixa de 0,8–1,4 (m/m). O ciclo de pressurização foi realizado da seguinte forma: o ar comprimido foi injetado no biorreator até que atingisse a pressão manométrica de 0,07 MPa e a pressão foi mantida durante 2 min. Após esse período, a pressão foi reduzida para 0,015 MPa e o biorreator foi mantido nessa pressão por 58 min. Após, o ciclo era reiniciado novamente. Além disso, o ar no biorreator era movimentado por um ventilador, que forçava a circulação do ar através dos espaços entre as bandejas. Para comparação do desempenho dos cultivos no biorreator GDD, foram realizados cultivos em frascos estáticos. Embora, não foram fornecidos maiores detalhes sobre esses cultivos, como por exemplo, a quantidade de substrato, a altura do leito e se havia algum controle da temperatura (HE e CHEN, 2013).

A atividade pectinolítica obtida no biorreator GDD foi 1,83 vezes maior do que aquela obtida nos frascos estáticos, na proporção líquido:sólido 1:1. Já a diferença de temperatura medida na altura de 3 cm de leito foi de 1,33°C para o biorreator GDD, menor do que a diferença de 4,83°C que foi obtida nos frascos estáticos, ambos os cultivos na mesma proporção líquido:sólido de 1,0.

De fato, é incoerente fazer comparações dos cultivos em frascos estáticos, pois não apresentam sistema de aeração forçada, nem ciclos de pressurização e

despressurização de ar, o que acaba por limitar a transferência de calor à condução no interior do leito. Para realizar a avaliação do biorreator GDD teria sido melhor escolher um biorreator de leito fixo com aeração forçada, já que ambos possuem um sistema que favorecem a transferência de calor no interior do leito.

Embora os autores tenham relatado que a utilização de ciclos de pressurização e despressurização de ar estéril poderiam promover a evaporação e o arrefecimento do leito e, assim, poderiam representar uma alternativa aos métodos de agitação tradicionais, o biorreator GDD apresentou as seguintes desvantagens para aplicação em escala industrial: a baixa produtividade volumétrica em relação ao volume total do biorreator, o alto consumo de energia, a rápida perda de umidade do leito e o alto risco de contaminação. Ademais, necessita de mão de obra intensiva por ter funcionamento similar ao biorreator de bandeja, inviabilizando economicamente o processo (HE e CHEN, 2013).

O trabalho de Pitol *et al.* (2016) representa o estudo com a maior escala de produção de pectinases até o presente: foi cultivado *Aspergillus niger* CH4 em 27 kg de farelo de trigo, com adição de 3 kg de bagaço de cana como agente de porosidade do leito (TABELA 1). O biorreator é um cilindro horizontal de aço inox com uma caixa retangular acoplada na parte interna (0,60 de largura × 0,70 de comprimento × 0,50 m de altura) de 200 L, onde se encontra o leito (FIGURA 6). A base dessa caixa retangular é perfurada para facilitar a distribuição do ar através de toda a extensão do leito e fica posicionada acima da câmara onde entra o ar saturado. Uma fração do ar de saída do biorreator passa por um analisador de gases que mede os teores de CO₂ e O₂. O equipamento pode trabalhar ou como leito fixo ou como leito fixo com agitação intermitente. O biorreator possui sistema de medição de temperatura com quatro pontos de medição instalados ao longo do eixo vertical.

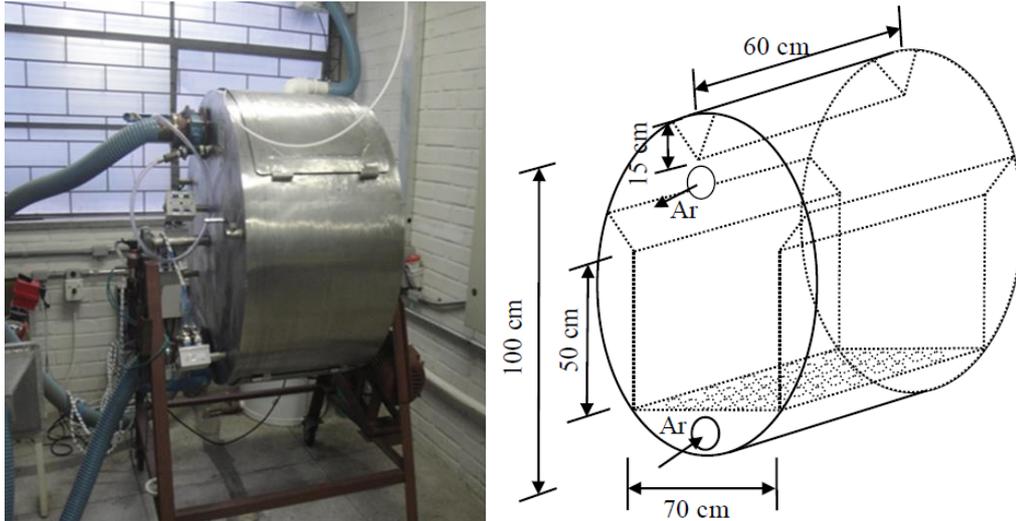


FIGURA 6 – BIORREATOR PILOTO
 FONTE: BARGA (2007)

O leito permaneceu completamente estático durante os cultivos e, como resultado, ocorreram alguns problemas. Por exemplo, no cultivo de 30 kg de substrato seco, o fungo causou a aglomeração das partículas de substrato, o que levou ao encolhimento do leito e ao surgimento de caminhos preferenciais entre o leito e a parede do biorreator. Como consequência, o leito sofreu um superaquecimento, com temperaturas atingindo até 43°C, medidas na altura de 33 cm de leito. No final do cultivo foi realizado um mapeamento do leito, ou seja, foram retiradas amostras de diferentes posições e alturas do leito para medição das atividades pectinolíticas. Os resultados foram bastante diferentes, variando de 11 a 28 U por grama de substrato seco.

Pitol *et al.* (2016) realizaram seus cultivos sem utilizar o recurso da agitação intermitente disponível no biorreator para reassentar o leito, apesar dos problemas com compactação do leito e formação de caminhos preferenciais do ar fornecido.

Pitol *et al.* (2016) propuseram uma estratégia de ampliação de escala de manter a altura do leito em 40 cm e aumentar o diâmetro do biorreator para vários metros, mantendo a velocidade superficial do ar em $0,1 \text{ m s}^{-1}$. O controle de temperatura do ar entrada seria realizado sempre que o leito alcançasse 35°C. Entretanto, essa estratégia não fornece garantias de uniformidade de formação de produto através do leito, já que a produtividade de $1,84 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ foi calculada com base na atividade pectinolítica medida no topo do leito em 10 h de cultivo.

A reprodutibilidade dos cultivos e a homogeneidade de produto através do leito são características desejáveis quando se trata da ampliação de escala de um

processo industrial. Embora Pitol *et al.* (2016) tenham demonstrado a falta de uniformidade através do leito por meio do mapeamento das atividades pectinolíticas em diferentes posições, não estudaram a utilização da agitação intermitente para solucionar esse problema. Também não foi realizado um cultivo com a aplicação da estratégia de escala proposta no intuito de verificar a homogeneidade do produto através do mapeamento do leito no tempo de 10 h, que havia sido reportado como o momento da maior produtividade no topo.

2.6 FES E UNIFORMIDADE

A resolução do problema da falta de uniformidade na concentração de produto através do leito em FES consiste em um dos grandes desafios que dificultam a utilização de FES em larga escala. A falta de uniformidade de produto pode ser provocada pela ocorrência de gradientes de temperatura e de umidade através do leito do biorreator. A aeração forçada ajuda na remoção do calor gerado, além de fornecer suprimento de O₂, mas pode resultar na secagem e encolhimento do leito. Esses problemas podem ser relacionados à formação de caminhos preferenciais no interior do leito, que ocorre como resultado da aglomeração do substrato pelo crescimento das hifas aéreas dos fungos. O encolhimento do leito induz a passagem do ar pelos caminhos preferenciais formados, impedindo o fluxo de ar através do leito e diminui a eficiência de remoção do calor gerado pelo micro-organismo no leito (DURAND e CHEREAU, 1987). A geração de calor metabólico e os mecanismos de transferência de calor limitados em FES podem resultar em um aumento na temperatura do leito suficiente para prejudicar o processo. Esse aumento da temperatura do leito pode provocar a perda de umidade do leito e, conseqüentemente, levar a inibição do metabolismo do micro-organismo, ao menos em algumas regiões do leito (MITCHELL *et al.*, 1999).

Apesar dos problemas listados acima serem reconhecidos há um longo tempo, poucos trabalhos têm dado atenção às conseqüências que as condições heterogêneas de cultivo têm sobre o crescimento do micro-organismo e a distribuição de produto no leito em escalas envolvendo 1 kg ou mais de substrato úmido. Quatro trabalhos abordaram o estudo da uniformidade do leito em bandejas

sem aeração forçada (NAGEL *et al.*, 2000; YANG, HUANG e TSAO, 2002; BASAK *et al.*, 2003; CHEN, XU e LI, 2004). Entretanto, nesse tipo de biorreator, a transferência de calor é limitada à condução através do leito, que limita a altura do leito em poucos centímetros. Portanto, esses estudos não apresentam relevância de resultados para comparação com o biorreator de leito fixo com aeração forçada utilizado neste trabalho, que pode acomodar um leito de até 50 cm de altura.

O único trabalho em um biorreator de leito fixo que abordou o efeito de gradientes de temperatura no crescimento de um fungo filamentosos na distribuição de produto no interior do leito foi realizado por Ghildyal *et al.* (1994). Os autores utilizaram um biorreator de coluna de leito fixo com aeração forçada, com dimensões de 34,5 cm de altura e 15 cm de diâmetro, em cinco diferentes fluxos de ar de 5, 10, 15, 20 e 25 L min⁻¹ (FIGURA 7). Para a produção de amiloglucosidase, foi utilizado *Aspergillus niger* CFTRI 1105 em 0,75 kg de farelo de trigo com 0,015 kg de farinha de milho e umidificado com solução ácida mineral. Foram medidas as temperaturas e atividades de amiloglucosidade em três diferentes alturas de leito, de 3,3, 17 e 28 cm a partir da base da coluna.

A temperatura aumentou conforme os medidores se aproximavam do topo do leito em qualquer fluxo de ar, devido ao transporte convectivo de calor a partir da base do leito. O transporte convectivo de calor ocorre da seguinte maneira: quando o ar está passando no início do leito, aquece e, como resultado, sua capacidade de carregar vapor aumenta; conforme esse mesmo ar avança através da altura do leito, se aquece até atingir um limite máximo de temperatura que pode ocorrer antes de atingir o topo do leito. Dessa maneira, a aeração forçada mantém temperaturas menores nas regiões do leito mais próximas da entrada de ar. As regiões mais próximas do topo do leito recebem ar mais quente e com o calor metabólico gerado, a temperatura aumenta nessa região do leito. As temperaturas medidas em todas as alturas foram menores com as vazões de ar maiores. Por exemplo, na altura de 17 cm de leito, a temperatura diminuiu 16,4°C, com o aumento da velocidade do ar de 5 para 25 L min⁻¹. Já para a altura de 28 cm, a redução foi de 14,6°C, comparando essas mesmas velocidades de ar.

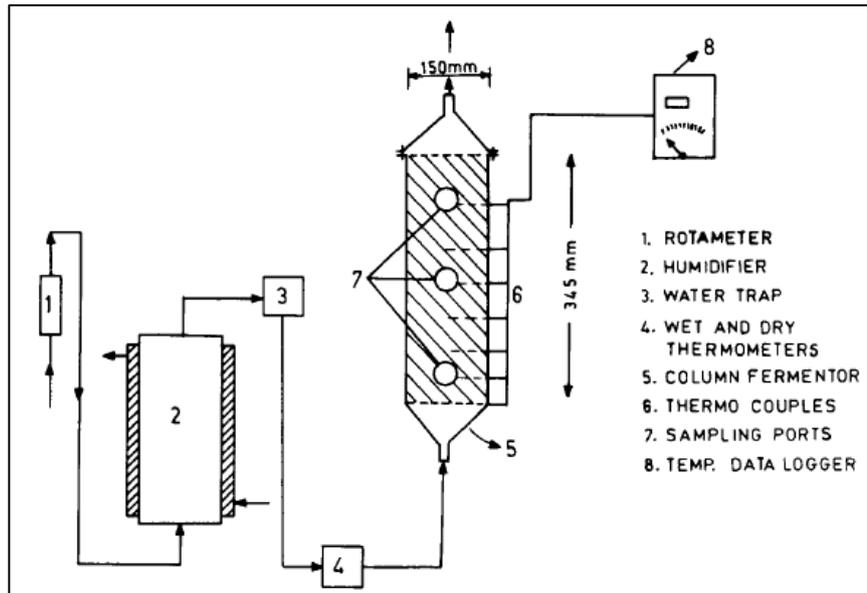


FIGURA 7 – BIORREATOR DE LEITO FIXO COM AERAÇÃO FORÇADA
 FONTE: GHILDYAL *et al.* (1994)

Na altura do leito de 3,3 cm, foram registradas as menores temperaturas e foram medidas as maiores atividades de amiloglicosidase. Por outro lado, quanto menor o fluxo de ar, maior a temperatura medida e, conseqüentemente, menor a atividade de amiloglicosidase.

Ghildyal *et al.* (1994) sugeriram que poderiam reduzir ainda mais os gradientes de temperatura com maior aumento do fluxo de ar, porém, isto poderia provocar a evaporação, que é outro parâmetro crítico em FES. Apesar do fornecimento de ar úmido ao sistema (92-95% UR a $30 \pm 2^\circ\text{C}$), essa diminuição da umidade poderia ser considerável, levando a uma redução da atividade enzimática. Embora os autores tenham relatado que a utilização de um biorreator de leito fixo com aeração forçada permite uma altura maior de substrato e a produção de maiores quantidades de amiloglicosidase, devido à redução dos gradientes de temperatura e o fornecimento adequado de oxigênio, o problema da heterogeneidade de produto através do leito de FES não foi solucionado.

2.7 FES E AGITAÇÃO

Os biorreatores de FES que permitem agitação, do tipo tambor rotativo ou por meio de agitação mecânica no interior do leito, podem proporcionar melhores condições de transferência de calor e de massa em comparação com biorreatores de leito fixo, bem como promover homogeneidade do leito ao longo da fermentação (FIGURA 8). Embora, em sistemas com agitação contínua, o micélio dos fungos pode ser danificado, prejudicando a formação do produto de interesse (LONSANE *et al.*, 1985). A agitação intermitente pode ser uma alternativa à agitação contínua, mas ainda seria necessário determinar a frequência ótima dos eventos de agitação. Apesar da importância do assunto, ainda há poucos estudos do efeito de diferentes regimes de agitação intermitente em biorreatores de FES em escalas iguais ou maiores a 1 kg de substrato úmido. Estes estudos levantam duas questões em relação à agitação intermitente. Primeiro, que existe o problema da falta de uniformidade das condições de cultivo no leito, que geram consequências para a uniformidade de produtos no leito e foi abordada por De Reu *et al.* (1993), Han, Kiers e Nout (1999) e Gassara *et al.* (2013). Segundo, o efeito da agitação intermitente em relação ao fungo que causa a formação de aglomerados, que pode prejudicar a fermentação e foi abordado por Schutyser *et al.* (2003).

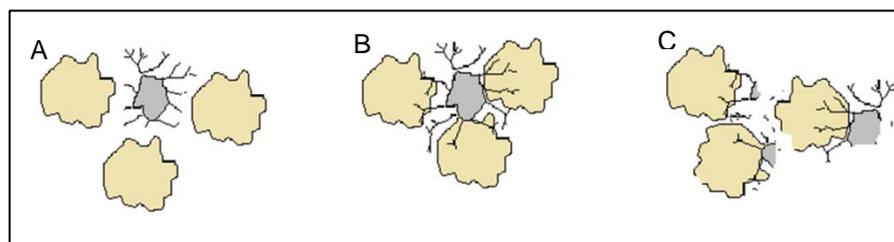


FIGURA 8 – REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA AGITAÇÃO INTERMITENTE EM FES. (A) No início do cultivo (B) Após crescimento das hifas aéreas (C) Após evento de agitação
 FONTE: A AUTORA (2016)

De Reu *et al.* (1993) desenvolveram um biorreator do tipo tambor rotativo (BTR) para produção de *tempe* em escala de laboratório. O biorreator utilizado apresentava volume de 4,7 L com 20 cm de diâmetro e 15 cm de comprimento. O biorreator possuía um sensor de temperatura no interior do leito e outro no espaço vazio (*headspace*), além de uma sonda para medição da umidade relativa do ar no

espaço vazio. O sistema também contava com fornecimento de ar úmido e analisador de gases O₂ e CO₂ na saída de ar. A velocidade de rotação, a direção e a duração foram programadas e controladas por um bloco de programação que também permitia intervenção manual.

Para a produção de *tempe*, foi utilizado o fungo *Rhizopus oligosporus* LU 575 NRRL 5905, inoculado em 1 kg de substrato de grãos de soja descascados, lavados e cozidos. Os experimentos foram conduzidos com cinco *set points* (32, 34, 36, 38,5 e 41°C). O *set point* é a temperatura do sistema na qual se inicia a agitação descontínua do sistema, com frequência aproximada de 1,4 h⁻¹. Durante o evento de agitação, a temperatura do substrato diminui, pois o substrato se mistura com o ar que está a 30°C. Ao atingir novamente a temperatura de rotação, inicia-se um novo evento de agitação e assim sucessivamente. Foram realizados experimentos sem agitação no mesmo BTR para comparar com o desempenho dos experimentos realizados com uso da agitação descontínua.

De Reu *et al.* (1993) relataram que o sistema de controle possibilitou a manutenção da temperatura no valor ótimo de crescimento para o micro-organismo (aproximadamente 37°C). Assim, o fungo continuou o desenvolvimento até 70 h de fermentação. Essa estratégia contrasta com a produção de *tempe* sem agitação, que parou após 36 h de fermentação quando atingiu 44°C. Embora, a medição de temperatura foi realizada num único ponto do leito e, portanto, não foi verificado se a temperatura estava uniforme no leito inteiro.

Posteriormente, foi realizado um estudo em um BTR similar, com dimensões de 1,1 m de comprimento e diâmetro interno de 0,7 m, com volume de 450 L e capacidade de 100-140 kg de soja úmida (HAN, KIERS e NOUT, 1999). Os micro-organismos utilizados foram *Rhizopus microsporus* LU 573 e *Rhizopus oligosporus* LU 575. O regime de agitação foi intermitente, com agitação por 30 s e repouso por 3 min, resultando em uma frequência de 17,1 h⁻¹ de acordo com a temperatura do *set point* no sistema de controle. As fermentações com agitação foram realizadas em duas temperaturas de incubação diferentes configuradas no *set point* do sistema de controle em 30 e 37°C. O controle de temperatura para o BTR era um sistema com um sensor de temperatura no leito, um banho de água com termostato para aquecimento e três pulverizadores de água fria com termostato para refrigeração externa do BTR. Durante a fermentação, o BTR ficava parcialmente imerso no banho para permitir o controle. Para comparação do desempenho do BTR, foram

realizadas fermentações em caixas de plástico rígido (bandejas) para a produção de *tempe*. Foram realizados vários experimentos com diferentes temperaturas iniciais na sala de incubação das bandejas de 25, 30 e 37°C, mas só foram mostrados os resultados de 25 e 30°C. Para a fermentação a 25°C em bandejas, a temperatura do leito atingiu 37°C e para 30°C, a temperatura do leito atingiu 42°C. As fermentações foram acompanhadas por 72 h para monitorar as mudanças na composição e textura do produto.

Apesar dos autores relatarem que o sistema com agitação foi capaz de manter a temperatura no *set point* ajustado, não são mostrados dados de monitoramento de temperatura do leito. De fato, nessa escala de largura e altura de biorreator, a troca de calor por condução nas paredes faz uma contribuição relativamente pequena à remoção do calor do leito e podem ter ocorrido gradientes de temperatura nas regiões do leito distantes da parede. Em relação à aeração, fator de grande importância para controle de temperatura em FES, Han, Kiers e Nout (1999) não apresentaram informações de temperatura e de umidade do ar, apenas que foi fornecido ar filtrado na vazão de 2 L min⁻¹. Nem mesmo foi mencionada a posição da entrada, distribuição e saída de ar do leito.

Foram realizadas várias análises para comparar o desempenho das fermentações com agitação descontínua com as fermentações sem agitação, embora as amostras tenham sido coletadas num único ponto do leito. Os resultados mostraram um aumento de pH, teor de nitrogênio amoniacal, amônia e teor de matéria seca não lipídica solúvel em água, que são esperados, ocorreram somente para as fermentações em bandejas e são devidos ao metabolismo das proteínas na produção de *tempe*. Portanto, apesar dos autores relatarem que o controle de temperatura no BTR foi adequado, a agitação intermitente afetou negativamente o desenvolvimento dos micro-organismos utilizados na produção de *tempe*.

Outro estudo foi realizado por Gassara *et al.* (2013), a fim de verificar a influência da aeração e diferentes regimes de agitação em FES para produção de enzimas ligninolíticas. Os experimentos foram conduzidos em um BTR com volume de 12 L contendo 4,5 kg de bagaço de maçã e inoculado com uma suspensão de esporos de *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24275. O biorreator estava localizado em um ambiente com a temperatura controlada em 37°C, com velocidade de agitação de 2 rpm e fluxo de ar de 2 vvm. A primeira amostra foi coletada em 6 horas de cultivo e as amostras foram coletadas posteriormente a cada 12 h até

completar 10 dias de fermentação. Foram testados três regimes de agitação: agitação contínua (C) durante todo o processo; (C/D/C) agitação contínua (C) durante a fase lag, sem agitação (D) na fase de crescimento e agitação contínua (C) na fase estacionária; (D/C/D) sem agitação (D) na fase lag, agitação contínua (C) na fase de crescimento e sem agitação (D) na fase estacionária. Para verificação dos melhores resultados, foram medidas as atividades de lignina peroxidase, lacase e manganês peroxidase, bem como a viabilidade do fungo e o teor dos compostos polifenólicos.

Os diferentes regimes de agitação influenciaram a produção de enzimas ligninolíticas, a viabilidade e a liberação de compostos polifenólicos. O melhor regime foi o sistema de agitação C/D/C, o que pode indicar que a ausência de agitação durante a fase de crescimento do *P. chrysosporium* aumentou a produção de enzimas ligninolíticas e da viabilidade celular. O mesmo comportamento foi observado em relação à liberação dos compostos polifenólicos. A ausência de agitação durante a fase de crescimento de *P. chrysosporium* aumentou a produção de enzimas que, por sua vez, aumentou a liberação dos compostos polifenólicos.

Entretanto, os autores não forneceram dados sobre a temperatura durante os experimentos e nem se preocuparam em coletar amostras em diferentes pontos do biorreator. Os autores definiram os períodos com e sem agitação, de acordo com as fases de crescimento do micro-organismo, mas não explicaram o critério de mudança nas fases. Não foi feita a comparação da produção dessas enzimas e dos compostos polifenólicos em outros sistemas sem agitação.

Schutyser *et al.* (2003) realizaram um estudo sobre aglomeração de substrato provocada pelo crescimento de hifas aéreas de fungos em FES num período inicial estático antes do primeiro evento de agitação. Para os experimentos, foi utilizado *Aspergillus oryzae* inoculado em grãos de trigo em um biorreator do tipo tambor horizontal rotativo. O biorreator consistia num cilindro de vidro, com duas placas laterais de policarbonato, com volume de 28,3 L. No eixo central do biorreator havia quatro sensores de temperatura que penetravam o leito e que poderiam ter a posição ajustada na direção radial, o que permitia o monitoramento da temperatura do leito em quatro pontos diferentes. O sistema de aeração era formado por um tubo estreito perfurado na região do centro do leito, ligado ao eixo horizontal, com um canal que forçava o ar através da superfície do leito com vazão de 6 L min⁻¹. Antes de entrar no biorreator, o ar foi umidificado a 25°C. O biorreator foi colocado dentro

de uma câmara com a temperatura controlada em 34°C. O ar umidificado passava, através de um tubo estreito, pela câmara, e era aquecido a 30°C. O ar de saída do biorreator passava por um condensador de vidro a 4°C para remover o vapor d'água e, em seguida, passava pelo analisador de oxigênio. Após a inoculação do substrato, o biorreator era agitado na velocidade de 10 rpm durante alguns minutos, para garantir a homogeneidade da distribuição de esporos. Durante a fermentação o leito não foi agitado. O final de cada fermentação foi determinado pelos autores, e, nesse momento, o leito foi agitado a na velocidade de 1 rpm até que completasse 5 rotações. A decisão sobre o tempo no qual fazer a agitação foi baseado no consumo de oxigênio medido no final da fermentação, para determinar a capacidade da agitação quebrar os aglomerados de substrato que tinham sido formados. Após o procedimento de agitação, o biorreator foi aberto com cuidado e o leito foi separado em três porções: grãos únicos, aglomerados pequenos (2 a 20 grãos) e aglomerados grandes (> 20 grãos). Cada porção foi pesada e a fração em peso foi determinada pela divisão da massa da fração pela massa total das três frações. Foram conduzidas várias fermentações para determinar a faixa de consumo de oxigênio, correspondente à dificuldade em quebrar os aglomerados formados, por meio da agitação.

Os autores concluíram que, se o leito é mantido estático durante muito tempo antes do primeiro evento de agitação, formam-se grandes aglomerados que são suficientemente fortes para permanecerem intactos mesmo quando o leito é agitado. Schutyser *et al.* (2003) sugeriram que a melhor estratégia para prevenir a formação destes aglomerados resistentes é a utilização de um evento de agitação no início do cultivo, a fim de quebrar os aglomerados antes que eles adquiram esta alta resistência. Embora suas investigações experimentais fossem limitadas a um único evento de agitação preventiva, eles levantaram a possibilidade de que podem ser necessários eventos de agitação subsequentes para manter o leito de substrato livre de problemas de aglomeração durante todo o processo.

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A FES para a produção de pectinases em escala piloto abre possibilidades para viabilizar a hidrólise enzimática de pectina presente na polpa cítrica. Embora Pitol *et al.* (2016) em seu estudo de ampliação da escala de produção de pectinases por FES relatou problemas de falta de uniformidade de produto no leite no final do cultivo e o encolhimento do leite causado pelo crescimento do fungo que formou aglomerados com as partículas de substrato.

Schutyser *et al.* (2003) realizaram um estudo da utilização da agitação descontínua para evitar a aglomeração do substrato provocada pelo fungo. Os autores recomendaram a utilização de um evento de agitação preventivo no início do cultivo para quebrar as hifas dos fungos e evitar a aglomeração do substrato. Esse estudo fundamentou a investigação da estratégia da agitação intermitente a fim de reduzir os problemas de aglomeração e encolhimento do leite relatados por Pitol *et al.* (2016) para o cultivo de *Aspergillus niger* em farelo de trigo em biorreator de leite fixo em escala piloto.

O objetivo geral desse trabalho é continuar o trabalho de Pitol (2014) no desenvolvimento da FES no biorreator piloto para ampliação de escala da produção de pectinases, com os seguintes objetivos específicos:

- Estudar vários regimes de agitação intermitente para determinar a quantidade de eventos de agitação necessários e quando devem ser aplicados;
- Determinar o efeito da agitação intermitente na uniformidade da atividade pectinolítica no final do cultivo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA

A cepa do fungo filamentosso *Aspergillus niger* CH4 utilizada nesse trabalho foi cedida pelo Prof. Dr. Jesus Cordova e Prof. Dr. Gustavo Viniegra-Gonzalez, da Universidade de Guadalajara, México. Para manutenção, as culturas estoque foram repicadas em meio batata dextrose ágar (BDA) e incubadas a 30°C por três dias. Após, as placas com os esporos foram armazenados a 4°C por até três meses antes de um novo repique. Além disso, foram coletados esporos de uma placa de BDA, com uma solução estéril de glicerol 15% (v/v) para manutenção a -20°C.

4.2 PROCEDIMENTOS GERAIS PARA CULTIVO NO BIORREATOR PILOTO

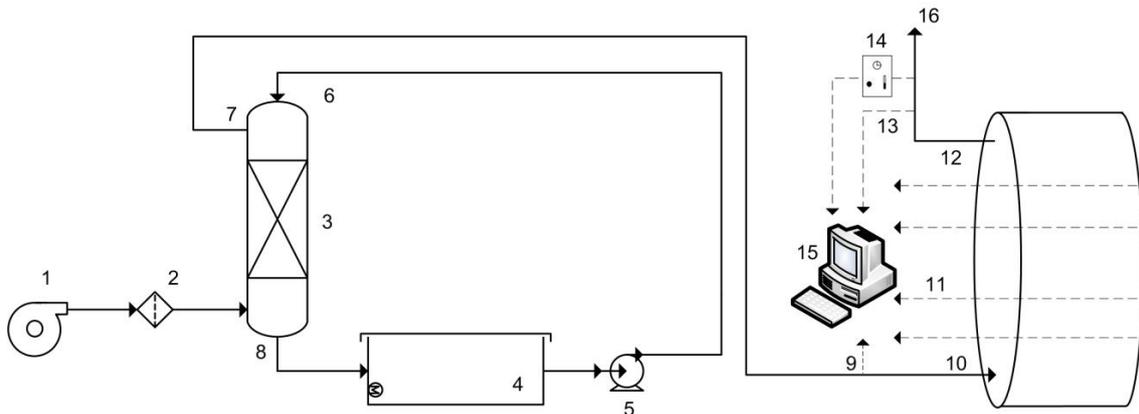
4.2.1 Substratos

Os substratos utilizados foram os resíduos agroindustriais, farelo de trigo e bagaço de cana. 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 seco ao sol. Exceto isso, os substratos não receberam tratamento prévio para utilização.

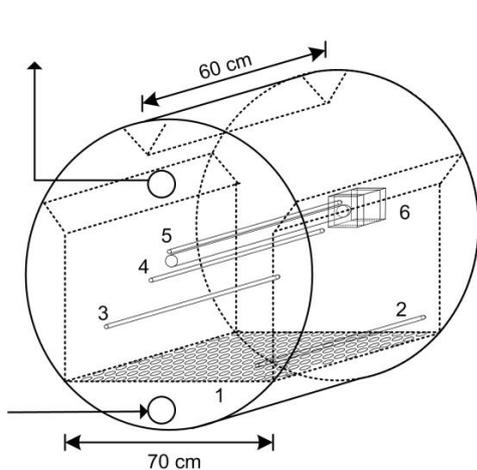
4.2.2 Descrição do biorreator piloto

O biorreator tem capacidade para um leito de 200 L e está localizado na Usina Piloto A, do Setor de Tecnologia da UFPR. É constituído por um cilindro de aço inoxidável AISI 306 que contém um prisma retangular (70 cm x 60 cm x 50 cm) no interior. A base do prisma é retangular e perfurada na parte inferior, e funciona

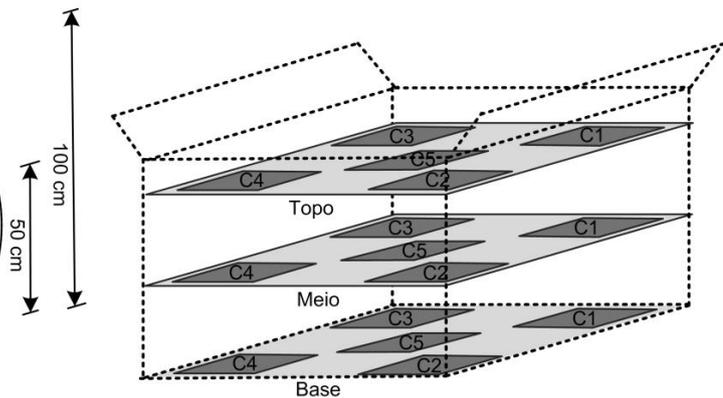
como suporte do substrato (FIGURAS 9a e 9b) (BIZ *et al.*, 2016). Uma malha de arame de aço inox perfurada, com espaçamento de 1 mm, cobre a placa da base do leito. O ar é injetado na parte inferior da base e flui a partir do fundo para o topo do leito.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 9 – BIORREATOR PILOTO. (a) Visão geral do biorreator e do sistema de aeração. (1) soprador de ar; (2) filtro de ar; (3) torre de umidificação; (4) reservatório de água; (5) bomba-d' água; (6) entrada de água na torre de umidificação; (7) suprimento de ar saturado para o biorreator; (8) retorno do excesso de água para o reservatório; (9) medidor de temperatura do ar de entrada; (10) entrada de ar; (11) medidores de temperatura do leito; (12) saída de ar; (13) medidor de temperatura do ar de saída; (14) sensor de oxigênio; (15) computador com *software Labview* para aquisição de dados; (16) saída para o lavador de gases. (b) Detalhes de projeto do biorreator de leito fixo de escala piloto. (1) Base perfurada com suporte com placa de malha de arame de 1 mm de abertura; (2) matriz com termopares na altura de 5 cm; (3) matriz com termopares na altura de 18 cm; (4) matriz com termopares na altura de 33 cm; (5) matriz com termopares na altura de 46 cm; (6) motor elétrico com inversor de frequência. (c) Locais de retirada das amostras no final do cultivo para mapeamento do leito. As amostras da Base foram coletadas na altura em torno de 2 cm, as amostras do Meio em torno de 20 cm de altura e as amostras do Topo em torno de 40 cm de altura do leito.

FONTE: Adaptado de Biz *et al.* (2016)

Um soprador capta ar a partir do exterior do edifício. Este ar é filtrado através de um sistema composto de lã de vidro junto a um microfiltro com poros de 0,2 μm antes de chegar à torre de humidificação. O fluxo é medido por um medidor de vazão de pressão diferencial (Kobold, Hofheim, Alemanha). A água é bombeada para o topo da torre de humidificação em contracorrente ao ar, a partir de um reservatório retangular de 1200 L, posicionado no piso ao lado da torre. O excesso de água retorna ao reservatório. A água é mantida a $32 \pm 2^\circ\text{C}$ por meio de duas resistências de 1000 W e um termostato.

O ar sai do topo da coluna de humidificação com uma umidade relativa de 99% e uma temperatura próxima da temperatura do reservatório de água. No momento em que entra na parte inferior do biorreator, está em torno de 2°C mais fria do que quando se deixou a coluna de humidificação. Após atravessar o leito, o ar de saída passa através de um lavador de gases que contém uma solução de água e hipoclorito de sódio, com concentração de 10% (v/v) de cloro ativo.

O biorreator possui termopares que medem a temperatura na entrada e na saída do ar. Há também quatro poços de termopares dentro do biorreator, posicionados nas alturas de 5, 18, 33 e 46 cm (FIGURA 9b - nas posições 2, 3, 4 e 5, respectivamente). Cada poço mede a temperatura em quatro posições horizontais diferentes. As temperaturas reportadas para cada altura do leito representam as médias destes quatro medições em relação à horizontal.

4.2.3 Checagem dos termopares

Para o procedimento de checagem, os módulos de transmissão de dados eram ligados com 30 min de antecedência para estabilizar o funcionamento. A seguir, o biorreator foi preenchido com água até cobrir todos os termopares e a temperatura verificada com termômetro de mercúrio. A leitura foi comparada com o valor apresentado pelo programa Bio2fase, configurado no *software Labview* (National Instruments) por Barga (2007). A diferença da medida da temperatura da água no termômetro com a temperatura registrada pelo programa foi inserida no programa como fator de correção.

4.2.4 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) em solução de 0,5% (v/v), que é constituído de ácido peracético e peróxido de hidrogênio. Com a ajuda de um borrifador, o sanificante foi aplicado em toda a superfície interna e externa do biorreator e utensílios e, após 30 min, foi realizado um enxágue para a retirada dos resíduos do produto.

O reservatório de água do sistema de umidificação foi limpo com detergente neutro e, após o enxágue, o reservatório foi abastecido com 1000 L de água e foi adicionado 1 L de solução de hipoclorito de sódio com 10% de cloro ativo. A bomba do reservatório foi acionada para misturar a solução por 5 min com a válvula de água para a torre fechada e a válvula de retorno para o reservatório aberta. Em seguida, foi aberta a válvula de água para a torre de umidificação por uma hora para a circulação da solução.

4.2.5 Preparo do pré-inóculo em BDA

Para o preparo da solução de esporos, a cepa de *Aspergillus niger* CH4 foi cultivada em frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BDA em estufa a 30°C por quatro dias. Os esporos foram suspensos em 40 mL de água destilada estéril com a raspagem do micélio com um bastão de vidro. A suspensão de esporos foi filtrada para remover os resíduos de micélio e de meio através de um funil recoberto por tecido perfurado (musseline). Para a determinação da concentração de esporos por mL, foi feita contagem em câmara de Neubauer. A concentração de esporos no pré-inóculo foi ajustada para 2×10^7 esporos por mL.

4.2.6 Preparo do inóculo para a escala piloto

Foram cultivados quarenta frascos Erlenmeyer de 250 mL, cada um com 10 g de substrato (massa seca). O substrato era composto de uma mistura de 70% farelo de trigo e 30% bagaço de cana (por massa) que foram autoclavados a 121°C por 15 minutos. O substrato foi umedecido com uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com concentração final de 4,4% (m/m, baseada no substrato seco total), que foi primeiramente autoclavada a 121°C por 15 minutos, para obtenção de um teor de umidade final de 50% (m/m, base úmida). Cada frasco foi inoculado com pré-inóculo suficiente para atingir a concentração de 2×10^7 esporos por mL. Os frascos foram incubados a 30°C até que houvesse a esporulação (7 dias). Os esporos foram suspensos em água estéril e, após, a solução foi filtrada através de um funil de Buchner recoberto com gaze estéril, com o auxílio de uma bomba de vácuo conectada a um frasco Kitassato. A determinação do número de esporos por mL foi feita pela contagem em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada a 2×10^7 esporos por mL.

4.2.7 Cultivos no biorreator piloto

A aeração forçada foi mantida constante em $150 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ de ar úmido saturado, resultando numa velocidade superficial do ar de $0,1 \text{ m s}^{-1}$ no leito. Todos os cultivos foram realizados com 27 kg de farelo de trigo e 3 kg de bagaço de cana, que resultou num leito com altura inicial de 40 cm. O substrato sólido, uma solução de 3 L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com concentração inicial de 4,4% (m/m, baseada na massa de substrato seco total) e 36,13 litros de água para obter um teor inicial de umidade de 62% foram autoclavados a 121°C por 2 h. Após resfriamento, foi adicionada 5,6 L de suspensão de esporos, volume levado em conta no cálculo das quantidades para atingir a umidade inicial de 62%, com uma concentração de, no mínimo, $4,5 \times 10^{11}$ esporos por grama de substrato seco e, em seguida, o sólido inoculado foi adicionado ao biorreator piloto. O biorreator foi mantido em agitação durante 30 min, para a homogeneização do meio de cultivo. Após esse período, a superfície do leito

foi nivelada utilizando um rastelo e o biorreator foi fechado e o sistema de umidificação e circulação do ar acionados.

O biorreator permaneceu estático durante a maior parte do tempo. Para executar cada evento de agitação, as linhas de entrada e de saída de ar e os cabos dos termopares foram desconectados e, em seguida, o biorreator foi agitado em torno do seu eixo central a 5 rpm durante 2 min. Após, o topo do leito foi novamente nivelado com um rastelo. As linhas de ar de entrada e saída e os cabos dos termopares foram então reconectados.

Para facilitar a descrição dos resultados de cada cultivo foi designada uma nomenclatura especial de MIX-N_x, onde:

MIX = radical para cada cultivo

-N = número de eventos de agitação do cultivo

x = tempo do mapeamento do cultivo

Por exemplo, MIX-3₂₀ se refere ao cultivo MIX com três eventos de agitação (-3) e que o mapeamento foi realizado em 20 h de cultivo.

TABELA 2 - CULTIVOS NO BIORREATOR PILOTO PARA PRODUÇÃO DE PECTINASES COM EVENTOS DE AGITAÇÃO INTERMITENTE

	CULTIVOS					
	MIX-0 ₂₀	MIX-1 ₂₆	MIX-5 ₂₆	MIX-3 ₁₅	MIX-3 ₂₀	MIX-3 ₂₆
Eventos de agitação (tempo de cultivo)	0	1x (10 h)	5x (8 h, 10 h, 12 h, 14 h e 16 h)	3x (5 h, 7 h e 9 h)	3x (8 h, 10 h e 12 h)	3x (8 h, 10 h e 12 h)
Mapeamento (tempo de cultivo)	20 h	26 h	26 h	15 h	20 h	26 h
Atividade pectinolítica máxima (U g ⁻¹) (tempo de cultivo)	22 (18 h)	19 (18 h)	23 (24 h)	15 (15 h)	24 (18 h)	24 (24 h)
Atividade pectinolítica média através do leito no mapeamento (U g ⁻¹)*	18 ± 2,1	21 ± 4,1	22 ± 1,6	16 ± 1,2	22 ± 2,0	25 ± 4,3
Produtividade máxima no topo do leito (U g ⁻¹ h ⁻¹) (tempo de cultivo)	1,29 (12 h)	1,25 (15 h)	1,26 (12 h)	0,96 (15 h)	1,33 (18 h)	1,21 (18 h)
Teor médio de umidade através do leito no mapeamento (% b.u.)*	60 ± 3,6	52 ± 4,8	53 ± 5,8	59 ± 2,1	60 ± 6,8	51 ± 5,1

FONTE: A AUTORA (2016)

*Desvio-padrão da amostra

4.2.8 Amostragens

Durante os cultivos, foram coletadas amostras para a determinação da atividade pectinolítica e da umidade apenas no topo do leite, para evitar a criação de caminhos preferenciais para o fluxo do ar. A retirada das amostras seguiu a ordem C4, C3, C1 e C2, conforme FIGURA 9c, que se repetiu até o final do cultivo. No final dos cultivos, foi realizado um mapeamento do leite, isto é, as amostras foram removidas a partir de cinco posições horizontais diferentes na base (ao redor de 2 cm do leite), na metade (em 20 cm do leite) e próximo ao topo (em 40 cm do leite), a fim de caracterizar a uniformidade do leite (FIGURA 9c).

4.2.9 Determinação da umidade

A umidade foi determinada em uma balança de infravermelho (Gehaka IV 2000), utilizando 3,0 g de amostra. A temperatura utilizada foi de 105°C e a medição foi programada para terminar quando a variação entre as leituras de massa subsequentes fosse menor que 0,2% em 15 s. Neste trabalho, os valores de umidade são dados em %m/m, base úmida.

4.2.10 Extração

O extrato bruto enzimático dos sólidos fermentados foi obtido por adição de 20 mL de tampão acetato (200 mM, pH 4,5) a 1 g de substrato seco para cada amostra. A extração foi feita a 180 rpm e 30°C, por 30 min. Após, o extrato foi filtrado em funil recoberto com gaze para eliminar as partículas de sólido.

4.2.11 Determinação da atividade pectinolítica

A liberação de açúcares redutores foi analisada utilizando o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (BERNFELD, 1955). Foi utilizada uma curva padrão de ácido D-galacturônico variando de 0 a 2 g L⁻¹. Foi feita uma diluição 1:5 mL de extrato bruto em tampão acetato 200 mM, pH 4,5. Para os ensaios enzimáticos, 0,25 mL de extrato diluído foram incubados com 0,25 mL de solução de 1% de pectina cítrica (m/v) (Sigma-Aldrich, 75% de metilação), por 20 min a 30°C (BIZ *et al.*, 2014). Após a incubação, foram adicionados 0,5 mL do reagente 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 a solução de substrato foi adicionada 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 µmol de ácido D-galacturônico liberado por minuto (U), por grama de substrato sólido seco.

4.2.12 Determinação do desvio padrão da amostra

O desvio padrão da amostra a partir das cinco amostras coletadas em cada uma das três alturas, base, meio e topo do leito, foi calculado com a seguinte fórmula:

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

onde:

s = desvio padrão da amostra

\bar{x} = média das amostras

n = tamanho da amostra

5 RESULTADOS

Seis cultivos foram realizados no biorreator piloto com o crescimento de *Aspergillus niger* em uma mistura de 90:10 (% m/m) de farelo de trigo e bagaço de cana. Cada cultivo é denominado por um código que mostra o número de eventos de agitação e o tempo do mapeamento em horas subscrito.

No cultivo MIX-0₂₀, não foi realizado nenhum evento de agitação. No cultivo MIX-1₂₆, foi realizado um evento de agitação em 10 h de cultivo. Nos cultivos MIX-3₂₀ e MIX-3₂₆, foram realizados eventos de agitação em 8, 10 e 12 h. Já para o cultivo MIX-3₁₅, foram realizados eventos de agitação nesses mesmos tempos e foi mapeado em 18 h. Embora, para esse cultivo a fase *lag* foi mais longa, com 3 horas de duração a mais do que o normal, devido a um problema de queda na temperatura do reservatório de água da torre de umidificação, que ocorreu uma hora após a inoculação e resultou numa temperatura menor que 30°C até 7 horas de cultivo. Em razão disso, foram subtraídas 3 h de todos os tempos para elaboração do gráfico das atividades pectinolíticas e das umidades no topo do leito para esse cultivo. Isso deslocou os eventos de agitação para 5, 7 e 9 h. No cultivo MIX-5₂₆ os eventos de agitação ocorreram em 8, 10, 12, 14 e 16 h.

Os resultados desses cultivos foram comparados com os de dois cultivos realizados no mesmo sistema por Pitol *et al.* (2016): MIX-0₂₆ é seu terceiro cultivo, que foi mapeado em 26 h, enquanto que MIX-0₁₂ representa as primeiras 12 h de seu quarto cultivo, ou seja, o intervalo do cultivo antes da variação de temperatura do ar de entrada. Os valores em cm a seguir são referentes às alturas do leito de FES, sendo 33 cm a maior altura de medição das temperaturas no leito. Os dados de umidade para os cultivos MIX-0₂₆ e MIX-0₁₂ foram obtidos de Pitol (2014).

Para realizar amostragem, o sistema de aeração foi desligado para a abertura do biorreator. Esse procedimento de parada do sistema de aeração provocou uma queda na temperatura do ar de saída, entretanto, sem interromper as medições de temperatura. Esses picos para baixo foram desconsiderados para a confecção do gráfico de temperaturas do ar de entrada e de saída ao longo dos cultivos.

5.1 PERFIS DE TEMPERATURA DO LEITO

Em todos os cultivos com agitação, os perfis de temperatura axiais do leito foram menores do que nos cultivos sem agitação (FIGURA 10a, FIGURA 11a, FIGURA 12a, FIGURA 14a e FIGURA 15a). Em todos os casos, a temperatura do ar de entrada ficou em torno de 30°C (FIGURA 10b, FIGURA 11b, FIGURA 12b, FIGURA 14b e FIGURA 15b). Para os cultivos sem agitação, foram medidas temperaturas acima de 40°C na altura de 33 cm: MIX-0₂₆ atingiu o máximo de 43°C em 16 h (PITOL *et al.*, 2016) (FIGURA 10a), enquanto que MIX-0₂₀ alcançou 41°C em 15 h (FIGURA 11a).

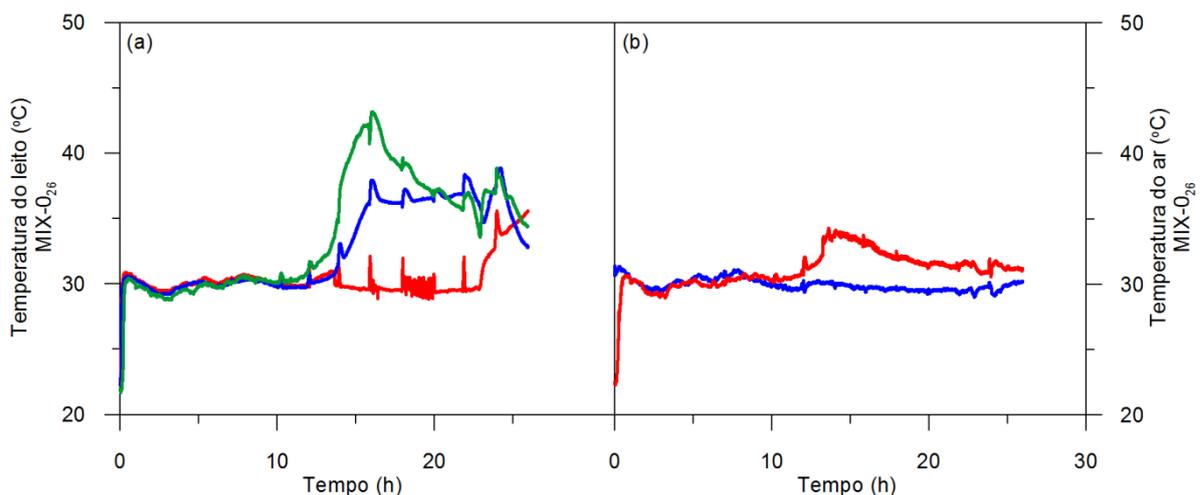


FIGURA 10 – PERFIS DE TEMPERATURAS TEMPORAIS DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX-0₂₆ (a) Perfis de temperatura em três alturas de leito (5,18 e 33 cm) (b) Perfis de temperatura para a entrada e saída de ar. O número depois do traço representa o número de eventos de agitação, enquanto que o subscrito indica o tempo (h) em que a fermentação foi terminada. Os resultados acima são reproduzidos de Pitol *et al.* (2016).

Legendas: (a): (→) 5 cm de altura (→) 18 cm de altura e (→) 33 cm de altura; (b): (→) saída de ar (→) entrada de ar.

FONTE: A AUTORA (2016)

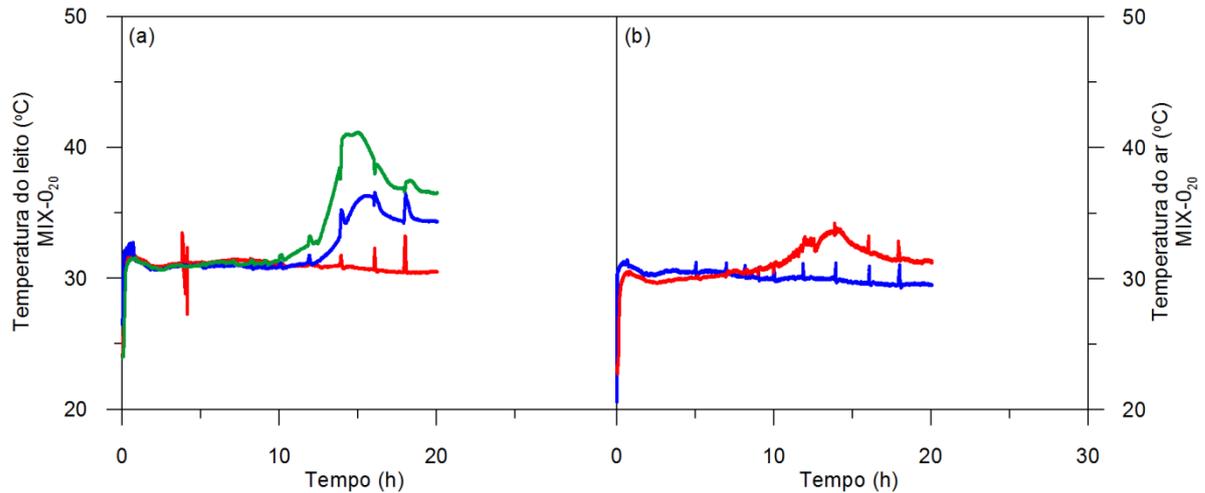


FIGURA 11 – PERFIS DE TEMPERATURAS TEMPORAIS DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX-0₂₀ (a) Perfis de temperatura em três alturas de leito (5,18 e 33 cm) (b) Perfis de temperatura para a entrada e saída de ar. O número depois do traço representa o número de eventos de agitação, enquanto que o subscrito indica o tempo (h) em que a fermentação foi terminada.

Legendas: (a): (→) 5 cm de altura (→) 18 cm de altura e (→) 33 cm de altura; (b): (→) saída de ar (→) entrada de ar.

FONTE: A AUTORA (2016)

Para os cultivos com eventos de agitação, os perfis de temperaturas axiais medidos logo após a agitação foram consideravelmente menores do que os observados para os cultivos sem agitação. Por exemplo, em MIX-1₂₆, a temperatura em 33 cm permaneceu em torno de 35°C entre 17 e 21 h de cultivo (FIGURA 12a). Entretanto, para os cultivos MIX-1₂₆ e MIX-3₂₆, após aproximadamente 20 h de cultivo, a temperatura do ar de saída diminuiu e ficou abaixo da temperatura do leito em 33 cm. Essa ocorrência é uma indicação clara de que, a partir desse período do cultivo, o ar passava através de caminhos preferenciais ao invés de atravessar o leito (FIGURA 13). Por exemplo, em 24 h em MIX-1₂₆, a temperatura em 33 cm foi de 39°C, em comparação com a temperatura do ar de saída que foi de 32°C (comparar FIGURA 12a com FIGURA 12b). Da mesma forma, em 20 h de cultivo de MIX-3₂₆, a temperatura em 33 cm foi 3°C maior do que a temperatura do ar de saída (comparar FIGURA 14a com FIGURA 14b). Para MIX-5₂₆, os eventos de agitação adicionais impediram a formação de caminhos preferenciais, pois, nesse cultivo, a temperatura do ar de saída não ficou abaixo da temperatura em 33 cm em nenhum momento (comparar FIGURA 15a com FIGURA 15b).

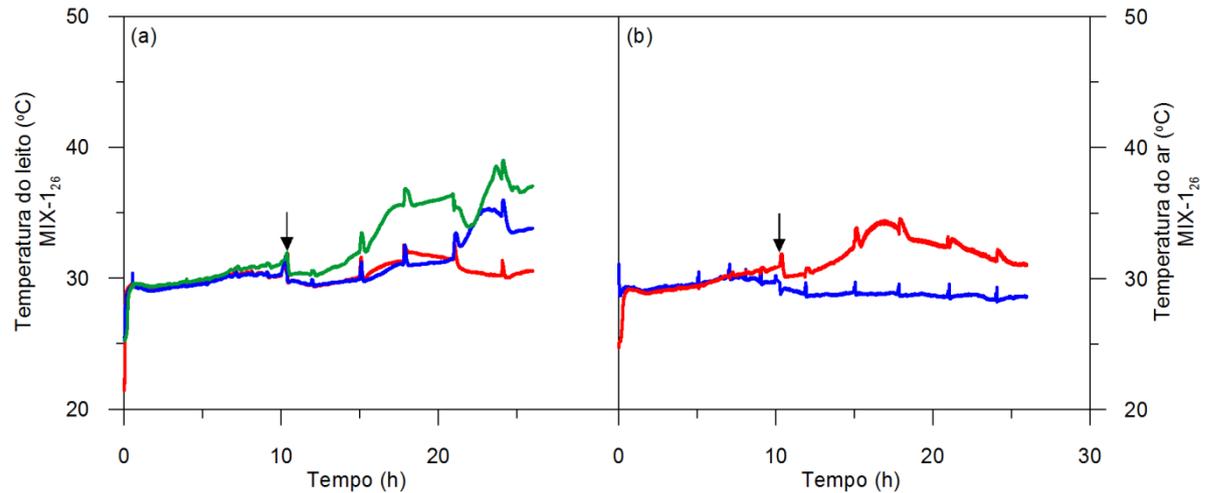


FIGURA 12 – EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO SOBRE O PERFIL DE TEMPERATURA TEMPORAL DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX-1₂₆ (a) Perfis de temperatura em três alturas de leito (5,18 e 33 cm) (b) Perfis de temperatura para a entrada e saída de ar. O número depois do traço representa o número de eventos de agitação, enquanto que o subscrito indica o tempo (h) em que a fermentação foi terminada. As setas indicam os momentos em que o leito foi agitado.

Legendas: (a): (→) 5 cm de altura (→) 18 cm de altura e (→) 33 cm de altura; (b): (→) saída de ar (→) entrada de ar.

FONTE: A AUTORA (2016)



FIGURA 13 – IMAGEM DO LEITO DE MIX-1₂₆ NO FINAL DO CULTIVO
As setas indicam os caminhos preferenciais formados pela aglomeração do leito.
FONTE: A AUTORA (2016)

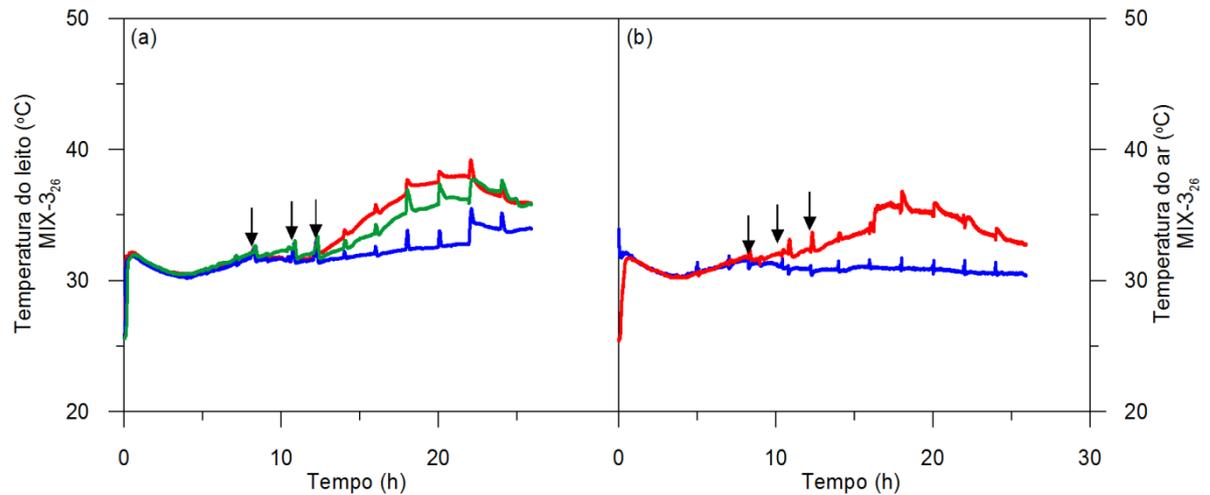


FIGURA 14 – EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO SOBRE O PERFIL DE TEMPERATURA TEMPORAL DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX-3₂₆ (a) Perfis de temperatura em três alturas de leito (5,18 e 33 cm) (b) Perfis de temperatura para a entrada e saída de ar. O número depois do traço representa o número de eventos de agitação, enquanto que o subscrito indica o tempo (h) em que a fermentação foi terminada. As setas indicam os momentos em que o leito foi agitado.

Legendas: (a): (→) 5 cm de altura (→) 18 cm de altura e (→) 33 cm de altura; (b): (→) saída de ar (→) entrada de ar.

FONTE: A AUTORA (2016)

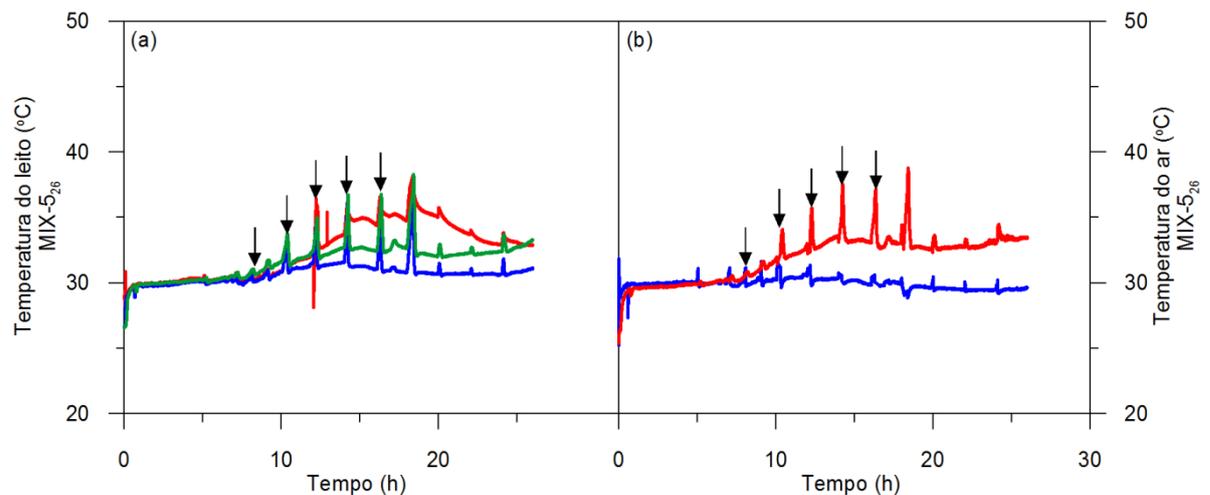


FIGURA 15 – EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO SOBRE O PERFIL DE TEMPERATURA TEMPORAL DO AR DE ENTRADA E DE SAÍDA E EM DIFERENTES ALTURAS DENTRO DO LEITO MIX-5₂₆ (a) Perfis de temperatura em três alturas de leito (5,18 e 33 cm) (b) Perfis de temperatura para a entrada e saída de ar. O número depois do traço representa o número de eventos de agitação, enquanto que o subscrito indica o tempo (h) em que a fermentação foi terminada. As setas indicam os momentos em que o leito foi agitado.

Legendas: (a): (→) 5 cm de altura (→) 18 cm de altura e (→) 33 cm de altura; (b): (→) saída de ar (→) entrada de ar.

FONTE: A AUTORA (2016)

Nos cultivos MIX-3₂₆ e MIX-5₂₆, os maiores valores de temperatura no leito foram medidos em 5 cm (FIGURA 14a e FIGURA 15a). Esse problema localizado ocorreu devido a uma falha de projeto do equipamento, pois o suporte dos

termopares em 5 cm de altura fica muito próximo à parede do biorreator. Quando o leito foi removido no final desses cultivos, foi encontrada uma aglomeração localizada de substrato no pequeno espaço entre o suporte dos termopares a 5 cm e a lateral e a base do leito. Essa aglomeração pode ter ocorrido devido ao substrato nesse local possivelmente não ter sido movimentado durante os eventos de agitação do leito. Conseqüentemente, não foram quebradas as hifas aéreas ligadas ao substrato, o que diminuiu a permeabilidade da região, levando a um aumento localizado na temperatura (FIGURA 16).



FIGURA 16 – IMAGEM DO LEITO AGLOMERADO NO TERMOPAR NA ALTURA DE 5 CM DE LEITO NO FINAL DO CULTIVO MIX-5₂₆
FONTE: A AUTORA (2016)

5.2 PERFIS TEMPORAIS DE ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E DE UMIDADE NO TOPO DO LEITO

No cultivo controle MIX-0₂₆, realizado por Pitol *et al.* (2016), a atividade pectinolítica máxima no topo do leito foi de 23 U g⁻¹ em 14 h, mas a atividade caiu para 13 U g⁻¹ após a temperatura próxima ao topo do leito atingir 43°C. A partir de 20 h, quando a temperatura próxima ao topo do leito diminuiu, a atividade pectinolítica voltou a subir (FIGURA 17a) (PITOL *et al.*, 2016). Um resultado similar foi obtido para MIX-0₂₀, com uma atividade pectinolítica máxima de 22 U g⁻¹ em 18 h que caiu para 18 U g⁻¹ em 20 h após a temperatura em 33 cm atingir 41°C (FIGURA 18a).

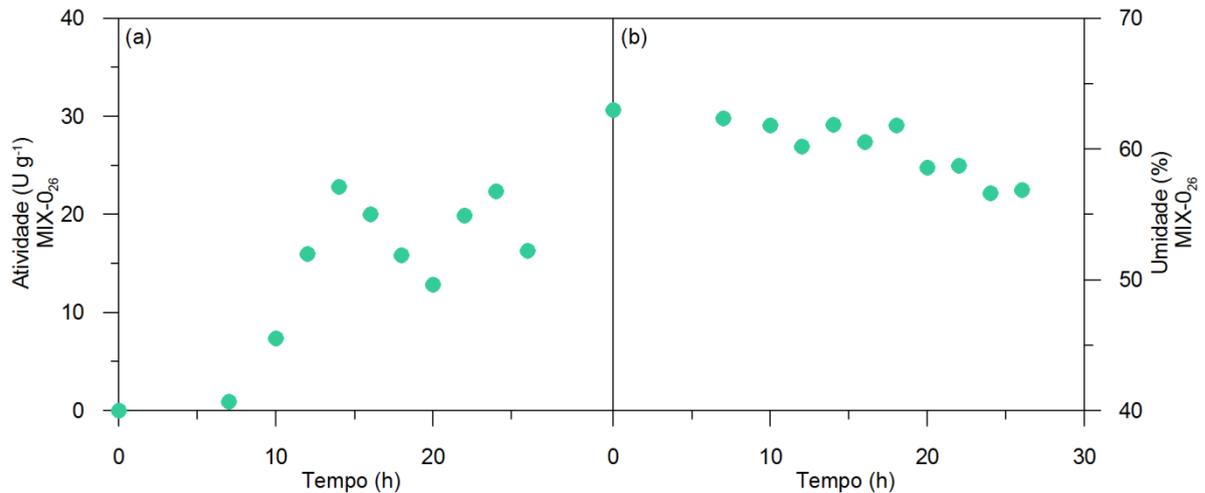


FIGURA 17 - PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-0₂₆ (a) Atividades pectinolíticas (b) Teor de umidade. Os resultados para a atividade pectinolítica para MIX-0₂₆ foram extraídos de Pitol *et al.* (2016) e os resultados do teor de umidade para a MIX-0₂₆ foram extraídos de Pitol (2014). FONTE: A AUTORA (2016)

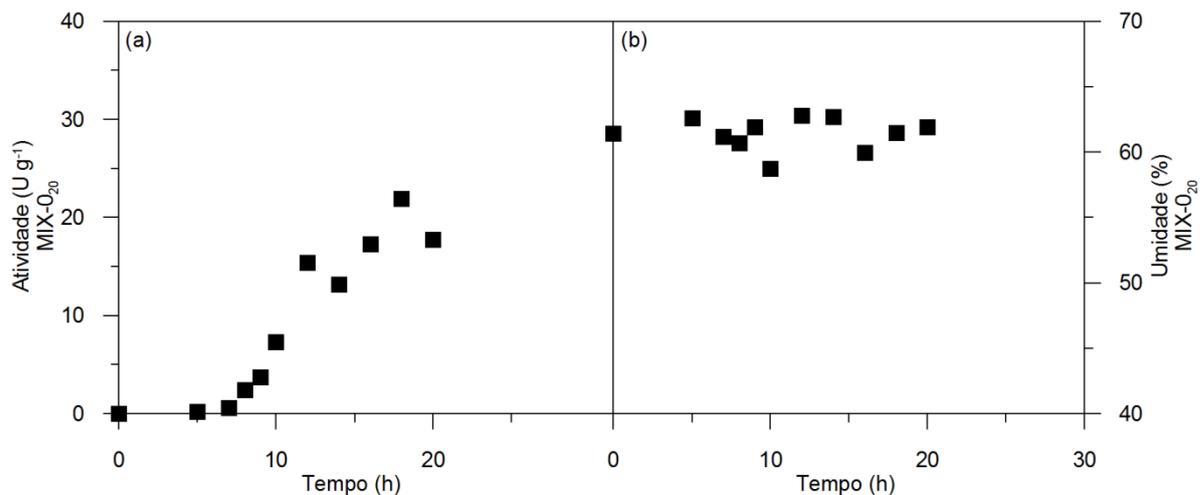


FIGURA 18 - PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-0₂₀ (a) Atividades pectinolíticas (b) Teor de umidade FONTE: A AUTORA (2016)

Em MIX-1₂₆, a atividade pectinolítica no topo do leito foi de 19 U g⁻¹ em 18 h (FIGURA 19a), um pouco menor do para o cultivo controle (MIX-0₂₆). Para MIX-5₂₆, a atividade pectinolítica máxima no topo do leito foi de 23 U g⁻¹, similar ao controle, mas ocorreu mais tarde, em 24 h de cultivo (FIGURA 20a). Nesse caso, os cinco eventos de agitação afetaram a atividade pectinolítica negativamente: no último evento de agitação em 16 h, a atividade pectinolítica foi de 19 U g⁻¹, porém, após isso a atividade aumentou lentamente (FIGURA 20a). Por outro lado, nos cultivos

com três eventos de agitação, as atividades pectinolíticas máximas no topo do leito foram de 24 U g^{-1} para MIX-3₂₀ e 22 U g^{-1} para MIX-3₂₆, em 18 h, ou seja, os picos ocorreram um pouco mais tarde do que MIX-0₂₆ (14 h) (FIGURA 21a, FIGURA 22a e FIGURA 17a).

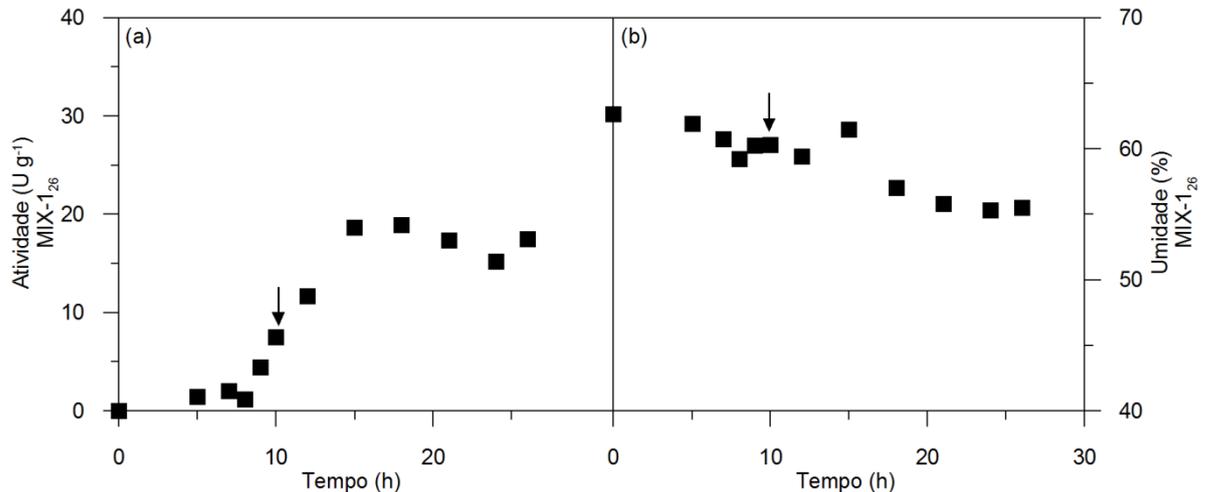


FIGURA 19 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-1₂₆ (a) Atividades pectinolíticas (b) Teor de umidade. As setas indicam os momentos em que o leito foi agitado.

FONTE: A AUTORA (2016)

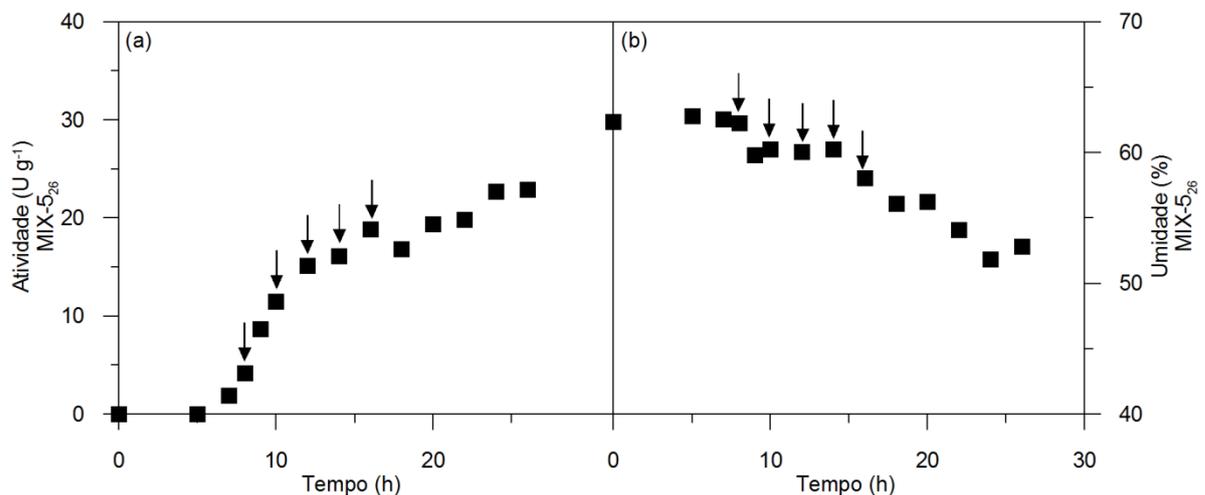


FIGURA 20 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-5₂₆ (a) Atividades pectinolíticas (b) Teor de umidade. As setas indicam os momentos em que o leito foi agitado.

FONTE: A AUTORA (2016)

Em todos os cultivos, a umidade no topo do leito diminuiu ao longo do cultivo. Nos cultivos sem agitação (MIX-0₂₆) e com um evento de agitação (MIX-1₂₆), a umidade caiu em torno de 7% (pontos percentuais) em 26 h (FIGURA 17b e

FIGURA 19b, respectivamente) e de 10-13% quando foram realizados mais eventos de agitação (MIX-5₂₆ e MIX-3₂₆) (FIGURA 20b e FIGURA 22b, respectivamente). Em nenhum dos cultivos a umidade caiu abaixo de 50%. Nos casos em que se formaram caminhos preferenciais, que ocorreu em torno de 15 h para MIX-0₂₆ (FIGURA 17b) e em torno de 18 h para MIX-1₂₆ (FIGURA 19b), a umidade em 26 h foi em torno de 4% maior do que os valores correspondentes para MIX-5₂₆ e MIX-3₂₆ (FIGURA 20b e FIGURA 22b, respectivamente). Esse comportamento pode ser explicado da seguinte forma: quando há formação de caminhos preferenciais, o ar passa ao redor do leito, o que reduz a velocidade de evaporação de umidade em comparação com o que ocorre quando o ar passa através do leito.

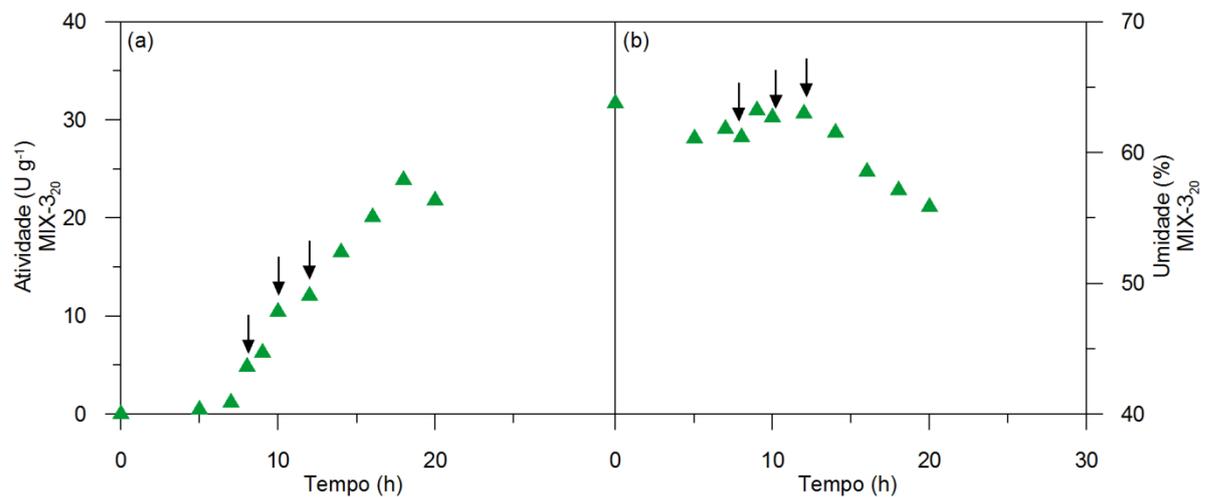


FIGURA 21 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-3₂₀ (a) Atividades pectinolíticas (b) Teor de umidade. As setas indicam os momentos em que o leito foi agitado.

FONTE: A AUTORA (2016)

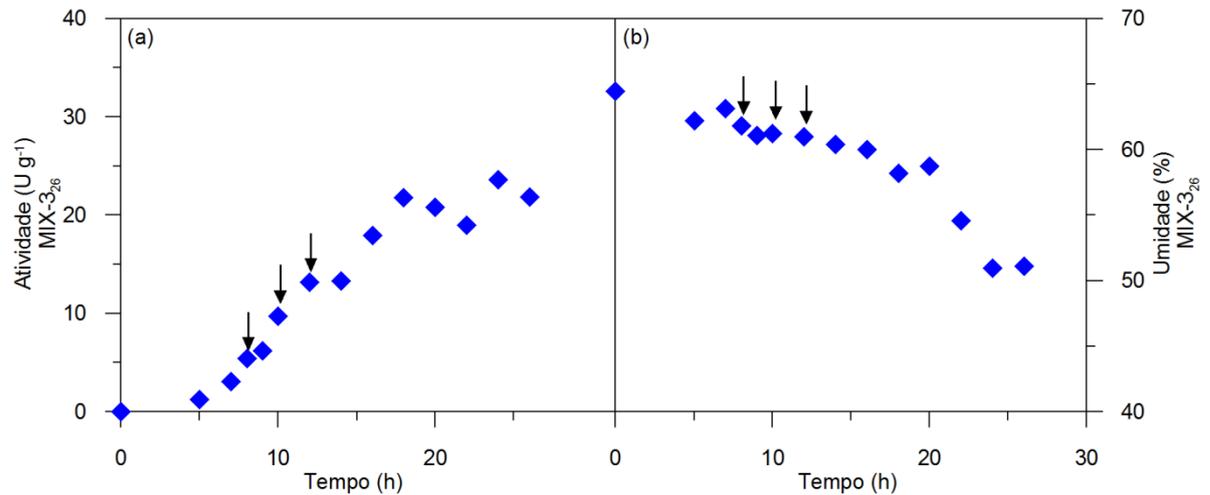


FIGURA 22 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-3₂₆ (a) Atividades pectinolíticas (b) Teor de umidade. As setas indicam os momentos em que o leito foi agitado.

FONTE: A AUTORA (2016)

5.3 UNIFORMIDADE DA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA DO LEITO

Ao final de cada cultivo, foram coletadas amostras de diferentes alturas e posições no leito (FIGURA 9c). A média da atividade pectinolítica e o desvio padrão da amostra foram calculados para cada uma das três diferentes alturas nas quais as amostras foram coletadas.

A atividade pectinolítica variou significativamente com a altura do leito no final do cultivo MIX-0₂₆, com média de 23 U g⁻¹ na base do leito em comparação com a média de 15 U g⁻¹ no meio e 16 U g⁻¹ no topo do leito (FIGURA 23). O comportamento heterogêneo também foi observado ao final dos cultivos MIX-1₂₆ e MIX-3₂₆. Para MIX-1₂₆, a atividade pectinolítica média foi de 25 U g⁻¹ na base do leito e 17 U g⁻¹ no topo do leito, enquanto que para MIX-3₂₆, os valores correspondentes foram 29 e 22 U g⁻¹, respectivamente. Já MIX-5₂₆ apresentou significativa homogeneidade axial ao final do cultivo: para todas as alturas do leito, a média da atividade pectinolítica foi de 22 a 23 U g⁻¹.

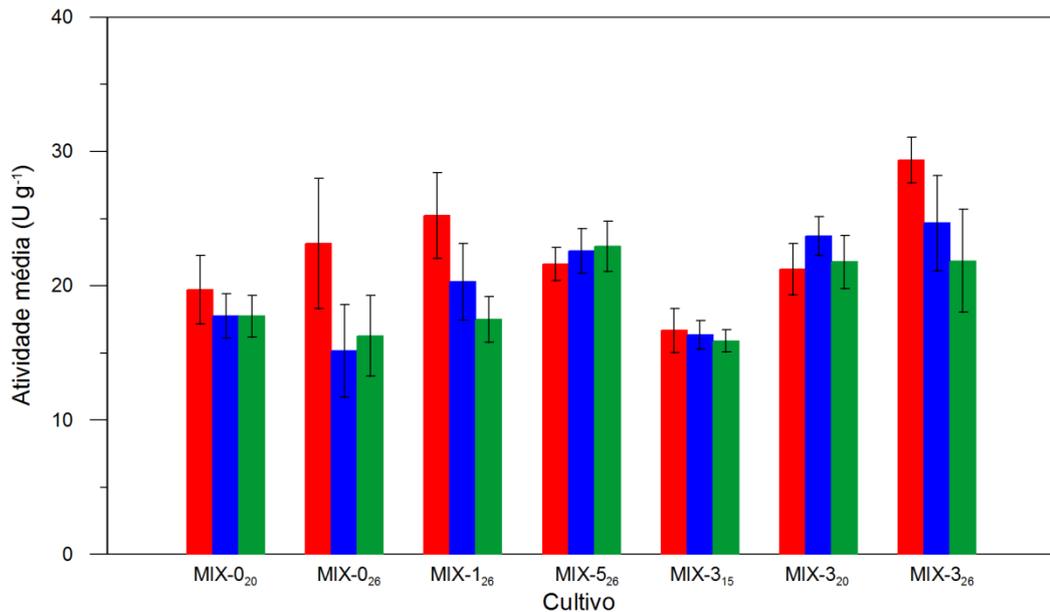


FIGURA 23 - A UNIFORMIDADE DAS ATIVIDADES PECTINOLÍTICAS AO LONGO DO EIXO VERTICAL DO LEITO

A localização das amostras "base", "meio" e "topo" estão indicados na Fig. 9c. As barras representam a atividade de pectinase média para as amostras retiradas a partir do mesmo plano horizontal. As barras de erro representam o desvio padrão da amostra para cinco amostras. Os resultados para MIX-0₂₆ foram calculados a partir de Pitol *et al.* (2016).

Legendas: As diferentes alturas do leito (●) base (●) meio e (●) topo
 FONTE: A AUTORA (2016)

A agitação também afeta a heterogeneidade de atividade pectinolítica no mesmo plano horizontal, que reflete no valor do desvio padrão da amostra para as amostras coletadas no mesmo plano. Para MIX-0₂₆, as amostras coletadas no mesmo plano horizontal apresentaram desvios padrão da amostra com valores de 3 a 5 U g⁻¹ (FIGURA 23). Para os cultivos MIX-1₂₆ e MIX-3₂₆, os desvios padrão da amostra foram um pouco menores, variando de 1,7 a 3,2 U g⁻¹ para MIX-1₂₆ e de 1,7 a 3,8 U g⁻¹ para MIX-3₂₆. A execução de cinco eventos de agitação (MIX-5₂₆) promoveu homogeneidade na horizontal, mesmo após 10 h do último evento de agitação em 16 h de cultivo, com todos os desvios padrão da amostra sendo abaixo de 2 U g⁻¹.

Com três eventos de agitação, foi possível ver a evolução da heterogeneidade das atividades pectinolíticas no leito (FIGURA 23), tanto axialmente (média de cada altura) quanto horizontalmente (desvio padrão da média para cada plano), ao longo do tempo após o último evento de agitação em 12 h. Em 15 h, a atividade pectinolítica média para todas as alturas do leito variou entre 16 e 17 U g⁻¹ e os desvios padrão da amostra para as três alturas do leito foram menores que 2 U g⁻¹. Em 20 h, a atividade pectinolítica média para todas as alturas do leito aumentou

para valores entre 21 e 24 U g⁻¹ e os desvios padrão da amostra para as três alturas do leito foram em torno de 2 U g⁻¹. Finalmente, em 26 h, a atividade pectinolítica média na base do leito aumentou consideravelmente em relação ao valor em 20 h, alcançando 29 U g⁻¹. Além disso, os desvios padrão da amostra para as três alturas do leito variaram de 2 a 4 U g⁻¹, que mostra o aumento da heterogeneidade na horizontal.

5.4 REPRODUTIBILIDADE DOS CULTIVOS

Em ambos os cultivos sem agitação e os cultivos com três eventos de agitação, os experimentos foram realizados em triplicata; a única diferença dentro de cada triplicata foi que os cultivos foram terminados em tempos diferentes. Quando os perfis temporais de atividade pectinolítica para MIX-3₁₅, MIX-3₂₀ e MIX-3₂₆ são colocados no mesmo gráfico, os perfis praticamente se sobrepõem (FIGURA 24a). Por outro lado, quando os perfis temporais de atividade pectinolítica para MIX-0₁₂, MIX-0₂₀ e MIX-0₂₆ são colocados no mesmo gráfico, os perfis ficam sobrepostos no início e depois divergem (FIGURA 25a). Os perfis temporais de umidade apresentam um resultado similar: os perfis para MIX-3₁₅, MIX-3₂₀ e MIX-3₂₆ (FIGURA 24b) são mais próximos uns dos outros do que os perfis para MIX-0₁₂, MIX-0₂₀ e MIX-0₂₆ (FIGURA 25b). Devido a esses resultados, conclui-se que a agitação, mesmo intermitente, promove a reprodutibilidade dos cultivos.

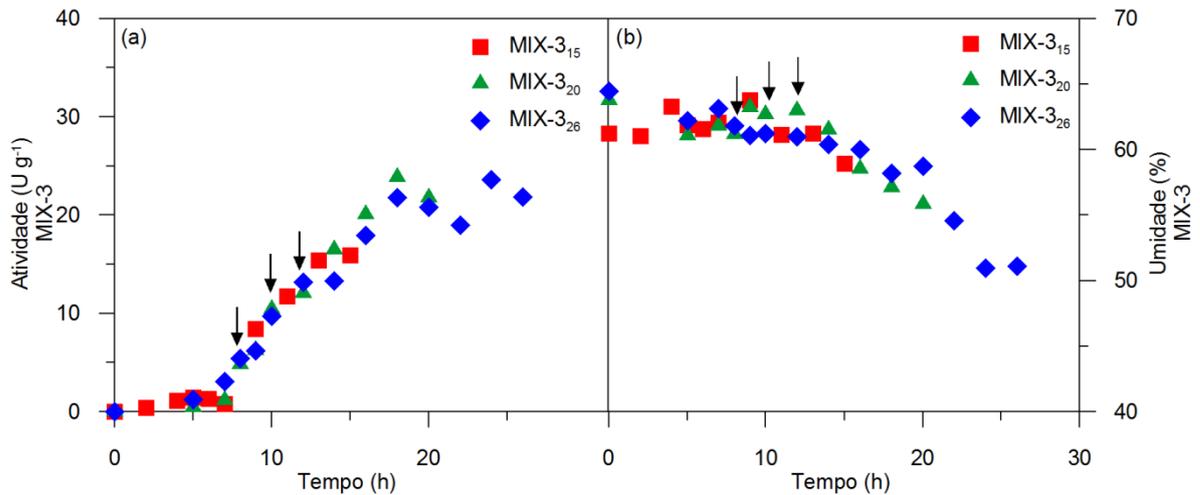


FIGURA 24 - EFEITO DO REGIME DE AGITAÇÃO NOS PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-3 (a) Atividades pectinolíticas (b) Teor de umidade. As setas indicam os momentos em que o leito foi agitado.

FONTE: A AUTORA (2016)

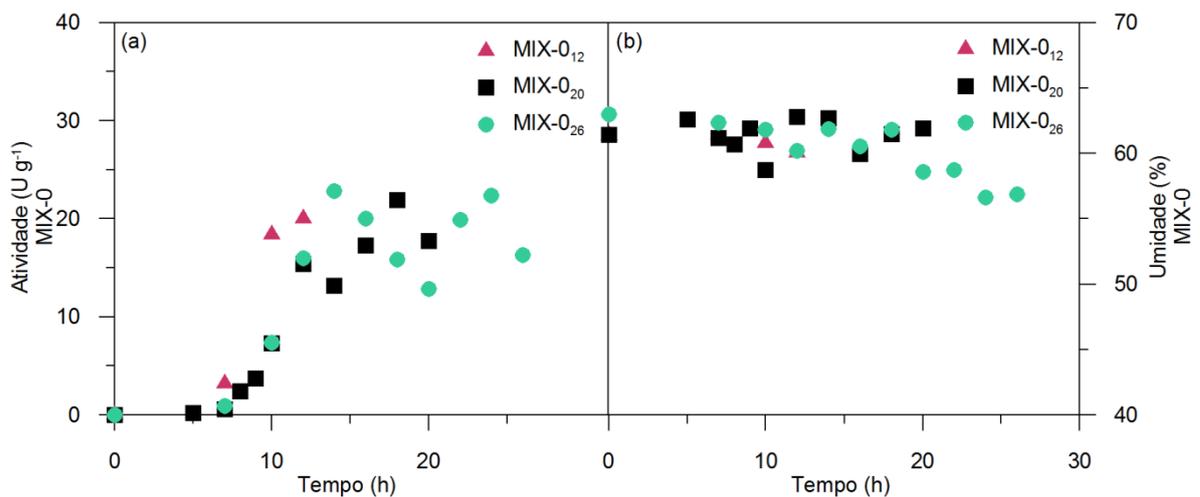


FIGURA 25 - PERFIS TEMPORAIS PARA ATIVIDADE PECTINOLÍTICA E TEOR DE UMIDADE DE AMOSTRAS RETIRADAS A PARTIR DO TOPO DO LEITO MIX-0 (a) Atividades pectinolíticas (b) Teor de umidade. Os resultados para a atividade pectinolítica para MIX-0₂₆ e MIX-0₁₂ foram extraídas de Pitol *et al.* (2016) e os resultados do teor de umidade para MIX-0₂₆ e MIX-0₁₂ foram extraídas do Pitol (2014).

FONTE: A AUTORA (2016)

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra que eventos de agitação intermitente são benéficos para a produção de pectinases em FES em escala piloto, além de contribuir, de maneira geral, para o estudo da agitação intermitente e seu efeito na uniformidade de produto através do leito. Essas contribuições serão discutidas a seguir.

6.1 PRODUÇÃO DE PECTINASES EM FES EM ESCALA PILOTO

A produção de pectinases, obtida no presente trabalho com a utilização da agitação intermitente é melhor do que a produção obtida por Pitol *et al.* (2016) na ausência de agitação, com o mesmo micro-organismo, biorreator e substrato (composto de uma mistura 90:10 de farelo de trigo e bagaço de cana). A utilização da agitação intermitente minimizou a compactação do leito e os problemas de gradientes de temperatura relatados por Pitol *et al.* (2016), que resultaram na não uniformidade de produto no leito.

A melhor estratégia é realizar três eventos de agitação e parar o cultivo em 20 h. O uso de três eventos de agitação equilibra os efeitos positivos e negativos da agitação: fornece um leito razoavelmente uniforme em 20 h de cultivo e evita a desaceleração do processo que ocorreria com cinco eventos de agitação.

Vale ressaltar que a decisão de parar o cultivo em 20 h é baseada no resultado do mapeamento do leito e não em amostras coletadas no topo do leito. Tipicamente, em biorreatores de leito fixo, as amostras são coletadas no topo do leito durante os períodos de operação estática para evitar a perfuração do leito, o que poderia promover a formação de caminhos preferenciais e, conseqüentemente, o superaquecimento do leito. Entretanto, o desempenho do cultivo não pode ser avaliado com base em amostras coletadas no topo do leito. Baseada em tais amostras, no presente trabalho, a produtividade máxima seria calculada para MIX-0₂₆: com a colheita em 14 h; a atividade pectinolítica de 23 U g⁻¹ neste momento do

cultivo resulta numa produtividade estimada de $1,64 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Ao aplicar o mesmo critério ao cultivo MIX-3₂₀, a colheita seria realizada em 18 h, com uma atividade pectinolítica de 24 U g^{-1} , resultando numa produtividade de $1,33 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. O mapeamento, que considera o leito completo, fornece um resultado diferente: a atividade pectinolítica média de 22 U g^{-1} obtida em 20 h para MIX-3₂₀ é significativamente maior ($p=0,05$) do que a atividade pectinolítica média de 18 U g^{-1} obtida em 20 h para MIX-0₂₀. Os valores de produtividades correspondentes ao momento do mapeamento são de $1,1 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para MIX-3₂₀ e de $0,9 \text{ U g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para MIX-0₂₀.

Um benefício adicional da utilização da agitação intermitente é a melhor reprodutibilidade entre os cultivos: do ponto de vista do controle de qualidade em processos comerciais, a reprodutibilidade entre os cultivos é tão importante quanto a uniformidade do produto através do leito nos cultivos individuais.

6.2 REGIMES DE AGITAÇÃO E UNIFORMIDADE EM BIORREACTORES DE FES

Há muito tempo, se sabe que podem ocorrer significativos gradientes de temperatura e de umidade em biorreatores estáticos de FES. A agitação intermitente tem sido utilizada no intuito de minimizar esses gradientes, com alguns autores comparando o desempenho da fermentação com diferentes regimes de agitação. No entanto, não há estudos anteriores sobre o efeito de diferentes regimes de agitação na distribuição de produto no leito em escalas iguais ou maiores a 1 kg de substrato úmido.

O efeito de condições não uniformes de crescimento na distribuição de produto através do leito foi abordado por Ghildyal *et al.* (1994). Eles obtiveram perfis temporais de temperatura do leito e de atividade de amiloglucosidase em três alturas do leito diferentes, para cultivos realizados com cinco velocidades de vazão de ar diferentes. Os resultados mostraram significativos gradientes de temperatura axial. Por exemplo, mesmo na maior vazão de ar testada, de 25 L min^{-1} , foi registrada uma temperatura de $37,4^\circ\text{C}$ na altura de 28 cm de leito, comparado com a temperatura do ar de entrada em 30°C . O principal resultado foi que a atividade de amiloglucosidase tem a tendência de diminuir com a altura do leito, relacionado ao

fato de que maiores temperaturas são alcançadas em maiores alturas do leite. No entanto, apesar de assinalar a necessidade de diminuir os gradientes de temperatura com o objetivo de obter altas atividades de amiloglucosidase em todo o leite, Ghildyal *et al.* (1994) não investigaram o uso da agitação intermitente para atingir esse objetivo. Do mesmo modo, embora Pitol *et al.* (2016) mapearam o leite, demonstrando a falta de uniformidade de produto, também não estudaram o uso da agitação intermitente.

Por outro lado, os estudos que abordaram o uso da agitação intermitente como uma estratégia para aumentar o desempenho global da fermentação, não investigaram o efeito dos regimes de agitação na uniformidade de produto no leite no final da fermentação. Por exemplo, de Reu *et al.* (1993) compararam um leite estático com agitação descontínua (frequência de $1,4 \text{ h}^{-1}$) para a produção de 1 kg de *tempe* de soja num biorreator de tambor rotativo (BTR), mas a comparação foi feita com base na medida de temperatura de um único ponto do leite. Num estudo subsequente para o mesmo processo em um BTR similar, mas numa escala envolvendo de 100 a 140 kg de soja cozida, Han *et al.* (1999) aplicaram agitação intermitente na frequência de $17,1 \text{ h}^{-1}$. No entanto, foi determinado um único valor para cada variável medida para cada tempo de amostragem e, portanto, a uniformidade do leite não foi caracterizada nesse estudo. Do mesmo modo, Gassara *et al.* (2013) utilizaram 4,5 kg de substrato úmido para estudar a produção de enzimas lignolíticas por *Phanerochaete chrysosporium* em um BTR com regimes diferentes de agitação, incluindo contínuo e “contínuo/descontínuo/contínuo” (isto é, regimes diferentes de agitação em diferentes fases da fermentação), mas, novamente, foram atribuídos valores únicos para todo o biorreator em cada tempo de amostragem. A falta de preocupação desses autores com a uniformidade de produto é compreensível: com agitação intermitente frequente em um BTR, o leite é mantido razoavelmente uniforme. Isto não ocorre em biorreatores de leite fixo agitados intermitentemente, em que a agitação é aplicada com uma frequência menor. Na verdade, com agitação frequente nesses BTR's agitados descontinuamente, esses autores não enfrentariam problemas de formação de uma rede de micélio que amarra as partículas de substrato em um aglomerado: quaisquer aglomerados formados são quebrados rapidamente. A situação é diferente quando a agitação é aplicada apenas algumas vezes por dia. No período sem agitação, o crescimento das hifas aéreas dos fungos entrelaça as partículas de substrato,

formando aglomerados. Schutyser *et al.* (2003) afirmaram que, nesse caso, é conveniente agitar o leito no início da fermentação a fim de quebrar as hifas aéreas que estão ligadas às partículas de substrato antes de se tornarem fortes demais, ou seja, antes de ser inviável separar em partículas únicas ou pequenos aglomerados. Isso é especialmente importante quando a agitação é obtida pela rotação do corpo do biorreator, tal como ocorreu no biorreator de Schutyser *et al.* (2003) e no biorreator de leito fixo utilizado neste trabalho, já que esse modo de agitação é de menor intensidade do que a intensidade que poderia ser obtida com um agitador mecânico.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo sobre a utilização da agitação intermitente do leito no início do cultivo demonstra que é possível minimizar problemas de aglomeração do substrato e, conseqüentemente, reduzir os gradientes de temperatura através de todo o leito. Através dessa redução dos gradientes de temperatura, pode-se promover a homogeneidade da atividade pectinolítica, com níveis uniformes ao longo de toda a extensão do leito no momento da colheita. O melhor regime foi um cultivo de 20 h com eventos de agitação em 8, 10 e 12 h. Neste caso, a atividade pectinolítica média de 15 amostras coletadas de diferentes posições na horizontal e na vertical do leito foi de 22 U g^{-1} , com desvio padrão da amostra de 2 U g^{-1} . Além disso, a temperatura máxima atingida no melhor regime foi de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ que é a temperatura máxima que o micro-organismo utilizado suporta sem danos à produção de pectinases.

Os resultados deste trabalho também confirmam a sugestão de Schutyser *et al.* (2003), que não foi investigada experimentalmente, de que um único evento de agitação preventivo poderia não ser suficiente: no presente trabalho, ao aplicar um único evento de agitação em 10 h de cultivo (MIX-1₂₆), ocorreram problemas de aglomeração do substrato e subsequente formação de caminhos preferenciais de fluxo de ar ao final do cultivo, com baixa uniformidade nos níveis de atividade pectinolítica do leito em 26 h (que variou de 17 a 25 U g^{-1} , ver FIGURA 19a).

8 PROPOSTAS FUTURAS

Embora este trabalho mostre que eventos de agitação intermitente contribuem para reduzir os gradientes de temperatura e promovem a uniformidade da produção de pectinases através do leito de FES em escala piloto, ainda existem lacunas para a produção de pectinases por FES em escala industrial.

A elaboração de um modelo matemático realista, capaz de descrever os fenômenos de transferência de massa e calor pode ser uma ferramenta eficaz para guiar a ampliação de escala em FES para várias toneladas de substrato. Esse modelo deve fornecer informações úteis sobre a operação e o projeto de um biorreator industrial, além de mostrar as variáveis operacionais que devem ser manipuladas para atingir as condições ótimas para o processo (MITCHELL, VON MEIEN e KRIEGER, 2003). Já existem modelos matemáticos, porém, são modelos teóricos sem validação experimental ou são muito restritos em termos de transferência de massa e de calor e do micro-organismo utilizado (WEBER, TRAMPER e RINZEMA, 1999; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ e PÉREZ-CORREA, 2007; VON MEIEN e MITCHELL, 2002; CASCIATORI et al., 2016).

Além disso, é necessário realizar um estudo sobre a viabilidade econômica do processo, a fim de implantar a produção de pectinases por FES no processo de uma biorrefinaria de polpa cítrica.

REFERÊNCIAS

AXELOS, M. A. V.; THIBAUT, J. F. Influence of the substituents of the carboxyl groups and of the rhamnose content on the solution properties and flexibility of pectins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, n. 2, p.77-82, 1991.

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.

BASAK, M. K.; GANGULY, P. K.; BHADURI, S. K.; SARKAR, S. Industrial production of *Penicillium corylophilum* on rice husk and its application in jute processing. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 70-73, 2003.

BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzymology**, v.1, p. 149-157, 1955.

BIZ, A.; FARIAS, F. C.; MOTTER, F. A.; PAULA, D. H.; RICHARD, P.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Pectinase activity determination: an early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works!. **PLoS One** **9**, e109529, 2014.

BIZ, A.; FINKLER, A. T. J.; PITOL, L. O.; MEDINA, B. S.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation on a mixture of citrus waste and sugarcane bagasse in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 54-62, 2016.

BLAKE, J. D.; RICHARDS, G. N. Problems of lactonisation in the analysis of uronic acids. **Carbohydrate Research**, v. 8, p. 275-281, 1968.

BOMGARDNER, M. M. Pushing pectin. **Chemical & Engineering News**, v. 91, p. 20, 2013. Disponível em: <http://cen.acs.org/articles/91/i29/Pushing-Pectin.html>. Acesso em: 28/01/2016.

CASCIATORI, F.P., BÜCK, A., THOMÉO, J.C., TSOTSAS, E. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 103-116, 2016.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. D. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CHEN, H-Z.; XU, J.; LI, Z-H. Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 117-122, 2005

CIRIMINNA, R.; CHAVARRÍA-HERNÁNDEZ, N.; HERNÁNDEZ, A. I. R.; PAGLIARO, M. Pectin: a new perspective from the biorefinery standpoint. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**, v. 9, p. 368-377, 2015.

CitrusBr–Press Release: Estoques globais de suco de laranja brasileiro em 30 de junho de 2015. Disponível em: <http://www.citrusbr.com/pressreleases/?id=311573>. Acesso em: 19/02/2016.

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.

DE REU, J. C.; ZWIETERING, M. H.; ROMBOUTS, F. M.; NOUT, M. J. R. Temperature control in solid substrate fermentation through discontinuous rotation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 261-265, 1993.

DURAND, A., CHEREAU, D. A new pilot reactor for solid-state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 476-486, 1987.

FARIAS F. C. Caracterização da degradação enzimática de resíduos pécticos. Universidade Federal do Paraná, Paraná, Curitiba, 2014.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M., PÉREZ-CORREA, J. R. Realistic model of a solid substrate fermentation packed-bed pilot bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 224-234, 2007.

GASSARA, F.; AJILA, C. M.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D.; VERMA, M.; VALERO, J. Influence of aeration and agitation modes on solid-state fermentation of apple pomace waste by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ligninolytic enzymes and co-extract polyphenols. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 2119-2126, 2013.

GHILDYAL, N. P.; GOWTHAMAN, M. K.; RAGHAVA RAO, K. S. M. S.; KARANTH, N. G.; Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: effect of temperature gradients. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 253-257, 1994.

GROHMANN, 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.

HAN, B.; KIERS, J. L.; NOUT, R. M. J. Solid-substrate fermentation of soybeans with *Rhizopus* spp.: comparison of discontinuous rotation with stationary bed fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 205-209, 1999.

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.

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.

KUIVANEN, J.; PENTILÄ, M.; RICHARD, P. Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. **Microbial Cell Factories**, v.14, n. 2, p. 2-9, 2015.

LOHRASBI, M.; POURBAFRANI, C.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Process design and economic analysis of a citrus waste biorefinery with biofuels and limonene as products. **Bioresource Technology**, v. 101, p.7382-7388, 2010.

LONSANE, B. K.; GHILDYAL, N. P.; BUDIATMAN, S.; RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.7, n.6, p. 258-265, 1985.

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.

MFRURAL – Alimentos para nutrição animal: polpa cítrica. Disponível em: <http://www.mfrural.com.br/produtos.aspx?categoria2=182&nmoca=alimentos-para-nutricao-animal-polpa-citrica>. Acesso em: 19/02/2016.

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

MITCHELL, D. A.; LUZ, L. F. L.; KRIEGER, N.; BEROVIČ, M. Bioreactors for solid-state fermentation, in: M. Moo-Young (Ed.), **Comprehensive Biotechnology: Engineering Fundamentals of Biotechnology**. Academic Press–Elsevier, Massachusetts, p. 347-360, 2011.

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., 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.

MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 266-277, 2008.

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

NAGEL, F-J. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 2, p. 219-230, 2001.

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.

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, p. 9-18, 2009.

PÉREZ, S.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; DOCO, T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. **Biochimie**, v. 85, p. 109-121, 2003.

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.

PITOL, L. O. Ampliação de escala da produção de pectinases em fermentação no estado sólido. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

PITOL, L. O.; BIZ, A.; MALLMANN, E.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. Production of pectinases by solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 1009-1018, 2016.

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

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.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno Pedagógico, Lajeado**, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. J. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SCHUTYSER, M. A. I.; PAGTER, P.; WEBER, F. J.; BRIELS, W. J.; BOOM, R. M.; RINZEMA, A. Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*: experiments and modeling. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 5, p. 503-513, 2003.

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.

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.

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, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química 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, n. 4, p. 416-428, 2002.

WEBER, F. J., TRAMPER, J., RINZEMA, A. A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minitans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, p. 447-458, 1999.

WERPY, T.; PETERSEN, G. Top value added chemicals from biomass - volume I: results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas (EERE, 2004).

Disponível em: <http://www.ascension-publishing.com/BIZ/HD49.pdf>. Acesso em: 22/02/2016.

YANG, X.; HUANG, T.; TSAO, G. T. Pressure pulsation in solid-phase fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 599-610, 2002.

YAPO, B. M.; LEROUGE, P.; THIBAUT, J. F.; RALET, M. C. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 426-435, 2007.